

**PRISCILA CRISTINE CARRARO**

**EXPRESSÃO DE GENES E FATORES DE TRANSCRIÇÃO LIPOGÊNICOS EM  
EXPLANTES MAMÁRIOS DE OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS “*IN VITRO*”  
COM ÁCIDO PALMÍTICO**

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

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

**LAGES, SC  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Carraro, Priscila Cristine  
expressão de genes e fatores de transcrição  
lipogênicos em explantes mamários de ovelhas  
lactantes cultivados in vitro com ácido palmítico /  
Priscila Cristine Carraro. - Lages , 2018.  
63 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Biologia da lactação. 2. Metabolismo lipídico .  
3. Leite ovino. I. Estrasulas de Oliveira, Dimas .  
II. Universidade do Estado de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**PRISCILA CRISTINE CARRARO**

**EXPRESSÃO DE GENES E FATORES DE TRANSCRIÇÃO LIPOGÊNICOS EM  
EXPLANTES MAMÁRIOS DE OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS “*IN VITRO*”  
COM ÁCIDO PALMÍTICO**

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

**Banca Examinadora:**

**Orientador:** \_\_\_\_\_  
Professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Membro:** \_\_\_\_\_  
Professor Dr. Rogério Ferreira  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Membro:** \_\_\_\_\_  
Dra. Fernanda Hentz  
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI

**Lages, 26 de Fevereiro de 2018**



A Deus, minha fortaleza e força, aos meus  
pais e avós, meus esteios.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por ser minha força, por nunca ter me desamparado e ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais Itacir e Edilene, e meus avós Nelson e Ivani, pelo incentivo, suporte e pelo amparo nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs Camila e Talita, que me impulsionam e encorajam. Também aos meus avós e demais familiares, pelo apoio de sempre.

Ao Tiago, pelo companheirismo, auxílio e por tornar meus dias mais leves e alegres.

Aos amigos que Lages me trouxe e às gurias do futsal, por compartilharem bons momentos comigo. Também às amigas de longa data, que apesar dos poucos ou raros momentos juntas, nunca deixaram nossa amizade mudar ou enfraquecer.

À Bianca, Bruna e Jeimy, que não dividiram apartamento, mas sim compartilharam um lar comigo durante esse tempo. Agradeço pela companhia, pelos mates, risadas e amizade que construímos.

Aos meus colegas do Nutriger, pela ajuda e parceria durante o mestrado. Aos colegas e professores do CEDIMA e do setor de Produção Animal, pelo auxílio, pelos momentos de descontração e pela troca de experiências.

Ao CAV/UDESC, pela oportunidade, pelo suporte e por me permitir realizar mais um sonho.

À CAPES, pela concessão dos 24 meses de bolsa.

À FAPESC pelo auxílio financeiro através do PAP-UDESC.

Enfim, ao meu orientador, professor Dimas, por ser tão presente durante meu mestrado, pelo conhecimento partilhado, pelos conselhos e orientação concedidos. Gracias!



## RESUMO

A suplementação lipídica com ácido palmítico (C16:0), tem se mostrado eficiente em dar suporte à produção e aumentar o teor de gordura do leite. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do C16:0 na expressão de genes envolvidos na síntese *de novo* (ACC- $\alpha$  PII, ACC- $\alpha$  PIII e FASN), internalização (CD36), transporte intracelular (FABP 3 e 4) e dessaturação (SCD) de ácidos graxos, e também em um dos fatores de transcrição (PPAR- $\gamma$ ) envolvidos na regulação de enzimas envolvidas na síntese da gordura do leite. Foram realizados cultivos de explantes mamários de três ovelhas da raça Lacaune com 40 dias em lactação, obtidos através de biópsia. Os explantes foram cultivados por 24 horas, com os tratamentos: controle [meio de cultivo + albumina bovina (98%; BSA) a 75  $\mu$ M] e ácido palmítico [meio de cultivo + C16:0 (99%) a 75  $\mu$ M + albumina bovina (98%; BSA)]. Posteriormente foi extraído o RNA total, sintetizado o DNA complementar (cDNA) e realizada a análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS, utilizando o procedimento MIXED. O C16:0 aumentou, respectivamente, a expressão gênica da ACC- $\alpha$  PIII, ACC- $\alpha$  PII e FASN em 1,5, 1,3 e 1,3 vezes, quando comparado ao controle. A expressão gênica da CD36, FABP3, FABP4, SCD e PPAR- $\gamma$  não sofreu efeito de tratamento. O aumento de ácidos graxos de cadeia curta e média observados na literatura pode justificar o aumento da expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese *de novo* no presente estudo. O motivo pelo qual os genes envolvidos na via da captação de AG da circulação sanguínea não foram afetados pelo ácido palmítico não está claro.

**Palavras-chave:** Biologia da lactação. Metabolismo lipídico. Leite ovino.



## ABSTRACT

Lipid supplementation with palmitic acid (C16:0) has been shown to increase milk production and milk fat content. The objective of this study was to evaluate the effect of C16:0 in the expression of genes involved in *de novo* synthesis (ACC- $\alpha$  PII, ACC- $\alpha$  PIII and FASN), internalization (CD36), intracellular transport (FABP 3 and 4) and fatty acids desaturation (SCD), and also in the transcription factor (PPAR- $\gamma$ ) involved in the regulation of genes involved in the milk fat synthesis. Mammary explants from three Lacaune ewes with 40 days in milk, obtained through biopsy were cultured for 24 hours with one of the following treatments: control [culture medium + bovine albumin (98%; BSA) at 75  $\mu$ M] and palmitic acid [culture medium + C16:0 (99%) at 75  $\mu$ M]. Subsequently, total RNA was extracted, complementary DNA (cDNA) was synthesized and carried out the real-time quantitative polymerase chain reaction analysis (RT-qPCR). The data were analyzed by the SAS statistical software, using the MIXED procedure. C16:0 increased, respectively, ACC- $\alpha$  PIII, ACC- $\alpha$  PII and FASN gene expression in 1.5, 1.3 and 1.3 fold, when compared to the control. The CD36, FABP3, FABP4, SCD and PPAR- $\gamma$  gene expression had no treatment effect. The increase in short and medium-chain fatty acids observed in the literature may justify the increase in gene expression of the enzymes involved in *de novo* synthesis in the present study. The reason the genes involved in the FA uptake pathway from the bloodstream were not affected by palmitic acid is unclear.

**Keywords:** Lactation biology. Lipid metabolism. Sheep milk.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Principais processos relacionados ao metabolismo lipídico em células epiteliais mamárias.....26
- Figura 2 — Abundância dos genes ACC- $\alpha$  PIII (A), ACC- $\alpha$  PII (B) e FASN (C) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados in vitro com ácido palmítico em comparação com o controle. ....41
- Figura 3 — Abundância dos genes CD36 (A), FABP3 (B) e FABP4 (C) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados in vitro com ácido palmítico em comparação com o controle. ....42
- Figura 4 — Abundância do gene SCD1 (A) e do fator de transcrição PPAR- $\gamma$  (B) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados in vitro com ácido palmítico em comparação com o controle. ....43



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 — Primers ovinos usados nas análises de RT-qPCR.....	39
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACBP	Proteína de ligação de acil-CoA
ACC	Acetil CoA carboxilase
ACSL	Acil-CoA sintetase de cadeia longa
AG	Ácido (s) graxo (s)
AGCC	Ácido (s) graxo (s) de cadeia curta
AGCL	Ácido (s) graxo (s) de cadeia longa
AGCM	Ácido (s) graxo (s) de cadeia média
AGI	Ácido (s) graxo (s) insaturado (s)
AGMI	Ácido (s) graxo (s) monoinsaturado (s)
AGPI	Ácido (s) graxo (s) poliinsaturado (s)
AGNE	Ácido (s) graxo (s) não esterificado (s)
AGPAT	Acilglicerol fosfato aciltransferase
BEN	Balanco energético negativo
BEP	Balanco energético positivo
CD36	Translocador de ácido (s) graxo (s)
cDNA	DNA complementar
DEL	Dias em lactação
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FASN	Ácido graxo sintase
GPAT	Glicerol-3 fosfato acil transferase
INSIG	Proteína induzida por insulina
LPL	Lipoproteína lipase
MAC-T	Linhagem de células alveolares mamárias bovinas
mRNA	RNA mensageiro
MS	Matéria seca
nSREBP	Fragmento nuclear da SREBP
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PPERs	Elementos de resposta do proliferador de peroxissomo
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptor retinóide X
SCAP	Proteína de clivagem-ativação da SREBP
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SLC27A	Proteína de transporte de ácidos graxos
SREBPs	Proteínas de ligação de elementos reguladores de esterol
TG	Triglicerídeo (s)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
2.1	O USO DE GORDURAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES .....	23
<b>2.1.1</b>	<b>O uso de ácidos graxos específicos</b> .....	24
2.1.1.1	<i>O efeito da suplementação com ácido palmítico em ruminantes</i> .....	24
2.2	SÍNTESE DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA .....	25
<b>2.2.1</b>	<b>Síntese <i>de novo</i></b> .....	26
<b>2.2.2</b>	<b>Ácidos graxos pré-formados</b> .....	27
2.2.2.1	<i>Ativação e transporte intracelular de ácidos graxos</i> .....	28
2.2.2.2	<i>Dessaturação dos ácidos graxos</i> .....	29
<b>2.2.3</b>	<b>Síntese de triglicerídeos e gotículas lipídicas do leite</b> .....	30
<b>2.2.4</b>	<b>Regulação das enzimas da síntese de lipídeos</b> .....	31
2.3	O USO DE MODELOS <i>IN VITRO</i> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	ANIMAIS, BIÓPSIAS E TRATAMENTOS .....	37
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	38
4.3	DESENHO DOS PRIMERS .....	38
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	53
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55



## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da produção e demanda de leite e produtos lácteos no mundo, tem crescido o número de estudos voltados a melhorar a compreensão da biologia da lactação e da síntese do leite nas últimas décadas. Dentre os constituintes do leite, a gordura é o principal componente energético e é responsável por muitas das propriedades físicas, características de fabricação e qualidades organolépticas do leite e dos produtos lácteos. A gordura também é o componente do leite mais variável e os fatores ambientais e fisiológicos que afetam a gordura do leite têm sido amplamente caracterizados (BAUMAN & GRIINARI, 2003). A nutrição é o fator predominante que afeta a gordura do leite e representa uma ferramenta prática para alterar a produção e a composição de ácidos graxos (AG) da gordura do leite (BAUMAN et al., 2006). Dessa forma, pesquisas que visam melhorar o entendimento da regulação nutricional da síntese de gordura do leite vêm sendo desenvolvidas.

O leite de ovelha representa 1,4% da produção mundial de leite (FAO, 2015). No entanto, apesar de representar pouco a nível mundial, as fazendas produtoras de leite de ovelha representam uma parte significativa da economia agrícola em muitos países, especialmente aqueles que fazem fronteira com o Mar Mediterrâneo e no Oriente Médio (BALTHAZAR et al., 2017). O valor nutricional do leite de ovelha é maior que o de leite de cabra e vaca, com maiores níveis de proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas essenciais para a saúde humana e um valor calórico correspondente a 5932 kJ/kg (BARŁOWSKA et al., 2011; PARK et al., 2007). Enquanto a vaca e a cabra produzem, respectivamente, 3,3 ( $\pm 0,2$ ) e 3,8 ( $\pm 0,1$ ), a ovelha produz em média 5,9 ( $\pm 0,3$ ) gramas de gordura em 100 g de leite produzido (JANDAL, 1996; PARK et al., 2007).

