

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Parâmetros metabólicos e reprodutivos de fêmeas suínas pré-púberes após
suplementação da dieta com ácidos graxos poli-insaturados**

Marina Vianna Otte

Pelotas, 2017

Marina Vianna Otte

**Parâmetros metabólicos e reprodutivos de fêmeas suínas pré-púberes após
suplementação da dieta com ácidos graxos poli-insaturados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Thomaz Lucia Junior

Coorientador: Dr. Ivan Bianchi

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O89p Otte, Marina Vianna

Parâmetros metabólicos e reprodutivos de fêmeas suínas pré-púberes após suplementação da dieta com ácidos graxos poli-insaturados. / Marina Vianna Otte ; Thomaz Lucia Junior, orientador ; Ivan Bianchi, coorientador. — Pelotas, 2017.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Ômega-3. 2. Expressão gênica. 3. Imuno-histoquímica. 4. Conversão alimentar. 5. Leitoas. I. Lucia Junior, Thomaz, orient. II. Bianchi, Ivan, coorient. III. Título.

CDD : 636.4

Marina Vianna Otte

Parâmetros metabólicos e reprodutivos de fêmeas suínas pré-púberes após
suplementação da dieta com ácidos graxos poli-insaturados

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador)
PhD em Medicina Veterinária pela University of Minnesota

Dra. Karina Lemos Goularte
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Monique Tomazele Rovani
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Félix Hilario Diaz González
Doutor em Bioquímica Animal pela Universidade Federal de Viçosa

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos alcançadas, oportunidades e conquistas, pelas pessoas especiais que foram colocadas em meu caminho e pela sabedoria nas horas mais necessárias.

Aos meus pais, Armando e Célia, pelo exemplo de vida, por todo o amor e apoio dedicado. A minha irmã, Laura, que mesmo distante se fez sempre presente. Aos meus tios, Jorge e Regina, que me acolheram no seu lar e tornaram meus dias mais felizes. Muito obrigada a toda minha família pela oportunidade de seguir com esta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior, por ter aceitado o desafio da orientação e possibilitar que eu conclua essa etapa da minha vida.

Aos coorientadores que tive nesta jornada, Bernardo Gasperin, Fabiana Moreira e Ivan Bianchi, agradeço pelas oportunidades e orientação, pelos esclarecimentos, pelo apoio, pelos conselhos e instruções, pela disponibilidade, pelo companheirismo e paciência, por todos os momentos de alegria que passamos juntos e também pela amizade construída.

Aos professores e colegas do ReproPel, onde fiz grandes amigos, agradeço por todo o apoio e companheirismo durante o mestrado, sempre dispostos a me auxiliar, especialmente a Karina, Monike, Veronica, Andréia, Sara, Carine, Serginho, Henrique, Diego, Norton e Jorge. Vocês alegraram meus dias e me incentivaram a chegar ao fim dessa fase, sempre presentes com um mate amargo, um ombro amigo ou uma piada engraçada.

Aos professores e colegas do NEPPA, em especial a Camila, a Beth e ao Juahil, que cederam seu tempo para contribuição na realização deste estudo e me acolheram durante a realização do experimento. A todos os alunos da graduação e do técnico que me ajudaram e me ensinaram muitas coisas, em especial a Julia e a Mayara, que fizeram da casa delas a nossa casa, a Sarah, Kebb e Raquel, que se tornaram grandes amigas.

Aos órgãos de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) pela concessão da bolsa de estudos, e a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na construção de mais uma etapa, o meu muito obrigada.

Resumo

OTTE, Marina Vianna. **Parâmetros metabólicos e reprodutivos de fêmeas suínas pré-púberes após suplementação da dieta com ácidos graxos poli-insaturados.** 2017.43f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O uso de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ômega-3 na dieta de animais tem demonstrado benefícios, porém existem poucos estudos em leitoas evidenciando os potenciais efeitos da inclusão deste suplemento na alimentação. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com ômega-3 fonte de ácido docosahexaenóico (DHA) em leitoas recém desmamadas. Dezesesseis fêmeas suínas foram divididas em dois grupos: controle, que recebeu apenas a dieta adequada à idade; e o grupo ômega-3, no qual recebeu a adição de DHA misturado à ração (3,5 g animal/dia). A suplementação ocorreu por 52 dias. Após este período, os animais foram abatidos. Os ovários foram coletados, para posterior avaliação através de expressão de RNA e imuno-histoquímica. Foram realizadas três coletas de sangue por fêmea, antes e durante a suplementação, para avaliação dos seguintes indicadores metabólicos: triglicérides, colesterol total, lipoproteínas de baixa (LDL-colesterol) e de alta densidade (HDL-colesterol), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transpeptidase (GGT) e estradiol. As leitoas foram pesadas semanalmente durante o experimento. Também foi realizado o controle do consumo diário de alimento por 17 dias, enquanto os animais estavam em gaiolas individuais, a fim de calcular a conversão alimentar. O consumo diário de ração foi menor no grupo ômega-3, que também apresentou melhor conversão alimentar ($P < 0,05$), ainda que o ganho de peso não tenha diferido entre os grupos ($P > 0,05$). Os níveis plasmáticos de colesterol total foram inferiores nas leitoas que receberam DHA ($P < 0,05$), enquanto que os animais de ambos os grupos apresentaram uma redução nos níveis de HDL-colesterol na última coleta, correspondente ao D52 ($P < 0,05$). A suplementação resultou em menor imunomarcagem para leptina e seu receptor (ObRb) no citoplasma de ovócitos inclusos em folículos primários ($P < 0,05$), além de menor expressão gênica das enzimas desmolase, aromatase e receptor de hormônio luteinizante ($P < 0,05$) obtidas das células foliculares. A inclusão de ômega-3 como uma fonte de DHA na dieta de leitoas pré-púberes resultou em melhor desempenho zootécnico dos animais, no entanto houve uma redução de alguns parâmetros reprodutivos avaliados.

Palavras-chave: ômega-3; expressão gênica; imuno-histoquímica; conversão alimentar; leitoas

Abstract

OTTE, Marina Vianna. **Metabolic and reproductive parameters in prepubertal sows after dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids**. 2017. 43f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The use of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the diet of animals has shown benefits, but there are few studies in sows demonstrating the potential effects of adding this supplement to the diet. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementing with omega-3 source of docosahexaenoic acid (DHA) to female swine after weaning. Sixteen females were allocated to two groups: control, which received only the diet recommended for their age; and the omega-3 group, which received 3.5 g DHA per animal per day, mixed to the diet. The supplementation lasted 52 days. After that period, females were slaughtered and their ovaries were collected, to be evaluated through RNA expression and immunohistochemistry. Three blood samples per female were collected, before and during supplementation, to evaluate the following metabolic indicators: triglycerides, total cholesterol, low (LDL-cholesterol) and high density lipoproteins (HDL-cholesterol), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transpeptidase (GGT) and estradiol. The females were weighed weekly and their daily feed intake was recorded during 17 days, while they were housed in individual cages, to calculate feed conversion. Females in the omega-3 group presented lower daily feed intake and better feed conversion compared to control females ($P < 0.05$), although weight gain did not differ between groups ($P > 0.05$). Total cholesterol plasma levels were lower in females receiving DHA ($P < 0.05$), while animals in both the groups presented reduced HDL-cholesterol levels at the last collection, corresponding at D52 ($P < 0.05$). Supplemented females presented lower immunolabeling for leptin and its receptor (ObRb) in the cytoplasm of oocytes included in primary follicles ($P < 0.05$), and lower gene expression for the enzymes desmolase, aromatase and luteinizing hormone receptor ($P < 0.05$) obtained from follicular cells. The inclusion of omega-3 as a source of DHA in the diet of prepubertal sows resulted in better the zootechnical performance of the animals, however there was a reduction of some reproductive parameters evaluated.

Keywords: omega-3; gene expression; immunohistochemistry; feed conversion; gilts

Lista de Figuras

Figura 1	Peso corporal de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	22
Figura 2	Níveis séricos de colesterol total em fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	24
Figura 3	Níveis séricos de HDL-colesterol em fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	24
Figura 4	Imunomarcacão para leptina (Ob) e seu receptor (ObRb) em ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle (esquerda) e com adição de ômega-3 na dieta (direita).....	25
Figura 5	Expressão gênica RNAm das células foliculares e níveis séricos de estradiol de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	27

Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequência de <i>primers</i> utilizados para PCR em tempo real	21
Tabela 2 Desempenho zootécnico de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	23
Tabela 3 Parâmetros metabólicos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.....	23
Tabela 4 Intensidade da imunomarcação (média dos valores da moda) para leptina e seu receptor (ObRb) no citoplasma e no núcleo de ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta (0: maior intensidade; 255: sem coloração).....	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

ARA	Ácido α -linolênico
CA	Conversão alimentar
CMDR	Consumo médio diário de ração
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
GMDP	Ganho médio diário de peso
IFC	Instituto Federal Catarinense
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LH	Hormônio luteinizante
MG	Minas Gerais
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
OIFP	Ovócito incluído em folículo primário
OIFS	Ovócito incluído em folículo secundário
OIFT	Ovócito incluído em folículo terciário
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Metodologia.....	16
2.1 Animais e dietas.....	16
2.2 Desempenho zootécnico.....	17
2.3 Dosagens bioquímicas e hormonais.....	18
2.4 Imuno-histoquímica.....	18
2.5 Extração de RNA, transcrição reversa, PCR em tempo real.....	20
2.6 Análise estatística.....	21
3 Resultados.....	22
4 Discussão.....	28
5 Conclusão.....	32
Referências.....	33
Anexos.....	42

1 Introdução

O Brasil atualmente é um dos maiores produtores e exportadores de carne suína no mundo, contando com um plantel de cerca de 2,1 milhões de matrizes industriais distribuídas em granjas por todo o país, que se concentram nos estados de SC, PR e RS (ABPA, 2016). Dentre os fatores que influenciam a rentabilidade de um sistema industrial de suínos, a eficiência reprodutiva é determinante para a produtividade de uma granja, sendo representada pelo número de leitões desmamados por fêmea ao ano (DIAL et al., 1992). A prolificidade das fêmeas é influenciada pela eficiência com que leitoas iniciam a vida reprodutiva. No Brasil, a idade média das leitoas no momento da primeira cobertura foi de 234,3 dias em 2015, segundo a AGRINESS (2015). Portanto, condições nutricionais adequadas para estas fêmeas, ainda durante a fase de crescimento, poderão resultar em maior precocidade reprodutiva e maiores taxas de ovulação nos seus ciclos reprodutivos iniciais (AHERNE & WILLIAMS, 1992).

