



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINARIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**REGULAÇÃO GÊNICA DE
ISOFORMAS DA ACETIL-COA
CARBOXILASE ALFA EM
OVELHAS SUPLEMENTADAS
COM ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO**

ELVIS TICIANI

LAGES, 2014

ELVIS TICIANI

**REGULAÇÃO GÊNICA DE ISOFORMAS DA ACETIL-
COA CARBOXILASE ALFA EM OVELHAS
SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira.

Co-orientador: Rogério Ferreira

LAGES, SC

2014

T555r Ticiani, Elvis
Regulação gênica de isoformas da acetil-coa carboxilase alfa em ovelhas suplementadas com ácido linoleico conjugado / Elvis Ticiani. – Lages, 2014.
74 p.: il.; 21 cm

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

Coorientador: Rogério Ferreira

Bibliografia: p. 59-73

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Depressão da gordura do leite. 2. Glândula mamária. 3. Síntese de lipídeos no leite. I. Ticiani, Elvis. II. Oliveira, Dimas Estrasulas de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.3 – 20.ed.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para meus “pais cientistas” Dimas Estrasulas de Oliveira e Rogério Ferreira. Não há dúvidas que o presente trabalho não seria possível sem o apoio e ensinamento repassado por ambos, apresentando-me ao universo acadêmico e me fazendo ter um maior apreço pela ciência, servindo não apenas como exemplos de pesquisadores, mas como exemplos de conduta ética.

Aos meus pais, Neide e José Ticiani, pelo amor e apoio incondicional.

Aos professores do CEDIMA, Ubirajara, Eliana, Sandra e Fabiana por permitirem a minha “hospedagem” no laboratório e por, juntamente com seus orientados, propiciarem um ótimo ambiente de trabalho.

À minha namorada Beatriz pela ajuda na correção gramatical e todo o apoio e compreensão.

Aos melhores estagiários que eu poderia ter: Ana, Camila e Maurício, pela grande colaboração na condução do experimento e pela amizade.

Aos “amigos de laboratório” pelos momentos de descontração e pela ajuda nos momentos de dúvida: Alais, Camila, Carol, Cláudia, Eveline, Fernanda, Flávia, Giane, Jéssica, Monica, Paula e Sheyla.

À Letieri, Kaue e Alan pela ajuda durante as biópsias.

Ao professor Luiz Cláudio Miletto por muito contribuir no meu aprendizado.

Aos meus amigos da república, Daniel, Ederson, Filipe, Pedro e Rorai pelos momentos de descontração e parceria.

À Fazenda Pinheiro Seco que possibilitou a condução do experimento.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao expandirmos o campo do
conhecimento apenas aumentamos o
horizonte da ignorância.
(Henry Miller)

RESUMO

TICIANI, ELVIS. **Regulação gênica de isoformas da acetil-coa carboxilase alfa em ovelhas suplementadas com ácido linoleico conjugado**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

A Suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA *trans*-10, *cis*-12) para ovelhas em lactação reduz a gordura do leite regulando a expressão dos genes de enzimas envolvidas na síntese lipídica na glândula mamária. Um exemplo é a acetil-CoA carboxilase alfa ($ACC\alpha$), uma enzima chave na síntese *de novo* de ácidos graxos. A $ACC\alpha$ é codificada por mRNAs transcritos a partir dos promotores PI, PII, PIII, caracterizados como tecido-específico no genoma ovino. Este estudo avaliou os efeitos da suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal para ovelhas em lactação cruzadas Lacaune/Texel, sobre a expressão gênica de diferentes transcritos de mRNA da $ACC\alpha$. Doze ovelhas arranjadas em um delineamento experimental inteiramente casualizado receberam por 14 dias um dos seguintes tratamentos, durante o início, meio e fim de lactação: Controle (forragem + 1 kg de concentrado) e CLA [forragem + 1kg de concentrado + 30mL/d de CLA (29,9% *trans*-10, *cis*-12)]. A suplementação com CLA foi administrada oralmente. Foram feitas biópsias de glândula mamária e tecido adiposo no 14º dia de cada período experimental. O RNA foi extraído, o cDNA sintetizado para posterior análise por PCR real time. Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED. Teor de gordura

do leite foi reduzido pela suplementação de CLA em todos os períodos de lactação. Comparado ao controle, o CLA reduziu ($P < 0,05$) os transcritos oriundos do PIII na glândula mamária no início e meio da lactação, aumentando transcritos oriundos PI no tecido adiposo. No final da lactação houve uma maior depressão da gordura do leite e transcritos derivados do PII foram reduzidos. Em suma, nossos resultados sugerem que o CLA *trans*-10, *cis*-12, regula a expressão gênica da ACC α , diminuindo a expressão a partir do promotor II e III, no tecido mamário e aumentando a expressão gênica ACC α através do PI no tecido adiposo, apresentando influências da fase de lactação sobre o comportamento das isoformas de mRNA da ACC α .

Palavras-chave: depressão da gordura do leite, glândula mamária, síntese de lipídeos no leite.

ABSTRACT

TICIANI, ELVIS. 2014. **Transcriptional Regulation of Acetyl-CoA carboxylase Alpha isoforms in dairy ewes supplemented with conjugated linoleic acid.** 2014. 74 f. Dissertation (Master's degree in Animal Science - area of concentration: Animal science) – Santa Catarina State University. Animal Science Graduate Program, Lages, 2014.

Feeding *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) to lactating ewes reduces milk fat by down-regulating gene expression of enzymes involved in lipid synthesis in mammary gland. An example is acetyl-CoA carboxylase alpha ($ACC\alpha$), a key enzyme in the *de novo* fatty acid synthesis pathway. $ACC\alpha$ is encoded by mRNAs transcribed from three promoters, PI, PII and PIII, characterized as tissue-specific in the ovine genome. This study evaluated the effects of a rumen-protected *trans*-10, *cis*-12 CLA supplement fed to crossbred Lacaune/Texel lactating ewes, on gene expression of different mRNA transcripts of $ACC\alpha$. Twelve ewes arranged in a completely randomized design received for 14 days one of the following treatments, at 15 (early), 70 (mid) and 120 (late) days of lactation: Control (forage + 0.9 kg of concentrate-DM) and CLA [forage + 0.9 kg of concentrate + 28g/d of CLA (29.9% *trans*-10, *cis*-12)]. The CLA supplement was orally dosed. Mammary gland and adipose tissue biopsies were taken on day 14. Subsequently RNA was extracted, cDNA synthesized and real time PCR analysis conducted. Data were analyzed by MIXED procedure. Milk fat content was reduced by CLA supplementation in all stages of lactation. Compared to Control, in the mammary gland CLA reduced ($P < 0.05$)

transcript from PIII in early and mid lactation, increasing transcript from PI in adipose tissue. In the late lactation there was a higher milk fat depression and transcripts PII-derived were downregulated. Overall, our results suggest that *trans*-10, *cis*-12 CLA down-regulates ACC α gene expression by decreasing expression from promoter II and III in mammary tissue and increases ACC α gene expression by increasing expression promoter I in adipose tissue, having influences of stage of lactation on the behavior of mRNA isoforms of ACC α .