Estudos em nível de biologia molecular do processo de síntese e secreção do leite têm caracterizado genes relacionados às enzimas envolvidas na captação, interiorização, transporte e ativação intracelular, síntese *de novo*, dessaturação e esterificação de AG, a fim de associar os efeitos da dieta sobre a abundância de suas transcrições e/ou atividades. Nos ruminantes, graças ao conhecimento recente das sequências de cDNA de vários desses genes, ferramentas moleculares para estudar sua expressão foram desenvolvidas para permitir a quantificação de seu mRNA por real-time RT-qPCR (BERNARD, 2008).

Os suplementos de gordura saturada de cadeia longa têm sido usados para aumentar a densidade energética das dietas, produção de gordura e produção de leite em ruminantes, especialmente vacas leiteiras (ENJALBERT et al., 2000; LOCK et al., 2013; STEELE, 1969; STEELE & MOORE, 1968; WANG et al., 2010). No entanto, as respostas de produção às

gorduras altamente saturadas (>85% de ácidos graxos saturados) variam muito. Embora vários estudos tenham sido relatados com fontes de gordura contendo aproximadamente 85% de ácido palmítico (C16:0), os AG restantes podem ter influenciado as respostas ao tratamento, tornando necessários estudos com AG puros. Rico et al. (2014a) forneceram um suplemento com 97,9% de C16:0 e outro com 97,4% de ácido esteárico (C18:0) e, observaram aumento na eficiência alimentar (1,48 vs. 1,40), na concentração (3,66 vs. 3,55%) e produção (1,68 vs. 1,59 kg/d) de gordura do leite, e na produção de leite corrigida para 3,5% do teor de gordura (47,5 vs. 45,6 kg/d), quando comparado o C16:0 com o C18:0. No entanto, os genes envolvidos na síntese do leite não foram mensurados, e os autores sugeriram a realização de um futuro trabalho para entender o papel dos AG na regulação da lipogênese mamária. Para o nosso conhecimento, não existem estudos com ovelhas que tenham avaliado os efeitos da suplementação de um suplemento de ácido palmítico puro, seja *in vivo* ou *in vitro*.

A revisão de Grummer (1991) descreveu que a suplementação de gordura geralmente diminui a proporção de AG *de novo* (C6:0 a C16:0) na gordura do leite de forma linear com o aumento da suplementação de gordura. Esses efeitos foram relatados com fornecimento de suplementos de AG saturados e insaturados (BANKS et al., 1976; CLAPPERTON & BANKS, 1985). Lock et al. (2013) relataram que as concentrações de todos os AG de C6:0 a C14:1 cis-9 do leite diminuiriam como resultado do fornecimento de um suplemento rico em ácido palmítico (~85%) para vacas leiteiras. Neste âmbito, nós hipotetizamos que os efeitos da suplementação de C16:0 em explantes de glândula mamária ovina lactante cultivados *in vitro* envolverão diminuição da expressão de genes envolvidos na síntese *de novo* e, aumento da expressão de genes envolvidos nas fases de captação, interiorização, transporte intracelular e dessaturação de AG.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O USO DE GORDURAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

As gorduras estão presentes em pequenas quantidades (menos de 50 g/kg MS) na maioria dos alimentos naturais disponíveis para alimentação animal, exceto nos grãos das oleaginosas. No entanto, suplementos lipídicos são usados em rações por razões nutricionais ou econômicas para aumentar o nível de energia nas dietas. Devido ao seu elevado valor energético, os suplementos lipídicos podem contribuir para atender as necessidades energéticas dos animais (DOREAU & CHILLIARD, 1997). Essa tem sido uma das estratégias nutricionais empregadas para reduzir o tempo em que os animais permanecem em balanço energético negativo (BEN) e para dar suporte à produção de leite. De maneira geral, a suplementação lipídica pode aumentar a produção de leite, o teor e/ou a produção de gordura e melhorar a eficiência da produção leiteira (ALLEN, 2000).

As principais sementes de oleaginosas comumente usadas na ração de ruminantes são o caroço de algodão, soja tostada, girassol e canola, todas ricas em ácidos graxos insaturados (AGI) (KONONOFF et al., 2004). Ainda, óleos extraídos dessas sementes e outros subprodutos de plantas são fontes comuns de gordura em rações. No entanto, justamente por conter substanciais níveis de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) rapidamente disponíveis que podem atrapalhar a fermentação ruminal e digestibilidade da fibra, seu uso nas dietas se torna limitado (JENKINS, 1993). Diante disso, muitos trabalhos têm focado em métodos para incluir gordura adicional na dieta sem alterar a função do rúmen. As estratégias utilizadas para incorporar gordura à dieta são a proteção dos AGI da ação microbiana ruminal e suplementação com ácidos graxos altamente saturados (JENKINS & McGUIRE, 2006).

Existem processos químicos que “protegem” a gordura da ação dos microrganismos ruminais fazendo com que a digestão ocorra apenas no trato digestivo inferior e os produtos assim disponíveis no mercado são os chamados “bypass” (NAIK, 2013). Contudo, ainda assim, seu uso pode apresentar algumas restrições, como por exemplo, os sais de cálcio de ácidos graxos, uma das formas de gordura bypass menos degradáveis no rúmen e bastante utilizada (ELMEDDAH et al., 1991), para que seja inerte no rúmen, o pH ruminal deve ser mantido acima de 5,5 (CHALUPA et al., 1986).

O fornecimento de suplementos ricos em ácidos graxos saturados (AGS) pode ser bastante útil por serem mais inertes ao metabolismo ruminal (GRUMMER, 1988;

PALMQUIST & JENKINS, 1980). Harvatine e Allen (2006) relataram que a concentração e a produção de gordura do leite diminuíram linearmente à medida que o grau de insaturação de um suplemento lipídico aumentava na dieta. Rico et al. (2014b) reportaram que um suplemento contendo 84,8% de ácido palmítico apresentou menor risco de induzir depressão na gordura do leite, quando comparado com um produto contendo apenas 47,4% fornecido à vacas de alta produção. Em outro estudo, Relling e Reynolds (2007) adicionaram um suplemento com 87% de AGS a 3,5% do consumo de MS da dieta de vacas leiteiras e observaram um aumento na porcentagem e produção de gordura do leite em comparação com os tratamentos contendo 58% de AGPI (sais de Ca de AG de óleo de soja) e 36% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI; sais de Ca de AG de óleo destilado de palma).

### **2.1.1 O uso de ácidos graxos específicos**

#### *2.1.1.1 O efeito da suplementação com ácido palmítico em ruminantes*

Resultados positivos e variáveis têm sido obtidos com suplementação de gordura altamente saturada em dietas de ruminantes, como no estudo desenvolvido por Mosley et al. (2007), onde foi observado um aumento linear na produção de gordura do leite e incorporação de C16:0 na gordura do leite quando a inclusão de um suplemento rico em ácido palmítico (86,6%) aumentou de 1,8 para 5,2% do consumo de MS da dieta de vacas leiteiras. Esse potencial de maximizar as respostas dos animais durante a lactação pelo uso de gorduras saturadas justifica o interesse em entender os efeitos do uso de AGS específicos, pois podem afetar o desempenho geral do animal e a composição do leite e, portanto, estão intimamente relacionados com a rentabilidade da atividade (RICO, 2013).

Utilizando um suplemento contendo 85% de C16:0, Lock et al. (2013) observaram um aumento de 8,6% na eficiência de produção e um aumento de 7,2% no teor de gordura do leite, sendo atribuído ao aumento de ácidos graxos com 16 carbonos secretados no leite. Um trabalho do nosso grupo, desenvolvido por Tódero et al. (2016) mostrou um aumento de 8,3% no teor de gordura do leite de vacas que receberam um suplemento lipídico contendo 88% de ácido palmítico quando comparado com um grupo controle sem suplementação lipídica. Já Piantoni et al. (2013) também destacaram a falta de estudos com suplementação de ácidos graxos puros e forneceram a vacas em lactação um suplemento contendo 99% de C16:0 e obtiveram aumentos na produção de leite (2,5%) e no teor de gordura do leite (3,3%).

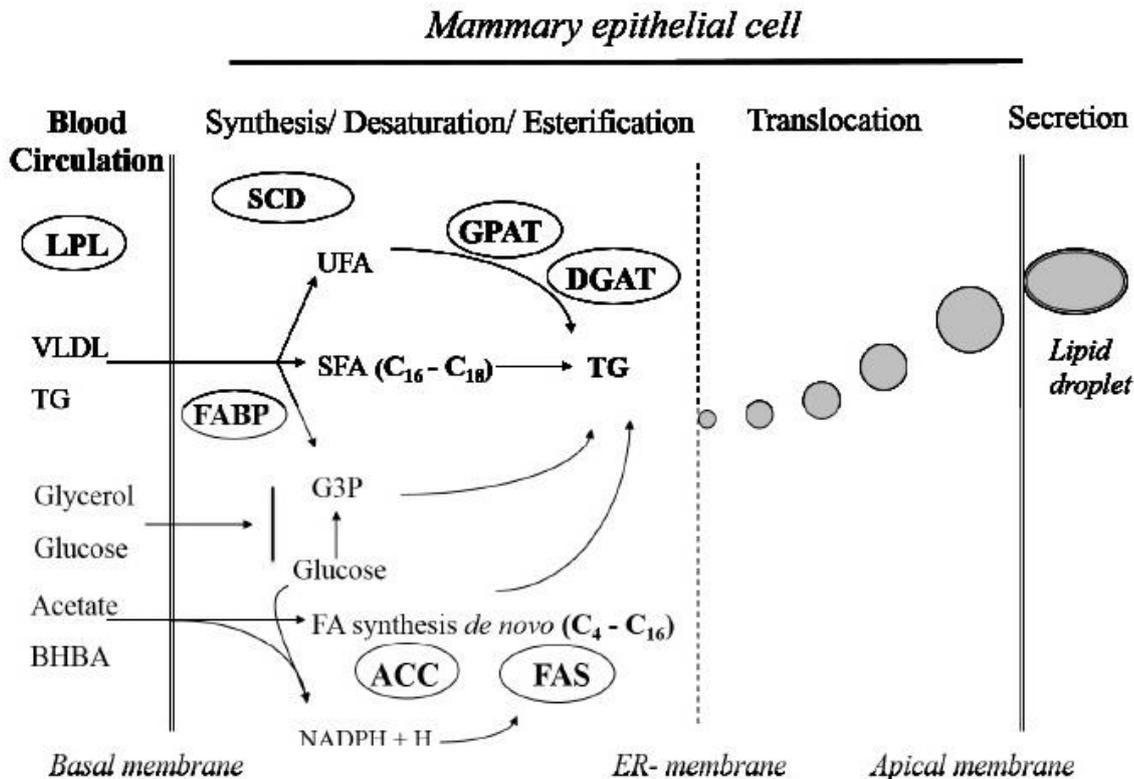
Em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (BALDIN et al., 2017), observou-se maior concentração (0,29 unidades percentuais) de gordura no leite de ovelhas que receberam um suplemento com 46% de ácido palmítico comparando-se com um suplemento rico em AGPI. A literatura dispõe de vários estudos avaliando os efeitos do sabão de cálcio de ácidos graxos sobre o desempenho de ovelhas leiteiras (Gargouri et al., 2006; compilado de 18 trabalhos); contudo, experimentos que avaliaram o uso de gorduras altamente saturadas ou de ácidos graxos específicos são escassos.

## 2.2 SÍNTESE DE GORDURA NA GLÂNDULA MAMÁRIA

A gordura do leite é composta por cerca de 98% de triglicerídeos (TG), dos quais aproximadamente 95% são AG e menos de 1% são fosfolipídeos, com pequenas quantidades de colesterol, 1,2-diacilglicerol, monoacilglicerol e AG livres (BERNARD et al., 2008). Apesar das proporções muito diferentes de gordura no leite entre espécies, as células epiteliais secretoras dos alvéolos mamários de todas as espécies utilizam os mesmos mecanismos para produzir uma proporção constante de triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol no leite (DILS, 1986).