A conversão alimentar pode influenciar o início da vida reprodutiva de matrizes, uma vez que a idade média à primeira cobertura pode variar de acordo com a condição nutricional dos animais e possui um efeito significativo sobre a produtividade da matriz ao longo de toda a sua vida reprodutiva (ZANGERONIMO et al., 2013). Para garantir que a nutrição durante a fase de crescimento das leitoas não prejudique seu ingresso na vida reprodutiva, as fêmeas devem ser alimentadas *ad libitum* até o momento do acasalamento, com uma dieta contendo 16% de proteína (AHERNE & WILLIAMS, 1992).

Na interação entre nutrição e função reprodutiva, o uso de suplementos na dieta de fêmeas suínas vem sendo cada vez mais estudado, visando ganhos na produtividade, como o aumento no número de leitões nascidos e a redução no intervalo desmame-estro (WU et al, 2009), melhorias nas taxas de conversão alimentar e no ganho de peso dos leitões (KLUGE et al, 2006). Desta forma, seria possível maximizar a eficiência no uso de alimentos e minimizar os custos de produção, além de gerar economia em termos ambientais, por não aumentar o número de fêmeas alojadas na granja.

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) têm demonstrado uma série de benefícios na saúde humana e animal. Dentre estes benefícios, destacam-se: ação antiinflamatória e antitrombótica; redução dos lipídeos do sangue; regulação hormonal; regulação da resposta imunológica; e propriedades vasodilatadoras (CALDER & YAQOOB, 2009). Em humanos, alguns efeitos benéficos conhecidos são a prevenção de doenças cardíacas e a redução de condições como hipertensão, diabetes tipo 2 e artrite reumatóide, entre outras (CALDER & YAQOOB, 2009). O uso de PUFA como suplemento na dieta de fêmeas suínas vem sendo testado com o objetivo de melhorar a nutrição dos animais e incrementar seu potencial reprodutivo através de um maior número de leitões desmamados por fêmea ao ano (TANGHE & DE SMET, 2013).

Os PUFA podem ser da série n-3 (ômega-3) ou n-6 (ômega-6), conforme a posição da primeira dupla ligação em relação à extremidade metil terminal. Os PUFA mais importantes da série n-3 são os ácidos eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA) e docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA). Ambos têm como precursor o ácido α -linolênico (C18:3n-3, ALA), que é um ácido graxo essencial, pois precisa ser obtido estritamente através da dieta (KURLAK & STEPHENSON, 1999). O DHA possui importante função estrutural na constituição da dupla camada de fosfolipídeos nas membranas celulares e está presente em elevadas concentrações no cérebro e na retina (STILLWELL & WASSALL, 2003). O EPA é essencial para o sistema imunológico por ser um precursor de antiinflamatórios eicosanóides, além de inibir a produção de eicosanóides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico (CALDER, 2009).

Os PUFA podem ser obtidos de diversas fontes, tais como plantas (por exemplo, girassol e linhaça), peixes e algas marinhas. Contudo, as plantas possuem uma bioconversão ineficiente de ALA para EPA e a produção de DHA é quase ausente (DOUGHMAN et al., 2007). O óleo de peixe apresenta níveis elevados de EPA e DHA, mas pode ser considerado como um recurso não sustentável, visto que algumas populações de peixes marinhos selvagens vêm se esgotando (LORENZEN, 2005). Já certas microalgas heterotróficas produzem altos níveis de EPA e DHA e podem ser reproduzidas em laboratório, além de apresentarem estabilidade dos níveis nutricionais, se constituindo em uma alternativa sustentável (DOUGHMAN et al., 2007).

Há várias evidências que PUFA n-3 desempenham um papel positivo quando fornecidos através da dieta, em especial durante a gestação e a lactação. Após a suplementação com ômega-3 em fêmeas suínas, foi verificado aumento da concentração de DHA no sangue e em alguns tecidos (SMIT et al., 2013). Os PUFA podem ser incorporados aos tecidos embrionários (BRAZLE et al., 2009), modulando os meios de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de hormônios esteróides e no estresse oxidativo (JUMP, 2008). Assim, pode ocorrer alteração na composição do conteúdo de ácidos graxos em ovócitos suínos, nos quais os PUFA representam uma porção significativa da sua constituição (HOMA et al., 1986) e também no fluido folicular em leitoas (WARZYCH et al., 2011). Em fêmeas bovinas, após suplementação com PUFA, folículos pré-ovulatórios apresentaram maior diâmetro e elevada concentração de hormônios esteróides no fluido folicular, assim como maior expressão de RNA da enzima P450 aromatase nas células da granulosa, a qual é responsável pela produção de estrógenos (ZACHUT et al., 2008). Estes eventos podem resultar em maior competência ovocitária, conforme relatado em camundongos (WAKEFIELD et al., 2008).

Foram demonstrados efeitos positivos sobre o desenvolvimento embrionário, como relatado *in vitro*, para vacas e ovelhas (GULLIVER et al., 2012) e para suínos (BRAZLE et al.; 2009). Como os PUFA atuam como precursores na síntese de prostaglandinas e podem modular a expressão de várias enzimas envolvidas na função reprodutiva (WATHES et al., 2007), houve redução na secreção de prostaglandinas pelo endométrio, o que prolonga a vida útil dos corpos lúteos (LEROY et al., 2008). De tal forma ocorre um incremento na taxa de sobrevivência embrionária, resultando em aumento no número de leitões nascidos (SMITS et al.; 2011; TANGHE et al.; 2014). Assim como os níveis séricos de ácidos graxos em leitões também foram aumentados (FRITSCHÉ et al., 1993), os PUFA também exercem função importante para o crescimento e o desenvolvimento fetal (INNIS, 1991). Suplementação com dietas ricas em PUFA n-3 também foram associadas com baixa concentração plasmática de triglicerídeos em camundongos e humanos (HARRIS & BULCHANDANI, 2006) e de colesterol em suínos (MOREIRA et al., 2016), o que pode estar associado a redução da síntese de hormônios esteróides, como progesterona e estradiol, cujo precursor é o colesterol (STAPLES et al., 1998).

Outro marcador metabólico que pode ser influenciado pela inclusão de PUFA na dieta é a leptina (CHA & JONES, 1998), a qual está positivamente correlacionada com aumento nos níveis plasmáticos de IGF-1, LH, progesterona, estradiol e de estradiol intrafolicular em leitoas, podendo ser associada com melhor qualidade oocitária (FERGUSON et al., 2003). A leptina e seu receptor de cadeia longa (ObRb) foram identificados no hipotálamo de fetos, leitoas pré-púberes, fêmeas cíclicas e porcas gestantes (LIN et al., 2001), atuando como um fator permissivo que sinaliza o estado nutricional para a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ZIEBA et al., 2005). A leptina pode agir de maneira endócrina ou parácrina nas gônadas, devido à presença de receptores na superfície de células foliculares, incluindo teca e granulosa (KARLSSON et al., 1997). A medida que as leitoas se aproximam da puberdade, seus níveis circulantes de leptina aumentam (QIAN et al., 1999) e a imunomarcação para ObRb no hipotálamo se torna mais intensa (MOREIRA et al., 2014).

O início da vida reprodutiva de fêmeas suínas está positivamente associada à sua condição corporal e o seu estado nutricional afeta tanto a idade na qual atingirão a puberdade, como a sua taxa de ovulação durante os primeiros ciclos estrais (PENZ et al., 2009). Portanto, a suplementação com dietas incluindo PUFA pode aumentar suas reservas de gordura e o seu peso corporal (AMARAL et al., 2010), com potenciais efeitos sobre o início da puberdade (ZIEBA et al., 2005; MOREIRA et al., 2016).

Tem sido observado que a nutrição afeta a foliculogênese e os componentes do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (PRUNIER & QUESNEL, 2000a,b). Os estudos sobre a foliculogênese e a ovulação são importantes para a maximização da eficiência das biotécnicas aplicadas, assim como o controle do desenvolvimento folicular e das taxas de ovulação, através de um melhor conhecimento dos eventos bioquímicos e ambientais (DOWNEY et al., 1998; PORTER et al., 2000). Os mecanismos pelos quais os PUFA afetam a expressão gênica são complexos e envolvem múltiplos processos, considerando que a função folicular ovariana é regulada através de mecanismos autócrinos e parácrinos, influenciados por uma regulação endócrina de hormônios gonadotróficos e somatotróficos (MARTINS et al., 2008).

A esteroidogênese é um evento que envolve uma série de enzimas e hormônios expressos em células da teca e da granulosa durante diversas fases do ciclo estral (OLIVEIRA et al., 2011). As enzimas esteroidogênicas necessárias para a síntese de hormônios esteróides sexuais são responsáveis pela conversão de moléculas de colesterol em pregnenolona, que após é convertida em progestágenos, transformada em andrógenos (androstenediona e testosterona), e finalmente convertidos em estrógenos (GAUCHER et al., 2004; MILLER et al., 2009; NAKAMURA, 2010). A enzima desmolase (CYP11A1) é responsável pela clivagem das cadeias laterais do colesterol para sua conversão em pregnenolona, estando envolvida em uma das primeiras etapas do processo de síntese de esteróides, enquanto a aromatase (CYP19A1) é responsável pela conversão de androstenediona em estrógeno nas células da granulosa (LAVOIE & KING, 2009). Neste processo também estão envolvidos genes receptores de hormônios que atuam em diversos momentos do ciclo reprodutivo, como receptor de hormônio folículo estimulante (FSHR), receptor de hormônio luteinizante (LHCGR), receptor de andrógenos (AR) e receptor de progesterona (PGR) (KOHEK & LATRONICO, 2001).