Key-words: milk lipid synthesis, mammary gland, milk fat depression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da região reguladora do gene da ACC α ovina, e os mRNAs resultantes dos diferentes promotores, com regiões 5' distintas não traduzidas..... 29

ARTICLE

Figure 1 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in early lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA)..... 54

Figure 2 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in mid lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA)..... 56

Figure 3 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in late lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA)..... 57

Figure 4 – Effects of supplementation with CLA on fatty acid synthase in mammary and adipose tissue from lactating ewes in mid lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA). 58

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Performance and milk composition from dairy ewes supplemented with CLA at different lactation periods. n = 6 (Control) and 6 (CLA)	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBP	Proteína de ligação de acil-CoA
ACC α	Acetil-CoA carboxilase alfa
ACSL	Acil-CoA sintetase de cadeia longa
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGNE	Ácido graxo não-esterificado
CD36	Translocador de ácido graxo 36
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLA	Ácido linoleico conjugado
DGL	Depressão da gordura do leite
FABP	Proteína de ligação de ácido graxo
FAS	Ácido graxo sintase
INSIG	Gene insulina-induzido
LPL	Lipoproteína lipase
MS	Matéria seca
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
P	Promotor
PCR	Reação em cadeia da polimerase
S14	Hormônios tireóideos Spot 14
SCAP	Proteína de clivagem-ativação da SREBP
SCD	Esteroil-CoA-dessaturase
SLC27A	Proteínas de transporte de ácidos graxos 27 ^a
SREBP	Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol
TAG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ARTICLE	
ACC α	Acetyl-CoA carboxylase alpha
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CLA	Conjugated linoleic acid -Methyl ester

DIM	Days in milking
DM	Dry matter
E	Exon
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FA	Fatty acid
FASN	Fatty acid synthase
mRNA	Ribonucleic acid Messenger
P	Promoter
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
RPS18	Ribosomal protein S18
TAE	Tris acetate EDTA

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
%	Porcentagem
C	Carbonos
kg	Quilograma
°C	Graus célsius
D	Dia
mL	Mililitro
mg	Miligrama
μL	Microlitro
V	Volts
mM	Millimolar
UV	Ultravioleta
P	Probabilidade
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 LIPOGÊNESE MAMÁRIA	26
2.1.1 Síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos	26
2.1.1.1 Acetil-CoA Carboxilase Alfa	28
2.1.2 Ácidos graxos pré-formados	31
2.1.2.1 Ativação e transporte intracelular de ácidos graxos ...	32
2.1.2.2 Dessaturação dos ácidos graxos.....	33
2.1.3 Formação dos triglicerídeos e gotículas lipídicas	34
2.2 DEPRESSÃO DA GORDURA DO LEITE (DGL)	35
2.2.1 Metabolismo mamário durante a depressão da gordura do leite (DGL)	40
2.2.1.1 Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP1).....	41
3 CHAPTER ONE - ARTICLE	44
3.1 INTRODUCTION	45
3.2 MATERIALS AND METHODS	46
3.2.1 Animals and treatments	47
3.2.2 Milk sampling and analysis	47
3.2.3 Tissue biopsy	47
3.2.4 ACCα transcripts quantification	48
3.2.5 Statistical Analysis	50
3.3 RESULTS	50
3.4 DISCUSSION	52
3.5 CONCLUSION	59
3.6 REFERENCES	59
4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	62
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O início da lactação sinaliza uma mudança profunda na síntese lipídica nos três principais tecidos lipogênicos em mamíferos: hepático, adiposo e mamário (FLINT *et al.*, 1979). Essa mudança decorre de uma necessidade fisiológica de grande quantidade energética no leite e esse mecanismo está sob o controle coordenado de vários hormônios. Os ácidos graxos utilizados pelas células epiteliais da glândula mamária para a síntese lipídica podem vir de duas fontes: ácidos graxos pré-formados provenientes de adipócitos ou absorvidos da dieta, e ácidos graxos oriundos da síntese *de novo* das próprias células do epitélio mamário.

Os ácidos graxos provenientes da dieta têm a capacidade de regular alguns aspectos do metabolismo animal, dentre esses é possível citar isômeros do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) que possuem as duplas ligações conjugadas, como o ácido linoleico conjugado (CLA *trans*-10, *cis*-12). O CLA *trans*-10, *cis*-12 é um intermediário do processo de bio-hidrogenação e ocorre no rúmen apenas sob certas condições específicas. Este, sabidamente tem efeito indutor na depressão da gordura do leite por inibir a expressão de enzimas e fatores de transcrição associados à síntese lipídica (HARVATINE; BAUMAN, 2006).

A taxa de síntese de ácidos graxos na glândula mamária ao iniciar a lactação tem grande aumento, sendo este acompanhado por um acréscimo na quantidade de duas enzimas que são responsáveis pela síntese: acetil-CoA carboxilase (ACC α) e ácido graxo sintase (FASN) (BARBER *et al.*, 1997). A ACC α catalisa o primeiro passo na síntese dos ácidos graxos e é considerado o passo limitante na velocidade do processo. Assim, mudanças na atividade e expressão da

ACC α estão intimamente correlacionadas com o grau de atividade lipogênica em tecidos de mamíferos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi quantificar a expressão gênica de diferentes isoformas da acetil-CoA carboxilase alfa em diferentes fases de lactação de ovelhas leiteiras com depressão na gordura do leite induzida pela suplementação de ácido linoleico conjugado na dieta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPOGÊNESE MAMÁRIA

Os estudos sobre a elucidação dos processos da biologia da lactação na glândula mamária de ruminantes avançaram significativamente durante o século XX (BAUMAN *et al.*, 2006). Esses, inicialmente definiram e quantificaram os principais aspectos do metabolismo lipídico na glândula mamária, incluindo a síntese de ácidos graxos (AG) do leite através da síntese *de novo* e pré-formados captados da corrente sanguínea (BAUMAN; DAVIS, 1974).

A síntese de gordura do leite necessita de uma coordenada ação enzimática envolvendo a captação de substratos, o transporte de metabólitos, lipogênese *de novo*, transporte de AG, dessaturação, esterificação, formação, transporte e excreção da gotícula de gordura. Em ruminantes, os AG são oriundos de duas fontes, que em situações de balanço energético positivo, contribuem igualmente (em base molar): AG da síntese *de novo* formados nas células do epitélio mamário e AG pré-formados captados da circulação (HAWKE; TAYLOR, 1995). No entanto, embora, os passos bioquímicos envolvidos na síntese de lipídios do leite sejam conhecidos há décadas (NEVILLE; WALSH, 1995), a identificação dos genes que medeiam estas etapas e a fisiologia molecular de produção lipídica apenas recentemente começaram a ser compreendidas em detalhes (McMANAMAN, 2012).