Sabe-se que a síntese de gordura do leite depende da atividade coordenada de enzimas envolvidas na captação de substratos, lipogênese *de novo*, transporte, dessaturação e esterificação de ácidos graxos, formação, transporte e excreção da gotícula de gordura (ver Figura 1; WRIGHT et al., 2006). Nos ruminantes, os AG provêm de duas fontes, que em condições de balanço energético positivo (BEP), contribuem igualmente (em base molar) para a composição da gordura do leite: AG da síntese *de novo* formados nas células do epitélio mamário e AG pré-formados oriundos da dieta captados da circulação sanguínea (HAWKE & TAYLOR, 1995). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; 4 a 8 carbonos) e cadeia média (AGCM; 10 a 14 carbonos) surgem quase exclusivamente da síntese *de novo*. Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL; >16 carbonos) são derivados da absorção de lipídeos circulantes e os ácidos graxos de 16 carbonos de comprimento são originários de ambas as fontes (BAUMAN & GRIINARI, 2003).

Figura 1 — Principais processos relacionados ao metabolismo lipídico em células epiteliais mamárias.



Fonte: RICO, 2013

É mostrada a captação de AG da circulação sanguínea, dessaturação de AG de cadeia longa, síntese *de novo* de AG e secreção de glóbulos de gordura do leite. Abreviações: lipoproteína lipase (LPL); esteroil CoA dessaturase (SCD); proteína de ligação de ácidos graxos (FABP); acetil CoA carboxilase alfa (ACC- $\alpha$ ); ácido graxo sintase (FAS); glicerol-3 fosfato acil transferase (GPAT); diacilglicerol aciltransferase (DGAT); triglicerídeos (TG).

### 2.2.1 Síntese *de novo*

A lipogênese *de novo* ocorre no citoplasma da célula da glândula mamária de ruminantes lactantes e é um processo cíclico sequencial no qual as unidades de acetil são continuamente adicionadas a um "iniciador", usualmente o acetil CoA, mas podendo ser usado também o  $\beta$ -hidroxibutirato (BAUMAN & DAVIS, 1974). Diferente dos monogástricos, que utilizam a glicose como fonte de carbono, nos ruminantes, o acetato gerado da fermentação ruminal de carboidratos, é a principal fonte de carbono e o  $\beta$ -hidroxibutirato, produzido pelo epitélio do rúmen a partir do butirato absorvido, fornece cerca

de metade dos primeiros quatro carbonos utilizados na síntese *de novo* dos AG do leite (BAUMAN & GRIINARI, 2003).

Um passo importante na síntese de AG é catalisado pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC; WRIGHT et al., 2006). São encontradas as formas alfa e beta da ACC em animais (KIM, 1997), sendo que a alfa é a forma encontrada em tecidos lipogênicos e regula a taxa de síntese dos AG; já a beta é encontrada em tecidos não lipogênicos e está associada com o controle da oxidação dos AG (DRACKLEY, 2000). A ACC- $\alpha$  é responsável pela formação de malonil-CoA, o substrato intermediário necessário para o alongamento da cadeia dos AG realizado pela enzima multifuncional ácido graxo sintase (FASN; SMITH, 1994).

Inicialmente, foi demonstrada a existência de três regiões promotoras no gene da ACC: PI, PII e PIII; sendo que são expressos em diferentes tecidos. O uso do PIII é limitado ao pulmão, fígado, rim, cérebro e predominantemente a glândula mamária em lactação nas espécies bovina (MAO et al., 2002) e ovina (BARBER et al., 2003). A expressão do PII é universal, com uma expressão elevada na glândula mamária em lactação. O PI é preferencialmente utilizado no tecido adiposo e no fígado sob condições lipogênicas, e na glândula mamária bovina em lactação (MAO et al., 2001), enquanto na glândula mamária ovina, sua contribuição é baixa ou ausente (2%; MOLENAAR et al., 2003).

A FASN catalisa a condensação de malonil-CoA oriundo da reação da ACC com acetil-CoA e butiril-CoA, depois disso ocorrem outros ciclos de redução e condensação até a formação do ácido graxo saturado C16:0, o principal produto da reação da FASN. Contudo, a ácido graxo sintase de ruminantes possui atividade de aciltransferase de cadeia média também; a glândula mamária dessas espécies, através da FASN são as únicas que possuem capacidade de esterificar butiril-CoA (C4:0-CoA) e hexanoil-CoA (C6:0-CoA) na posição sn-3 do glicerol. Ainda, há enzimas acil-tioesterases, que são responsáveis pela interrupção do alongamento da cadeia de AG, uma vez que ele tenha atingido determinado comprimento. A cadeia de acil-tioesterase é associada com o complexo FASN e libera tioesteres acil-CoA. Juntos, esses fatores são responsáveis pela alta proporção de cadeias curtas e médias de AG nos TG do leite (BARBER et al., 1997; BIONAZ & LOOR, 2008b; DILS, 1986).

### **2.2.2 Ácidos graxos pré-formados**

Os ácidos graxos pré-formados absorvidos pela glândula mamária e diretamente utilizados para a síntese da gordura do leite são derivados de lipoproteínas circulantes (lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL e quilomicron) e ácidos graxos não

esterificados (AGNE) que se originam da absorção de lipídeos do trato digestivo e da mobilização de reservas de gordura corporal, respectivamente (BARBER et al., 1997; BAUMAN & DAVIS, 1974). Em ruminantes, os AG que são captados da circulação são oriundos maioritariamente da absorção intestinal de ácidos graxos derivados da dieta e do metabolismo ruminal. Comumente, os AG provindos da lipólise e da mobilização da gordura corporal constituem menos de 10% da gordura do leite. Já em situações que os animais se encontram em BEN, a parcela dos ácidos graxos mobilizados aumenta de acordo com a dimensão do déficit de energia (BAUMAN & GRIINARI, 2001). Três quartos dos TG de lipoproteínas intestinais são usados pela glândula mamária em lactação (PALMQUIST, 2006).

A captação intracelular dos AG depende da ação da lipoproteína lipase (LPL), a qual realiza a ancoragem do VLDL ou quilomicrons ao endotélio mamário e, seguidamente, hidrolisa os TG no núcleo da lipoproteína liberando AG desesterificados para que sejam internalizados (FIELDING & FRAYN, 1998). Bionaz e Loor (2008b) observaram que o padrão de expressão de LPL mamária de bovinos foi notavelmente similar à curva de lactação, o que pode ser indicativo de um papel importante desse gene na manutenção da síntese do leite.

Após a desesterificação, inicia a passagem dos AG para o interior da célula, que pode ocorrer através de proteínas que captam e transportam os AG, pelo mecanismo “flip-flop” ou por difusão passiva dos AG através das membranas, sendo este último de menor importância quando comparado aos anteriores. O translocador de ácido graxo (CD36) e proteínas de transporte de ácidos graxos (SLC27A) estão entre as principais proteínas envolvidas no transporte de AG (DOEGE & STAHL, 2006). Bionaz e Loor (2008b) mensuraram o mRNA da CD36 em vacas lactantes e verificaram um aumento na expressão (>8 vezes) durante a lactação, o que confirma um papel importante para CD36 na síntese de gordura do leite. Em outro estudo, os mesmos autores detectaram aumento da expressão da SLC27A6 durante o primeiro mês de lactação, sugerindo um papel da mesma na captação de AGNE (BIONAZ & LOOR, 2008a).

#### *2.2.2.1 Ativação e transporte intracelular de ácidos graxos*

Após a entrada dos AG na célula epitelial mamária, antes de atuarem nas vias metabólicas os AGCL são esterificados à coenzima A na face interna da membrana plasmática. Essa ativação dos AG é realizada por isoformas da família acil-CoA sintetase de

cadeia longa (ACSL) (MASHEK & COLEMAN, 2006). Bionaz e Loor (2008b) avaliaram tecido mamário bovino e verificaram que o mRNA da ACSL1 é o que prevalece entre as isoformas de ACSL, já que sua concentração aumentou consideravelmente no início da lactação, indicando a relevância dessa isoforma no processo de síntese de gordura do leite.

O transporte e direcionamento seletivo dos AGCL para organelas específicas acontece de forma rápida e para isso são necessários transportadores específicos, tais como a proteína de ligação de ácidos graxos (FABP) e proteína de ligação de acil-CoA (ACBP), os principais transportadores envolvidos nesse caso (McARTHUR et al., 1999). As FABPs controlam a homeostase intracelular de lipídeos, regulando o transporte de AG no compartimento nuclear e extra nuclear da célula, e com isso, também influenciam na homeostase energética sistêmica (STORCH & McDERMOTT, 2009).

Bionaz e Loor (2008a) confirmaram a predominância de mRNA da isoforma FABP3 na glândula mamária da vaca. Nesse ensaio, a expressão das isoformas FABP3, FABP4 e FABP5, foi aumentada pelo início da lactação e apresentaram aumentos (1 a 78 vezes) em relação aos níveis encontrados no pré-parto. Esses resultados, segundo aqueles autores, sugeriram um papel importante da FABP3 e um papel menor da FABP4 e FABP5, na síntese de lipídeos mamários em bovinos. Os autores sugeriram ainda, que, a FABP3 em cooperação com a ACSL1 e a SLC27A6, direcionam AGCL para a esterificação em TG do leite. Esta suposição é sustentada pela associação física e coexpressão de FABP3 com CD36 encontrada por Spitsberg et al. (1995), assim como pela grande afinidade de ligação de FABP3 ao ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico, que são 3 dos mais abundantes AGCL do leite bovino (LOOR et al., 2005).

#### 2.2.2.2 Dessaturação dos ácidos graxos

Os AGMI, principalmente o ácido oleico (C18:1), estão entre os principais componentes da gordura do leite de ruminantes (JENSEN, 2002), contudo, sabe-se que boa parte dos AG captados e sintetizados pela glândula mamária é saturada. A enzima primária envolvida na síntese de AGMI a partir da dessaturação de AGS é a esteroil-CoA dessaturase (SCD). Essa enzima está presente em vários tecidos animais, ligada à membrana do retículo endoplasmático e é responsável por introduzir uma dupla ligação *cis* na posição  $\Delta 9$  (entre os carbonos 9 e 10) em uma ampla variedade de AG. Nesse processo, o C18:0 e o C16:0 são convertidos a C18:1 *cis*-9 (oleico) e a C16:1 *cis*-9 (palmitoleico), respectivamente (BIONAZ & LOOR, 2008b; NTAMBI & MIYAZAKI, 2004). A glândula mamária ruminante lactante

parece não ter a capacidade de alongar o ácido palmítico (ANNISON et al., 1967) e, portanto, todo o ácido esteárico é derivado do plasma, proveniente da dieta ou da lipólise do tecido adiposo (KINSELLA, 1970).

Duas isoformas da SCD foram caracterizadas em bovinos, 1 e 5, sendo que a primeira é abundantemente expressa na glândula mamária e desempenha um papel eminente na produção de gordura do leite (BERNARD et al., 2008; BIONAZ & LOOR, 2008b).

### **2.2.3 Síntese de triglicerídeos e gotículas lipídicas do leite**

Para serem incorporados no leite, os AG devem constituir os TG, já que aproximadamente 98% da gordura do leite é apresentada sob esta forma (BERNARD et al., 2008). O glicerol-3-fosfato exigido para a esterificação de ácidos graxos é gerado pela glicólise ou via fosforilação de glicerol livre pela glicerol quinase (KINSELLA, 1968; McBRIDE & KORN, 1964).