O FSH é uma gonadotrofina produzida pela hipófise que estimula o desenvolvimento, crescimento e maturação folicular, além da secreção de estrógenos pelas gônadas (ovário e testículo), enquanto o LH, também produzido pela hipófise, estimula a ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo (ROOS, 2013). Os andrógenos são hormônios predominantemente masculinos que nas fêmeas são provenientes das células da teca e servem como um substrato para a secreção de estradiol pela granulosa a partir de estímulo do FSH (GREGORASZCZUK et al., 2000). A progesterona é produzida pelo corpo lúteo e também pela placenta, possuindo como função principal a manutenção da gestação (ROOS, 2013).

Embora existam estudos sobre a suplementação com PUFA n-3 na dieta de fêmeas suínas, não há dados elucidando o seu potencial efeito no desempenho zootécnico e reprodutivo em animais durante o crescimento. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de uma dieta contendo ômega-3 como fonte de DHA extraída de microalgas heterotróficas, sobre parâmetros metabólicos, zootécnicos e reprodutivos em leitões desmamados.

2 Metodologia

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Araquari (protocolo nº 0128/2016).

2.1 Animais e dietas

O experimento foi desenvolvido nos meses de abril e maio de 2016 na Unidade de Ensino e Aprendizagem em Suinocultura da Escola Fazenda do IFC, localizada na região sul do Brasil (latitude 26°23'35.6"s, longitude 48°44'31.9"o). Fêmeas suínas pré-púberes cruzadas Landrace x Large White foram usadas como modelos experimentais (n = 16). Logo após o desmame, em torno de 36 dias de idade ($35,5 \pm 1,6$), as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos (n = 8, cada). O grupo controle recebeu as dietas convencionalmente usadas em cada fase de creche e crescimento. No grupo ômega-3, foi adicionado à dieta um suplemento comercial contendo 50% de extrato etéreo, 1,26% de lisina e 14% de DHA extraído de microalgas heterotróficas da espécie *Schizochytrium sp.* (*All-G-Rich*[®], Alltech, Araucária, PR, Brasil). Ao longo do período de suplementação (52 dias), as dietas dos grupos foram isoenergéticas e isoprotéicas e ofertadas *ad libitum*. A água foi fornecida através de bebedouro tipo chupeta. Uma das fêmeas do grupo suplementado veio a óbito antes do fim do experimento, por razão não relacionada ao estudo.

Foi feita a troca da ração pré-inicial para a ração inicial I quando os animais possuíam cerca de 60 dias de idade. A ração pré-inicial continha: 19% de proteína bruta; 2,5% de extrato etéreo; 0,4% de lisina; e 3230 Kcal/kg de energia metabolizável, enquanto a ração inicial I continha: 18% de proteína bruta; 6% de extrato etéreo; 1,15% de lisina; e 3350 Kcal/kg de energia metabolizável.

Durante os primeiros 4 dias de suplementação, cada grupo foi alojado separadamente em duas baias coletivas com piso de concreto, para adaptação à dieta. Para ambos os grupos, foram fornecidos 25 g da dieta com ração pré-inicial.

As dietas foram fornecidas individualmente para cada animal, uma vez ao dia, umedecida com água por via oral, com uso de seringas descartáveis de 10 ml. Após este período, as fêmeas foram transferidas para gaiolas metabólicas individuais de tamanho ajustável, com sistema de coleta de fezes e urina, nas quais permaneceram por 17 dias a fim de ser feito o controle da ingestão diária de alimento. Posteriormente (no 21° do experimento), cada grupo foi colocado em uma baia coletiva, com piso plástico vazado, na qual permaneceram por mais 31 dias. Em ambas instalações, as fêmeas receberam 100 g da dieta, uma vez ao dia, no período da manhã. No grupo suplementado, 25 g do suplemento foram incorporados a 75 g da ração, no momento da sua elaboração e mistura. Cada 1 g de suplemento continha 0,14 g de PUFA ômega-3 do tipo DHA. Portanto, cada leitoa foi suplementada com 3,5 g de DHA por dia, de acordo com estudos que relataram resultados positivos com dosagens semelhantes (MATEO et al, 2009; SMITS et al, 2011; MOREIRA et al, 2016). As leitoas foram pesadas semanalmente durante o experimento (nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49).

O abate ocorreu quando as fêmeas possuíam em torno de 88 dias de idade ($87,5 \pm 1,6$), em um frigorífico comercial, quando foram coletados ambos os ovários de todas as fêmeas. No momento da coleta, os ovários foram classificados quanto a presença ou ausência de folículos. Para cada fêmea, um dos ovários foi acondicionado inteiro em formol para posterior análise de imuno-histoquímica (IHQ), enquanto o outro ovário teve seus folículos aspirados e o líquido folicular obtido foi centrifugado a 1000 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foliculares foi armazenado em nitrogênio líquido, para posterior avaliação da expressão gênica de alguns enzimas esteroideogênicas.

2.2 Desempenho zootécnico

Os dados de consumo médio diário de ração (CMDR) foram obtidos por meio de pesagens das rações fornecidas aos animais, dividido pelo número de dias do período. Os valores de ganho médio diário de peso (GMDP) foram determinados por diferença entre as pesagens dos animais no início e final do período. Os dados de conversão alimentar (CA) foram calculados a partir da relação entre os dados de CMDR e GMDP para cada animal no período em que estavam nas gaiolas metabólicas individuais (17 dias).

2.3 Dosagens bioquímicas e hormonais

As amostras de sangue foram obtidas a partir de punção da veia jugular com seringas de 10 mL e agulhas calibre 40 x 1,2 mm, sempre no período da manhã. As amostras foram coletadas em 3 momentos: antes do início da suplementação (D0), 21 dias após o início da suplementação (D21) e no dia anterior ao abate (D52). O sangue foi transferido para tubos tipo vacutainer com ativador de coágulo, sendo centrifugado a 2500 g durante 10 min para obtenção do soro, que foi posteriormente transferido para criotubos e armazenados em freezer a -20°C. Os níveis de triglicerídeos (catálogo nº 87-2/100: Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG), de colesterol total (catálogo nº 11539: BioSystems, Curitiba, PR) e de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol) (catálogo nº 100-250/080: VIDA Biotecnologia, Belo Horizonte, MG) foram quantificados através de ensaio enzimático convencional. Os níveis de colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) foram obtidos de acordo com a equação de Friedewald et al. (1972). As dosagens de estradiol foram realizadas através da técnica de eletroquimioluminescência (Siemens 06601811 Immulite Estradiol LKE21: Siemens Healthcare Diagnósticos Ltda, São Paulo, SP), os níveis de aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados através de cinética UV (catálogo nº 109-2/100: Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) e os níveis de gama glutamil transpeptidase (GGT) através de cinética-colorimétrica (catálogo nº 105-2/50: Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG). Os resultados dos níveis de estradiol são referentes apenas à terceira coleta (D52) devido à sensibilidade do teste que possui como limite mínimo 11,8 pg/ml. Todas as análises foram realizadas em laboratório comercial, seguindo as instruções do fabricante de cada ensaio.

2.4 Imuno-histoquímica

Inicialmente, as amostras de ovário foram acondicionadas em solução de formol tamponado 10% por 24 h. Posteriormente, foi realizada a desidratação do tecido com álcool, a clarificação com xilol e a inclusão em parafina. As amostras foram cortadas com 3 µm de espessura e fixadas em lâminas com organossilano 3% (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, EUA) em etanol. Para o teste de IHQ, os tecidos foram desparafinados em estufa a 37°C por 30 min, clarificados com xilol e hidratados com álcool graduado. O anticorpo primário policlonal (Santa Cruz

Biotechnology Santa Cruz, CA, USA) usado foi: anti-leptina [Ob anticorpo; A-20, sc-842-coelho (IgG)], diluído 1:1000; e anti-ObRb [pAb M-18-cabra (IgG)], diluído 1:100.

Os anticorpos primários foram diluídos em albumina sérica bovina (BSA) 1,5%. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de bloqueio de peróxido de hidrogênio (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), e a recuperação antigênica foi feita em calor úmido a 121°C durante 3 min após o ponto de ebulição em solução de citrato pH 6.0. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com o kit de bloqueio de proteína (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). Foi feita a incubação das lâminas por 12 h com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C. Após, as lâminas com anti-Ob e anti-ObRb foram incubadas com os anticorpos secundários biotinizados, estravidina-biotina-peroxidase (LSAB *antileptin antibodies* kit: Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), e kit Histofine® (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan), respectivamente. O cromógeno utilizado foi 3.3' diaminobenzidina (DAB-K3468: Dako Corporation), incubado por 1 min e 15 s em temperatura ambiente, contrastado com hematoxilina aquosa por 45 s e montados com lamínula e resina sintética (Sigma Chemical Company®). As imagens foram capturadas com câmera digital acoplada a um microscópio (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan) usando a objetiva de 40X, com o auxílio do programa Motic Images Plus 2.0. A quantificação de coloração de proteínas foi realizada por um software de análise de imagens (Image J®) e o valor mais comum (moda) de cada área (ovócito) foi registrado através do aplicativo de histograma de 32 bits, utilizando uma escala que varia de 0, referente a maior intensidade de coloração, a 255, sem coloração (MOREIRA et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2014). Os valores de coloração do citoplasma e do núcleo foram analisados separadamente. Os ovócitos foram classificados em: inclusos em folículos primordiais/primários (OIFP) quando eram rodeados por uma camada de células da granulosa planas a cubóides; inclusos em folículos secundários (OIFS), quando rodeados por duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides; ou inclusos em folículos terciários (OIFT), quando cercados por várias camadas de células da granulosa e com formação de antro (Silva et al., 2011). Foram usados apenas folículos contendo ovócitos com clara visibilidade do citoplasma e núcleo, por isso os dados de OIFT foram descartados. As análises do anticorpo de leptina consideraram 110 OIFP e 90 OIFS para citoplasma e o mesmo valor para o núcleo, enquanto as análises do anticorpo ObRb consideraram 96 OIFP e 75 OIFS para citoplasma e o mesmo valor para o núcleo.

