

**UNIVERSIDADE DI ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – CIÊNCIA ANIMAL**

**DANIELLA THAÍS DE CASTRO BESSANI**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE  
OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS *IN VITRO* COM ÁCIDOS PALMÍTICO E  
ESTEÁRICO**

**LAGES**

**2020**



**DANIELLA THAÍS DE CASTRO BESSANI**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE  
OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS *IN VITRO* COM ÁCIDOS PALMÍTICO E  
ESTEÁRICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira

**LAGES**

**2020**



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

Bessani, Daniella Thaís de Castro

Expressão gênica em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* com ácidos palmítico e esteárico / Daniella Thaís de Castro Bessani. -- 2020.

60 p.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação -- Seleção --, Lages, 2020.

1. Metabolismo lipídico. 2. Síntese de gordura. 3. Lipogênese mamária. I. Oliveira, Dimas Estrasulas de. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação -- Seleção --. III. Título.



**DANIELLA THAÍS DE CASTRO BESSANI**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE  
OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS *IN VITRO* COM ÁCIDOS PALMÍTICO E  
ESTEÁRICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira

**BANCA EXAMINADORA**

**Orientador:**



Professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

**Membro:**



Professor Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

**Membro:**



Dra. Eveline Caterine Sandri  
AURORA Alimentos

Lages, 28 de agosto de 2020





*Dedico à minha família, com todo o meu amor e gratidão pelas conquistas até aqui.*



## AGRADECIMENTO

Agradeço...

A Deus pelo dom da vida e por guiar meu caminho.

A Nossa Senhora Aparecida por estar sempre presente na minha caminhada, me protegendo e guiando.

Aos meus pais, Antônio e Neci, por todo o amor, carinho e investimento durante todo este tempo, em especial por me apoiarem e acreditarem no meu potencial, na vida e na pós-graduação. Também pela minha irmã, Gabriella, pela compreensão e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas, pela oportunidade e confiança, além de toda dedicação, paciência, desafios, experiências e pela visão holística da vida.

A minha amiga Nemora, que se tornou amiga em um momento de muita dificuldade (pessoal e profissional). Somos um encontro na vida.

Aos meus amigos Rafaella, Georgia, Charline, Roberto, Beatriz e Alana, por toda ajuda, encorajamento, incentivo e amparo. Com vocês este caminho árduo, fez mais sentido.

Ao setor de ovinocultura UDESC/CAV, pela disponibilidade dos animais, em especial ao bolsista Gabriel e voluntários. Também as 3 ovelhas que fizeram parte deste trabalho.

Ao CEDIMA e ao Laboratório de Bioquímica veterinária, por terem cedido os espaços (sala de cultivo) e equipamentos para a realização das análises. Em especial ao Prof. Dr. Ubirajara, Prof. Dr. Milleti e as Téc. Rosane e Marisa por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Universidade e todos os professores do PPG em Ciência Animal – UDESC/CAV, que tive o privilégio de conhecer, conviver e adquirir conhecimentos nesses dois anos.

A EPAGRI e seus funcionários, pela disponibilidade dos animais que seriam utilizado no 1º Experimento. Além do acolhimento, ajuda e atenção, em especial a Sra. Vanessa, Sr. Juliano e Sr. Jonas que não mediram esforços para que o experimento acontecesse ou melhor, que não fosse cancelado.

Aos colegas de Grupo de Pesquisa em Nutrigenômica de Ruminantes – NUTRIGER, por toda a ajuda, aprendizado, e experiências trocadas no decorrer dos nossos trabalhos.

Aos colegas e amigos da salinha de estudos, pelos anos de convívio, conhecimentos divididos, conversar e risadas.

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

Agradeço de coração.



## RESUMO

BESSANI, D. T. C. **EXPRESSÃO GÊNICA EM EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS *IN VITRO* COM ÁCIDOS PALMÍTICO E ESTEÁRICO.** **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2020.

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito dos ácidos palmítico, esteárico e sua combinação na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes, cultivados *in vitro*. Foram utilizados explantes de tecido mamário de 3 ovelhas lactantes com partos gemelares, da raça Lacaune, com 30 ( $\pm$  4) dias de lactação, produzindo em uma ordenha  $1,3 \pm 0,8$  kg de leite/dia, peso vivo médio de  $70,5 \pm 9,5$  kg e escore de condição corporal  $3,0 \pm 0,5$ . O cultivo foi feito em placas de 6 poços em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e com umidade saturada por 24h. Utilizou-se os seguintes tratamentos: **a) Controle:** 6 ml de meio de cultivo + albumina sérica bovina (0,1% BSA); **b) C16:** 6 ml de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido palmítico; **c) C18:** 6 ml de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido esteárico; **d) C16C18:** 6 ml de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido palmítico +  $100\mu\text{M}$  de ácido esteárico. Após as 24h de cultivo, os explantes foram retirados das placas e realizou-se a extração de RNA, síntese de DNA complementar e análise de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS através do procedimento MIXED, a um nível de 5% de significância e tendência quando entre 5 e 10%. O tratamento C16 aumentou a abundância do RNAm da SCD em 227,4% e reduziu em 50% a abundância do RNAm da AGPAT6 em relação ao Controle. O tratamento C16C18 aumentou a abundância do RNAm da FASN, CD36, FABP4, SCD, GPAT e PPAR- $\gamma$  em 71,6, 111,7, 114,1, 218,6, 31,2 e 96,9%, respectivamente, em relação ao Controle. Concluindo, a adição do tratamento C16C18 em explantes de glândula mamária de ovelhas lactante, cultivados *in vitro*, foi capaz de aumentar a expressão dos genes envolvidos na síntese lipídica.

**Palavras-chave:** Metabolismo lipídico, Síntese de gordura, Lipogênese mamária.



## ABSTRACT

BESSANI, D. T. C. **GENE EXPRESSION IN MAMMARY GLAND EXPLANTS OF LACTATING EWES CULTIVATED *IN VITRO* WITH PALMITIC AND STEARIC ACIDS.** **Dissertation** (Master Degree in Animal Sciences – Area: Animal Production). University of the State of Santa Catarina. Post-graduate Program in Animal Sciences. Lages, 2020.

The objective of this study was to verify the effect of the palmitic and stearic acids, and their combination on the expression of genes involved in the lipid synthesis in mammary gland explants of lactating ewes cultivated *in vitro*. The mammary tissue explants from 3 lactating Lacaune ewes rearing twins, with 30 ( $\pm$  4) days of lactation, to produce  $1.3 \pm 0.8$  kg of milk / day, average live weight of 70,  $5 \pm 9.5$  kg and body condition score  $3.0 \pm 0.5$  were cultivated for 24 hours in 6-well plates in an oven at 37 ° C with 5% CO<sup>2</sup> and saturated humidity. The treatments were: a) Control: 6 mL of culture medium + bovine serum albumin (0.1% BSA); b) C16: 6 mL of culture medium + 100 $\mu$ M of palmitic acid; c) C18: 6 mL of culture medium + 100 $\mu$ M of stearic acid; d) C16C18: 6 mL of culture medium + 100 $\mu$ M palmitic acid + 100 $\mu$ M stearic acid. After cultivating for 24 hours, the explants were removed from the plates, RNA was extracted, complementary DNA synthesized, and the quantitative real-time PCR analysis (RT-qPCR) performed. The data were analyzed using software SAS through the MIXED procedure at a level of 5% of significance and trend between 5 to 10%. The C16 treatment increased the abundance of SCD RNAm by 227.4% and reduced the abundance of AGPAT6 RNAm by 50% when relation to the control. In addition, the C16C18 treatment increased the abundance of FASN, CD36, FABP4, SCD, GPAT, and PPAR- $\gamma$  mRNA by 71.6, 111.7, 114.1, 218.6, 31.2 and 96.9%, respectively, compared to the control treatment. Therefore, the addition of the C16C18 treatment in mammary gland explants of lactating ewes, cultivated *in vitro*, increased the expression of the genes involved in lipid synthesis.