2.1.1 Síntese *de novo* de ácidos graxos

A lipogênese *de novo* ocorre no citosol e é um processo cíclico sequencial no qual as unidades de acetil são

sucessivamente adicionadas a um "iniciador", usualmente o acetil-CoA, mas também sendo usado o β -hidroxibutirato na glândula mamária de ruminantes lactantes. Cerca de metade dos AG do leite (base molar) são derivados da síntese *de novo* (BAUMAN; DAVIS, 1974). Considerando que a síntese *de novo* em não ruminantes faz uso da glicose, os ruminantes utilizam acetato produzido na fermentação ruminal de carboidratos como a maior fonte de carbono. Em adição, o β -hidroxibutirato, produzido pelo epitélio do rúmen a partir do butirato absorvido, fornece cerca de metade dos primeiros quatro carbonos da síntese de novo dos AG em ruminantes (BAUMAN; GRINARI, 2003).

Quanto à regulação desta via, desde a descoberta que a atividade da ATP-citrato liase e NADP-malato desidrogenase foi menor no tecido adiposo bovino do que no fígado e tecido adiposo de ratos (HANSON; BALLARD, 1967), acreditava-se que estas enzimas limitavam a lipogênese nos ruminantes. No entanto, investigações subsequentes mostraram que, embora menor do que em tecidos de ratos, a atividade da ATP-citrato liase no tecido adiposo e glândula mamária de bovinos ainda é suficiente para permitir as taxas observadas de síntese de ácidos graxos (FORSBERG; BALDWIN; SMITH, 1985).

Com o avançar dos estudos, determinou-se que o passo limitante da velocidade na síntese de AG é catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (LOPEZ-CASILLAS *et al.*, 1989). Essa enzima converte acetil-CoA para malonil-CoA, o qual é o "doador" real de unidades de acetil no processo de alongamento dos ácidos graxos. Duas formas da enzima, designada alfa e beta, são encontradas em animais (KIM, 1997). A forma alfa é a enzima que se encontra em tecidos lipogênicos que regula a taxa de síntese dos AG. A forma beta é encontrada em tecidos não lipogênicos e está associada com o controle da oxidação dos ácidos graxos mitocondriais (DRACKLEY, 2000).

2.1.1.1 Acetil-CoA Carboxilase Alfa

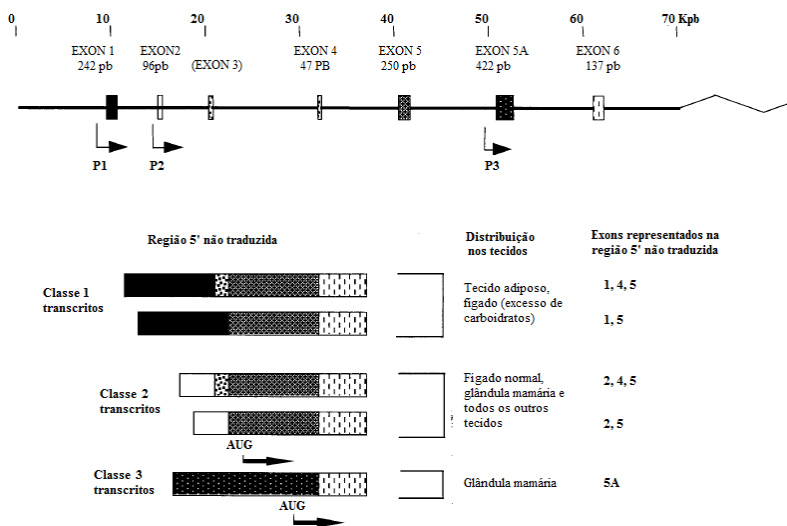
Historicamente, a acetil-CoA carboxilase alfa ($ACC\alpha$) é considerada limitante na síntese de AG (LOPEZ-CASILLAS *et al.*, 1989; KIM, 1997; BARBER *et al.*, 1997). Nos animais superiores, o aumento na atividade celular da $ACC\alpha$ resulta em aumento na produção de malonil-CoA, este sendo essencial para a síntese de AG. A $ACC\alpha$ desempenha atividade fundamental na regulação da repartição de nutrientes entre o fígado e os tecidos periféricos como parte de uma estratégia adaptativa para responder às demandas fisiológicas criadas durante situações como alimentação, jejum e lactação (ZAMMIT, 1996; LOFTUS *et al.*, 2000).

Durante a lactação, a $ACC\alpha$ desempenha uma função crucial, ao facilitar a entrega de precursores de ácidos graxos à glândula mamária para a síntese de gordura no leite. Isto é obtido através da repressão da atividade da $ACC\alpha$ no tecido adiposo e indução na glândula mamária, em parte através de alterações correspondentes ao nível de RNA mensageiro (mRNA) da $ACC\alpha$ nos dois tecidos (BARBER *et al.*, 1997). Para satisfazer estas demandas fisiológicas, a atividade da $ACC\alpha$ é controlada de forma acurada em um mecanismo mais rápido, que envolve a modulação alostérica e múltiplos sítios específicos de fosforilação (KIM *et al.*, 1989) e de forma crônica através de mudanças na expressão gênica (KIM; TAE, 1994). Porém, a regulação transcricional da $ACC\alpha$ é complexa e com vários promotores (P), resultando em variantes que são expressas de forma específica quanto aos tecidos e sinalização (BARBER *et al.*, 2005; TRAVERS; BARBER, 2001).

Estudos iniciais demonstraram que a $ACC\alpha$ era transcrita a partir de dois promotores, PI e PII, de forma tecido-específica, sendo a expressão do PII ubíqua, ao passo que a expressão do PI era limitada ao tecido adiposo e fígado, em

condições lipogênicas (LOPEZ-CASILLAS; PONCE-CASTANEDA; KIM, 1991; KIM; LEAHY; FREAKE, 1996). A utilização destes promotores resulta na geração de uma população heterogênea de mRNA contendo quer o exon 1, quer o exon 2 como exon primário, longitudinalmente sobre as combinações de exons 3 ou 4, antes do exon 5, o exon primário de codificação contendo a sequência AUG (Figura 1) (LUO *et al.*, 1989; BARBER; TRAVERS, 1995). A significância fisiológica dos promotores tecido-específico ou dos diversos transcritos não é clara, embora a utilização de PI possa refletir em uma maior capacidade de síntese lipídica para fins de uso diferente do reabastecimento de membrana, no fígado e no tecido adiposo. Abastecimento de membrana é atribuído ao PII, devido sua expressão em todos os tecidos. Como transcritos oriundos dos PI e PII diferem apenas nas suas regiões 5' não traduzidas, eles codificam essencialmente a mesma proteína (BARBER *et al.*, 2003).

Figura 1 – Estrutura da região reguladora do gene da ACC α ovina, e os mRNAs resultantes dos diferentes promotores, com regiões 5' distintas não traduzidas.



Fonte: Adaptado de Travers; Barber (2001).