2.5 Extração de RNA, transcrição reversa, PCR em tempo real

Para a extração do RNA total das células foliculares foi utilizado o protocolo baseado em Trizol (Quick-Zol, Ludwig Biotec Ltda., Alvorada, RS, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, adicionados 1 ml de trizol para cada 100 mg de tecido e submetidas a homogeneização com agulha e seringa, sendo após colocadas no vórtex por 30 s. Então foram deixadas em repouso por 5 min em temperatura ambiente, adicionados 0,2 ml de clorofórmio e misturados por 15 s no vórtex, ficando incubadas por 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro eppendorf, no qual foi adicionado 0,5 ml de isopropanol, homogeneizado por inversão e deixado em repouso por 10 min em temperatura ambiente. Após, foram novamente centrifugadas (2000 g por 10 min a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 ml de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA dissolvido em 0,025 ml de água livre de RNase. A quantificação do RNA extraído foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop- Thermo Scientific - Waltham, USA; Abs 260/280 nm ratio). A pureza do RNA foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, de forma que não foram utilizados valores inferiores a 1,8. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 5 min para digerir qualquer DNA genômico contaminante. Após a inativação da DNase a 65°C por 10 min, a reação de transcrição reversa foi realizada com o kit iScript™ cDNA Synthesis (BioRad Hercules, CA), conforme instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, Hercules, CA) utilizando SsoFast™ EvaGreen® supermix (BioRad, Hercules, CA) e *primers* específicos para suínos (Tabela 1). De modo a otimizar a análise de expressão gênica, diluições em séries com os RNAs de todas as amostras foram utilizadas para gerar uma curva padrão. Esta última foi construída através da representação gráfica do logaritmo da quantidade de partida do fator de diluição em relação ao valor de *Ct* obtidos durante a amplificação de cada diluição. As reações com um coeficiente de determinação (R^2) > 0,98 e eficiência entre 95-105% foram consideradas otimizadas. O método da curva padrão relativa foi utilizado para avaliar a quantidade de um transcrito particular, em cada amostra (CIKOS et al., 2007).

As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em relação aos valores médios de *Ct* para *GAPDH* e *RPL19* como controles internos.

Tabela 1- Sequência de *primers* utilizados para PCR em tempo real

Genes	Primers	Nomenclatura
pCYP11A1 F	TGCAATTGGTCCCCTCCTC	Enzima desmolase
pCYP11A1 R	TTTGAGAAGAAGGCGGGGTC	
pCYP19A1 F	TGCCAAGAATGTTCTTACAGGTA	Enzima aromatase
pCYP19A1 R	CAGAGTGACCTTCATCATGACCAT	
pFSHR F	CCAAGCTTCGAGTCATCCCA	Receptor de FSH
pFSHR R	GAAGGCATCAGGGTTCGATGT	
pLHCGR F	CAGCCACTGCTGTGCTTTTA	Receptor de LH
pLHCGR R	GAGTGTCTTGGGTGAGCAGA	
pAR F	GGCCTTGCTTTCTAGCCTCA	Receptor de andrógeno
pAR R	AGCCCATGGCAAACACCATA	
pPGR F	GCAGGTGTACCAGCCCTATC	Receptor de progesterona
pPGR R	GCTCCCACAGGTAAGGACAC	
pRPL19 F	ATGAAATCGCCAACGCCAAC	Housekeeping
pRPL19 R	GGTGTTTTTCCGGCATCGAG	
pGAPDH F	CAAGGGCATCCTGGGCTACA	Housekeeping
pGAPDH R	GCTTGACGAAGTGGTCGTTGA	

F: *Forward primers*; R: *Reverse primers*

2.6 Análise estatística

As variáveis foram submetidas a verificação de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas quando necessário. As respostas foram comparadas entre os tratamentos através de análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, com o efeito individual agrupado ao efeito das coletas. A comparação entre médias foi feita através do teste LSD (*least significant difference*). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistix® (2013).

3 Resultados

Apesar do aumento do peso corporal (Figura 1) ao longo do tempo ($P < 0,05$), não houve diferença ($P > 0,05$) no GMDP entre os grupos (Tabela 2). No entanto, houve uma interação do peso corporal ($P < 0,05$) conforme o tratamento nas pesagens do D7 e D14, sendo que nestes momentos as fêmeas que receberam ômega-3 se apresentaram mais leves (Figura 1). Contudo, as fêmeas que receberam suplemento (Tabela 2) apresentaram menores valores de CA que os animais do grupo controle, além de apresentarem menor CMDR ($P < 0,05$).

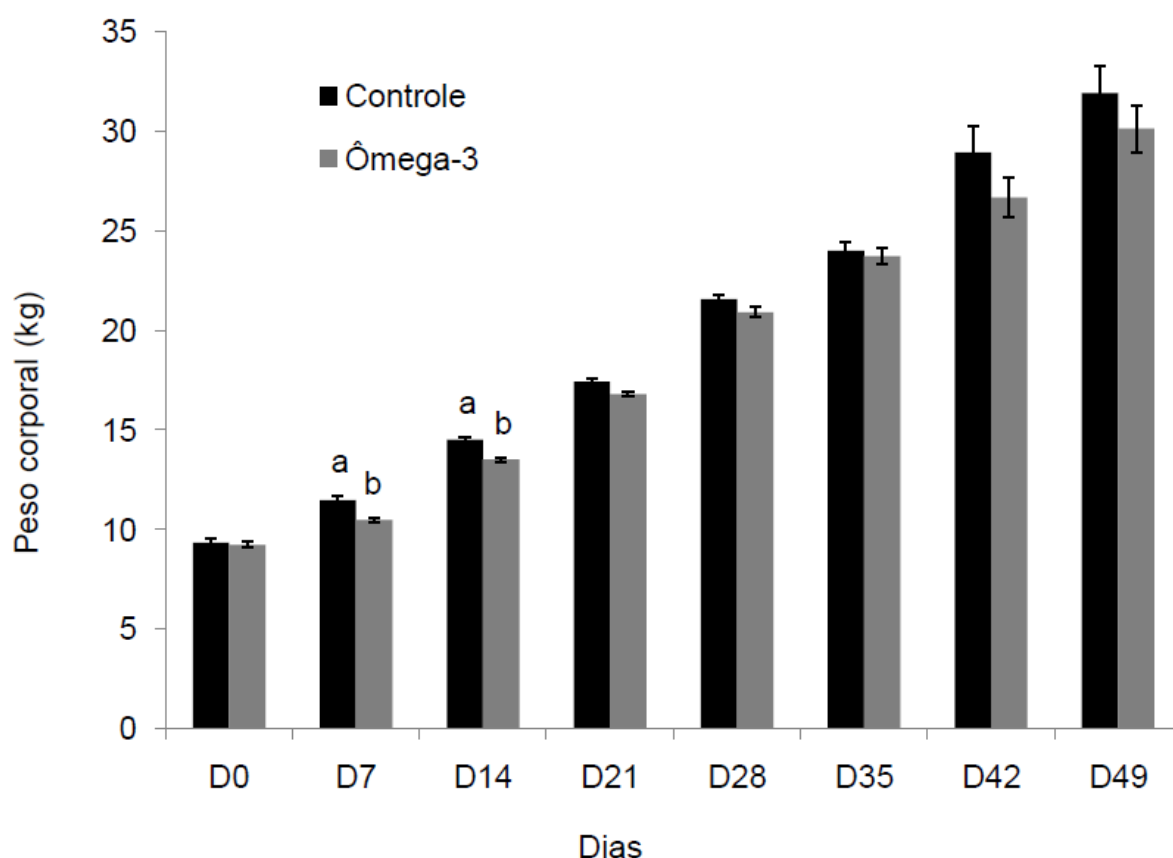


Figura 1: Peso corporal de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta

Tabela 2: Desempenho zootécnico de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta

Tratamento	Consumo diário (kg)	Ganho médio diário (kg)	Conversão alimentar
Controle	0,76 ± 0,05 ^a	0,43 ± 0,05 ^a	1,78 ± 0,17 ^a
Ômega-3	0,66 ± 0,05 ^b	0,41 ± 0,03 ^a	1,60 ± 0,12 ^b

^{a,b} Média ± EPM com expoentes diferentes entre os tratamentos na coluna (P<0,05)

Não foram observadas diferenças significativas para a maioria dos marcadores metabólicos entre os grupos (P > 0,05), considerando a média das três coletas (Tabela 3). No entanto, o nível de colesterol total foi inferior (P = 0,009) no grupo suplementado com ômega-3 no D52 (Figura 2).

Tabela 3: Parâmetros metabólicos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta

Parâmetros	Controle (n=8)	Ômega-3 (n=7)
Triglicerídeos (mg/dL)	62,1 ± 4,8	57,3 ± 4,9
Colesterol total (mg/dL)	96,7 ± 12,1	80,3 ± 10,5
LDL-colesterol (mg/dL)	54,9 ± 9,2	40,6 ± 6,5
HDL-colesterol (mg/dL)	28,6 ± 2,8	28,1 ± 3,9
GGT (U/L)	21,8 ± 2,1	24,9 ± 2,8
AST (U/L)	72,3 ± 9,9	92,4 ± 17,1

*Médias ± EPM não diferem

Os níveis de HDL-colesterol foram influenciados por uma interação entre os efeitos dos grupos e dos momentos das coletas de sangue (Figura 3). No D52 os valores de HDL-colesterol foram menores que no D0 em ambos os grupos. O grupo suplementado com ômega-3 apresentou já no D21 diminuição nos níveis de HDL-colesterol (P < 0,05) comparado ao D0, enquanto o grupo controle apresentou diminuição nos níveis de HDL-colesterol apenas no D52 (P < 0,05).

No exame post-mortem de 15 fêmeas, 12 apresentavam folículos antrais (6 em cada grupo). Não foram identificados corpos lúteos. Tanto a leptina quanto o ObRb foram identificados no núcleo e citoplasma dos OIFP e OIFS das fêmeas de ambos os tratamentos, conforme mostrado na Figura 4.