**Keywords:** Lipid metabolism, Fat synthesis, Mammary lipogenesis.





## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Descrição dos primers ovinos utilizados na análise de RT-qPCR.....	42
--	----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de gordura nas células epiteliais da glândula mamária (adaptado de RICO, 2013). .....	29
Figura 2. Abundância de RNAm do gene FASN, envolvido na síntese de novo na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	45
Figura 3. Abundância de RNAm dos genes CD36 (A), FABP4 (B) e SCD (C), envolvidos na captação, transporte e dessaturação de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes. ....	46
Figura 4. Abundância de RNAm dos genes GPAM (A) e AGPAT6 (B), envolvidos na síntese de triglicerídeos na glândula mamária de ovelhas lactantes. ....	47
Figura 5. Abundância de RNAm do gene PPAR- $\gamma$ , envolvido na regulação gênica na glândula mamária de ovelhas lactantes.....	48
Figura 6. Relação entre a Abundância de RNAm dos genes CD36 e FABP4 envolvidos na captação e transporte de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes.	52



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACACA $\alpha$	Acetil-CoA carboxilase alfa
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPAT	Acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHBA	Beta-hidroxibutirato
BME-UV1	Célula clonal mamária
CD36	Translocador de ácidos graxos - Molécula CD36
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLA	Ácido linoleico conjugado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DGL	Depressão de gordura do leite
ECC	Escore de condição corporal
EMAG	Ésteres metílicos de ácido graxo
EPM	Erro padrão da média
FABP	Proteína ligadora de ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
GPAT	Glicerol-3 fosfato aciltransferase
LPL	Lipase lipoproteica
MAC-T	Célula alveolar mamária - T
MS	Matéria seca
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NRC	National Research Council
PPAR- $\gamma$	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos - gama
PV	Peso vivo
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
2.1	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	27
2.2	GLÂNDULA MAMÁRIA .....	28
<b>2.2.1</b>	<b>Síntese da gordura do leite na glândula mamária.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Atividade gênica na glândula mamária.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.1</b>	<b>Síntese <i>de novo</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.2</b>	<b>Captação de ácidos graxos.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.2.3</b>	<b>Dessaturação de ácidos graxos.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.2.4</b>	<b>Síntese de triglicerídeos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2.5</b>	<b>Principais reguladores dos genes lipogênicos.....</b>	<b>31</b>
2.3	EFEITOS DOS LIPÍDIOS .....	32
<b>2.3.1</b>	<b>Ácido palmítico .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Ácido esteárico .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
5.1	ANIMAIS, BIÓPSIAS E TRATAMENTOS.....	39
<b>5.1.1</b>	<b>Biópsia de tecido mamário.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> e tratamentos.....</b>	<b>40</b>
5.2	ANÁLISES LABORATORIAIS .....	40
<b>5.2.1</b>	<b>Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.2</b>	<b>PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR).....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Primers.....</b>	<b>42</b>
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A suplementação com lipídios na dieta de ruminantes vem contribuindo positivamente sobre a produção animal, proporcionando aumento no valor energético da dieta, na produção de leite, no teor e/ou na produção de gordura e melhora da eficiência da produção leiteira.

Os ruminantes de produção leiteira podem ser suplementados com ácidos graxos saturados como por exemplo, ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). Estudos envolvendo suplementos lipídicos ricos em C16:0 e C18:0 mostraram que esses AG possuem a capacidade de aumentar o teor de gordura do leite e sua produção (TÓDERO et al. 2016 e PIANTONI et al. 2015). Entretanto, suas utilizações na dieta de ruminantes têm demonstrado grande variabilidade nos resultados na síntese de gordura do leite (ENJALBERT et al., 2000; BIONAZ e LOOR, 2008a) e na expressão dos genes avaliados *in vivo* (HORSTMANN, 2020 e RICO et al. 2020) e *in vitro* (YONEZAWA et al. 2004; KADEGOWDA et al. 2009; QI et al. 2014 e CARRARO et al. 2019).

Pesquisas com células mamárias em cultivos *in vitro* têm sido usadas para avaliar a expressão de genes sob vários tipos de protocolos. Além disso, o cultivo de tecidos da glândula mamária pode ser uma ferramenta importante para identificar peculiaridades específicas dos tecidos, e auxiliar no entendimento do mecanismo molecular, considerando que o tecido mantém características de quando *in vivo* (URIO et al. 2018).

Assim, investigações usando explantes da glândula mamária de animais em lactação cultivados *in vitro* podem auxiliar no entendimento da expressão de genes, reduzindo o uso dos animais e proporcionando resultados auxiliem no entendimento, pelo menos em parte, do que ocorre *in vivo* durante a síntese de gordura do leite em animais recebendo suplementos lipídicos.

Por esses motivos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos ácidos palmítico, esteárico e sua combinação na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes, cultivados *in vitro*.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTUDOS *IN VITRO*

*In vitro* é a expressão que designa algum processo biológico fora do sistema vivo do animal, acontecendo em ambiente controlado (ar, umidade, temperatura e suplementado com nutrientes) em um laboratório (ICHINOSE e NANDI, 1966; CHOI et al. 1988). Com uma amostra de tecido (explante) o modelo *in vitro* pretende simular o que ocorreria no órgão avaliado, tornando similar ao processo no tecido *in vivo* (AKERS, 2017).

Os estudos envolvendo cultivos de glândula mamária têm utilizado algumas linhagens celulares tais como a célula alveolar mamária T (MAC-T) (KADEGOWDA et al. 2009) e a célula clonal mamária (BME-UV1) (ZAVIZION et al. 1996). Esses estudos envolvendo linhagens de células têm abordado áreas como fisiologia e expressão gênica sob vários tipos de protocolos, como, por exemplo, aqueles conduzidos por Hansen e Knudsen (1987), avaliando o efeito dos AG's exógenos na biossíntese de lipídios nas células epiteliais de ruminantes; e por Keys et al. (1992) sobre a capacidade do tecido mamário bovino de sintetizar lipídios durante um período de incubação de 96 horas.

Além disso, os cultivos podem utilizar explantes da glândula mamária de mamíferos não lactantes, em pré-parto (SHAO et al. 2013), células alveolares isoladas de tecido mamário em lactação ou de animais não lactantes (CHOI et al. 1988). Embora haja limitações da técnica (não considerando a interação do metabolismo animal como um todo), essa prática permite a avaliação dos efeitos dos tratamentos especificamente no tecido/órgão em diferentes períodos de lactação.

Na área de investigação molecular, Urio et al. (2018) avaliaram a expressão de fatores de transcrição, genes lipogênicos e relacionados à produção de leite, em explantes mamários de ovelhas lactantes submetidos a uma alta dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 por 24h, e concluíram que explantes são um modelo passível de uso.

Kadegowda et al. (2009) utilizaram células MAC-T cultivadas *in vitro* com AG para estudos de expressão de genes e Hosseini et al. (2013) compararam a expressão de genes lipogênicos em células MAC-T e explantes mamários de vacas lactantes. Ambos concluíram que os explantes são mais fidedignos.

Apesar das limitações em obter tecido da glândula mamária de espécies não comumente usadas em laboratório, considera-se que o explante de tecido preserva a composição natural do

tecido mamário, quando comparado às linhagens celulares imortalizadas, devido à proximidade com os tecidos/células originais, possuindo um ambiente molecular mais semelhante ao *in vivo* (HOSSEINI et al. 2013) e a estrutura tridimensional e a matriz extracelular que são fatores essenciais para obter um epitélio mamário lactante funcional (MUSCHLER e STREULI, 2010).

## 2.2 GLÂNDULA MAMÁRIA

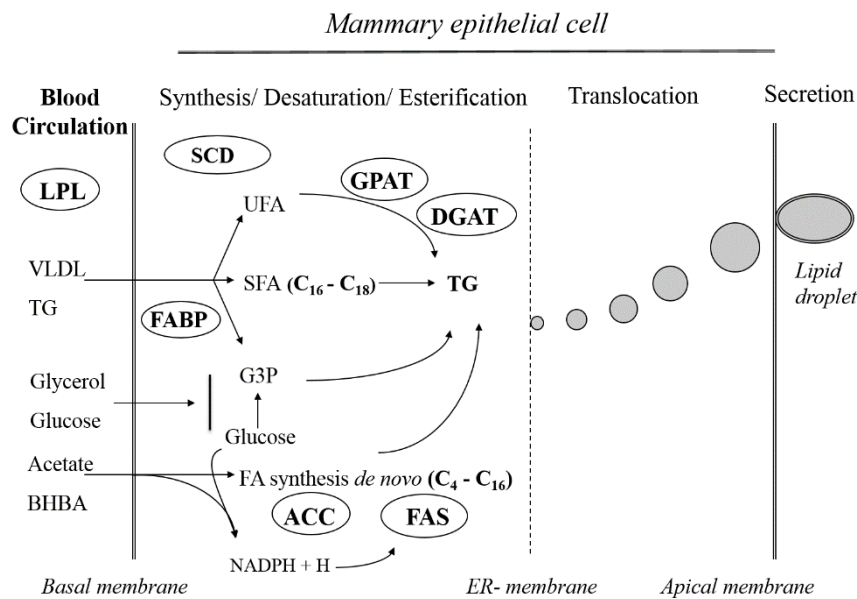
O desenvolvimento da glândula mamária ocorre principalmente durante a primeira gestação (VEIGA e FONSECA, 2019), sob influência dos hormônios prolactina e glicocorticoides (SHAO et al. 2013 e COHEN et al. 2018) associados com o desenvolvimento fetal.