Durante a caracterização dos cDNAs da ACC α em tecido ovino, foi isolado um novo transcrito a partir de glândula mamária lactante, em que o exon 5 e a sequência a montante foram substituídas por uma sequência de 460 nucleotídeos representados por um único exon, o exon 5A localizado entre os exons 5 e 6 do gene ovino (BARBER; TRAVERS, 1998). A transcrição desta variante do mRNA da ACC α mostrou-se sob controle de um terceiro promotor, PIII, imediatamente a montante do exon 5A, que resultou em um modo de expressão tecido-específico. Transcritos oriundos do PIII foram encontrados no pulmão, fígado, rim, cérebro e glândula mamária, mas não em uma série de outros tecidos, tais como tecido adiposo, linfático e muscular. Além disso, a expressão na glândula mamária foi induzida de forma significativa durante a lactação. Os transcritos do PIII são distintos, sendo que eles codificam uma ACC α com uma sequência N-terminal alternativa, os 76 aminoácidos

codificados pelo exon 5 os quais são substituídos por apenas 17 resíduos codificados pelo exon 5A (BARBER; TRAVERS, 1998). A função bioquímica conferida pelo exon 5A à isoforma da ACC α ainda não é clara, assim como a relevância fisiológica para os tecidos em que ela é expressa.

2.1.2 Ácidos graxos pré-formados

Ácidos graxos pré-formados captados pela glândula mamária e diretamente utilizados para a síntese de gordura do leite são derivados de lipoproteínas circulantes e ácidos graxos não esterificados (AGNE) os quais se originam da absorção de lipídeos a partir do trato digestivo e da mobilização de reservas corporais de gordura, respectivamente (BARBER *et al.*, 1997). Nos ruminantes, os ácidos graxos na gordura do leite, absorvidos da circulação, são derivados predominantemente da absorção intestinal de AG alimentares e microbianos. Tipicamente, a mobilização de gordura corporal contribui em menos de 10% dos ácidos graxos na gordura do leite. No entanto, quando os animais estão em um balanço energético negativo, a contribuição de ácidos graxos mobilizados aumenta em proporção direta com o nível do déficit de energia (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Para a captação dos AG oriundos da dieta, o VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) ou quilomicrons são ancorados ao endotélio mamário pela lipoproteína lipase (LPL), a qual, em seguida, hidrolisa os triglicerídeos no núcleo da lipoproteína e liberando AG desesterificados para serem absorvidos (FIELDING; FRAYN, 1998). Essa atividade é dependente da abundância de LPL no tecido bem como da presença de receptores para as lipoproteínas (TACKEN *et al.*, 2011).

Após a desesterificação, se dá início a passagem dos AG para o interior da célula, sendo que, nesse processo, ocorre a difusão passiva dos AG através das membranas. Porém, é de menor importância quando comparado com a absorção de AG mediada por proteínas ou pelo mecanismo flip-flop (DOEGE; STAHL, 2006). As principais proteínas envolvidas no transporte de AG são, entre outras, o translocador de ácido graxo (CD36) e proteínas de transporte de ácidos graxos (SLC27A) (DOEGE; STAHL, 2006). Acredita-se que CD36 participe também no processo de secreção de gordura do leite (KEENAN; MATHER, 2006) pela sua presença nas membranas dos glóbulos de gordura do leite (REINHARDT; LIPPOLIS, 2006).

2.1.2.1 Ativação e transporte intracelular de ácidos graxos

Antes de participar em vias metabólicas, os AG de cadeia longa são esterificados à coenzima A na face interna da membrana plasmática. A ativação dos AG ocorre, principalmente, via isoformas da família acil-CoA sintetase de cadeia longa (ACSL) (MASHEK; COLEMAN, 2006). No tecido mamário bovino o mRNA da ACSL1 é predominante entre as isoformas de ACSL (BIONAZ; LOOR, 2008a), pois sua concentração aumenta mais que quatro vezes no início da lactação, sugerindo que a abundância desta isoforma é importante para a síntese de gordura do leite (BIONAZ; LOOR, 2008b).

A livre difusão de AG de cadeia longa nas células é muito lenta e não explica o rápido transporte e direcionamento seletivo para organelas específicas (McARTHUR *et al.*, 1999), assim, AG de cadeia longa exigem transportadores específicos, sendo a proteína de ligação de ácidos graxos (FABP) e proteína de ligação de acil-CoA (ACBP) os principais transportadores de AG intracelulares (McARTHUR *et al.*, 1999).

Os FABPs de mamíferos ligam a AG de cadeia longa com alta afinidade (FROLOV *et al.*, 1997) e a variedade de tipos de FABP sugere funções distintas em tecidos diferentes. Várias abordagens experimentais têm mostrado que cada FABPs pode ter uma ou mais funções sobrepostas, algumas delas baseadas em elementos específicos da estrutura proteica. Embora a afinidade de ligação de todos os FABPs aos AG tende a se correlacionar diretamente com a hidrofobicidade, estudos de estrutura-função indicam que sutis mudanças tridimensionais, ocorridas após a ligação ao ligante, podem promover interações proteína-proteína ou proteína-membrana, o que em última instância determina a função de cada FABP (WOLFRUM *et al.*, 2001). As mudanças conformacionais no FABP estão focadas no domínio helicoidal/portal, uma região identificada por estudos *in vitro*, que é vital para as propriedades de transporte de AG nos FABPs. Assim, os FABPs modulam a homeostase intracelular de lipídios, regulando o transporte de AG no compartimento nuclear e extra nuclear da célula, e ao fazê-lo, também afetam a homeostase energética sistêmica (STORCH; McDERMOTT, 2009).

2.1.2.2 Dessaturação dos ácidos graxos

Apenas uma fração dos AG sintetizados pela glândula mamária é insaturada e a principal enzima envolvida na síntese de AG monoinsaturados (AGMI) é a estearoil-CoA-dessaturase (SCD). Presente em vários tecidos animais, a SCD é uma enzima ligada à membrana do retículo endoplasmático que introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10, em uma ampla gama de AG. Os substratos preferidos pela SCD são o ácido esteárico (C18:0) e, em menor grau, o palmítico (C16:0), por ter menor afinidade. Estes são convertidos em C18:1 *cis*-9 (oleico) e C16:1 *cis*-9 (palmitoleico),

respectivamente (NTAMBI; MIYAZAKI, 2004). Os AGMI servem como os principais substratos para a síntese de fosfolipídios de membrana, triglicerídeos, ésteres de colesterol e ésteres de cera (PATON; NTAMBI, 2009). Além disso, AGMI são sintetizados para servir como mediadores na transdução de sinal, bem como diferenciação celular (incluindo a diferenciação neuronal) (PATON; NTAMBI, 2009). Outros produtos da SCD também podem influenciar a apoptose e mutagênese em alguns carcinomas, como é o caso do ácido linoleico conjugado (CLA *cis*-9, *trans*-11) formado a partir do ácido vacênico (18:1 *trans*-11) (OCHOA *et al.*, 2004).