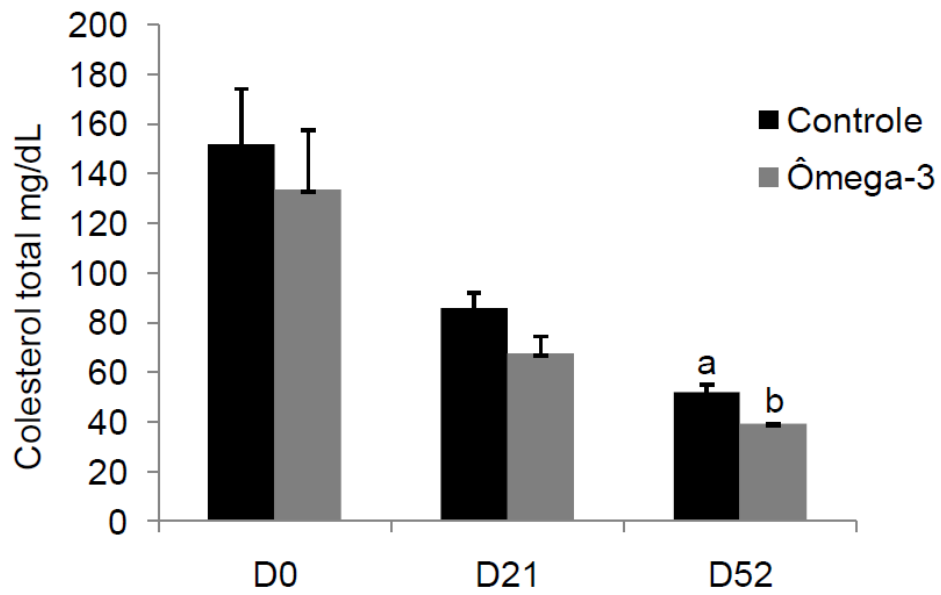


Figura 2: Níveis séricos de colesterol total em fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.

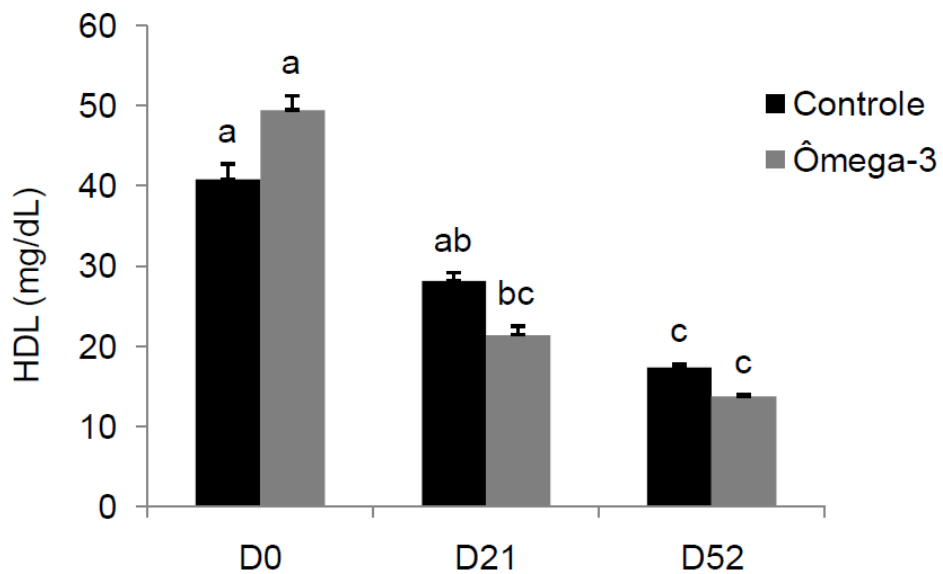


Figura 3: Níveis séricos de HDL-colesterol em fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.

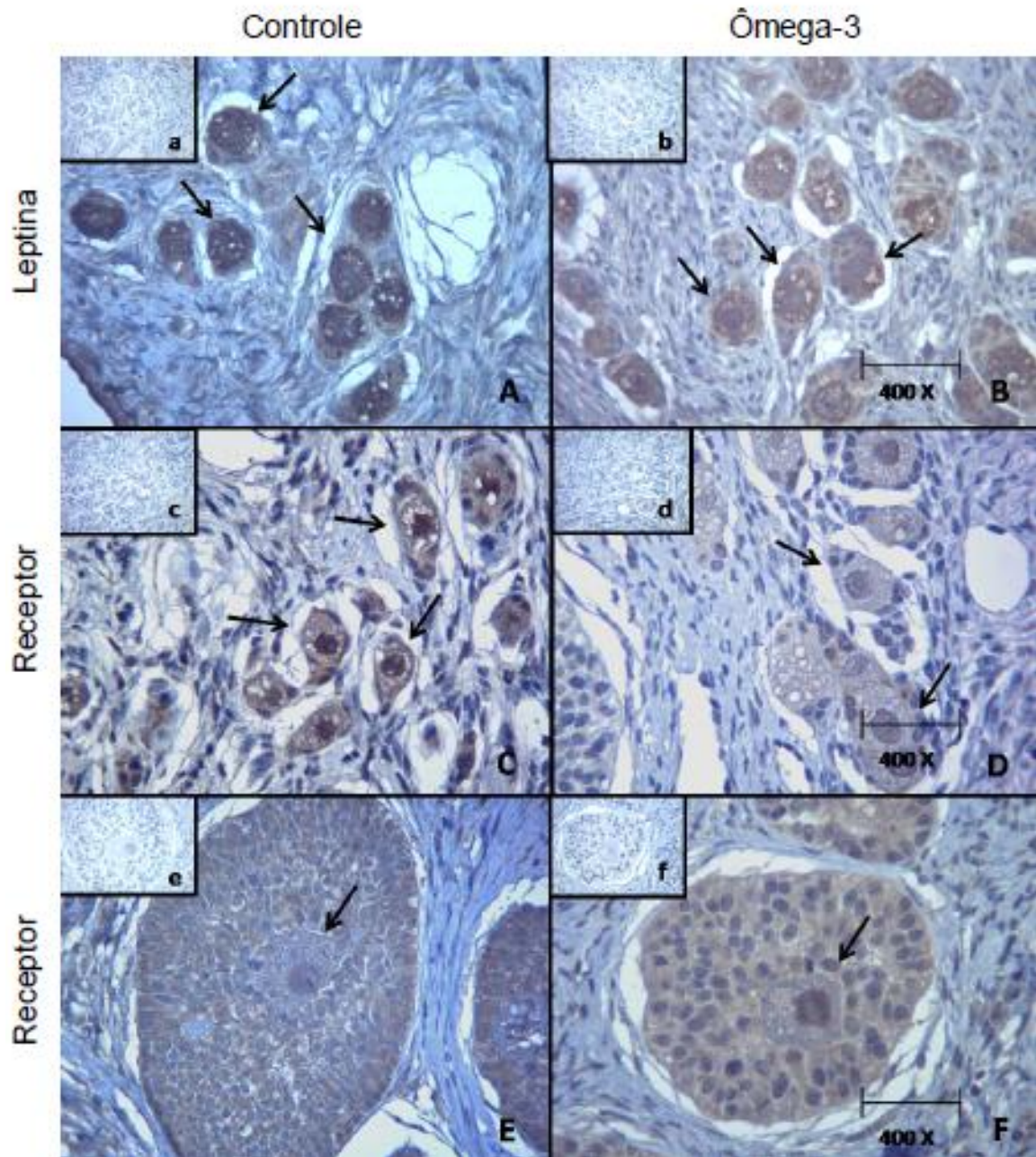


Figura 4: Imunomarcção para leptina (Ob) e seu receptor (ObRb) em ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle (esquerda) e com adição de ômega-3 na dieta (direita).

(A) Ovócitos inclusos em folículo primordial/primário: imunomarcção para leptina no citoplasma mais intensa em fêmea do grupo controle ($P < 0,05$) do que em fêmea suplementada com ômega-3 (B).

(C) Ovócitos inclusos em folículo primordial/primário: imunomarcção para ObRb no citoplasma mais intensa em fêmea do grupo controle ($P < 0,05$) do que em fêmea suplementada com ômega-3 (D).

(E) Ovócito incluído em folículo secundário: imunomarcção para ObRb no núcleo e citoplasma de fêmea do grupo controle semelhante comparada com fêmea suplementada com ômega-3 (F).

As figuras a, b, c, d, e e f são os controles negativos das figuras A, B, C, D, E e F, respectivamente.

Nas fêmeas suplementadas, ocorreu marcação de menor intensidade para leptina e ObRb no citoplasma de OIFP ($P < 0,05$) do que em ovócitos semelhantes nas fêmeas do controle (Tabela 4). Porém, não houve diferença ($P > 0,05$) na imunomarcação de leptina e ObRb no núcleo de OIFP e OIFS e no citoplasma de OIFS.

Tabela 4: Intensidade da imunomarcação (média dos valores da moda) para leptina e seu receptor (ObRb) no citoplasma e no núcleo de ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta (0: maior intensidade; 255: sem coloração).

Imunomarcação	Tratamento	n	Folículos primordiais/primários		n	Folículos secundários	
			Citoplasma	Núcleo		Citoplasma	Núcleo
Leptina	Controle	59	115,1 ± 2,1 ^a	125,4 ± 1,9	46	135,4 ± 2,5	132,5 ± 2,5
	Ômega-3	51	123,4 ± 2,8 ^b	127,2 ± 3,2	44	139,6 ± 2,7	136,8 ± 2,6
ObRb	Controle	50	146,9 ± 3,6 ^x	125,3 ± 4,4	42	164,1 ± 3,6	128,1 ± 3,2
	Ômega-3	46	157,8 ± 3,6 ^y	129,4 ± 3,2	33	168,4 ± 4,7	130,1 ± 4,4

^{a,b} Média ± EPM com expoentes diferentes entre os tratamentos na coluna ($P < 0,05$)

^{x,y} Média ± EPM com expoentes diferentes entre os tratamentos na coluna ($P < 0,05$)

As expressões da enzima desmolase (CYP11A1), da aromatase (CYP19A1) e do receptor de hormônio luteinizante (LHCGR) foram menores ($P < 0,05$) nas fêmeas suplementadas comparado ao grupo controle (Figura 5). No entanto as expressões de receptor de andrógeno (AR), receptor de hormônio folículo estimulante (FSHR) e receptor de progesterona (PGR) não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os grupos (Figura 5).