Nas ovelhas, o desenvolvimento da glândula mamária é concluído principalmente no período de gestação com escasso crescimento mamário durante o início da lactação. Então, a atividade metabólica celular e o transporte de nutrientes são aumentados para fornecer substratos para a síntese dos componentes do leite durante o início da lactação, através de importantes mudanças na expressão gênica da glândula mamária (GALLARDO et al. 2019).

### 2.2.1 Síntese da gordura do leite na glândula mamária

A gordura é o principal componente energético do leite e é responsável por muitas das propriedades físico-químicas e qualidades organolépticas dos produtos lácteos, além de inúmeras funções no organismo animal e humano (BAUMAN e GRIINARI, 2001; BAUMAN, 2011).

O leite é o produto que mais se diferencia entre as espécies de mamíferos e seus componentes podem ser alterados diretamente pela dieta. A síntese da gordura do leite exige que a glândula mamária tenha um constante suprimento de precursores além da ação de várias enzimas envolvidas na captação de substratos, síntese *de novo*, absorção, dessaturação, esterificação, transporte de AG e na formação das gotículas de gordura, conforme a Figura 1 (RICO, 2013).



**Figura 1.** Síntese de gordura nas células epiteliais da glândula mamária (adaptado de RICO, 2013).

Os ácidos graxos utilizados na síntese de gordura do leite são derivados de duas origens; da circulação sanguínea, podendo ser dos lipídios absorvidos da dieta (quilomícrons e/ou VLDL) ou da mobilização de reservas corporais; e da síntese “*de novo*” nas células epiteliais mamárias, que utiliza como precursores o acetato e o butirato produzidos durante o processo de fermentação ruminal dos carboidratos (KOZLOSKI, 2011; BERNARD et al. 2018).

## 2.2.2 Atividade gênica na glândula mamária

### 2.2.2.1 Síntese *de novo*

Para que a lipogênese via síntese *de novo* ocorra na glândula mamária de ruminantes são necessárias duas enzimas chaves, a acetil-CoA carboxilase alfa (ACACA $\alpha$ ) e a ácido graxo sintase (FASN) (SMITH, 1994), a fim de que resulte na produção de AG’s de cadeias curta e média e uma parte de C16:0 (HARVATINE et al. 2008).

A ACACA $\alpha$  é responsável pelo primeiro passo, convertendo acetil-CoA em malonil-CoA, considerado como um “primer” inicial para a síntese de ácidos graxos (AKERS, 2002). A enzima FASN atua catalisando a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, podendo fazer o alongamento dos AG’s até 16 carbonos na glândula mamária (SMITH, 1994). Além disso, a enzima Acil-tioesterase I atua nesse processo juntamente com a FASN, podendo interromper o

alongamento de AG's formando aqueles de cadeia curta e média contribuindo para a manutenção da fluidez do leite (SMITH, 1980).

### **2.2.2.2 Captação de ácidos graxos**

A captação intracelular dos AG, depende da ação da lipoproteína lipase (LPL), que capta e hidrolisa os triglicerídeos. A LPL está localizada nos capilares das células epiteliais mamárias e/ou adiposas, que permite que esses tecidos obtenham os AG's dos triglicerídeos derivados dos quilomícrons e do VLDL, originados da absorção pelas células do intestino ou produzidos pelo fígado (TSIPLAKOU et al. 2011), liberando AG's livres, glicerol e monoacilglicerol.

A captação dos AG's pode ocorrer por difusão ou via transporte saturável (BERNARD et al. 2008). De acordo com Palmquist (2006), a captação dos AG's pelas células epiteliais mamárias necessita de transportadores específicos, onde algumas proteínas desempenham um papel nesse transporte e dentre essas encontramos a proteína translocadora de ácidos graxos (CD36) localizada no epitélio mamário e a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP).

As FABPs controlam a homeostase intracelular de lipídeos, regulando o transporte de AG's no compartimento nuclear e extra nuclear da célula, e com isso, também influenciam na homeostase energética sistêmica (STORCH e MCDERMOTT, 2009).

### **2.2.2.3 Dessaturação de ácidos graxos**

Na glândula mamária, alguns AG's vindos da corrente sanguínea ou sintetizados no órgão são modificados pelo processo de dessaturação, o que explica a presença da maioria dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) encontrados na gordura do leite (KISSELLA, 1970). A principal enzima envolvida na síntese de MUFA a partir da dessaturação de AG's é a estearoil-CoA dessaturase (SCD). A ação dessa enzima é importante para a manutenção da fluidez do leite bem como para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados (LOCK e DE SOUZA, 2015).

#### 2.2.2.4 Síntese de triglicerídeos

A principal forma na qual a gordura do leite se encontra é como triglicerídeo. Para que os triglicerídeos sejam secretados no leite como glóbulos (gotículas) de gordura são necessárias algumas conversões na síntese (SHINGFIELD et al. 2010), Figura 1.

O primeiro passo da síntese de triglicerídeos é a conversão do glicerol-3-fosfato e acil-CoA em ácido lisofosfatídico na posição sn-1, realizada pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) (TAKEUCHI e REU, 2009). A GPAT é considerada como limitante da síntese de triglicerídeos e na regulação do fluxo de AG's (GONZALEZ-BARO et al. 2006).

O segundo passo é realizado pela acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase (AGPAT), responsável pela conversão do ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico, adicionando um grupo acil à posição sn-2 do esqueleto de glicerol (TAKEUCHI e REU, 2009). A terceira enzima envolvida na síntese de triglicerídeos é a diacilglicerol aciltransferase (DGAT), está é responsável por esterificar ácidos de cadeia longa e curta na posição sn-3 (PALMQUIST 2006; SHINDOU et al. 2009; TAKEUCHI e REU, 2009).

#### 2.2.2.5 Principais reguladores dos genes lipogênicos

Baumgard et al. (2002) sugeriram que os genes envolvidos na síntese de gordura do leite podem compartilhar um mecanismo regulatório em comum. Os principais fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão de genes na síntese *de novo* e na captação de AG's da corrente sanguínea são as proteínas de ligação de elementos reguladores de esterol (SREBPs) (HARVATINE e BAUMAN, 2006) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) (BIONAZ e LOOR, 2008a).

As SREBPs são uma família de fatores de transcrição que combinadas à proteína de clivagem-ativação da SREBP (SCAP) regulam a expressão de várias enzimas essenciais para síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos (EBERLE et al., 2004). A isoforma 1 (SREBP1), controla principalmente as enzimas envolvidas na síntese de gordura da glândula mamária (HARVATINE e BAUMAN, 2006). O SREBP1 transloca-se para o núcleo da célula, ligando-se a elementos reguladores de esterol nas regiões promotoras de genes alvo, recrutando coativadores e estimulando a transcrição dos genes alvo (HUSSEIN et al. 2013; BIONAZ e LOOR, 2008a).

O PPAR compreende um grupo de receptores nucleares com três isoformas, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  e PPAR- $\gamma$  (BIONAZ et al. 2013). Os PPARs são fatores de transcrição dependentes

de ligantes, que regulam a expressão dos genes alvos através da ligação aos elementos de respostas do proliferados de peroxissomos (PPERs) dos genes reguladores, através de 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 e MOLLER, 2002).

A PPAR- $\gamma$  possui uma maior expressão no tecido adiposo de ruminantes, mas também é o principal fator de transcrição regulando os genes da via da síntese *de novo* e aqueles envolvidos na captação de AG's da corrente sanguínea (BIONAZ e LOOR, 2008b). Além disso, Kadegowda et al. (2009) relataram que a PPAR- $\gamma$  é o gene chave que controla a expressão da síntese de gordura do leite em ruminantes.

## 2.3 EFEITOS DOS LIPÍDIOS

### 2.3.1 Ácido palmítico

O ácido palmítico é um um ácido graxo de cadeia longa (AGCL), que tem sido utilizado como suplemento lipídico na dieta de ruminantes e uma grande variabilidade nos resultados pode ser observada (ENJALBERT et al. 2000; RICO et al. 2014). Piantoni et al. (2013) suplementaram vacas em lactação com C16:0 e obtiveram aumentos na produção de leite (2,5%) e no teor de gordura do leite (3,3%). Em outro estudo com vacas, Tódero et al. (2016) utilizaram um suplemento contendo 88% de C16:0 e comparado ao tratamento sem suplementação lipídica, observaram um aumento de 8,3% no teor de gordura do leite.

De acordo com Rico et al. (2014), a suplementação com C16:0 melhorou a concentração e a produção de gordura do leite de vacas bem como a eficiência de conversão alimentar em relação à suplementação com C18:0. Mosley et al. (2007) forneceram diferentes níveis (0 a 1.500 g) de óleo de palma na dieta de vacas em lactação e observaram um aumento no teor de C16:0 na gordura do leite e não obtiveram alterações na ingestão de matéria seca.