Em mamíferos, os AG não são distribuídos aleatoriamente nas posições sn-1, sn-2 e sn-3 do esqueleto de glicerol dos TG; esta distribuição não aleatória determina atributos funcionais e nutricionais do leite (GERMAN et al., 1997). Em bovinos, uma proporção elevada (56-62%) de AG esterificados nas posições sn-1 e sn-2 do esqueleto de glicerol são saturados de cadeia média e longa (C10:0 a C18:0), com C16:0 igualmente distribuído entre sn-1 e sn-2, C8:0, C10:0, C12:0 e C14:0 mais localizados em sn-2 e C18:0 mais localizado em sn-1. Além disso, cerca de 24% dos AG esterificados na posição sn-1 é C18:1. Finalmente, uma alta proporção de AG esterificados na posição sn-3 é de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0; 44%) e ácido oleico (27%) (JENSEN, 2002; SMALL, 1991).

O primeiro passo na biossíntese de TG é a esterificação de glicerol-3-fosfato na posição sn-1 (conversão de glicerol 3-fosfato e acil-CoA em ácido lisofosfatídico), que é catalisada pela glicerol-3 fosfato acil transferase (GPAT; COLEMAN & LEE, 2004). Quatro isoformas da GPAT podem estar envolvidas nesta via. A GPAT sempre foi considerada como limitante na via da síntese de glicerolípideos e na regulação do fluxo de ácidos graxos. Parece provável que a biossíntese dos dois principais componentes das gotículas lipídicas, a monocamada de fosfolípideos e os TG do núcleo, deve ser sincronizada. Assim, é provável que as diferentes isoformas de GPAT funcionem de forma coordenada para sintetizar esses lipídeos (WENDEL et al., 2009).

O segundo passo da síntese de triglicerídeos é executado pela acilglicerol fosfato aciltransferase (AGPAT; BERNARD et al., 2008) e compreende a conversão de ácido

lisofosfatídico em ácido fosfatídico, adicionando um grupo acil à posição sn-2 do esqueleto de glicerol (TAKEUCHI & REUE, 2009). A AGPAT tem uma afinidade maior por acil-CoA saturados na ordem C16>C14>C12>C10>C8 (MARSHALL & KNUDSEN, 1977), o que está de acordo com a alta proporção observada de AGS de cadeia média e longa na posição sn-2 dos TG, com palmítico como AG principal (representando 43% do ácido palmítico total encontrado no triglicerídeo). A disponibilidade de substrato na glândula mamária bovina e ovina também é um fator para a composição de AG na posição sn-2, permitindo sua manipulação em certa medida por fatores nutricionais, em interação com a afinidade do substrato (MISTRY & MEDRANO, 2002).

A terceira enzima envolvida na síntese de TG, diacilglicerol aciltransferase (DGAT), é a única proteína que é específica para a síntese de triglicerídeo e, portanto, pode desempenhar um importante papel regulatório (MAYOREK et al., 1989; BERNARD et al., 2008). A DGAT esterifica os ácidos graxos de cadeia longa e de cadeia curta na posição sn-3 (SMITH et al., 2000).

Os TG são secretados como gotículas de tamanhos variáveis. Estas gotículas são revestidas com uma membrana de proteínas e lipídeos polares. No leite de vacas, 99% ou mais dos lipídeos totais fundem-se nessas gotículas, que são chamadas de gordura do leite ou glóbulos lipídicos do leite. Mais de 95% dos lipídeos totais desses glóbulos são os TG, com quantidades menores de glicerídeos parciais, esteróis, fosfolipídeos, glicolipídeos e hidrocarbonetos (KEENAN & PATTON, 1995; MATHER & KEENAN, 1998).

#### **2.2.4 Regulação das enzimas da síntese de lipídeos**

Baumgard et al. (2002) sugeriram que vários genes envolvidos na síntese de gordura do leite na glândula mamária bovina podem compartilhar um mecanismo regulatório comum. Os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão de genes-chave são as proteínas de ligação de elementos reguladores de esterol (SREBPs) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs) (CLARKE, 2001).

As SREBPs são uma família de fatores de transcrição que combinadas à proteína de clivagem-ativação da SREBP (SCAP) regulam a homeostase lipídica controlando a expressão de uma série de enzimas necessárias para a síntese de colesterol, AG, TG e fosfolipídeos endógenos (EBERLÉ et al., 2004). Existem as isoformas 1a e 1c da SREBP, sendo que a 1c regula predominantemente as enzimas envolvidas na síntese de gordura e espera-se que seja o transcrito predominante expresso no tecido mamário. No entanto, devido à quantidade

limitada de sequência disponível, os trabalhos referem-se a ambas isoformas coletivamente como SREBP1 (HARVATINE & BAUMAN, 2006).

A proteína SREBP1 é complexada com a SCAP e ancorada no retículo endoplasmático por associação com uma terceira proteína, a proteína induzida por insulina (INSIG). A SREBP é ativada quando a INSIG é dissociada do complexo SREBP/SCAP, permitindo a translocação para o complexo de Golgi, onde ocorre liberação de um fragmento nuclear (nSREBP). Por sua vez, o nSREBP é translocado para o núcleo onde se liga a elementos reguladores de esterol nas regiões promotora/intensificadora de genes alvo, recruta coativadores e estimula a transcrição dos genes alvo (EBERLÉ et al., 2004; HUSSEIN et al., 2013).

Os PPARs englobam um grupo de receptores nucleares com três isoformas, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  e PPAR- $\gamma$ , sendo este último o mais estudado em ruminantes (BIONAZ et al., 2013). Os fatores de transcrição PPARs são dependentes de ligantes e regulam a expressão gênica através da ligação aos elementos de resposta do proliferador de peroxissomo (PPERs) dos genes alvos. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero formado junto com o receptor retinóide X (RXR). Com a ligação de um agonista, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, permitindo a ligação com o gene alvo e promovendo a transcrição do mesmo (BERGER & MOLLER, 2002).

Apesar de possuir maior expressão no tecido adiposo de ruminantes, o metabolismo lipídico na glândula mamária desses animais parece ser controlado, pelo menos em parte, pelo PPAR- $\gamma$ , uma vez que se observou aumento da sua expressão na glândula mamária de vacas, entre a prenhez e a lactação (BIONAZ & LOOR, 2008b). Nesse mesmo estudo, os autores observaram um grande aumento na expressão de uma rede de genes potencialmente envolvidos na síntese de gordura do leite e na maioria dos genes alvo de PPAR- $\gamma$ . Sobre esse aspecto, Kadegowda et al. (2009) constataram que o PPAR- $\gamma$  controla a expressão de genes-chave envolvidos na síntese de gordura do leite, incluindo SREBF1 (que codifica a SREBP1), sugerindo que SREBF1 é um gene alvo de PPAR- $\gamma$  em ruminantes. Assim, os autores sugeriram uma ação em conjunto entre a SREBP1 e PPAR- $\gamma$  no controle da síntese da gordura do leite.

### 2.3 O USO DE MODELOS *IN VITRO*

Estudos transcriptômicos complexos que investigam mecanismos que influenciam o metabolismo da glândula mamária geralmente envolvem experimentos *in vivo*. Contudo, os tratamentos *in vivo* podem ter efeitos sistêmicos que tornam difícil prever o controle do ambiente das células epiteliais (ROSE & McCONOCHE, 2006). Por esse motivo, um modelo *in vitro* adequado mimetizando a função da glândula mamária é uma ferramenta importante para o estudo das funções fisiológicas da mesma.

As incubações de tecidos mamários (pedaços ou explantes) ou a cultura de ácinos ou organoides isolados (estruturas epiteliais isoladas de alvéolos ou ductos) e células epiteliais isoladas (primárias ou imortalizadas) têm uma longa história no estudo da proliferação e diferenciação de células mamárias e biossíntese de componentes do leite (AKERS, 2017). Na década de 70, incubações de explantes (RIVERA, 1972) de animais prenhes ou tratadas com estrogênio e progesterona foram especialmente importantes na identificação de hormônios necessários para induzir a diferenciação celular secretória (estrutural e bioquímica) necessária para a síntese e secreção do leite (AKERS, 2017).

Apesar das limitações em obter consistentemente tecido de espécies não comumente usadas em laboratório, sob condições controladas (por exemplo, idade do animal, estágio de desenvolvimento glandular e paridade), sabe-se que as células primárias ou os explantes de tecido são provavelmente mais representativos do sistema *in vivo*, quando comparadas a linhagens celulares imortalizadas, devido à proximidade temporal com os tecidos/células originais possuindo, provavelmente, um ambiente molecular mais semelhante (HOSSEINI et al., 2013). Quando comparado com células isoladas, o explante preserva a composição do tecido mamário, a estrutura tridimensional (3D) e a matriz extracelular; fatores essenciais para obter um epitélio mamário lactante totalmente funcional (MUSCHLER & STREULI, 2010).

Hosseini et al. (2013) verificaram a expressão de genes e observaram que o tecido mamário em comparação com as células MAC-T apresentou uma maior expressão de genes envolvidos no anabolismo lipídico (particularmente síntese da gordura do leite). Neste mesmo estudo, a análise dos genes selecionados indicou claramente que as células MAC-T cultivadas em um sistema bidimensional (2D) não se parecem muito com o tecido mamário em lactação, particularmente para a função que o tecido mamário faz melhor: sintetizar o leite. Os autores sugeriram que as células MAC-T podem ser um modelo adequado para estudar a regulação da síntese de proteínas do leite, mas não são tão sensíveis em comparação com o tecido mamário para estudos da regulação da síntese da gordura do leite.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBEJETIVO GERAL

Verificar o efeito do ácido palmítico na expressão de genes e fatores de transcrição envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o ácido palmítico é capaz de alterar a expressão de genes envolvidos na síntese *de novo* (ACC- $\alpha$  PII, ACC- $\alpha$  PIII e FASN), internalização (CD36), transporte intracelular (FABP 3 e 4) e dessaturação (SCD) de ácidos graxos.

- Mensurar alterações provocadas pelo C16:0 em um dos fatores de transcrição (PPAR- $\gamma$ ) envolvidos na regulação de genes responsáveis pela síntese da gordura do leite.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UEDESC), protocolo número 3799150316.

### 4.1 ANIMAIS, BIÓPSIAS E TRATAMENTOS

Foram realizados cultivos de explantes mamários de três ovelhas da raça Lacaune pertencentes à Fazenda Estrela da Serra, localizada em Bom Retiro - SC, com 40 ( $\pm$  6) dias em lactação (DEL) e escore de condição corporal (ECC) de 3,25 ( $\pm$  0,25; escala de 1 a 5). As amostras foram obtidas através de biópsia sob prévia anestesia local com 2 mL cloridrato de lidocaína, realizada no ponto médio da metade direita ou esquerda do úbere, utilizando agulha co-axial (Hospifer; Porto Alegre, RS, Brasil) e instrumento específico para biópsia Bard Max-Core (Bard Biopsy Systems; Covington, GA, EUA). Após o procedimento, os três animais foram submetidos à aplicação de antiinflamatório (Flunixin Meglumine - 1,1 mg/kg).

As amostras foram armazenadas em meio de cultivo, alocadas em caixa de isopor com gelo e transportadas imediatamente para o laboratório do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA-CAV/UEDESC). Os explantes pesavam em média 30 mg ( $\pm$  0,005) e foram cultivados em placas de seis poços (Nunclon; Nunc, Roskilde, Denmark), em sextuplicatas, em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> no ar e atmosfera com umidade saturada, durante 24 horas, utilizando os seguintes tratamentos:

1) Controle: 390  $\mu$ l de meio de cultivo + 10  $\mu$ l de albumina bovina na concentração de 75  $\mu$ M (BSA, 98%; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

2) Ácido palmítico: 390  $\mu$ l de meio de cultivo + 10  $\mu$ l de ácido palmítico na concentração de 75  $\mu$ M (99%; Nu-Chek; Elysian, MN, EUA) + albumina bovina (98%; BSA).