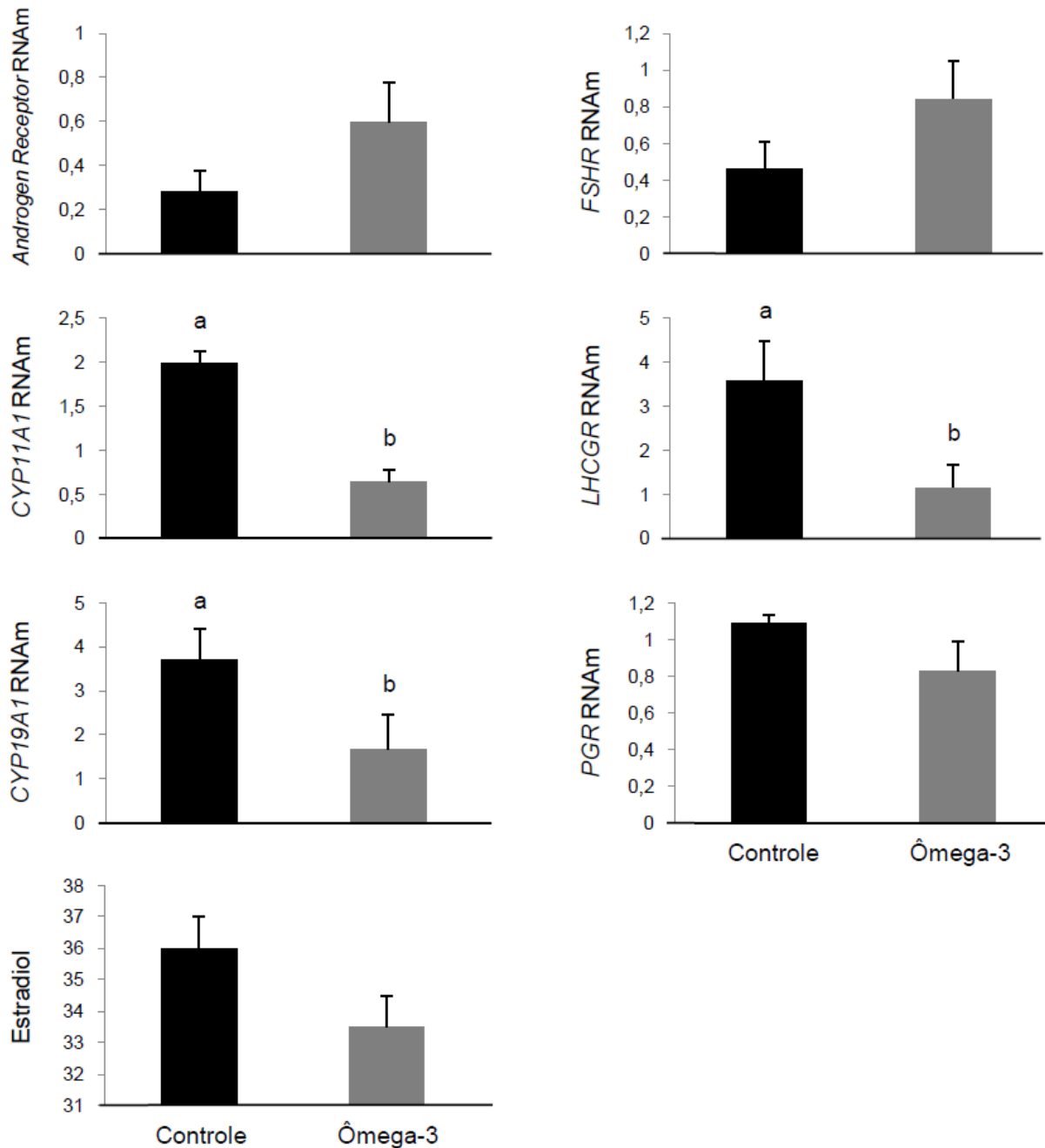


Figura 5: Expressão gênica RNAm das células foliculares e níveis séricos de estradiol de fêmeas suínas pré-púberes do grupo controle e com adição de ômega-3 na dieta.

Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). A expressão de desmolase, receptor de LH e aromatase foi maior nos animais do grupo controle ($P < 0,05$).

4 Discussão

O menor consumo de alimento observado no grupo de animais que recebeu suplementação contendo ômega-3 se deu pela inclusão de lipídeos na dieta (VERUSSA, 2015). Estes lipídeos apresentam uma cadeia rica em ácidos graxos de alto teor energético, limitando o consumo, porém convertendo em maior aproveitamento da ração. Pimenta et al (2003) avaliaram a adição de gordura no desempenho de leitões, observando que o consumo de ração é regulado de acordo com a energia presente na dieta, sendo que os leitões alimentados com rações sem adição de gordura tiveram maior consumo de ração diário e menor ganho de peso, além da piora na CA. Apesar de não ter sido observado diferença no GMDP, em dois momentos o grupo que recebeu ômega-3 se apresentou mais leve. Estes resultados estão de acordo com os achados de Murakami et al. (2010), que observaram redução no ganho de peso em frangos, após a inclusão de uma dieta contendo óleo de linhaça com altos níveis de PUFA n-3, devido ao menor consumo de alimento naquele período, o qual foi atribuído às características organolépticas do óleo de linhaça.

A adição de ômega-3 na dieta dos animais resultou em melhor CA, o que se justifica pela menor ingestão de ração. Andretta et al. (2009) observaram que os níveis de leptina são afetados por fatores nutricionais, sendo que maiores concentrações de leptina aumentam a sensação de saciedade dos animais, que reduzem a ingestão de alimentos. Assim, a suplementação com ácidos graxos na dieta de suínos levaria a aumento dos níveis séricos de leptina, podendo limitar o consumo de ração. São poucos os estudos que utilizaram ômega-3 como fonte de DHA como suplemento na dieta de suínos a fim de avaliar o desempenho zootécnico. Abril et al. (2003) obtiveram um impacto positivo com o uso de uma dieta enriquecida com DHA obtido de microalgas, com melhoria na CA dos leitões. Outros estudos avaliaram a inclusão de outros ácidos graxos, como óleo de soja (BAUDON et al., 2003) ou de canola (MYER et al., 1992), obtendo resultados similares.

As enzimas GGT e AST, que apresentaram concentração plasmática semelhante entre os tratamentos, se mantiveram dentro da faixa de valores considerados de referência para a idade, entre 10-60 U/L para GGT, e entre 32-94 U/L para AST (KANEKO et al., 1989). Estes dados sugerem que não houve comprometimento hepático durante o desenvolvimento destas leitoas, mesmo após o aumento da metabolização de lipídeos com a inclusão de ômega-3 no grupo suplementado (MOURA et al., 2014). Os teores plasmáticos de triglicerídeos também não foram afetados, o que pode ter ocorrido devido às dietas possuírem níveis de energia muito próximos. Conforme observado por Miyada et al. (1987), a utilização de rações isocalóricas pode ter levado a ausência de alteração nos valores séricos de triglicerídeos, após a inclusão de diferentes níveis de levedura na alimentação de suínos. Também foi observado um menor valor de HDL-colesterol no D52 em ambos os grupos, ao longo do desenvolvimento das fêmeas. Fatores ambientais como dieta, obesidade e exercícios, assim como fatores genéticos e ligados ao gênero exercem influência nos níveis séricos de HDL-colesterol, sendo que alguns distúrbios no metabolismo, os quais podem ocorrer em qualquer idade, promovem baixos níveis de HDL-colesterol (INEU et al., 2006). O grupo que recebeu o suplemento apresentou no D21 níveis plasmáticos de HDL-colesterol inferiores ao D0. Desta forma, a inclusão na dieta do suplemento contendo ômega-3, fonte de DHA, foi associada a uma antecipação na redução nos níveis de HDL-colesterol durante o crescimento daqueles animais, ao contrário do que foi revisado por Balk et al. (2006), que relataram que o consumo de óleo de peixe, fonte de ALA, resultou em aumento nos níveis plasmáticos de HDL-colesterol.

Durante a maior parte do período pré-púbere, a concentração de estradiol se mantém baixa (EVANS & DOHERTY, 2001), podendo variar entre 3,5-14,9 pg/ml (TONIOLLO et al., 1997). Entretanto, anteriormente à puberdade, os níveis de estradiol aumentam, flutuando de níveis inferiores a 20 pg/ml ao longo do ciclo estral, até níveis superiores a 50 pg/ml, nos 2 dias que antecedem o estro (HENRICKS et al., 1972). Os níveis encontrados em nosso estudo foram elevados, demonstrando um bom desenvolvimento reprodutivo dos animais em ambos os grupos, visto que a secreção de estradiol está associada a uma cooperação entre as células da teca e da granulosa (CORTEZ & TONIOLLI, 2012).

Este é o primeiro estudo a relatar imunomarcagem para a leptina e seu receptor no núcleo e citoplasma de ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes, presente nos ovócitos inclusos em folículos primários e secundários. Porém, em leitoas mais velhas, em período pré-púbere, a marcação foi observada somente no citoplasma (MOREIRA et al., 2013), sugerindo que embora leitoas mais jovens possam apresentar presença de leptina e ObRb no núcleo, na medida em que ocorre o desenvolvimento das fêmeas e a aproximação da puberdade, a leptina e seu receptor permanecem apenas no citoplasma. Como a concentração de leptina nos ovários de fêmeas suínas aumenta na medida em que ocorre o desenvolvimento dos folículos (GREGORASZCZUK et al., 2007), a diferença observada após a inclusão do suplemento contendo ômega-3 na dieta não se manteve nos folículos secundários, de forma que a suplementação não foi capaz de interferir na concentração de leptina e ObRb em folículos mais desenvolvidos.