Estudos *in vitro* relataram um efeito estimulador do C16:0 na síntese de C4:0 e os autores consideraram que o C16:0 atuou como um "primer" para a síntese de triacilglicerol por acilação na posição sn-1, permitindo que os AG's de cadeia média e curta fossem incorporados nas posições sn-2 e sn-3 (HANSEN e KNUDSEN, 1987). Além disso, estudos *in vitro* relataram um efeito estimulador de C16:0 nas células mamárias e observaram que o ácido palmítico é o substrato preferido pela célula mamária (HANSEN e KNUDSEN, 1987; KISSELLA, 1970).



Suplementando diferentes concentrações de C16:0 em células epiteliais mamárias bovinas, Qi et al. (2014) observaram efeito supressor da ACACA $\alpha$  e FASN e propuseram que o C16:0 poderia inibir a síntese *de novo*. Recentemente, Carraro et al. (2019) em um estudo *in vitro* testaram o C16:0 em explantes mamários de ovelhas lactantes, e observaram o aumento da expressão gênica das isoformas da ACACA $\alpha$  (PII e PIII) e FASN, genes envolvidos na via da síntese *de novo*.

### 2.3.2 Ácido esteárico

Os ruminantes podem ser alimentados com suplementos ricos em C18:0 mas sua utilização tem sido pouco descrita e os resultados encontrados em vacas lactantes apresentam grande variabilidade (PIANTONI et al. 2015).

Segundo o Sampath e Ntambi (2005), o C18:0 é encontrado no leite de ruminantes perfazendo de 5 a 15% da gordura. Piantoni et al. (2015) forneceram 2% do consumo de MS da dieta com C18:0 para vacas de alta produção e observaram um aumento na ingestão de alimentos, produção e teor de gordura do leite. Enjalbert et al. (2000) suplementaram C18:0 na dieta de vacas leiteiras e observaram aumento na produção de AG's pré-formados no leite e outros AG's de 18 carbonos com variação no grau de saturação. Em contrapartida, Boerman et al. (2017) forneceram diferentes níveis de C18:0 na dieta de vacas em lactação e não observaram efeitos sobre a produção e componentes do leite.

Recentemente, Toral et al. (2018), em um estudo com ovelhas lactantes, forneceram 2% do consumo de MS com óleo de peixe ou em combinação com C18:0 (2% do consumo de MS) para reverter a síndrome da depressão da gordura do leite (DGL) causada por óleo de peixe e observaram uma redução de 20% da concentração e produção de gordura no leite, sugerindo que seu uso não foi capaz de reverter a DGL causada pela suplementação com óleo de peixe.

Kadegowda et al. (2009) relataram o efeito *in vitro* do C18:0 e outros AGCL sobre genes lipogênicos em células MAC-T e encontraram reduções na expressão de ACACA $\alpha$  e FASN, em comparação ao grupo controle. Utilizando estearato em células epiteliais mamárias bovinas, Qi et al. (2014) também observaram efeito supressor da ACACA $\alpha$  e FASN. Liang et al. (2014) observaram *in vitro* que os ácidos oleico, esteárico e palmítico aumentaram o acúmulo de gotículas lipídicas e os níveis de FABP3 e PPAR- $\gamma$  nas CEM bovinas.

A utilização de suplementos ricos em ácidos graxos saturados para animais em período de lactação justifica o interesse em entender os efeitos desses AG's pois desencadeiam mudanças no desempenho geral do animal, na composição e volume de leite produzido, impactando na rentabilidade da atividade (RICO, 2013).

### 3 HIPÓTESES

Adição dos ácidos palmítico, esteárico e sua combinação em explantes de glândula mamária de ovelhas lactante, cultivados *in vitro*, irão aumentar a expressão dos genes envolvidos na captação, transporte, dessaturação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos e reduzir a expressão dos genes da síntese *de novo*.



#### **4 OBJETIVO**

Verificar o efeito dos ácidos palmítico, esteárico e sua combinação na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes, cultivados *in vitro*.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UEDESC), sob o protocolo 1393221119.

### 5.1 ANIMAIS, BIÓPSIAS E TRATAMENTOS

#### 5.1.1 Biópsia de tecido mamário

Foram utilizados explantes de tecido mamário de 3 ovelhas lactantes de partos gemelares, da raça Lacaune, com 30 ( $\pm 4$ ) dias de lactação (DEL), produzindo em uma ordenha  $1,3 \pm 0,8$  kg de leite/dia, peso vivo médio de  $70 \pm 7,5$  kg e escore de condição corporal (ECC)  $2,5 \pm 0,5$ , pertencentes do rebanho do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Na realização da biópsia foi administrado anestésico local (4mL, intramuscular de cloridrato de lidocaína) no ponto da incisão para o bloqueio local. As amostras foram obtidas através de uma incisão na pele no ponto médio da metade do úbere, utilizando agulha co-axial (Hospifer, Porto Alegre, RS, Brasil) e posteriormente utilizado um instrumento específico para biópsia (Geotek Medikal - EstaCore disposable biopsy cannula/GEC 1412, TIC. SAN. LTD. STI, Yenimahalle-Ankara, Türkiye) para coleta. Resumidamente, uma agulha de biópsia de calibre 16 foi inserida parcialmente através da agulha coaxial e amostras de tecido (~40 mg/biópsia) foram coletadas, inspecionadas para verificar a homogeneidade do tecido, rapidamente lavadas com solução salina e 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).

Após o procedimento aplicou-se anti-inflamatório (2mL, intramuscular, Megluminato de Flunixinina, durante 5 dias) e antibiótico (6mL, intramuscular, Enrofloxacina, dose única) e curativo no local com cicatrizante e repelente tópico até completa cicatrização, mantendo os animais em observação por ao menos 5 dias.

### 5.1.2 Cultivo *in vitro* e tratamentos

Os explantes foram separados com uma agulha em 24 fragmentos (6 por tratamento), com peso médio de  $40 \pm 3$  mg e cultivados em placas de 6 poços (Nunclon - Nunc, Roskilde, Denmark), em uma estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e com umidade saturada por 24h.

O meio de cultivo continha: Mammary Epithelium Basal Medium (99,2% MEBM, Lonza Walkersville, MD, USA), extrato de pituitária (0,4%), insulina (0,1%), gentamicina/anfotericina (0,1%), fator de crescimento epidérmico (0,1%), hidrocortisona (0,1%) e soro fetal bovino (10%). Os ácidos palmítico e esteárico foram diluídos de acordo com protocolo adaptado de Keating et al. (2008) e utilizou-se albumina bovina (BSA, 98%; Sigma-Aldrich).

Utilizou-se os seguintes tratamentos: **a) Controle:** 6 mL de meio de cultivo + albumina sérica bovina (0,1% BSA); **b) C16:** 6 mL de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido palmítico; **c) C18:** 6 mL de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido esteárico; **d) C16C18:** 6 mL de meio de cultivo +  $100\mu\text{M}$  de ácido palmítico +  $100\mu\text{M}$  de ácido esteárico. Após as 24h de cultivo, os explantes foram retirados das placas e colocados em criotubos contendo QiAzol Lysis Reagent (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA) e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

### 5.2.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras foram descongeladas e processadas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos portátil (Scienlabor, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences), seguindo o protocolo de utilização do fabricante. Foi utilizado DNase (Sigma-Aldrich) “on column” para remover possível contaminação por DNA. As concentrações do RNA foram verificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop, ND-2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) e a qualidade avaliada através da relação  $A_{260/280}$  que foi  $\sim 2,08 \pm 0,02$ . Posteriormente realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com “random primers” e “enzyme mix” em equipamento termociclador (MJ96+, Biocycler, Biosystems Importadora, Curitiba, PR, Brasil).



### 5.2.2 PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em triplicata em placa de 48 poços (MicroAmp<sup>TM</sup>, Applied Biosystems), com volume de reação de 15 µl por poço, sendo 5 µl (20ng) de cDNA e 10 µl de GoTaq q PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA). Os “primers” utilizados foram desenhados especificamente para cada gene de interesse. A curva padrão utilizada continha sete pontos com um “pool” de cDNA de todas as amostras em uma diluição seriada (100, 50, 25, 12, 6,25, 3,12 e 1,56%).

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

### 5.2.3 Primers

As sequências dos primers utilizados para avaliação da expressão gênica foi disponibilizada pelo banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos – GenBank (NCBI, Bethesda, MD, EUA) e/ou de estudos previamente publicados (Tabela 1), sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) e validados quanto a especificidade e eficiência antes da utilização. Foram utilizados dois genes “*housekeeping*” ( $\beta$ -actina e proteína ribossomal S18) e oito genes de interesse (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos primers ovinos utilizados na análise de RT-qPCR.