O meio de cultivo utilizado era semelhante ao de Peterson et al. (2004), composto por meio de crescimento de célula epitelial mamária (99,2 %; MEGM, Lonza; Basileia, Suíça), extrato de pituitária (0,4%), insulina (0,1%), gentamicina/anfotericina (0,1%), fator de crescimento epidérmico (EGF; 0,1%) e hidrocortisona (0,1%). O meio era isento de soro fetal bovino e foi suplementado com albumina bovina (0,1% - BSA, 98%; Sigma-Aldrich). O ácido palmítico foi diluído de acordo com protocolo adaptado de Keating et al. (2008) e Huynh et al. (2014), utilizando-se KOH (Synth; Diadema, SP, Brasil) e albumina bovina (BSA, 98%; Sigma-Aldrich).

#### 4.2 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Após as 24h de cultivo, os explantes foram retirados das placas, alocados em tubos contendo QiAzol Lysis Reagent (Qiagen Sciences; Germantown, MD, EUA) e submetidos a “moagem” com homogeneizador de tecidos portátil (Scienlabor - Ribeirão Preto, SP, Brasil) para posterior extração do RNA total, que foi realizado com a utilização do Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences). A possível contaminação por DNA foi removida por tratamento com DNase (Sigma-Aldrich) “on column”. A pureza do RNA foi verificada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop, ND-2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) e a qualidade avaliada através da relação  $A_{260/280 \text{ nm}}$  que foi  $\sim 2,03 (\pm 0,01)$ . Posteriormente realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) com “random primers” em aparelho termociclador (MJ96+, Biocycler; Biosystems Importadora, Curitiba - PR, Brasil).

O RT-qPCR foi realizado em triplicatas, em placa de 48 poços (Micro Amp, Applied Biosystems), com volume de reação de 15  $\mu\text{L}$ , sendo 5  $\mu\text{L}$  (30 ng) de cDNA e 10  $\mu\text{L}$  de GoTaq qPCR Master Mix (Promega; Madison, WI, EUA), no aparelho StepOne Real-Time (Applied BioSystems), com o uso de “primers” específicos para cada um dos genes avaliados. Os dados foram analisados com o software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems). As curvas de dissociação foram geradas no final de cada execução para verificar a presença de um único produto. Todas as amostras foram executadas com uma curva padrão de sete pontos com um “pool” de cDNA de todas as amostras com diluição seriada (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625%). Posteriormente, uma equação de regressão foi gerada ao traçar os valores de limiar do ciclo de RT-qPCR em relação ao log de cada valor da curva padrão. A inclinação (b) da equação descreveu a eficiência da reação. Todas as reações apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98 e eficiência entre 90 e 110%.

#### 4.3 DESENHO DOS PRIMERS

As sequências de primers foram obtidas a partir de estudos publicados ou do GenBank (NCBI; Bethesda, MD, EUA), sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad; CA, EUA) e validados quanto a especificidade, linearidade e eficiência antes da utilização. A expressão gênica dos genes e fatores de transcrição discriminados na Tabela 1 foi mensurada.

Tabela 1 — Primers ovinos usados nas análises de RT-qPCR.

Genes	Forward (F) e reverse (R) <sup>1</sup>	Referência/Acesso
ACC- $\alpha$ PII <sup>2</sup>	F: GCCTTGAGCTCTGAGGGCTC, R: CACGGAGCCAATTATGAATCG	Ticiani et al. (2016)
ACC- $\alpha$ PIII <sup>3</sup>	F: CTGCAGCAGGAGGACGAACT, R: TCCGCAGAACCCTCCATATC	Ticiani et al. (2016)
BACT <sup>4</sup>	F: GCCTTTGCCATCACTGCAAT, R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	Ticiani et al. (2016)
CD36 <sup>5</sup>	F: TGTGTTTGGAGGGATTCT R: CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG	Hussein et al. (2013)
FABP3 <sup>6</sup>	F: GGACAGCAAGAATTTTCGATGA R: CGATGATTGTGGTAGGCTTG	Hussein et al. (2013)
FABP4 <sup>7</sup>	F: ATGGCCAAACCCACTGTGAT, R: GGCCCAATTTGAAGGACATCT	NM_001114667.1
FASN <sup>8</sup>	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA, R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	Ticiani et al. (2016)
PPAR- $\gamma$ <sup>9</sup>	F: AAGAGCCTTCCAACCTCCCTCA, R: CCGGAAGAAACCCTTGCAT	Hussein et al. (2013)
RPS18 <sup>10</sup>	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA, R: CGGATGTGCGACGTCACACTT	Ticiani et al. (2016)
SCD1 <sup>11</sup>	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG, R: CATGAGGATGATGTTTCTCCAAAC	Hussein et al. (2013)

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

<sup>1</sup>Os primers são reportados como sequência 5' - 3'; <sup>2</sup>Acetil-CoA carboxilase alfa – Promotor II; <sup>3</sup>Acetil-CoA carboxilase alfa – Promotor III; <sup>4</sup> $\beta$ -actina; <sup>5</sup>Translocador de ácidos graxos; <sup>6</sup>Proteína de ligação de ácidos graxos – Isoforma 3; <sup>7</sup>Proteína de ligação de ácidos graxos – Isoforma 4; <sup>8</sup>Ácido graxo sintase; <sup>9</sup>Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama; <sup>10</sup>Proteína ribossômica S18; <sup>11</sup>Estearoil-CoA dessaturase – Isoforma 1.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute; Cary, NC, EUA, versão 9.2, 2009), utilizando o procedimento MIXED. O modelo utilizado incluiu o tratamento como efeito fixo e as amostras como aleatório. Foi utilizado como co-variável a

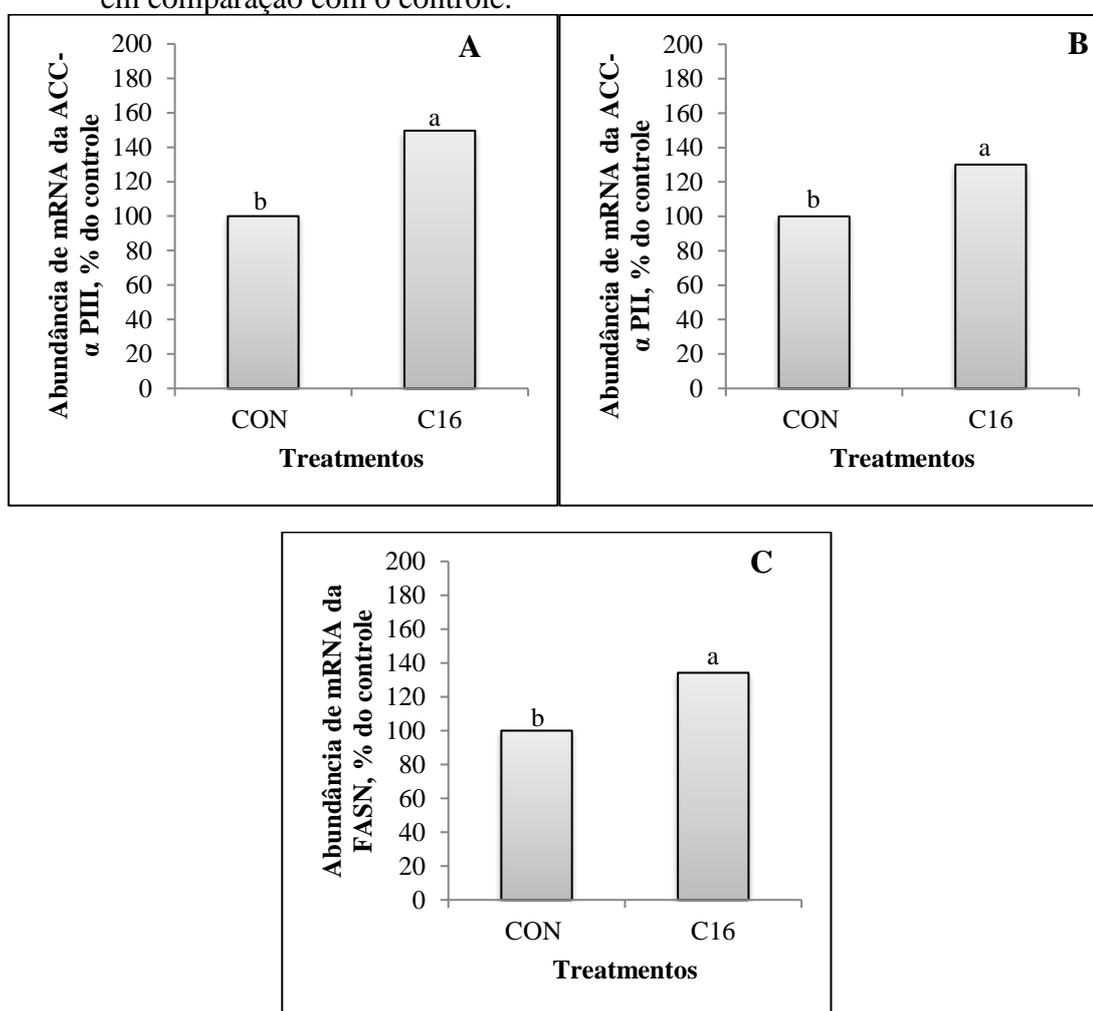
média geométrica dos “housekeeping” proteína ribossômica S18 (RPS18) e Beta-actina (BACT) (VANDESOMPELE et al., 2002).

Os valores de resíduos estudentizados fora de  $\pm 2,5$  foram considerados “outliers” e excluídos da análise. Quando necessário, os dados foram transformados para log<sub>2</sub> e reportados transformados de volta aos valores originais. O LSMEANS foi usado para comparar os tratamentos, sendo a significância declarada em  $P < 0,05$  e a tendência em  $P < 0,10$ .

## 5 RESULTADOS

Nenhum dado foi excluído da análise estatística como outlier. O ácido palmítico aumentou a expressão gênica da ACC- $\alpha$  PIII em 1,5 vezes ( $P=0,05$ ; ver Figura 2A), ACC- $\alpha$  PII em 1,3 vezes ( $P=0,002$ ; ver Figura 2B) e FASN em 1,34 vezes ( $P=0,05$ ; ver Figura 2C) quando comparado com o tratamento controle.

Figura 2 — Abundância dos genes ACC- $\alpha$  PIII (A), ACC- $\alpha$  PII (B) e FASN (C) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* com ácido palmítico em comparação com o controle.