Em bovinos, duas isoformas foram caracterizadas, SCD1 e SCD5, sendo a primeira abundantemente expressa na glândula mamária, e desempenha um papel importante na produção de gordura do leite (BERNARD; LEROUX; CHILLIARD, 2008; BIONAZ; LOOR, 2008). A SCD5 recentemente descoberta parece ser predominantemente expressa no cérebro e no pâncreas (LENGI; CORL, 2007). Ao contrário do que em roedores, não se sabe muito sobre a regulação nutricional da SCD em bovinos. Todavia, experimentos demonstraram que alimentação de vacas leiteiras com dietas de alto concentrado e baixa fibra (que induz a depressão de gordura do leite), inibe a expressão da SCD1, na glândula mamária (PETERSON *et al.*, 2003; HARVATINE; BAUMAN, 2006). Além disso, a infusão abomasal de CLA *trans*-10, *cis*-12, também inibe a expressão da SCD1 (BAUMGARD *et al.*, 2002; HARVATINE; BAUMAN, 2006).

2.1.3 Formação dos triglicerídeos e gotículas lipídicas

A gordura do leite é composta predominantemente de triglicerídeos (mais de 95%) em todos os mamíferos, porém o conteúdo de gordura do leite varia muito entre as espécies. Por exemplo, o teor da gordura do leite das baleias é em torno de

50%, enquanto que em rinocerontes é menos de 1%. (IVERSON; OFTEDAL, 1995).

Os ácidos graxos usados na biossíntese de triglicerídeos (TAG) são originários da síntese *de novo* na glândula mamária ou absorvidos a partir das lipoproteínas na circulação sanguínea (HAWKE; TAYLOR, 1995). Na gordura de leite bovino, os ácidos graxos com comprimento de cadeia carbônica entre C4 a C14 são oriundos da síntese *de novo* a partir do acetato e β -hidroxibutirato, o que é uma característica especial da lipogênese de ruminantes (HAWKE; TAYLOR, 1995), enquanto os ácidos graxos maiores que C18 são absorvidos da corrente sanguínea e o ácido palmítico (C16:0) provém das duas fontes (HAWKE; TAYLOR, 1995).

Embora fatores nutricionais sejam a principal fonte de variação da composição dos TAG, fatores genéticos e da lactação também têm influência (HAWKE; TAYLOR, 1995). Além disso, a biossíntese dos TAG via glicerol-3-fosfato (G-3-P) tem um efeito específico sobre a estrutura dos TAG na gordura do leite bovino, pois apresenta preferências na posição dos diferentes AG na molécula de glicerol. Em geral, o 1-palmitoil- e 1-oleoil-sn-G-3-P são considerados os substratos mais prováveis para acil-CoA:1-acil-sn-G-3-P aciltransferase na síntese de TAG, devido à elevada concentração de ácido palmítico e oleico na glândula mamária de ruminantes. O 1-palmitoil-sn-G-3-P e 1-oleoil-sn-G-3-P são unicamente acilados à outro acil-CoA com comprimento de cadeia entre C8 a C18 (MARSHALL; KNUDSEN, 1977a), o que resulta numa falta de acil-graxo de cadeia curta na posição-2-sn do glicerol. Marshall; Knudsen (1977b) mostraram que, na sequência, a acil-CoA:1,2-DAG aciltransferase catalisa a síntese dos TAG na glândula mamária de bovinos a partir de ambos butiroil-CoA e palmitoil-CoA com igual eficiência. No entanto, os grupos acilo de cadeia curta (C4:0 e C6:0) são conhecidos por serem mais abundantes na posição-3-sn dos TAG em gordura

de leite bovino que os grupos acilo palmitoil. Isto se dá, provavelmente, devido à maior concentração de butiroil-CoA livre na glândula mamária (MARSHALL; KNUDSEN, 1980).

2.2 DEPRESSÃO DA GORDURA DO LEITE (DGL)

Uma situação nutricional de interesse prático e biológico é a síndrome da baixa gordura do leite, comumente referida como depressão da gordura do leite (DGL). A DGL induzida pela dieta é classicamente observada em vacas alimentadas com grande quantidade de carboidratos altamente fermentáveis e/ou dietas que contenham fonte de ácidos graxos poli-insaturados, como os óleos vegetais e/ou marinhos. Descrita pela primeira vez pelo cientista francês Boussingault em 1845 (VAN SOEST, 1994), a DGL induzida pela dieta é caracterizada pela redução de até 50% na produção de gordura do leite, sem que ocorram mudanças na produção de leite e dos outros componentes (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Descobrir a DGL induzida pela dieta tem instigado pesquisadores há mais de um século (BAUMAN *et al.*, 2011), sendo que várias teorias foram propostas para explicá-la (GRIINARI *et al.*, 1998).

A primeira teoria defendia que em dietas com baixa fibra o decréscimo na relação acetato:propionato no rúmen durante a fermentação seria limitante à síntese de gordura do leite, contribuindo para a DGL, pois já que o acetato é o principal precursor de lipídios através da síntese *de novo* (SUTTON, 1985). Apesar dos estudos iniciais postularem que havia redução da disponibilidade de acetato para a síntese lipídica, estudos posteriores demonstraram que a redução da relação acetato:propionato se dava em virtude de um aumento na concentração molar de propionato e não pela diminuição na produção de acetato, invalidando a teoria inicial (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

A segunda teoria, conhecida como Insulino-glicogênica, proposta por McCymont; Vallance (1962) e melhor descrita por Jenny *et al.* (1974) e Annison (1976) baseia-se nas diferenças de regulação endócrina dos tecidos para utilização dos nutrientes com diferente resposta à insulina (BAUMAN; GRIINARI, 2003). A insulina tem um efeito de lipogênese (estimulatório), inibindo a lipólise no tecido adiposo. Entretanto, a glândula mamária não responde às mudanças na concentração de insulina na circulação (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Na teoria insulino-glicogênica, a DGL ocorreria em função do aumento na produção ruminal de propionato e aumento nas taxas hepáticas de gliconeogênese pela maior quantidade presente de substrato para síntese de glicose, aumentando a insulina circulante para mobilizar a maior quantidade de glicose no sangue. De acordo com esta teoria, os nutrientes da glândula mamária seriam desviados para o tecido adiposo ocasionando incremento na utilização de acetato, β -hidroxibutirato e ácidos graxos de cadeia longa derivados da dieta para as reservas corporais (BAUMAN; GRIINARI, 2001, 2003) Assim, a mudança na síntese de lipídios para o tecido adiposo causaria a falta de precursores para a síntese da gordura do leite.