Gene	Primers <sup>1</sup>	Acesso
ACACA $\alpha$ PII	F: GCCTTGAGCTCTGAGGGCTC R: ACGGAGCCAATTATGAATCG	Ticiani et al. (2016)
FASN	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	Ticiani et al. (2016)
SCD	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG R: CATGAGGATGATGTTTCTCCAAAC	Hussein et al. (2013)
CD36	F: TGTGTTTGGAGGGATTCT R: CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG	Hussein et al. (2013)
FABP3	F: GGACAGCAAGAATTTTCGATGA R: CGATGATTGTGGTAGGCTTG	Hussein et al. (2013)
FABP4	F: ATGGCCAAACCCACTGTGAT R: GGCCCAATTTGAAGGACATCT	NM_001114667.1
GPAM	F: GCATTGGTTCGGTGTAAAGCAT R: TTCTTTCCACTTCAAGGTTGC	Hussein et al. (2013)
AGPAT6	F: ACTTCCAGTACATCAGCCTGCGGC R: CGTGAAAGCGAGAGCTATCCTG	Hussein et al. (2013)
PPAR- $\gamma$	F: CCAAGAATATCCCCGGCT R: AGGCCAGCATCGTGTA AAA	Hussein et al. (2013)
$\beta$ -actina	F: GCCTTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	Ticiani et al. (2016)
RPS18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: CGGATGTCGACGTCACACTT	Ticiani et al. (2016)

<sup>1</sup> Os *primers* são reportados em sequência 5' – 3'. ACACA $\alpha$  PII: Acetil-CoA carboxilase alfa; FASN: Ácido graxo sintetase; SCD: Esteroil-CoA dessaturase; CD36: Translocador de ácidos graxos - Molécula CD36; FABP3: Proteína ligadora de ácido graxo 3; FABP4: Proteína ligadora de ácido graxo 4; GPAM: Glicerol-3-fosfato aciltransferase; AGPAT6: Acilglicerolfosfato aciltransferase 6; PPAR- $\gamma$ : Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos – gama;  $\beta$ -actina: Beta-actina; RPS18: Proteína Ribossomal S18.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS University Edition (SAS, 2017), através do procedimento MIXED, a um nível de 5% de significância e tendência entre 5 e 10%. A expressão gênica foi avaliada considerando os tratamentos como efeito fixo e as amostras como efeito aleatório em um delineamento inteiramente casualizado. A média geométrica de genes *housekeeping* (S18 e  $\beta$ -actina) foi usada como covariável nas suas respectivas análises.

Os resíduos estudentizados fora de  $\pm 3,0$  foram considerados “outliers”, sendo identificados e excluídos da análise estatística. Foram identificados outliers nos genes CD36 (n=1, tratamento C16C18), FABP4 (n=1, tratamento Controle), GPAM (n=1, tratamento C16), AGPAT6 (n=1, tratamento C16C18), e PPAR- $\gamma$  (n=1, tratamento Controle).

Os dados são apresentados como abundância relativa de RNA, considerando o controle como 100%.

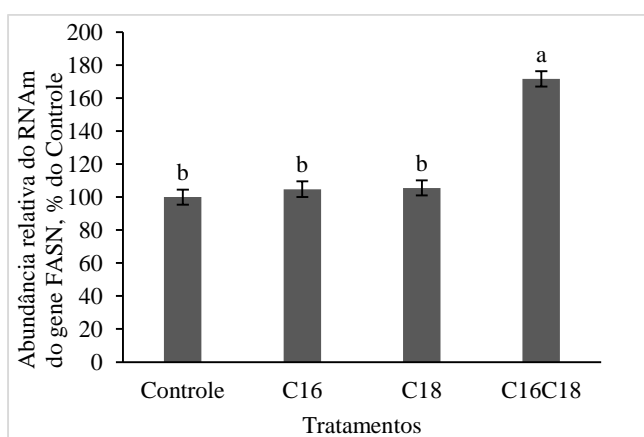


## 6 RESULTADOS

Na Figura 2 pode-se observar que o tratamento C16C18 aumentou a abundância de RNAm da FASN em 71,6, 63,8 e 62,6% em relação ao Controle ( $P = 0,002$ ) e aos tratamentos C16 ( $P = 0,005$ ) e C18 ( $P=0,004$ ), respectivamente.

Não houve efeito ( $P = 0,71$ ) dos tratamentos C16, C18 e C16C18 sobre a expressão gênica da ACACA $\alpha$  PII em relação ao Controle.

**Figura 2.** Abundância de RNAm do gene FASN, envolvido na síntese de novo na glândula mamária de ovelhas lactantes.



<sup>1</sup> Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM

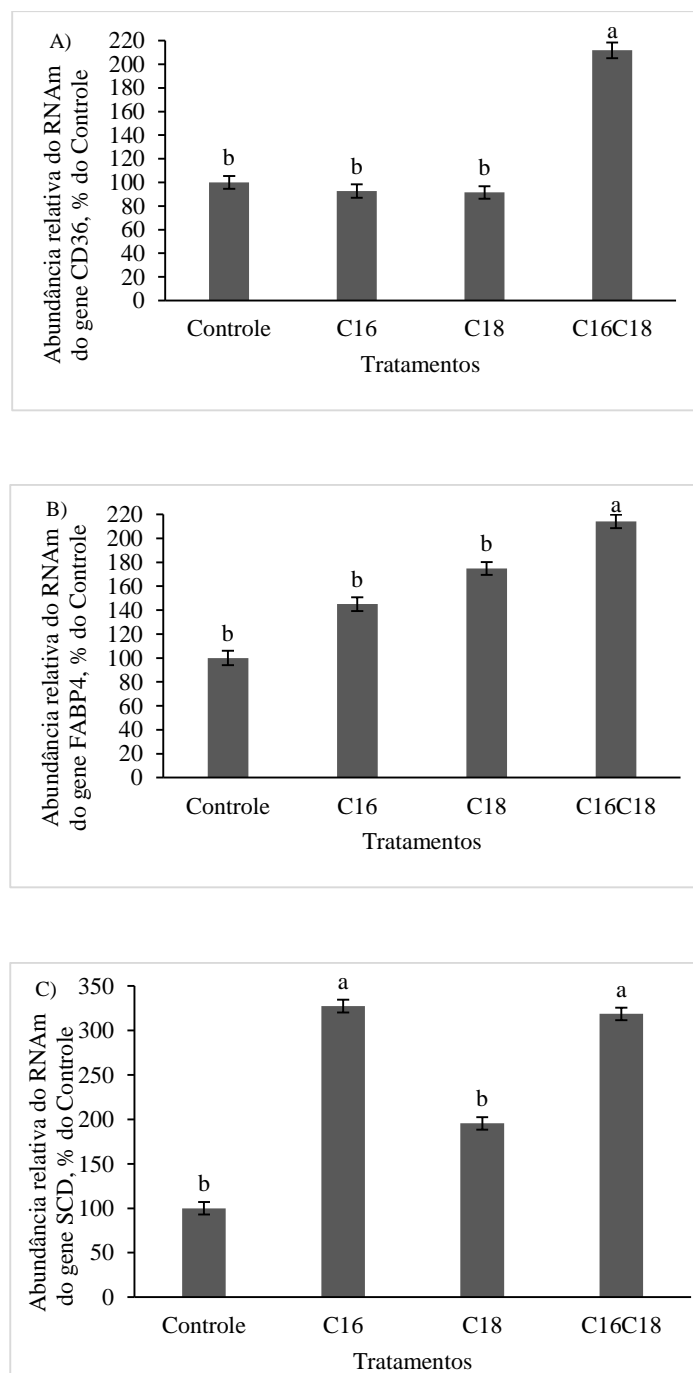
<sup>2</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Em relação aos genes envolvidos na captação, transporte e dessaturação de AG's na glândula mamária, o tratamento C16C18 aumentou em 111,7, 128,5 e 131,4% ( $P = 0,0001$ ) a abundância de RNAm da CD36 quando comparado ao Controle e aos tratamentos C16 e C18, respectivamente (Figura 3A).

Houve um aumento de 114,1% na abundância de RNAm da FABP4 no tratamento C16C18 e uma tendência ( $P = 0,09$ ) em aumentar a abundância de RNAm no tratamento C18 em relação ao Controle (Figura 3B). Não houve efeito de tratamento para o gene FABP3 ( $P = 0,26$ ).

Em relação a abundância do RNAm da SCD (Figura 3C), houve um aumento de 218,6 e 227,4% para os tratamentos C16C18 e C16, respectivamente em relação ao Controle. O tratamento C16 aumentou em 67,5% em relação ao tratamento C18. Ainda, houve tendência do tratamento C16C18 aumentar a SCD em 63% ( $P = 0,07$ ) comparado ao tratamento C18. Não houve efeito do tratamento C18 ( $P = 0,15$ ) comparado ao Controle (Figura 3C).

**Figura 3.** Abundância de RNAm dos genes CD36 (A), FABP4 (B) e SCD (C), envolvidos na captação, transporte e dessaturação de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes.