Embora Smits et al. (2011) tenham relatado um incremento no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas após a suplementação com ômega-3, atribuído a efeitos positivos sobre o número de folículos e qualidade ovocitária, no presente estudo, com uso de fêmeas recém desmamadas, a inclusão de um suplemento contendo ômega-3 na dieta foi associada com imunomarcagem menos intensa para leptina e seu receptor em OIFP e menor expressão gênica de algumas enzimas esteroideogênicas, desmolase, aromatase e receptor de LH. Estes achados sugerem que a suplementação de ômega-3 fonte de DHA em animais nessa idade possa trazer efeitos negativos sobre a função reprodutiva das fêmeas, o que deverá ser elucidado em estudos futuros, utilizando leitoas em idade reprodutiva como modelo experimental. Sabe-se que a leptina produzida no tecido adiposo possui influência na regulação de diversos hormônios sexuais, entre os quais o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), FSH e LH (BARASH et al., 1996; CHEHAB et al., 1997; CUNNINGHAM et al., 1999). Farooqi et al., (2007) verificou que a deficiência de ObRb resulta em uma baixa regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal resultando em baixos níveis de esteróides sexuais.

A desmolase é uma das enzimas envolvidas nas primeiras etapas da esteroideogênese, na qual é responsável pela clivagem das cadeias laterais do colesterol, em seu processo de conversão em pregnenolona (LAVOIE & KING, 2009). A redução da expressão desta enzima nos animais que receberam ômega-3 coincide com a redução nos níveis plasmáticos de colesterol. O colesterol é o

precursor dos hormônios esteroidogênicos, e está diretamente relacionado com a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário e da foliculogênese (GRUMMER & CARROLL, 1991). Altos níveis de colesterol estão associados à produção de um maior número de folículos (PFEIFER et al., 2009), podendo estar também relacionado com maior esteroidogênese em nível folicular (KRONFELD et al., 1980). O colesterol proveniente da dieta pode ter impedido, através de retroalimentação, a síntese do colesterol no fígado através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, responsável pela regulação da formação de colesterol (ISTVAN & DEISENHOFER, 2001). Outros estudos já haviam observado que a adição de ômega-3 na dieta pode levar a diminuição do colesterol (SENGUPTA & GHOSH, 2015; MOREIRA et al., 2016).

De acordo com Newell-Fugate et al. (2014), altos níveis séricos de colesterol estão positivamente correlacionados com aumento da expressão gênica da aromatase, onde fêmeas suínas alimentadas com uma dieta altamente calórica, com elevados níveis de gordura, colesterol e frutose, apresentaram elevação nos níveis séricos de colesterol total e leptina, aumento da expressão da aromatase no tecido adiposo visceral, ciclos estrais mais longos e maior número de cistos foliculares nos ovários. No presente estudo, leitões com níveis inferiores de colesterol apresentaram imunomarcagem menos intensa para leptina e ObRb em nível ovariano e menor expressão da aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos, além de redução da expressão do receptor de LH (LHCGR). Estes achados seriam associados com a presença de folículos menos diferenciados ou subdesenvolvidos, trazendo prejuízos ao ambiente folicular (LUO & WILTBANK, 2006). Uma menor expressão de CYP19A1 em células do *cumulus oophorus* foi associada à infertilidade em mulheres, podendo mediar a queda na qualidade oocitária (BARCELOS et al., 2013).

5 Conclusão

A inclusão do suplemento contendo ômega-3 fonte de DHA na dieta de leitoas pré-púberes foi associada com melhora do desempenho zootécnico dos animais, através de uma melhor conversão alimentar, diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total e redução de alguns parâmetros reprodutivos avaliados, apresentando imunomarcagem menos intensa para leptina e ObRb no citoplasma de ovócitos incluídos em folículos primordiais e primários e menor expressão gênica das enzimas desmolase, aromatase e receptor de LH nas células foliculares.

Referências

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Suinocultura**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

ABRIL, R.; GARRETT, J.; ZELLER, S.G.; SANDER, W.J.; MAST, R.W. Safety assessment of DHA-rich microalgae from Schizochytrium sp. Part V: target animal safety/toxicity study in growing swine. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.37, p. 73-82, 2003.

AGRINESS. **Melhores da Suinocultura**. Resultados consolidados Brasil e Argentina. 8 ed., 2015.

AHERNE, F.X.; WILLIAMS, I.H. Nutrition for optimizing breeding herd performance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 8, p. 589-608, 1992.

AMARAL, W.S.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Reproductive performance of gilts according to growth rate and backfat thickness at mating. **Animal Reproduction Science**, v.121, p. 139–144, 2010.

ANDRETTA, I.; LOVATTO, P.A.; LEHNEN, C.R.; HAUSCHILD, L.; ROSSI, C.A.R. Relação do ácido linoleico conjugado com a qualidade de carcaça em suínos: uma meta-análise. In: **III Seminário Sistemas de Produção Agropecuária**. Dois Vizinhos, Paraná, 2009. Anais.

BALK, E.M.; LICHTENSTEIN, A.H.; CHUNG, M.; KUPELNICK, B.; CHEW, P.; LAU, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. **Atherosclerosis**, v.189, p. 19–30, 2006.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v.137, p. 3144–3147, 1996.

BARCELOS, I.D.E.S.; DONABELA, F.C.; DA BROI, M.G.; RIBAS, C.P.; MEOLA, J.; NAVARRO, P.A. Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve

submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus. **Reprodução & Climatério**, v.28, p. 51-56, 2013.

BAUDON, E.C.; HANCOCK, J.D.; LLANES, N. Added fat in diets for pigs in early and late finishing. **Swine Day**, p. 155-158, 2003.

BRAZLE, A.E.; JOHNSON, B.J.; WEBEL, S.K.; RATHBUNAND, T.J.; DAVIS, D.L. Omega-3 fatty acids in the gravid pig uterus as affected by maternal supplementation with Omega-3 fatty acids. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 994-1002, 2009.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, v.91, p. 791–795, 2009.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **BioFactors**, 35, 266-272, 2009.

CHA, M.C.; JONES, P.J.H. Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. **Journal of Lipid Research**, v.39, p. 1655–1660, 1998.

CHEHAB, F.F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M.E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, v.275, p. 88-90, 1997.

CIKOS, S.; BUKOVSKA, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, 8:113, 2007.

CORTEZ, A.A.; TONIOLLI, R. Aspectos fisiológicos e hormonais da foliculogênese e ovulação em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p. 163-173, 2012.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.60, p. 216–222, 1999.

DIAL, G.D.; MARSH, W.E.; POLSON, D.D.; VAILLANCOURT, J.P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L. et al., ed. **Diseases of swine**. Ames: Iowa State University Press. 7 ed., p. 88-137, 1992.

DOUGHMAN, S.D.; KRUPANIDHI, S.; SANJEEVI, C.B. Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. **Current Diabetes Reviews**, v.3, p. 198-203, 2007.

DOWNEY, B.R., MOOTOO, J.E., DOYLE, S.E. A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation. **Animal Reproduction Science**, v.49, p. 269-279, 1998.

EVANS, A.C.O.; DOHERTY, J.V. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. **Livestock Production Science**, v.68, p. 1-12, 2001.

FAROOQI, S.; WANGENSTEEN, T.; COLLINS, S.; KIMBER, W.; MATARASE, G.; KEOGH, J.M.; LANK, E.; BOTTOMLEY, B.; LOPEZ-FERNANDEZ, J.; AMARO, I.F.; DATTANI, M.T. et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. **The New England Journal of Medicine**, v.356, p. 237-247, 2007.

FERGUSON E.M.; ASHWORTH C.J.; EDWARDS S.A.; HAWKINS N.; HEPBURN N.; HUNTER M.G. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. **Reproduction**, v.126, p. 61-71, 2003.

FRIEDEWALD, W.F.; LEVY, R.Y.; FREDERICKSON, D.S. Estimation of LDL cholesterol concentration without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p. 499-502, 1972.

FRITSCHKE, K.L.; HUANG, S.C.; CASSITY, N.A. Enrichment of Omega-3 Fatty Acids in Suckling Pigs by Maternal Dietary Fish Oil Supplementation. **Journal of Animal Science**, v.71, p. 1841-1847, 1993.

GAUCHER, E.A.; GRADDY, L.G.; LI, T.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; SCHREBER, D.R.; LIBERLES, D.A.; JANIS, C.M.; BENNER, S.A. The planetary biology of cytochrome P450 aromatases. **BMC Biology**, v.2, p. 1-14, 2004.

GREGORASZCZUK, E.L.; BYLICA, A.; GERTLER, A. Response of porcine theca and granulosa cells to GH during short-term in vitro culture. **Animal Reproduction Science**, v.58, p. 113-125, 2000.

GREGORASZCZUK, E.L.; PTAK, A.; WOJCIECHOWICZ, T.; NOWAK, K. Action of IGF-I on expression of the long form of the leptin receptor (ObRb) in the pre pubertal period and throughout the estrous cycle in the mature pig ovary. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p. 289-295, 2007.

GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p. 3838-3852, 1991.

GULLIVER, C.E.; FRIEND, M.A.; KING, B.J.; CLAYTON, E.H. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, v.131, p. 9–22, 2012.

HARRIS, W.S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Current Opinion in Lipidology**, v.17, p. 387–393, 2006.

HENRICKS, D.M.; GUTHRIE, H.D.; HANDLIN, D.L. Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. **Biology of Reproduction**, v.6, p.210-218, 1972.

HOMA, S.T.; RACOWSKY, C.; MCGAUGHEY, R.W. Lipid analysis of immature pig oocytes. **Journals of Reproduction & Fertility**. v. 77, p. 425-434, 1986.

INEU, M.L.; MANENTI, E.; COSTA, J.L.V.; MORIGUCHI, E. Manejo da HDL: avanços recentes e perspectivas além da redução de LDL – Artigo de revisão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, 2006.

INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. **Progress in Lipid Research**, v.30, p. 39–103, 1991.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. **Science**, v. 292, p. 1160-1164, 2001.

JUMP, D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current opinion in lipidology**, v.19, p. 242-247, 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4 ed. London: Academic Press, 932p., 1989.