Sendo a função da insulina manter a homeostase da glicose, sua infusão geralmente resulta em hipoglicemia e na mudança de reguladores metabólicos. O uso de “clamp-euglicêmico” hiperinsulinêmico permite examinar o papel da insulina sem a complicação da hipoglicemia (DeFRONZO *et al.*, 1979). Bauman; Griinari (2001) revisaram dados de cinco experimentos utilizando “clamp” com vacas em balanço energético positivo. A insulina circulante foi elevada de quatro a seis vezes sobre os níveis basais e a glicose mantida nos níveis normais por quatro dias, seguido por uma avaliação dos efeitos crônicos e agudos. Não houve evidências da resistência

à insulina baseada nas taxas constantes de infusão de glicose necessárias para manter a glicemia e a redução da circulação de ácidos graxos não esterificados (BAUMAN; GRINARI, 2001, 2003). O efeito sobre a síntese de gordura do leite foi mínimo durante o uso de “clamp-euglicêmico” hiperinsulinêmico, invalidando a teoria em que o aumento da insulina circulante reduziria a síntese de gordura do leite.

Sob outro ponto de vista de causa e efeito relacionando a composição das dietas e a DGL, Davis; Brown (1970) foram os primeiros a sugerir uma possível relação entre ácidos graxos 18:1 *trans* e a DGL, indicando uma associação entre a bio-hidrogenação ruminal incompleta e a síntese de gordura no leite. Posteriormente, corroborando com essa afirmação, após diversas observações, notou-se haver um aumento no teor de ácidos graxos *trans* na gordura do leite (18:1 *trans*) em uma variedade de dietas que causavam DGL (GRINARI *et al.*, 1998) concomitantemente com a maior saída de AG *trans* do rúmen (WONSIL *et al.*, 1994). Todavia, em alguns estudos, os aumentos foram fracamente correlacionados com a produção de gordura do leite (KALSCHEUR *et al.*, 1997; ONETTI *et al.*, 2001). Assim, a base através da quais certas dietas causam DGL deveria ser mais complexa do que uma simples relação com a produção total de AG *trans*.

A chave para o desenvolvimento desta teoria ocorreu quando Grinari *et al.* (1998), utilizando cromatografia gasosa para avaliar o perfil de ácidos graxos do leite, descobriram que havia uma mudança no padrão de AG *trans*, e apenas alguns isômeros eram aumentados durante a DGL e não todos os AG *trans* que anteriormente tinham sido correlacionados. Especificamente, o teor de 18:1 *trans*-10 aumentou durante a DGL induzida pela dieta. Neste trabalho foram estabelecidas também as condições ruminais para a produção destes AG *trans* específicos sendo: 1) a presença de substrato ruminal na forma de AG poli-insaturados e 2) um ambiente ruminal

modificado (baixo pH) o qual altera a rota de bio-hidrogenação.

Bauman; Griinari (2003) apresentaram uma via possível da bio-hidrogenação do ácido linoleico, na qual ocorreria a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12, em condições de baixo pH ruminal e/ou uma alta quantidade de óleos poli-insaturados. Em princípio, o ácido linoleico seria isomerizado para CLA *trans*-10, *cis*-12, e posteriormente reduzido para C18:1 *trans*-10. O último passo desta via seria a hidrogenação do C18:1 *trans*-10, com a formação do ácido esteárico (C18:0).

No rúmen, poucas bactérias têm a capacidade de sintetizar o CLA *trans*-10, *cis*-12, e somente uma pequena fração do substrato (ácido linoleico) é convertida (MAIA *et al.*, 2010). A sua conversão para um ácido graxo mais reduzido é um indicativo de que este isômero de CLA é um intermediário ligado à célula bacteriana e não um produto final da bio-hidrogenação (KIM *et al.*, 2002).

Baseando-se nos resultados acima, Bauman; Griinari (2001) propuseram a “teoria da bio-hidrogenação”, hoje a mais aceita pela comunidade científica. A teoria da bio-hidrogenação na DGL diz que a inibição da síntese de gordura na glândula mamária ocorre por ação de ácidos graxos (AG) específicos, como por exemplo o CLA *trans*-10, *cis*-12, produzidos como intermediários da bio-hidrogenação no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Para estudos *in vitro*, não há sistema de cultura de células que mantenha a viabilidade de células do epitélio mamário secretando ativamente (BAUMAN *et al.*, 2011) então, após a elaboração da teoria, pesquisas foram feitas em vacas leiteiras utilizando infusões pós-ruminal (abomasal e duodenal) de AG específicos para evitar alterações pelas bactérias do rúmen e determinar quais AG *trans* seriam os responsáveis pela DGL. Investigações iniciais usaram misturas de isômeros de CLA e estabeleceram evidências do conceito da teoria da

bio-hidrogenação onde infusões abomasais de misturas de CLA por um curto período de tempo resultaram em uma acentuada redução na secreção de gordura no leite, a qual voltou a níveis normais quando a suplementação foi suspensa (CHOUINARD *et al.*, 1999a; CHOUINARD *et al.*, 1999b). A partir daí era necessário identificar qual isômero presente nas misturas de CLA era o responsável pelos efeitos e Baumgard *et al.*, (2000) forneceram os isômeros *cis*-9, *trans*-11, e *trans*-10, *cis*-12. Apenas este último foi efetivo para a redução do teor e produção de gordura.

A DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 é marcada pela redução da secreção dos ácidos graxos de todos os tamanhos, embora a redução daqueles oriundos da síntese *de novo* (C4 a C14 e parte dos C16) é mais acentuada (BAUMGARD *et al.*, 2001). Esta redução se dá devido a diminuição na quantidade de enzimas responsáveis pela síntese e transporte lipídico na glândula mamária ao alterar a expressão gênica.

2.2.1 Metabolismo mamário durante a depressão da gordura do leite (DGL)

Os estudos da função e nível de expressão dos genes demonstraram uma complexa e coordenada sequência de eventos moleculares de adaptações mamárias para a lactação em murinos, bovinos, caprinos e suínos (ANDERSON *et al.*, 2007; BIONAZ *et al.*, 2007; OLLIER *et al.*, 2007; TRAMONTANA *et al.*, 2008, respectivamente), trazendo novas percepções sobre a regulação gênica. Até recentemente os estudos eram pouco viáveis, mas o recente avanço no sequenciamento do genoma bovino combinado com as técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu quantificar quando a funcionalidade dos genes estava sendo alterada pelos

nutrientes ingeridos (nutrigenômica), tornando-se ferramenta poderosa para análise da expressão gênica. Trabalhos em genômica funcional reforçaram a visão de que a regulação da transcrição na expressão do gene é essencial, porque é um dos principais mecanismos de regulação em longo prazo do metabolismo celular (BIONAZ; LOOR, 2008b).

O fato é que o CLA *trans*-10, *cis*-12 e a DGL induzida pela dieta envolve uma redução na produção de ambos AG *de novo* e pré-formados, sugerindo uma regulação coordenada de enzimas da síntese lipídica. Baumgard *et al.* (2002) demonstraram a redução na expressão gênica das enzimas da síntese lipídica no tecido mamário de vacas com DGL induzida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 e após, outros estudos deram suporte ao conceito do decréscimo na expressão das enzimas lipogênicas (PETERSON *et al.*, 2003; HARVATINE; BAUMAN, 2006; GERVAIS *et al.*, 2009). De forma geral, a quantidade de mRNA para ácido graxo sintase, acetil-CoA carboxilase, lipoproteína lipase, estearoil-CoA dessaturase, acil-CoA graxo sintase, glicerol-fosfato acil transferase e acil glicerol-fosfato aciltransferase é diminuída durante a DGL (PETERSON *et al.*, 2003).