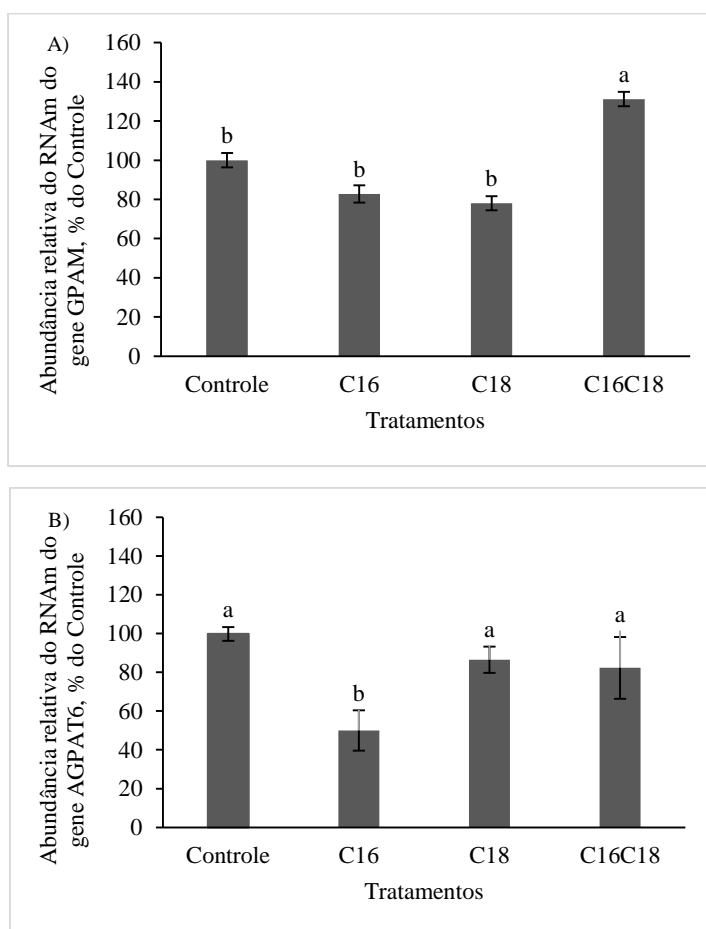


<sup>1</sup> Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM

<sup>2</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Na expressão dos genes envolvidos na síntese de triglicerídeos, o tratamento C16C18 aumentou em 31,2, 58,5 e 68,1% a abundância do RNAm da GPAM, em relação ao Controle ( $P = 0,03$ ) e aos tratamentos C16 ( $P = 0,005$ ) e C18 ( $P = 0,002$ ), respectivamente (Figura 4A). Quanto a expressão da AGPAT6, o tratamento C16 reduziu em 50% a abundância de RNAm em relação ao Controle (Figura 4B).

**Figura 4.** Abundância de RNAm dos genes GPAM (A) e AGPAT6 (B), envolvidos na síntese de triglicerídeos na glândula mamária de ovelhas lactantes.

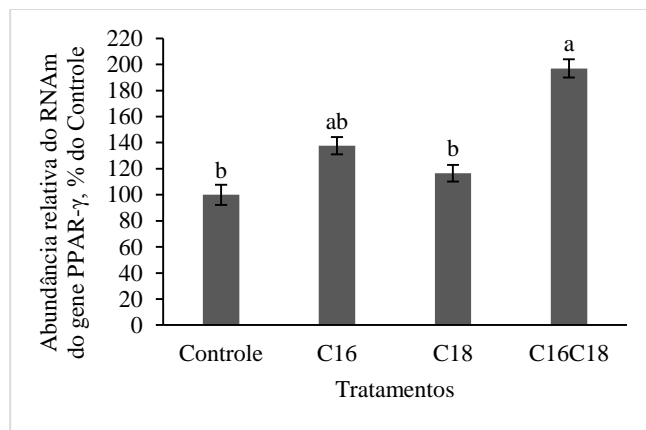


<sup>1</sup> Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM

<sup>2</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.

O tratamento C16C18 também aumentou a abundância de RNAm da PPAR- $\gamma$  em 96,9 e 69,1% em relação ao Controle e ao tratamento C18, respectivamente (Figura 5).

**Figura 5.** Abundância de RNAm do gene PPAR- $\gamma$ , envolvido na regulação gênica na glândula mamária de ovelhas lactantes.



<sup>1</sup> Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM

<sup>2</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.



## 7 DISCUSSÃO

Apesar dos ácidos palmítico e esteárico serem dois AGCL, quimicamente semelhantes, diferindo em apenas 2 unidades de carbono (LOFTEN et al. 2014), estudos envolvendo sua utilização na dieta de ruminantes têm demonstrado grande variabilidade nos efeitos sobre a síntese de gordura do leite (ENJALBERT et al. 2000; BIONAZ e LOOR, 2008a) e na expressão dos genes avaliados *in vivo* (HORSTMANN, 2020 e RICO et al. 2020) e *in vitro* (YONEZAWA et al. 2004; KADEGOWDA et al. 2009; QI et al. 2014 e CARRARO et al. 2019). Com base nisso, o presente trabalho avaliou os efeitos dos ácidos palmítico, esteárico e sua combinação.

Diferente do esperado, os tratamentos C16 e C18 não foram capazes de alterar a expressão dos genes envolvidos na síntese *de novo* na glândula mamária de ovelhas lactantes. Estes resultados diferiram de Carraro et al. (2019), que observaram um aumento da expressão gênica das isoformas da ACACA $\alpha$  (PII e PIII) e FASN em explantes mamários de ovelhas lactantes, cultivados *in vitro* com C16:0. Além disso, foi proposto por Kadegowda et al. (2009) e Qi et al. (2014) um efeito supressor da síntese *de novo* ao avaliarem o efeito *in vitro* dos ácidos palmítico, esteárico e outros AGCL sobre genes lipogênicos em células, e assim propuseram que os AGCL poderiam inibir a síntese *de novo* do leite através de genes (ACACA e FASN).

Estudos anteriores sugeriram razões em que o ácido palmítico poderia causar o efeito supressor na síntese *de novo*: 1) C16:0 reduz a expressão dos genes da síntese *de novo*, principalmente inibindo a ACACA, devido ao aumento das concentrações celulares de acil-coA quando adicionado ao C16:0 (CLARKE e CLARKE, 1982) e 2) C16:0 pode diminuir a atividade da ACACA ou da FASN devido à inibição alostérica pelo C16:0 (WRIGHT et al. 2002). Além desses autores citados, Hansen e Knudsen (1987) e Kadegowda et al. (2009) sugeriram três razões para o efeito supressor da ACACA $\alpha$  com ácido esteárico: 1) C18:0 inibe a síntese *de novo* regulando negativamente a expressão gênica de ACACA, 2) por uma possível competição da acil-CoA de cadeia longa com a acil-CoA de cadeia média, as quais possuem funções distintas, realocando AG's nas posições sn-2 e sn-3 do esqueleto de triglicerídeos, e 3) a acil-CoA de cadeia longa causa um efeito supressor na atividade da ACACA. Apesar desse efeito supressor da síntese *de novo* não ter sido encontrado neste estudo, pressupõe-se que algumas interferências possam ser relacionadas, como por exemplo, o material biológico avaliado ser de espécie diferente e a isoforma da ACACA ser diferente dos resultados reportados na literatura. Vale ressaltar que a isoforma PII é expressa no tecido mamário, adiposo e no fígado, com expressão elevada na glândula mamária em lactação e a isoforma PIII é limitada e predominante na glândula mamária bovina e ovina (BARBER, 2003). Contudo, essas

interferências citadas acima, levam a acreditar que se tivéssemos avaliado a ACACA $\alpha$ PIII possivelmente poderíamos ter encontrado respostas diferentes.

No entanto, hipotetizamos que a ACACA $\alpha$  não é um passo limitador da taxa na síntese de novo *in vitro* (WRIGHT et al. 2006). Em decorrência da combinação dos ácidos palmítico e esteárico, pelo tratamento C16C18, promover o aumento da abundância do RNAm da FASN. Até o presente momento, a autora desconhece algum trabalho que tenha avaliado o efeito combinado dos ácidos palmítico e esteárico, na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária de animais em lactação. Entretanto, baseando-se em trabalhos que avaliaram isoladamente esses AG's, é possível relacionar o resultado da abundância do RNAm da FASN, com os reportados na literatura por Hansen e Knudsen, (1987), Kissella, (1970) e Carraro et al. (2019). O estudo de Hansen e Knudsen, (1987), ao cultivar células mamárias de vacas e cabras com C16:0, relataram que a adição de C16:0 estimulou a síntese e incorporação de AG's sintetizados *de novo* em triglicerídeos, por atuar como um "iniciador" para a síntese de triacilglicerol por acilação na posição sn-1; assim, permitindo que os AG's de cadeia média e cadeia curta fossem incorporados nas posições sn-2 e sn-3. Além disso, Hansen e Knudsen, (1987) e Kissella, (1970), relataram que o C16:0 é o substrato preferencial das células mamárias e possui um efeito estimulador na síntese de gordura do leite, e principalmente na síntese de C4:0 e da sua incorporação em TG em células da glândula mamária. Carraro et al. (2019) observaram um aumento da expressão gênica da FASN, testando *in vitro* o C16:0 em explantes mamários de ovelhas lactantes.