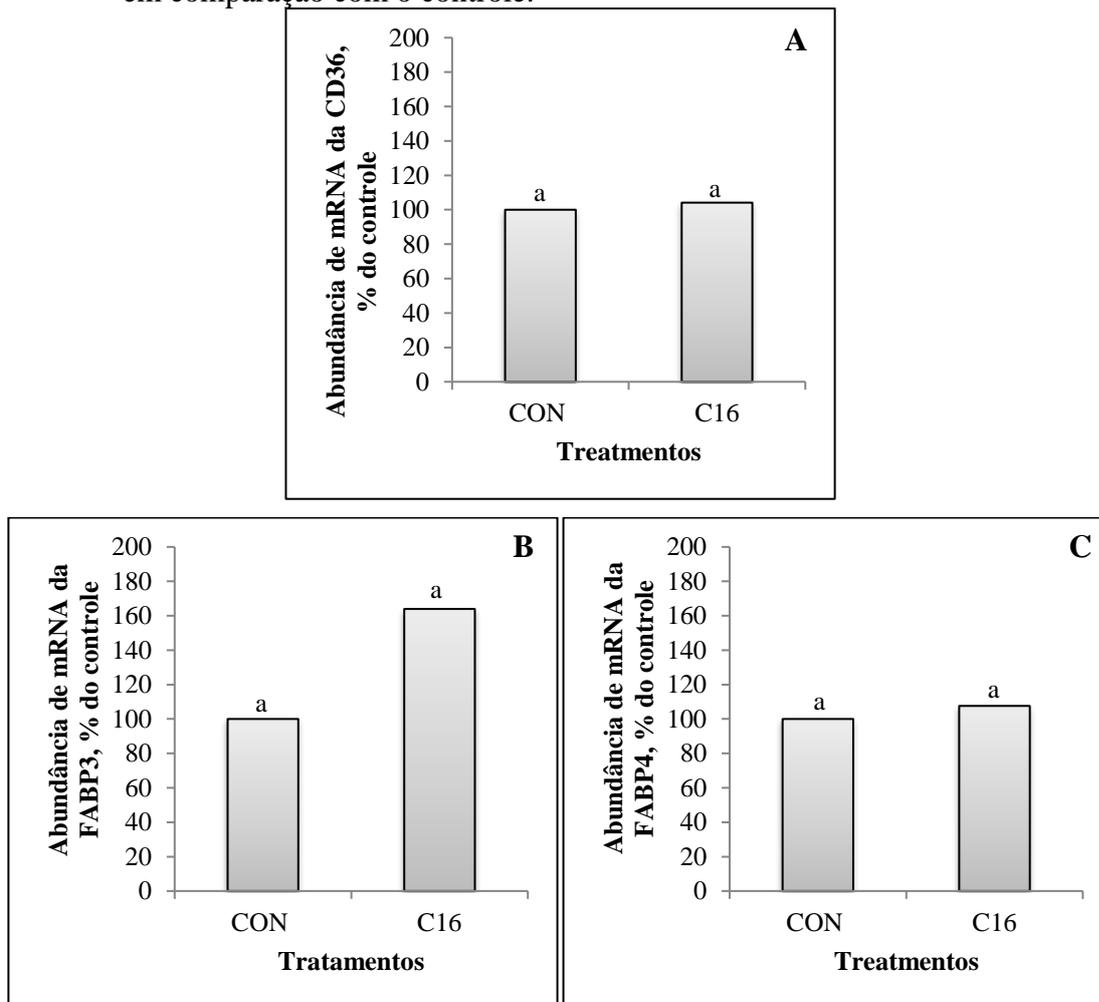
Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

<sup>A</sup>Acetil CoA carboxilase alfa Promotor III (ACC- $\alpha$  PIII) → SEM CON = 0.111 e SEM C16 = 0.111; <sup>B</sup>Acetil CoA carboxilase alfa Promotor II (ACC- $\alpha$  PII) → SEM CON = 0.099 e SEM C16 = 0.137; <sup>C</sup>Ácido graxo sintase (FASN) → SEM CON = 0.349 e SEM C16 = 0.481.

Dos genes envolvidos na internalização de AG, foi avaliado o CD36, o qual não apresentou diferença entre os tratamentos ( $P=0,89$ ; ver Figura 3A).

Quanto aos genes envolvidos no transporte intracelular de AG, o ácido palmítico não foi diferente do tratamento controle na FABP3 ( $P=0,14$ ; ver Figura 3B) e nem na FABP4 ( $P=0,83$ ; ver Figura 3C).

Figura 3 — Abundância dos genes CD36 (A), FABP3 (B) e FABP4 (C) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* com ácido palmítico em comparação com o controle.

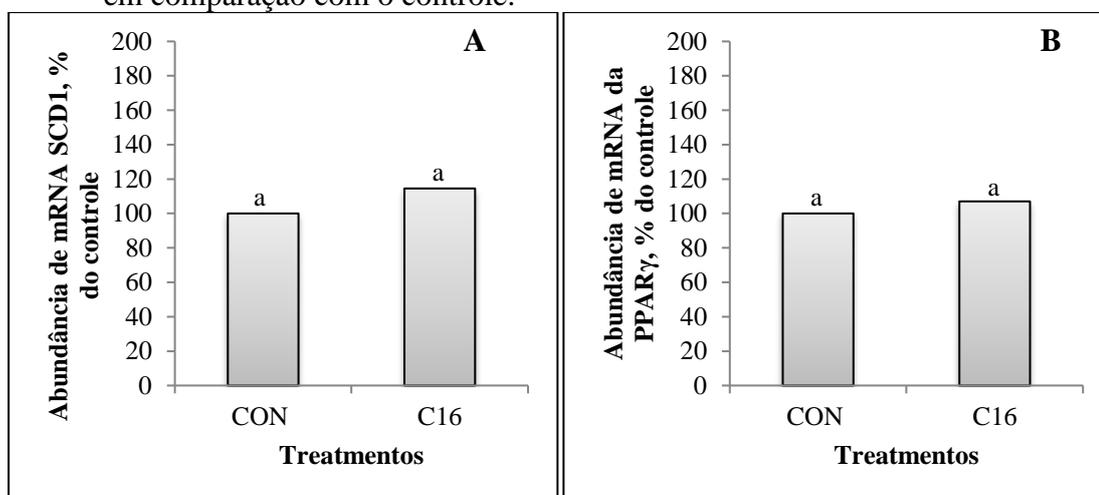


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

<sup>A</sup> Translocador de ácido graxo (CD36) → SEM CON = 0.089 e SEM C16 = 0.089; <sup>B</sup> Proteína de ligação de ácidos graxos 3 (FABP3) → SEM CON = 0.091 e SEM C16 = 0.091; <sup>C</sup> Proteína de ligação de ácidos graxos 4 (FABP4) → SEM CON = 0.077 e SEM C16 = 0.077.

O gene da enzima SCD, responsável pela dessaturação de AG, bem como do fator de transcrição PPAR- $\gamma$ , envolvido na regulação da expressão de genes-chave da síntese de gordura do leite, não foram afetados pelo ácido palmítico quando comparado ao tratamento controle ( $P=0,60$  e  $0,71$  respectivamente; ver Figura 4A e 4B).

Figura 4 — Abundância do gene SCD1 (A) e do fator de transcrição PPAR- $\gamma$  (B) em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* com ácido palmítico em comparação com o controle.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

<sup>A</sup>Estearoil CoA dessaturase 1 (SCD1) → SEM CON = 0.053 e SEM C16 = 0.053; <sup>B</sup>Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR- $\gamma$ ) → SEM CON = 0.050 e SEM C16 = 0.050.



## 6 DISCUSSÃO

Observou-se aumento da expressão gênica de todos os genes envolvidos na síntese *de novo* de AG na glândula mamária (ACC- $\alpha$  PII, ACC- $\alpha$  PIII e FASN) avaliados no presente estudo. Esse resultado corrobora com os achados de Hansen e Knudsen (1987), que relataram que a adição de ácido palmítico ao meio de incubação de células mamárias de cabra estimulou a síntese e incorporação de ácidos graxos sintetizados *de novo* em triglicerídeos. No entanto, Noble et al. (1969) verificaram que a suplementação de 10% de ácido palmítico na dieta de vacas diminuiu as concentrações e produções de C6:0, C10:0, C12:0 e C14:0 e as concentrações de C8:0 e C14:1. Da mesma forma, as concentrações de AG de cadeia curta e média (C6:0-C15:0) foram diminuídas ou tenderam a diminuir quando C16:0 foi suplementado na dieta de vacas leiteiras em lactação (WARNTJES et al., 2008). Suplementando diferentes doses de ácido palmítico em células epiteliais mamárias (MAC-T) bovinas, Qi et al. (2014) observaram expressões de mRNA da ACC e FASN diminuídas e propuseram que o ácido palmítico poderia inibir a síntese *de novo* de AG do leite através de genes (ACC e FASN) associados a esta via. Já é comprovado que ACC e FASN são dois genes importantes envolvidos na síntese de AG do leite em tecido mamário de ruminantes, já que a síntese *de novo* de AG via acetil-CoA e butiril-CoA, é executada pela ACC e pela FASN (BIONAZ & LOOR, 2008b). No estudo de Hansen e Knudsen (1987) citado acima, os autores presumiram que o C16:0 atuou como um "iniciador" para a síntese de triacilglicerol por acilação na posição sn-1, assim, permitindo que os ácidos graxos de cadeia média e cadeia curta fossem incorporados nas posições sn-2 e sn-3; nós pressupomos que um processo semelhante aconteceu em nosso estudo.

Rico et al. (2014c) observaram que um suplemento com 84,8% de ácido palmítico diminuiu a concentração dos AG *de novo* no leite em 11% nas vacas de alta produção e em 13% nas vacas de baixa produção, contudo aumentou a concentração de gordura do leite e a produção de AG com 16 carbonos em mais de 25% quando comparado ao controle. No entanto, outros estudos que relataram o aumento da gordura do leite com suplementação de C16:0 não apresentaram diminuição na produção dos AG sintetizados *de novo*. Por exemplo, Mosley et al. (2007) relataram um aumento de quase 100% na produção de C16:0 e nenhuma diminuição na produção dos AG sintetizados *de novo*. Esses entre outros trabalhos têm mostrado efeito positivo sobre o teor de gordura do leite com fornecimento de suplementos ricos em ácido palmítico para vacas e ovelhas lactantes, principalmente pelo aumento de C16:0 quando se observa o perfil de ácidos graxos do leite, o que se justifica como sendo pela

maior oferta de ácido palmítico pré-formado vindo da dieta. Como este AG é o produto final da síntese *de novo*, poderíamos inferir então que a sua síntese na glândula mamária poderia ser menor e com isso diminuir a expressão gênica das enzimas estudadas. Entretanto, observa-se também em alguns estudos, como o de Vyas et al. (2012), onde avaliaram os efeitos de quantidades crescentes de AG de cadeia curta e média na dieta de vacas e observaram que o aumento do conteúdo desses AG na dieta aumentou linearmente a porcentagem de gordura do leite, com maior produção de alguns AG sintetizados *de novo*. Esses achados corroboram com o aumento da expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese *de novo* mensuradas no presente estudo.

A gordura do leite compreende 95 a 98% de TG e a síntese de TG mamária envolve a esterificação de AG em 3 carbonos do esqueleto de glicerol (JENSEN, 2002). O ácido palmítico é um precursor importante para iniciar a acilação na posição sn-1, formando ácido lisofosfatídico sn-1; já os AG de cadeia curta são necessários para o passo limitante da taxa de esterificação na posição sn-3 (HANSEN & KNUDSEN, 1987). Diante disso, a maior disponibilidade de ácido palmítico pode aumentar a incorporação de AG de cadeia curta e média durante a síntese de TG, refletindo na maior produção de AG sintetizados *de novo* (VYAS et al. 2012).

Efeitos *in vivo* do fornecimento de suplementos ricos em ácido palmítico para vacas leiteiras incluíram aumento na produção de C4:0 no leite (ENJALBERT et al., 1998; LOCK et al., 2013). Além disso, estudos *in vitro* relataram um efeito estimulador de C16:0 na síntese de C4:0 e da sua incorporação em TG em células de glândulas mamárias bovinas (HANSEN & KNUDSEN, 1987). Sugeriu-se que o aumento da produção de C4:0 poderia ser parte de um mecanismo para manter a fluidez da gordura do leite à temperatura corporal, com um aumento na produção de C4:0 devido ao grande “pool” de diglicerídeos de AG com alto peso molecular que resulta da incorporação de AG de cadeia longa captados do plasma (BARBANO & SHERBON, 1980); isso poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento na expressão de ambas isoformas da ACC- $\alpha$  observadas no presente estudo. A diminuição da concentração de outros AG *de novo* (C6:0 a C14:0) na gordura do leite (LOCK et al., 2013; WARNTJES et al., 2008) nem sempre ocorre com uma diminuição simultânea da sua produção (ENJALBERT et al., 2000). Foi proposto que a suplementação de ácido palmítico pode diminuir a atividade da ACC ou da FASN devido à inibição alostérica pelo C16:0 (WRIGHT et al., 2002), ou inibir a ACC da glândula mamária pelo palmitoil-CoA derivado do C16:0 (MILLER et al., 1970); contudo este mecanismo não pode ser confirmado pelos achados do presente estudo.