KARLSSON, C.; LINDELL, K.; SVENSSON, E.; BERGH, C.; LIND, P.; BILLING, H.; CARLSSON, L.M.; CARLSSON, B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p. 4144-4148, 1997.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 90, p. 316-324, 2006.

KOHEK, M.B.F.; LATRONICO, A.C. O papel dos receptores das gonadotrofinas na reprodução feminina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v.45, p. 369-374, 2001.

KRONFELD, D.S.; DONOGHUE, S.; NAYLOR, J.M.; JOHNSON, K.; BRADLEY, C.A. Metabolic effects of feeding protected tallow to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.63, p. 545-552, 1980.

KURLAK, L.O.; STEPHENSON, T.J. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**. v. 80, p. 148–154, 1999.

LAVOIE, H.A., KING, S.R. Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p. 880-907, 2009.

LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p. 623–632, 2008.

LIN, J.; RICHARD BARB, C.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology of Reproduction**, v.64, p. 1614–1618, 2001.

LORENZEN, K. Population dynamics and potential of fisheries stock enhancement: practical theory for assessment and policy analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v.360, p. 171-89, 2005.

LUO, W.; WILTBANK, M.C. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.75, p. 217–225, 2006.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p. 36-49, 2008.

MATEO, R.D.; CARROLL, J.A.; HYUN, Y.; SMITH, S.; KIM, W.S. Effect of dietary supplementation of n-3 fatty acids and elevated concentrations of dietary protein on the performance of sows. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 948-959, 2009.

MILLER, W.L. Androgens synthesis in adrenarche. **Reviews of Endocrinology Metabolic Disorders**, v.10, p. 03-17, 2009.

MIYADA, V.S. A levedura seca na alimentação de suínos: estudos adicionais sobre o seu valor protéicos e vitamínico. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Querioz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 159 f., 1987.

MOREIRA, F.; CORCINI, C.D.; MONDADORI, R.G.; GEVEHR-FERNANDES, C.; MENDES, F.F.; ARAUJO, E.G.; LUCIA JR., T. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. **Animal Reproduction Science**, v.139, p. 89-94, 2013.

MOREIRA, F.; GHELLER, S.M.M.; MONDADORI, R.G.; VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; LUCIA JR., T. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus: uterus and ovaries of swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p. 1074–1078, 2014.

MOREIRA, F.; CHEUICHE, Z.M.G.; RIZZOTO, G.; SANTOS, M.Q, SCHUCH, M.S., FLACH, M.J.; GASPERIN, B.G.; BIANCHI, I.; LUCIA JR, T. Metabolic and reproductive parameters in prepubertal gilts after omega-3 supplementation in the diet. **Animal Reproduction Science**, v.170, p. 178-183, 2016.

MOURA, S.V.; LOPES, M.S.; SCHMITT, E.; RABASSA, V.R.; SCHWEGLER, E.; SCHNEIDER, A., GOULART, M.A.; BUOSI, R.J.; PINO, A.B.D.; FERNANDES, C.G.; BIANCHI, I.; CÔRREA, M.N. Avaliação do diagnóstico de perihepatite em suínos após o abate e sua relação com os níveis de enzimas hepáticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p. 1351-1358, 2014.

MURAKAMI, K.T.T.; PINTO, M.F.; PONSANO, E.H.; NETO, M.G. Desempenho produtivo e qualidade da carne de frangos alimentados com ração contendo óleo de linhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p. 401-407, 2010.

MYER, R.O.; LAMKEY, J.W.; WALKER, W.R.; BRENDEMUHL, J.H.; COMBS, G.E. Performance and carcass characteristics of swine when fed diets containing canola oil and added copper to alter the unsaturated: saturated ratio of pork fat. **Journal of animal science**, v.70, p. 1414- 1423, 1992.

NAKAMURA, M. The mechanism of sex determination in vertebrates – Are sex steroids the key factor? **Journal of Experimental Zoology**, v.313, n.7; p.381-398, 2010.

NEWELL-FUGATE, A.E.; TAIBL, J.N.; CLARK, S.G.; ALLOOSH, M.; STUREK, M.; KRISHER, R.L. Effects of Diet-Induced Obesity on Metabolic Parameters and Reproductive Function in Female Ossabaw Minipigs. **Comparative Medicine**, v.64, p. 44–49, 2014.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; MINGOTI, G.Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p. 418-432, 2011.

PENZ JR, A.M.; BRUNO, D.; SILVA, G. Interação nutrição-reprodução em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p. 183-194, 2009.

PFEIFER, L.F.M; PIVATO, I.; RUMPF, R.; DIONELLO, N.J.L.; SCHNEIDER, A., GOULART, M.A.; CÔRREA, M.N. Cholesterol levels affect the quantity of follicles in beef cattle ovum pick-up. **Archivos de Zootecnia**, v.58, 2009.

PIMENTA, M.E.S.G.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T.; LOGATO, P.V.R.; MURGAS, L.D.S.; BERTECHINI, A.G. Diferentes fontes e níveis de lipídios no desempenho de leitões pós-desmame. **Ciência e agrotecnologia**, v.27, p. 1130-1137, 2003.

PORTER, M.B., BRUMATED, J.R., SITES, C.K. Effect of prolactin on follicle-stimulating hormone receptor binding and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v.73, p. 99-105, 2000.

PRUNIER, A., QUESNEL, H. Influence of the nutritional status on ovarian development in female pigs. **Animal Reproduction Science** , v.60-61, p. 185-197, 2000a.

PRUNIER, A., QUESNEL, H. Nutritional influences on the hormonal control of reproduction in female pigs. **Livestock Production Science**, v.63, p. 1-16, 2000b.

QIAN, H.; BARB, C.R.; COMPTON, M.M.; HAUSMAN, G.J.; AZAIN, M.J.; KRAELING, R.R.; BAILE, C.A. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v.16, p. 135–143, 1999.

ROOS, L.R. Endocrinologia reprodutiva dos suínos e hormônios exógenos comerciais utilizados na indústria suinícola: revisão de literatura. **Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária)—Universidade de Brasília**, Brasília, 71 f., 2013.

SCHNEIDER, A.; ZHI, X.; MOREIRA, F.; LUCIA JR., T.; MONDADORI, R.G.; MASTERNAK, M.M. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. **Journal of Ovarian Research**, 7, 120, 2014.

SENGUPTA, A.; GHOSH, M. Reduction of cardiac and aortic cholesterol in hypercholesterolemic rats fed esters of phytosterol and omega-3 fatty acids. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p. 2741–2750, 2015.

SILVA, R.C.; BÃO, S.N.; JIVAGO, J.L.P.R.; LUCCI, C.M. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. **Theriogenology**, v.76, p. 1647–1657, 2011.

SMITS, R.J.; LUXFORD, B.G.; MITCHELL, M.; NOTTLE, M.B. Sow litter size is increased in the subsequent parity when lactating sows are fed diets containing n-3 fatty acids from fish oil. **Journal of Animal Science**, v.89, p. 2731-2738, 2011.

SMIT, M.N.; PATTERSON, J.L.; WEBEL, S.K.; SPENCER, J.D.; CAMERON, A.C.; DYCK, M.K.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R. Responses to n-3 fatty acid (LCPUFA) supplementation of gestating gilts, and lactating and weaned sows. **Animal**, v.7, p. 784-792, 2013.

STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 856–871, 1998.

STATISTIX®. **Statistix 10 Analytical Software**. Tallahassee, FL, USA. 2013.

STILLWELL, W.; WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.126, p. 1–27, 2003.

TANGHE, S.; DE SMET, S. Does sow reproduction and piglet performance benefit from the addition of n-3 polyunsaturated fatty acids to the maternal diet? **The Veterinary Journal**. v. 197, p. 560–569, 2013.

TANGHE, S.; MISSOTTEN, J.; RAES, K.; VANGEYTE, J.; DE SMET, S.; Diverse effects of linseed oil and fish oil in diets for sows on reproductive performance and pre-weaning growth of piglets. **Livestock Science**, v.164, p. 109-118, 2014.

TONIOLLO, G.H.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, C.A.; MALHEIROS, E.B.; CARVALHO, L.F.O.S. Níveis séricos de cortisol e 17- β estradiol durante o ciclo estral em marrãs (*Sus scrofa domestica* – Linnaeus 1758). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p. 297-307, 1997.

VERUSSA, G.H. Uso de lipídeos na nutrição de suínos. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.12, p. 4288-4301, 2015.

WAKEFIELD, S.L.; LANE, M.; SCHULZ, S.J.; HEBART, M.L.; THOMPSON, J.G.; MITCHELL, M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.294, p. 425-434, 2008.

WARZYCH, E.; CIESLAK, A.; PAWLAK, P.; RENSKA, N.; PERS-KAMCZYC, E.; LECHNIAK, D. Maternal nutrition affects the composition of follicular fluid and transcript content in gilt oocytes. **Veterinarni Medicina**, v.56, p. 156-167, 2011.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, p. 190–201, 2007.

WU, G.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; KIM, S.W.; LI, X.L.; SATTERFIELD, M.C.; SPENCER, T.E. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: Mechanisms and implications for swine production. **Journal of Animal Science**. v.88, p. 195-204, 2009.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, v.135, p. 683-692, 2008.

ZANGERONIMO, M.G.; OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S. Efeito da nutrição na reprodução em marrãs – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.20, 2013.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p. 166–185, 2005.

Anexos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO - MEC
 Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Câmpus Araquari

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)
 DO INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE, CÂMPUS ARAQUARI**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Parâmetros metabólicos e reprodutivos de leitões após suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na dieta” sob a responsabilidade de “Ivan Bianchi” que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794 de 08 de Outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais IFC-Araquari em reunião de “22/03/2016”

Vigência do projeto:	23/03/2016 a 28/02/2017
Espécie/Linhagem:	Suíno (F1)
No de Animais:	18
Peso/Idade:	21 dias
Sexo:	Ambos
Origem:	Escola Fazenda IFC Araquari

Bethânia da Rocha Medeiros
 Médica Veterinária (CRMV/SC 2669)
 Profa. EBTT (Siape nº 1827906)
 Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IFC - Câmpus Araquari
 Portaria nº 2.488/2014/Reitoria