O mecanismo das possíveis causas para esse aumento na expressão da FASN ainda não está completamente esclarecido. No entanto, pressupõe-se que em virtude de uma maior disponibilidade de AG no tratamento C16C18 proporcionou uma melhor utilização pelo explante de glândula mamária, estando de acordo com os resultados encontrados por Kadegowda et al. (2008) que sugeriram uma utilização ideal de C16:0 e C18:0 para o desempenho da lactação, que ocorreria quando ambos são disponibilizados em uma combinação 1:1 e 2:1 de C16:0 e C18:0, respectivamente.

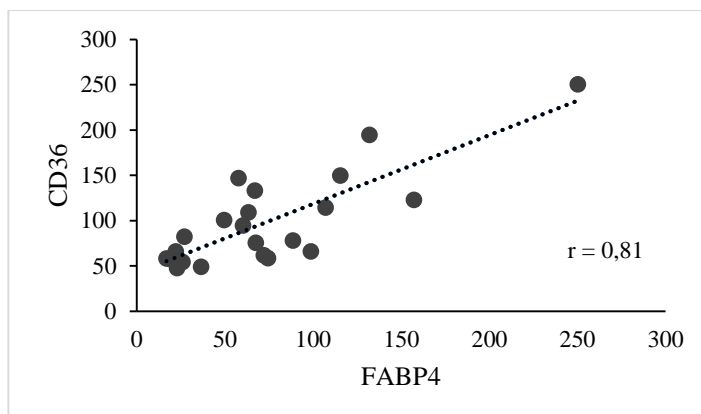
No presente estudo, o tratamento C16C18 também promoveu o aumento da abundância do RNAm da CD36. Essa desempenha uma função importante no transporte dos AG's pelas células epiteliais mamárias (BIONAZ e LOOR, 2008b) tendo preferência por AGCL, principalmente C18:0 (GLATZ et al. 2010). Além dessa, existem outras formas de internalização de AG na glândula mamária, como o processo conhecido como "flip-flop" (CONTRERAS et al. 2010 e GLATZ e LUIKEN, 2018) e por difusão passiva de AG através da membrana (SCHWENK et al. 2010). Yonezawa et al. (2004), Kadegowda et al. (2009) e Qi

et al. (2014), indicaram que a abundância do RNAm da CD36 aumentou quando células mamárias bovinas foram cultivadas *in vitro* com AGCL (palmítico, esteárico, oleico e linoleico). Dessa forma, hipotetizamos que o transportador CD36 é a principal forma de captação de AGCL (palmítico e esteárico) em explantes da glândula mamária de ovelhas lactantes.

Em relação a abundância de RNAm das FABPs, não houve efeito dos tratamentos na expressão da FABP3, estando de acordo com os resultados reportados na literatura por Qi et al. (2014), o qual mostraram que a expressão de FABP3 foi inibida pela adição de C16:0 e C18:0 em meio de cultivo. Em contraste, o tratamento C16C18 aumentou a abundância de RNAm da FABP4, estando de acordo com os resultados reportados por Yonezawa et al. (2004) e Kadegowda et al. (2009), o qual mostraram aumento na abundância de mRNA da FABP4 comparado ao controle quando cultivada *in vitro* com AGCL. Sendo assim, pressupõe-se que o transporte intracelular de AGCL em explantes de glândula mamária ovina ocorre principalmente pela FABP4.

Estudos anteriores indicaram que a FABP e CD36 são duas proteínas de estreita relação funcional nas células epiteliais mamárias bovina (SPITSBERG et al. 1995). Com a intenção de verificar essa associação no presente estudo, na Figura 6 é possível observar a relação positiva entre os dois genes. Ainda, vale ressaltar que Spitsberg et al. (1995) observaram que essas duas proteínas apresentam máxima expressão conforme o período de lactação ( $30 \pm 4$  dias) e podem influenciar nas células epiteliais secretoras da membrana plasmática. Além disso, o complexo FABP/CD36 pode estar envolvido no transporte de gordura através da membrana e na remoção ou adição de glóbulo de gordura do leite. Contudo, hipotetizamos que essa relação FABP/CD36 também ocorre em explantes de glândula mamária de ovelhas em lactação e podem estar envolvidas no transporte de glóbulos de gordura quando ocorre adição do AGCL.

**Figura 6.** Relação entre a abundância de RNAm dos genes CD36 e FABP4 envolvidos na captação e transporte de ácidos graxos na glândula mamária de ovelhas lactantes.



Em relação a abundância do RNAm da SCD, os tratamentos C16 e C16C18 aumentaram a expressão de SCD, indicando que há necessidade de aumentar a dessaturação de alguns AG's quando há maior disponibilidade de AG's saturados na glândula mamária. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Kadegowda et al. (2009) que relataram que C16:0 aumentou a expressão gênica da SCD1 em células MAC-T. O mesmo pode ser observado no trabalho de Jacobs et al. (2013), que suplementaram AG em células MAC-T bovinas e mensuraram a abundância de RNA, dessa forma calcularam o índice de dessaturase da composição de AG's nas células como medida indireta da atividade da SCD. Os mesmos autores demonstraram que o tratamento com C16:0 aumentou o conteúdo de ácido palmítico e o índice de dessaturase de C16:0, indicando que o C16:0 fornecido foi captado e convertido em C16:1 cis-9 pela SCD1 nas células MAC-T.

Neste estudo para síntese de triglicerídeos, houve aumento da abundância RNAm da GPAM para o tratamento C16C18 em relação ao Controle, indicando que a capacidade de conversão e regulação do fluxo de AG's pela GPAM ocorreu em explantes da glândula mamária ovina com adição de AGCL. No entanto, não foi observado o mesmo efeito do aumento da abundância RNAm na AGPAT6, que é considerado o gene responsável pelo segundo passo da conversão na síntese de triglicerídeos. Já o tratamento C16 reduziu em 50% a abundância de RNAm da AGPAT6 em relação ao Controle, indo contra os resultados encontrados por Kadegowda et al. (2009), que cultivaram células MAC-T com C16:0 e C18:0 e observaram que esses AG's aumentaram a expressão gênica da AGPAT6 em relação ao Controle. Bionaz e Looor, (2008b) observaram a expressão de AGPAT6, e propuseram que esta foi a mais afetada pelo estágio de lactação. Sugere-se que a redução da abundância RNAm da AGPAT6 pode estar relacionada ao estágio de lactação ( $30 \pm 4$  dias) que os animais estavam no dia da coleta dos explantes.

O tratamento C16C18 também aumentou a abundância de RNAm do PPAR- $\gamma$ , um fator de transcrição que regula vários genes da glândula mamária de animais lactantes (ZHANG et al. 2018; PÉREZ et al. 2019). Além disso, Kadegowda et al. (2009) e Bionaz et al. (2012) relatam que a SCD é um gene alvo do PPAR- $\gamma$ , o que está de acordo com os resultados encontrados neste estudo. Diante do exposto, pressupõe-se que o PPAR- $\gamma$  é um fator de transcrição essencial para os genes envolvidos na síntese e transporte de ácidos graxos quando tratados com AGCL.

A adição de ambos AG's (palmítico e esteárico) no tratamento C16C18 em explantes da glândula mamária de ovelhas lactantes promoveu aumento da abundância de RNAm de seis genes avaliados. Pressupõe-se que em virtude de um maior "pool" de AG's no tratamento C16C18 em relação aos outros tratamentos (Controle, C16 e C18), a internalização dos AG na glândula mamária de ovelhas, possa ter ocorrido pelo transportador CD36 que é uma das principais formas de captação de AGCL pelas células epiteliais mamárias.

Ainda, sugere-se que em virtude de uma maior disponibilidade de AG no tratamento C16C18 proporcionou a utilização ideal pela glândula mamária de ovelhas lactantes. Dessa forma, Qi et al. (2014) observaram que a viabilidade das BMECs e o acúmulo de TG eram estimulados dependente da concentração, com adição de AGCL saturados no meio de cultura. Corroborando com essa ideia, Rico et al. (2020) sugerem que o mecanismo do aumento da secreção de gordura do leite com 16:0 em relação a outros suplementos contendo ácidos graxos saturados não parece estar relacionado à modulação da expressão de genes relacionados à lipogênese na glândula mamária, mas ao aumento do fornecimento de substrato.