Os mecanismos moleculares envolvidos nessa inibição ainda não são bem compreendidos, mas a função da família de fatores de transcrição de proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP) foi baseada em suas funções como regulador global da expressão para muitos genes envolvidos na síntese lipídica (PETERSON *et al.*, 2004; SHIMANO, 2009). Isso foi reforçado em estudos com cultivo de linhagem celular do epitélio mamário, nos quais o CLA *trans*-10, *cis*-12 diminuiu a atividade nuclear da proteína SREBP1 (PETERSON *et al.*, 2004). Além disso, um mecanismo divulgado por Harvatine; Bauman (2006) identificou o elemento responsivo a hormônios tireóideos Spot 14 (S14) como um gene candidato e responsivo ao tratamento

com CLA *trans*-10, *cis*-12. Embora sua função bioquímica exata não seja conhecida, o S14 é um gene que codifica uma proteína nuclear intimamente associada à regulação da síntese de ácidos graxos em tecidos lipogênicos (KINLAW *et al.*, 1995).

2.2.1.1 Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP1)

A família de fatores de transcrição SREBP1 funciona como regulador global da síntese de lipídios (EBERLE *et al.*, 2004), ligando-se à sequência de DNA dos genes responsivos ao elemento regulatório de esterol. Existem duas isoformas, sendo a SREBP1c predominantemente reguladora das enzimas envolvidas na síntese da gordura. No entanto, devido à quantidade limitada de sequência disponível, os trabalhos não distinguem entre as isoformas 1a e 1c, assim, referindo-se a elas coletivamente como SREBP1 (HARVATINE; BAUMAN, 2006).

A SREBP1 e sua reguladora (acompanhante), a proteína de clivagem-ativação da SREBP (SCAP) combinam-se para regular a expressão de mRNA de enzimas que sintetizam os AG e colesterol a partir de moléculas precursoras (HORTON *et al.*, 2002; GOLDSTEIN *et al.*, 2006). Sabendo-se disso, foi proposto que a glândula mamária de ratos (ANDERSON *et al.*, 2007) e bovinos (HARVATINE; BAUMAN, 2006) usam o sistema de SCAP- SREBP1 para regular a síntese *de novo* de AG e integrar a regulação da expressão de genes em dietas que induzem a DGL. O passo principal pelo qual são reguladas as SREBPs é a migração da proteína SREBP1 de comprimento total, a partir do retículo endoplasmático (onde está ancorada por outra proteína, a gene insulina-induzido 1, INSIG1, ou gene insulina-induzido 2, INSIG2) para o complexo de Golgi. Este processo é governado pela SCAP, que conduz os SREBPs

inativos e, no complexo de Golgi os SREBPs são ativados por duas proteases e liberados para o citoplasma indo, então, para o núcleo regular a transcrição de genes dependentes de SREBP1. É importante notar que a perda da SCAP evita a migração de SREBPs para o complexo de Golgi, restringindo a liberação da região de ligação ao DNA, limitando a indução da transcrição de genes dependentes de SREBP1 (RUDOLPH *et al.*, 2010).

Para testar a hipótese de que SREBP1c é importante na lipogênese de novo na glândula mamária, Rudolph *et al.*, (2010), investigaram a lactação em ratas com o gene SREBP1c nulo e, diferentemente do esperado, apenas uma pequena diminuição da síntese da gordura do leite na lactação das ratas foi observado, possivelmente porque a expressão de SREBP1a foi elevada para compensar a ausência de SREBP1c. Não está claro se este efeito é local ou sistêmico, já que o SREBP1c foi “nocauteado” em todos os tecidos. Por isso, os pesquisadores adotaram uma estratégia diferente para determinar o papel da SREBP na regulação da lipogênese *de novo* na glândula mamária em lactação, suprimindo somente nela a proteína de clivagem-ativação da SREBP (SCAP), o que resultou em um decréscimo de 25% na produção de AG da síntese *de novo*.

Cuidados devem ser tomados na interpretação de estudos ao longo da lactação, visto que a produção de gordura do leite é afetada por mecanismos diferentes em cada período (diferenciação celular e lactogênese ao iniciar a lactação, galactogênese durante o início da lactação, e apoptose durante a lactação estabelecida) (BAUMAN *et al.*, 2011). Embora a inibição *in vivo* de proteínas reguladas pela SREBP1 durante DGL esteja bem estabelecida, os pontos críticos e proteínas que regulam a ativação SREBP1 não foram descritos. Especificamente, uma ligação direta ou indireta entre o CLA *trans*-10, *cis*-12 e sinalização SREBP1 não foi elucidada, nem o mecanismo para a inibição da SREBP1 por outros AG bioativos (BAUMAN *et al.*, 2011).

3 CHAPTER ONE - ARTICLE

Transcriptional Regulation of Acetyl-CoA carboxylase Alpha isoforms in dairy ewes supplemented with conjugated linoleic acid

ABSTRACT: Feeding *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) to lactating ewes reduces milk fat by down-regulating gene expression of enzymes involved in lipid synthesis in the mammary gland. An example is Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC α), a regulated enzyme in the *de novo* fatty acid synthesis pathway. ACC α is encoded by mRNAs transcribed from three tissue specific promoters, PI, PII and PIII, in the ovine genome. This study evaluated the effects of a rumen-available *trans*-10, *cis*-12 CLA supplement on promoter specific ACC α expression in mammary and adipose tissue of lactating crossbred Lacaune/Texel ewes. Twelve ewes arranged in a completely randomized design were fed for 14 days at 15 (early), 70 (mid) and 120 (late) days of lactation one of the following treatments: Control (forage + 0.9 kg of concentrate - DM basis) and CLA [forage + 0.9 kg of concentrate + 28g/d of CLA (29.9% *trans*-10, *cis*-12)]. The CLA oil supplement was orally dosed once a day. Mammary gland and adipose tissue biopsies were taken on day 15 for gene expression analysis by Real-Time PCR. Data were analyzed by MIXED procedure. Milk fat content and yield was reduced by CLA supplementation during early, mid, and late lactation. Compared to Control, CLA reduced (P<0.05) transcripts from PIII in mammary tissue in early and mid lactation and increased transcripts from PI in adipose tissue. In late lactation there was a higher milk fat depression and transcripts PII-derived were downregulated. Overall, our results suggest that *trans*-10, *cis*-12 CLA down-regulates ACC α gene expression

by decreasing expression from promoter II and III in mammary tissue and increases ACC α gene expression by increasing expression from promoter I in adipose tissue, having influences of stage of lactation on the behavior of mRNA isoforms of ACC.