Estudos anteriores indicaram que a abundância de RNA da CD36 aumentou acentuadamente quando células foram cultivadas com ácido palmítico (KADEGOWDA et al., 2009; QI et al., 2014). Yonezawa et al. (2004) cultivaram células epiteliais mamárias bovinas na presença de vários AGCL (palmítico, esteárico, oleico e linoleico), e todos os AG exógenos aumentaram a expressão da CD36; o que pode indicar que os AGCL exógenos induzem a expressão de CD36 em células epiteliais mamárias bovinas cultivadas *in vitro*. Já nossos resultados não indicaram o mesmo, visto que a CD36 não apresentou diferença entre o tratamento com C16:0 comparado ao controle. Sabe-se que a CD36 desempenha um papel importante na importação de AG em células mamárias bovinas (BIONAZ & LOOR, 2008b), contudo além desta e de outra proteína conhecida envolvida na absorção de AG (SLC27A), existem outras formas de internalização de AG na glândula mamária, como o mecanismo de “flip-flop” e em menor escala, a difusão passiva de AG através das membranas (DOEGE & STAHL, 2006). Nós especulamos com base no que foi observado no estudo corrente e na literatura, que o ácido palmítico pode ter sido importado para as células mamárias através de outras maneiras que não são pela ação da CD36.

As FABPs estão entre as principais proteínas que permitem a rápida difusão e direcionamento seletivo de AGCL em direção a organelas específicas para o metabolismo (McARTHUR et al., 1999). Kadegowda et al. (2009) cultivaram células epiteliais mamárias (MAC-T) bovinas na presença de ácidos graxos e verificaram aumento na abundância de RNA da FABP3 e FABP4 (755% e 171%, respectivamente) com ácido palmítico quando comparado ao controle. Já Qi et al. (2014) mostraram que a expressão de FABP3 foi inibida pela adição de C16:0 ou C18:0 no meio de cultura. Ainda, nossos resultados não evidenciaram diferença na expressão da FABP3 e da FABP4 quando comparamos o tratamento de ácido palmítico com o controle. Menos dados estão disponíveis em relação ao efeito de AGCL saturados na expressão gênica da FABP3 e o motivo da discrepância entre os estudos ainda é desconhecido.

Bionaz & Loor (2008b) propuseram que uma função importante da FABP3 na glândula mamária bovina é fornecer AG para a SCD. A grande afinidade da FABP4 com o ácido oleico e o aumento da expressão sua expressão gênica durante a lactação no tecido mamário bovino (BIONAZ & LOOR, 2008a) levaram os autores a sugerir que a FABP3 fornece estearoil-CoA (ou outros substratos como 16:0 e 18:1 *trans*-11; WHETSTONE et al., 1986) para a SCD, que posteriormente libera ácido oleico para a FABP4. Faz sentido para nós que a função das FABPs esteja relacionada à SCD1, já que ambos os genes não tiveram a expressão gênica alterada pelo tratamento com o ácido palmítico em nosso estudo.

A SCD catalisa o passo crítico na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados a partir de ácidos graxos saturados e a regulação deste processo (NTAMBI & MIYAZAKI, 2003). Jacobs et al. (2013) suplementaram AG em células MAC-T bovinas e além de mensurar a abundância de RNA, calcularam o índice de dessaturase da composição de AG nas células como medida indireta da atividade da SCD, por exemplo,  $C16:1 \text{ cis-9} / (C16:0 + C16:1 \text{ cis-9})$  ou  $C18:1 \text{ cis-9} / (C18:0 + C18:1 \text{ cis-9})$ . A aplicação de ácido palmítico aumentou o conteúdo de C16:0 e o índice de dessaturase do C16, indicando que o C16:0 fornecido foi captado e facilmente convertido em C16:1 *cis*-9 pela SCD1 nas células MAC-T. O índice de dessaturase do C16 foi, no entanto, não relacionado à abundância relativa de SCD1, já que os autores não encontraram um efeito positivo do tratamento com ácido palmítico nos níveis de transcrição da SCD1. Os nossos achados para a expressão da SCD1 estão de acordo com os desses autores, já que não encontramos diferença na expressão da SCD1 com a suplementação de ácido palmítico comparado ao controle; mas não corroboram com os resultados do estudo de Kadegowda et al. (2009), onde o C16:0 aumentou a expressão gênica da SCD1 em células MAC-T. Apesar de termos associado o motivo pelo qual nós e Jacobs et al. (2013) não encontramos aumento na expressão da SCD1 não está claro, já que teoricamente o índice de dessaturase do C16 estaria aumentado pela suplementação e conseqüentemente maior conteúdo deste AG.

A análise da rede de genes no tecido mamário bovino mostrou que a expressão de PPAR- $\gamma$  e seus genes alvo foi aumentada durante a lactação, sugerindo um papel desse receptor nuclear na regulação da síntese de gordura do leite (BIONAZ & LOOR, 2008a, b). Anteriormente observou-se que os AGCL saturados aumentam a expressão dos genes alvo de PPAR $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  em células bovinas e de cabra, muitas vezes com um efeito mais forte do que os agonistas sintéticos (KADEGOWDA et al., 2009; BIONAZ et al., 2012; ZHAO et al., 2014). A resposta de PPAR aos AGCL saturados em ruminantes faria sentido evolutivo, considerando que esses são os AGCL primários absorvidos pelo intestino delgado devido à extensa bio-hidrogenação de AG insaturados da dieta no rúmen (BIONAZ et al., 2015). Apesar de mudanças na expressão de possíveis genes alvo da regulação por PPAR- $\gamma$ , Qi et al. (2014) relataram que a expressão de PPAR- $\gamma$  não foi afetada pela adição de ácido palmítico no meio de cultura com células MAC-T bovinas. Resultado que corrobora com o encontrado no presente estudo, onde a expressão gênica das isoformas da ACC- $\alpha$  (PI e PII) e FASN foram aumentadas pelo tratamento com ácido palmítico, mas a expressão gênica da PPAR- $\gamma$  não foi diferente do tratamento controle. Assim como Kadegowda et al. (2009) indicaram que a suplementação de AG incluindo 16:0, 18:0, 18:1 *cis*-9, 18:1 *trans*-10, 18:2 *trans*-10, *cis*-12

e 20:5, aumentaram ou diminuíram a expressão de genes lipogênicos sem afetar a abundância de RNA de PPAR- $\gamma$  em células epiteliais mamárias bovinas. Estes resultados são suportados pelo estudo *in vivo* em que as dietas com suplementos lipídicos não tiveram efeito na expressão de PPAR- $\gamma$  no tecido mamário bovino (INVERNIZZI et al., 2010). Embora não haja efeito de ácidos graxos na expressão de PPAR- $\gamma$ , não se pode negligenciar o papel desse fator de transcrição na síntese de gordura do leite (QI et al., 2014).



## 7 CONCLUSÕES

O efeito da suplementação *in vitro* com ácido palmítico em explantes de glândula mamária ovina não foi previamente relatado, e o nosso estudo mostra que este ácido graxo estimula os genes envolvidos na síntese *de novo* (ACC- $\alpha$  PII, PIII e FASN); o que pode significar um aumento na gordura do leite através do aumento da síntese de AG de cadeia curta e média. Não observamos efeito do ácido palmítico quando comparado ao controle, nos genes envolvidos na via da captação de AG da circulação sanguínea e o motivo disso não está claro. A ausência de diferença na expressão de PPAR- $\gamma$  entre ácido palmítico e controle pode sugerir que outros mecanismos de regulação das enzimas lipogênicas estão envolvidos neste caso.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do ácido palmítico na expressão de genes de enzimas envolvidas na síntese da gordura do leite e de um dos fatores de transcrição que atuam na regulação dessa síntese, utilizando como modelo de estudo explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro*. Com isso, comparar os resultados com os estudos *in vitro* e *in vivo* da suplementação de ácido palmítico e também de outros AG que a literatura reporta. Visto que entre os inúmeros estudos já realizados com suplementação de gordura, a maioria retrata o uso de produtos compostos por vários AG, nós achamos interessante realizar um estudo com um único AG para que o efeito do mesmo fosse determinado sem ocorrência de vieses causados por outros AG.

A escolha pelo estudo *in vitro* foi baseada na percepção de que esse modelo proporcionaria um ambiente mais controlado e com isso poderíamos “isolar” o efeito do tratamento no “órgão-alvo” que seria a glândula mamária, e porque suplementos lipídicos ricos em ácido palmítico e com teores reduzidos de outros ácidos graxos polinsaturados como o ácido linoleico (C18:2) comercialmente disponíveis são escassos no mercado brasileiro.

Trabalhos que tenham avaliado suplementação *in vitro* de ácido palmítico são escassos, especialmente os que tenham usado tecido mamário como modelo, já que os existentes (por exemplo, HANSEN & KNUDSEN, 1987; KADEGOWDA et al., 2009; QI et al., 2014) trabalharam com cultivo de células. Diante dos nossos resultados nós nos indagamos se os efeitos do C16:0 podem ser diferentes quando comparamos o cultivo de células com o de tecido e, além disso, se a dose para que o AG promova seus efeitos pode ser diferente entre os dois modelos utilizados.

Nossa hipótese inicial de que os efeitos da suplementação de C16:0 em explantes de glândula mamária ovina lactante cultivados *in vitro* poderia envolver diminuição da expressão de genes envolvidos na síntese *de novo* e, aumento da expressão de genes envolvidos nas fases de interiorização, transporte intracelular e dessaturação de AG, a qual não foi confirmada e outros “insights” nos ocorreram; dentre eles, a ideia de avaliar uma enzima Tioesterase, envolvida no alongamento da cadeia de AG oriundos da síntese *de novo*.

Por fim, consideramos importante a avaliação de outros genes envolvidos na síntese e regulação da síntese da gordura do leite, além da realização de um estudo *in vitro* que compare diferentes quantidades de AG suplementadas.



## REFERÊNCIAS

- AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10332–10352, 2017.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1624, 2000.
- ANNISON, E. F. et al. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism, and the role of plasma phospholipids and neutral lipids in milk-fat synthesis. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 637–647, 1967.
- BALDIN, M. et al. Milk fat response to calcium salts of palm or soybean in a normal or milk fat depression scenario in dairy ewes. **Livestock Science**, v. 206, p. 109–112, 2017.
- BALTHAZAR, C. F. et al. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.16, p. 247-262, 2017.
- BANKS, W. et al. Effect of feeding fat to dairy cows receiving a fat-deficient basal diet. II. Fatty acid composition of the milk fat. **Journal of Dairy Research**, v. 43, p. 219–227, 1976.
- BARBANO, D. M.; SHERBON, J. W. Polyunsaturated protected lipid: effect on triglyceride molecular weight distribution. **Journal of Dairy Science**. v. 63, p. 731–740, 1980.
- BARBER, M. C. et al. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1347, p. 101–26, 1997.
- BARBER, M. C. et al. Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase-alpha gene in mammary gland is associated with recruitment of SREBP-1 to a region of the proximal promoter defined by a DNase I hypersensitive site. **Biochemical Journal**, v. 375, p. 489–501, 2003.
- BARŁOWSKA, J. et al. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 291–302, 2011.
- BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In: LARSON, B. L.; SMITH, V. R. **Lactation: A Comprehensive Treatise**. New York: Academic, 1974. v. 2, p. 31–75.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15–29, 2001.
- 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. et al. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1235–1243. 2006.