Estudos com a utilização combinada de C16:0 e C18:0 *in vivo* e/ou *in vitro* são escassos, principalmente em tecido mamário. Assim, os trabalhos apresentados até o presente momento quando utilizam os AG's isolados apresentam uma grande variabilidade nos resultados. Diante do exposto, sugere-se que o efeito dos ácidos palmítico e esteárico podem ser diferentes quando trabalhados com outras concentrações nos cultivos de explantes de glândula mamária e tecido adiposo.



## 8 CONCLUSÃO

Adição combinada e a concentração de ácido palmítico e esteárico em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes, cultivados *in vitro*, foram capazes de aumentar a expressão dos genes envolvidos na síntese lipídica. Porém, quando adicionados isoladamente não apresentaram o mesmo efeito.





## REFERÊNCIAS

- AKERS, R. M. Milk component biosynthesis: Milk fat biosynthesis. In: AKERS, R. M. **Lactation and the mammary gland**. Iowa: Iowa State Press, 2002. Cap. 4. p. 95-96.
- AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10332–10352, 2017.
- 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.
- 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. et al. Nutrigenomics, Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review of Nutrition**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.299-319, 2011.
- BAUMAN, D. E. et al. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model. **The Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 138, n. 2, p.403-409, 2008.
- BAUMGARD L. H. *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** p.2155-2163. 2002.
- BERNARD, L. et al. Y. Expression and Nutritional Regulation of Lipogenic Genes in the Ruminant Lactating Mammary Gland. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], 2008.
- BERNARD et al. Milk Fat Globule in Ruminant: Major and Minor Compounds, Nutritional Regulation and Differences Among Species. **Europe Journal Science Technol.** p.1-27, 2018.
- BERGER, J. e MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409–435, 2002.
- BIONAZ, M. e LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC genomics**, v. 9, p. 366, 2008a.
- BIONAZ, M. e 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. **The journal of Nutrition**, p.1019-1024, 2008b.
- BIONAZ, M. et al. 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**, p.28, 2013.

BOERMAN, J. P. et al. Milk production and nutrient digestibility responses to increasing levels of stearic acid supplementation of dairy cows. **Journal of Dairy Science** [s.l.], v. 100, n. 4, p.2729-2738, 2017.

CARRARO, P.C et al. Palmitic acid increases the abundance of mRNA of genes involved in de novo synthesis of fat in mammary explants from lactating ewes. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 174, p.99-102, 2019.

CLARKE B.A. e CLARKE S.D. Polymer-protomer transition of acetyl-CoA carboxylase as a regulator of lipogenesis in rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.218. p.92-100, 1982.

COHEN B. C. et al. Lipid Metabolism in Mammary Epithelial Cells-A Comparison of Common In-Vitro Models. **Journal Advances in Dairy Research**. v.6. p.1-9, 2018.

CHOI, Y.J. Casein Gene Expression in Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, p.2898-2903, 1988.

CONTRERAS F. X. et al. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. **FEBS Letters**. p. 1779-1786. 2010.

EBERLE, D. et al. SREBF-1 Gene Polymorphisms Are Associated With Obesity and Type 2 Diabetes in French Obese and Diabetic Cohorts. **Diabetes**, [s.l.], v. 53, n. 8, p.2153-2157, 2004.

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** [s. L.], n.83, p.1428-1433, 2000.

GALLARDO M. et al. Effect of Diet and Type of Pregnancy on Transcriptional Expression of Selected Genes in Sheep Mammary Gland. **Animals**. p.1-13. 2019.

GLATZ, J. F. C. et al. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. **Physiological Reviews**, American Physiological Society, [s.l.], v. 90, n. 1, p.367-417, 2010.

GLATZ J. F.C. e LUIKEN J.F.P. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. **Journal of Lipid Research**. V. 5. p.1084-1093, 2018.

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

HANSEN, H. O. e 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. e BAUMAN, D. E. SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) Are Involved in the Regulation of Bovine Mammary Lipid Synthesis during Diet-Induced Milk Fat Depression and Treatment with CLA. **The Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 136, n. 10, p.2468-2474, 2006.

HARVATINE, K.J. et al. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v.3, p.40–54, 2008.

HORSTMANN, R. **Efeito do ácido esteárico (C18:0) sobre a produção, composição, perfil de ácidos graxos do leite e expressão de genes lipogênicos em ovelhas**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages-SC, f. 65. 2019.

HOSSEINI, A. et al. Transcriptomics Comparisons of Mac-T cells Versus Mammary Tissue during Late Pregnancy and Peak Lactation. **Advances in Dairy Research**, [s.l.], v.01, n. 01, p.1-12, 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**, [s.l.], v. 96, n. 6, p.3825-3834, 2013.

ICHINOSE, R. R. e NANDI, S. Influence of hormones on lobulo-alveolar differentiation of mouse mammary glands in vitro. **Journal Endocrin**, p.331-340, 1966.

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.

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**, [s.l.], v. 92, n. 9, p.4276-4289, 2009.

KADEGOWDA et al. Abomasal Infusion of Butterfat Increases Milk Fat in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p.2370-2379, 2008.

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**. p.284-292, 2008

KEYS, J. E. et al. The ability of bovine mammary tissue to synthesize lipids for 96 h when cocultured with liver and adipose tissue. **Biochem. Cell Biol.**, v.70, p.343-346, 1992.

KINSELLA, J. E. Stearic acid metabolism by mammary cells. **Journal Dairy Science** p.1757–1765, 1970.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica de Ruminantes**. 3. ed. Santa Maria-RS: Editora ufsm, p.212, 2011.

LIANG, M. et al. Functional analysis of FABP3 in the milk fat synthesis signaling pathway of dairy cow mammary epithelial cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal** p.1-9, 2014.

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

LOFTEN, J.R. et al. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 97, n. 8, p.4661-4674, 2014

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. e STREULI, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 2, p.1-19, 2010.

PALMQUIST, D. L. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. **Advanced Dairy Chem-istry**: v.2: Lipids. 3ed. p.43–92, 2006.

PEREZ et al. Nutrigenomic Effect of Saturated and Unsaturated Long Chain Fatty Acids on Lipid-Related Genes in Goat Mammary Epithelial Cells: What Is the Role of PPAR? **Veterinary. Science**. p. 2-19, 2019.

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

PIANTONI, P. et al. M. S. Palmitic acid increased yields of milk and milk fat and nutrient digestibility across production level of lactating cows. **Journal 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**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.414-421, 2014.

RICO, D. E. et al. Abomasally infused SFA with varying chain length differently affect milk production and composition and alter hepatic and mammary gene expression in lactating cows. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], p. 1-10, 2020.

RICO, J. E. et al. Compared with stearic acid, palmitic acid increased the yield of milk fat and improved feed efficiency across production level of cows. **Journal Dairy Science**, [s.L.], v. 97, n. 2, p.1057-1066, 2014.

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

SAMPATH H. e NTAMBI J. M. The Fate and Intermediary Metabolism of Stearic Acid. **Lipid**. Vol.40. p.1187-1191, 2005.

SCHWENK R.W. et al. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. p. 149-154, 2010.

SHAO, Y. et al. Lactogenic hormones stimulate expression of lipogenic genes but not glucose transporters in bovine mammary gland. **Domestic Animal Endocrinology**. p.57-69, 2013.

SHINDOU, H. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. **Journal of Lipid Research**. p.46-51, 2009.

SHINGFIELD, K. J. et al. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, n. 07, p.1140-1166, 2010.

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

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

SPITSBERG, V. L. et al. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. **Eur. J. Biochem**. p.872-878, 1995.

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

TAKEUCHI K. e REU K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **Physiol Endocrinol Metab**. p.195-1209, 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.

TORAL, P. G. et al. Use of high doses of 18 to try to mitigate the syndrome of milk fat depression in dairy ewes fed marine lipids. **Animal Feed Science and Technology**, [s.l.], v. 236, p.68-75, 2018.

TSIPLAKOU, E. et al. Differences in mRNA lipogenic gene expression in the subcutaneous adipose tissue of sheep and goats under the same dietary treatments. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 99, n. 2-3, p. 110-115, 2011.

URIO, M. et al. Technical Note: Culturing sheep lactating mammary explants for gene expression studies. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 164, p.102-104, 2018.

VEIGA M., DA FOSECA L.F. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite**. 1 ed. Pirassununga-SP: editora autores, p.20-25, 2019.

WRIGHT, T. C. et al. 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. 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**. p.2527–2534, 2004.

ZAVIZION, B. et al. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. **In Vitro Cell. Dev. Biol**, p.138-148, 1996.

ZHANG M. Q. et al., 2018 miR-454 regulates triglyceride synthesis in bovine mammary epithelial cells by targeting PPAR- $\gamma$ . **Gene**. p.1-7, 2018.