BAUMGARD, L. H. et al. Trans-10, cis-12 Conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2155-2163, 2002.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409–435, 2002.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 606, p. 67-108, 2008.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1019-1024, 2008a.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC genomics**, v. 9, p. 366, 2008b.

BIONAZ, M.; THERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: Saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. **British Journal of Nutrition**. V. 107, p. 179–191, 2012.

BIONAZ, M. et al. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. **PPAR Research**, v. 2013, 28 p., 2013.

BIONAZ, M.; OSORIO, J.; LOOR, J. J. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients, transcription factors, and techniques. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 5531-5553, 2015.

CHALUPA, W. et al. Ruminal fermentation *in vivo* as influenced by long chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1293-1301, 1986.

CLAPPERTON, J. L.; BANKS, W. Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1205–1211, 1985.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1129-1132, 2001.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 134–176, 2004.

DILS, R. R. Comparative Aspects of Milk Fat Synthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 904-910, 1986.

DOEGE, H.; STAHL, A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from *in vivo* models. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 259-68, 2006.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, p. 15-35, 1997.

DRACKLEY, J. K. Lipid metabolism. In: DRACKLEY, J. K. **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. p. 97-120.

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

ELMEDDAH, Y.; DOREAU, M.; MICHALET-DOREAU, B. Interaction of lipid supply and carbohydrate in the diet of sheep with digestibility and ruminal digestion. **Journal of Agricultural Science**, v. 116, p. 437-445, 1991.

ENJALBERT, F. et al. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1525-1532, 1998.

ENJALBERT, F. et al. Effects of duodenal infusions of palmitic, stearic, or oleic acids on milk composition and physical properties of butter. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1428-1433, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics: Food and agriculture data. 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 13 de novembro de 2017.

FIELDING, B. A.; FRAYN, K. N. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 495-502, 1998.

GARGOURI, A. et al. Lactational evaluation of effects of calcium soap of fatty acids on dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 66, p. 1-10, 2006.

GERMAN, J. B. et al. Milk fat composition: Targets for alteration of function and nutrition. In: WELCH, R. A. S. et al. **Milk Composition, Production and Biotechnology**. New York: CAB International, 1997. p. 39-72.

GRUMMER, R. R. Influence of Prilled Fat and Calcium Salt of Palm Oil Fatty Acids on Ruminal Fermentation and Nutrient Digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 117-123, 1988.

GRUMMER, R. R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3244-3257, 1991.

HANSEN, H. O.; KNUDSEN, J. Effect of Exogenous Long-Chain Fatty Acids on Lipid Biosynthesis in Dispersed Ruminant Mammary Gland Epithelial Cells: Esterification of Long-Chain Exogenous Fatty Acids. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1344-1349, 1987.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1092-1103, 2006.  
HARVATINE, K. J.; BAUMAN, D. E. SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) Are Involved in the Regulation of Bovine Mammary Lipid Synthesis during Diet-

Induced Milk Fat Depression and Treatment with CLA. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2468-2474, 2006.

HAWKE, J. C.; TAYLOR, M. W. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. In: FOX, P. F. **Developments in Dairy Chemistry**. London, UK: Chapman & Hall, 1995. v. 2, p. 37-81.

HOSSEINI, A. et al. Transcriptomics Comparisons of Mac-T cells Versus Mammary Tissue during Late Pregnancy and Peak Lactation. **Advances in Dairy Research**, v. 1: 103, 2013.

HUSSEIN, M. et al. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3825–3834, 2013.

HUYNH, F. K. et al. Measurement of Fatty Acid Oxidation Rates in Animal Tissues and Cell Lines. **Methods in Enzymology**, v. 542, p. 391- 405, 2014.

INVERNIZZI, G. et al. Sustained upregulation of stearoyl-CoA desaturase in bovine mammary tissue with contrasting changes in milk fat synthesis and lipogenic gene networks caused by lipid supplements. **Functional & Integrative Genomics**, v. 10, p. 561-575, 2010.

JACOBS, A. A. A. et al. Effects of short- and long-chain fatty acids on the expression of stearoyl-CoA desaturase and other lipogenic genes in bovine mammary epithelial cells. **Animal**, v. 7, p. 1508–1516, 2013.

JANDAL, J. M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 177-185. 1996.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3851–3863, 1993.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1302-1310, 2006.

JENSEN, R. G. *Invited Review*: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 295–350, 2002.

KADEGOWDA, A. K. G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4276–4289, 2009.

KEENAN, T. W.; PATTON, S. The milk lipid globule membrane. In: JENSEN, R. G. **Handbook of Milk Composition**. New York: Academic Press, 1995. p. 5–50.

KEATING, A. F. et al. Effect of conjugated linoleic acid on bovine mammary cell growth, apoptosis and stearoyl Co-A desaturase gene expression. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 284-292, 2008.

KIM, K. H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 77-99, 1997.

- KINSELLA, J. E. The incorporation of [ $^{14}\text{C}_3$ ] glycerol into lipids by dispersed bovine mammary cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 164, p. 540–549, 1968.
- KINSELLA, J. E. Stearic Acid Metabolism by Mammary Cells. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1757-1765, 1970.
- KONONOFF, P. J.; KEOWN, J. F.; GRANT, R. J. Supplemental fat for high producing dairy cows. **NebGuide**: University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, G158, 2004.
- LOCK, A. L. et al. Feeding a C16:0-enriched fat supplement increased the yield of milk fat and improved feed efficiency conversion of feed to milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1–10, 2013.
- LOOR, J. J. et al. High concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3986–99, 2005.
- MAO, J. et al. Genomic distribution of three promoters of the bovine gene encoding acetyl-CoA carboxylase alpha and evidence that the nutritionally regulated promoter I contains a repressive element different from that in rat. **Biochemical Journal**, v. 358, p. 127–135, 2001.
- MAO, J. et al. STAT5 binding contributes to lactational stimulation of promoter III expressing the bovine acetyl-CoA carboxylase alpha-encoding gene in the mammary gland. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 73–88, 2002.
- MARSHALL, M. O.; KNUDSEN, J. The specificity of 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase in microsomal fractions from lactating cow mammary gland towards short, medium and long chain acyl-CoA esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 489, p. 236–241, 1977.
- MASHEK, D. G.; COLEMAN, R. A. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, p. 274-278, 2006.
- MATHER, I. H.; KEENAN, T. W. Origin and secretion of milk lipids. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, p. 259–273, 1998.
- MAYOREK, N.; GRINSTEIN, I.; BAR-TANA, J. Triacylglycerol synthesis in cultured rat hepatocytes. The rate-limiting role of diacylglycerol acyltransferase. **European Journal of Biochemistry**, v. 182, p. 395–400, 1989.
- McARTHUR, M. J. et al. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1371-1383, 1999.
- McBRIDE, O. W.; KORN, E. D. Presence of glycerokinase in guinea pig mammary gland and the incorporation of glycerol into glycerides. **Journal of Lipid Research**, v. 5, p. 442–447, 1964.

MILLER, A. L.; GEROGH, M. E.; LEVY, H. R. Rat mammary gland acetyl-coenzyme A carboxylase. Interaction with milk fatty acids. **Biochemical Journal**, v. 118, p. 645–657, 1970.

MISTRY, D. H.; MEDRANO, J. F. Cloning and localization of the bovine and ovine lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) genes that codes for an enzyme involved in triglyceride biosynthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 28–35, 2002.

MOLENAAR, A. et al. All three promoters of the acetylcoenzyme A-carboxylase alpha-encoding gene are expressed in mammary epithelial cells of ruminants. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, p. 1073–1081, 2003.

MOSLEY, S. A. et al. Effect of varying levels of fatty acids from palm oil on feed intake and milk production in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 987–993, 2007.

MUSCHLER, J.; STREULI, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 2, a003202, 2010.

NAIK, P. K. Bypass Fat in Dairy Ration - A Review. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, p. 147-163, 2013.

NOBLE, R. C.; STEELE, W.; MOORE, J. H. The effects of dietary palmitic and stearic acids on milk fat composition in the cow. **Journal of Dairy Research**, v. 36, p. 375-381, 1969.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Recent insights into stearyl-CoA desaturase-1. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 255-261, 2003.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 91-104, 2004.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1–14, 1980.

PALMQUIST, D. L. Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 2, p. 43-92, 2006.

PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88–113, 2007.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D.E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2523-2527, 2004.

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

QI, L. et al. Effects of Saturated Long-chain Fatty Acid on mRNA Expression of Genes Associated with Milk Fat and Protein Biosynthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 414–421, 2014.

RELLING, A. E.; REYNOLDS, C. K. Feeding rumen-inert fats differing in degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1506–1515, 2007.

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

RICO, J. E.; ALLEN, M. S.; LOCK, A. L. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1057–1066, 2014a.

RICO, D. E.; YING, Y.; HARVATINE, K. J. Comparison of enriched palmitic acid and calcium salts of palm fatty acids distillate fat supplements on milk production and metabolic profiles of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5637–5644, 2014b.

RICO, D. E.; YING, Y.; HARVATINE, K. J. Effect of a high-palmitic acid fat supplement on milk production and apparent total-tract digestibility in high- and low milk yield dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 3739–3751, 2014c.

RIVERA, E. M. Influence of hormones on enzyme activity in mouse mammary gland in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1308–1316, 1972.

ROSE, M. T., McCONOCHE, H. The long road to a representative *in vitro* model of bovine lactation. **Journal of Intelligent & Fuzzy Systems**, v. 3, p. 67–72, 2006.

SMALL, D. M. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 11, p. 413–434, 1991.

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

SMITH, S. J. et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking DGAT 1. **Nature Genetics**, v. 25, p. 87–90, 2000.

SPITSBERG, V. L., MATITASHVILI, E., GOREWIT, R. C. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, p. 872–8, 1995.

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

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

STORCH, J.; McDERMOTT, L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S126–S131, 2009.

TAKEUCHI, K.; REUE, K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. E1195–E1209, 2009.

TICIANI, E. et al. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. **Animal**, v. 10, p. 1677–1683, 2016.

TÓDERO, C. et al. Palmitic acid increases milk fat content and yield in lactating cows. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 19, p. 319–325, 2016.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, 2002.

VYAS, D.; TETER, B. B.; ERDMAN, R. A. Milk fat responses to dietary supplementation of short- and medium-chain fatty acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5194–5202, 2012.

WANG, J. P. et al. Effect of saturated fatty acid supplementation on production and metabolism indices in heat-stressed mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4121–4127, 2010.

WARNTJES, J. L. et al. Effects of feeding supplemental palmitic acid (C16:0) on performance and milk fatty acid profile of lactating dairy cows under summer heat. **Animal Feed Science and Technology**, v. 140, p. 241–257, 2008.

WENDEL, A. A.; LEWIN, T. M.; COLEMAN, R. A. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 501–506, 2009.

WHETSTONE, H.D.; HURLEY, W.L.; DAVIS, C. L. Identification and characterization of a fatty acid binding protein in bovine mammary gland. **Comparative Biochemistry and Physiology – B**, v. 85, p. 687–692, 1986.

WRIGHT, T. C.; CANT, J. P.; McBRIDE, B. W. Inhibition of fatty acid synthesis in bovine mammary homogenate by palmitic acid is not a detergent effect. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 642–647, 2002.

WRIGHT, T. C. et al. Acetyl CoA Carboxylase Shares Control of Fatty Acid Synthesis with Fatty Acid Synthase in Bovine Mammary Homogenate. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2552–2558, 2006.

YONEZAWA, T. S. et al. Effects of long-chain fatty acids on cytosolic triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in primary cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2527–2534, 2004.

ZHAO, W. et al. Long chain fatty acids alter expression of genes involved in lipid metabolism in goat mammary epithelial cells partly through PPAR- $\gamma$ . In: ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting. **Journal of Dairy Science**. v. 97, (E-Suppl. 1):321, 2014.