INTRODUCTION

Long chain fatty acids and their derivatives are not only constituents of cellular structures, but they also function as molecular regulators affecting cellular activity. Furthermore, lipids can act as second messengers, running essential regulatory functions to mediate signal transduction of various external and internal agents (KIM, 1997).

An example of a bioactive fatty acid is conjugated linoleic acid (CLA) that causes milk fat depression (MFD). During MFD, lipogenic capacity and expression of key mammary lipogenic genes are coordinately down-regulated (BAUMAN *et al.*, 2011). Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC α) (EC 6.4.1.2) and fatty acid synthase (FASN) (EC 2.3.1.85) (KIM, 1997) are the two essential and regulated enzymes involved in fatty acid (FA) synthesis in eukaryote cells and both are down-regulated during MFD. ACC α results in the production of malonyl-CoA, the primary precursor in *de novo* FA synthesis. Interestingly, during early lactation the mammary gland has a high rate of lipid synthesis, while adipose tissue has a low rate of lipid synthesis. The partitioning of nutrients between tissues during lactation is well described at the endocrine level, but has not been well explored at the level of gene expression. Overall, regulation of ACC α activity is part of an adaptive strategy to meet changing physiological demands created during situations such as feeding, hunger and lactation (LOPEZ-CASILLAS; PONCE-CASTANEDA; KIM, 1991).

During lactation ACC α plays a key role to facilitate the use of FA precursors for synthesis of milk fat in the mammary gland. This occurs through repression in the activity of ACC α in adipose tissue and induction in the mammary gland, in part, by matching levels of ACC α mRNA in both tissues (BARBER *et al.* 1997). To meet these physiological demands, the activity of ACC α is controlled accurately by a rapid mechanism that involves allosteric modulation and multiple specific phosphorylation sites (KIM *et al.*, 1989). Complementary, chronic changes in gene expression also occur (KIM; TAE, 1994).

Previous studies have shown that ACC α is transcribed from two promoters (P), PI and PII, in a tissue-specific fashion with some differences between species (KIM; TAE, 1994). Constitutive expression from PII occurs in many tissues, whereas PI expression is limited to adipose tissue and liver under lipogenic conditions (BARBER *et al.*, 2003). Both PI and PII transcripts contain, respectively, exon (E) 1 and E2 as first exon (TRAVERS *et al.*, 2005). A third promoter driving ACC α expression (PIII) was identified in sheep (BARBER; TRAVERS, 1998). The activity of PIII leads to the formation of an N-terminally modified isoform of the enzyme, and it is active in the mammary gland with approximately a 15-fold increase during lactation (TRAVERS; BARBER, 1997; MAO *et al.*, 2001).

Nonetheless, the mechanisms in which ACC α expression is controlled in different tissues and different stages of lactation is not fully understood. The scenario becomes even more obscure during altered physiological conditions such as milk fat depression caused by inhibitors such as conjugated linoleic acid (i.e. *trans*-10, *cis*-12 CLA isomer).

The objective of this study was to quantify ACC α gene expression from promoters I, II and III during milk fat

depression induced by supplementation of conjugated linoleic acid (CLA) in the diet during three stages of lactation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatments

Twelve crossbred Lacaune/Texel ewes were arranged in a completely randomized design, and fed one of the following treatments: Control (forage + 0.9 kg of concentrate - DM basis) and CLA [Control + 28g of CLA methyl esters (CLA).day⁻¹ with 29.9% of *trans*-10, *cis*-12 CLA (Luta-CLA 60, BASF AG, São Paulo, Brazil)]. The CLA methyl ester supplement was orally dosed once a day with a syringe. All ewes grazed six paddocks of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and white clover (*Trifolium repens*) and were supplemented with corn silage overnight. The concentrate was composed by ground corn, soybean meal and a mineral/vitamin mix.

Santa Catarina State University ethical committee approved all management and animal care procedures. The treatments were applied in three different stages throughout lactation, in the same animals. The first was carried out when ewes were in 15 DIM (days in milking) (early). The second one at 70 DIM (mid) and the third one at 120 DIM (late). Each treatment period lasted 14 d and milk yield was individually measured on d 1, 10 and 14.

Milk sampling and analysis

On d 10 of each treatment period individual milk samples from the a.m. and p.m. milkings were collected. These samples were stored at 4°C with a preservative (bromopol tablet; D & F Control Systems Inc., San Ramon, CA, USA). All milk samples were proportionally composited according to

a.m. and p.m. yields. Milk fat, protein, lactose, and total solids were determined using infrared analysis (AOAC, 2000; method 972.160).

Tissue biopsies

Mammary biopsies were taken between 1 to 4 h after the a.m. milking on d 14 of each treatment period. Lidocaine hydrochloride subdermal block (3 mL/ewe) was administered above the incision site. A 0.5 cm incision was made in the skin at the midpoint of the rear quarter and a biopsy was collected using a Bard Max-Core Disposable Core Biopsy Instrument (Bard Biopsy Systems, Covington, GA, USA). Briefly, a 16-gauge biopsy needle was inserted 5 cm in to the mammary gland through the incision. Tissue samples (~10 mg tissue/biopsy) were inspected to verify tissue homogeneity, and snap frozen in liquid nitrogen. Samples were placed in cryotubes containing 1ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) and stored in liquid nitrogen until RNA extraction. Immediately after removal of the biopsy needle, a purse string suture was placed around the incision with number 1 Nylon. The biopsy procedure resulted in minimal bleeding and milk appeared normal in 2 to 4 milkings following the biopsy. No intra-mammary infections were observed.

The adipose tissue biopsy was taken from the tail head region immediately cranial and lateral to the last lumbar vertebra (dorsal subcutaneous depot). Prior to the biopsy, lidocaine hydrochloride subdermal block was administered in a circular pattern surrounding the incision site (3 mL/ewe). Once the block was effective, an incision was made in the skin and adipose tissue was dissected. The adipose tissue sample (~100-400 mg) was divided in 2 samples from the same site and also placed in cryotubes with PBS and snap frozen in liquid

nitrogen. The incision was irrigated and closed with number 1 Nylon using a blanket stitch. After biopsies of adipose and mammary tissues, flunixin meglumine (1.1mg/kg of BW) was administered.

ACC α transcripts quantification

Total mRNA was extracted from mammary and adipose tissue samples with the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) with on-column DNase treatment (RNase-free DNase set, Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA). The RNA concentration was measured using a spectrophotometer (NanoDrop ND-2000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Agarose electrophoresis was used to determine RNA integrity. Briefly, 1 μ L of total RNA and 1 μ L of GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 \times in water (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Germany) was resolved on a 1.5% agarose gel at a constant 100V and after visualized under UV light. Two discrete bands corresponding to the 28S and 18S ribosomal RNA were observed for all samples.

Total RNA was transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random primers. This cDNA was used with promoter specific primers for ovine E1, E2 and E5A exons (PI, PII and PIII, respectively). The PI primers were Acc_ex1f: 5'-TCCCAGACGCGACCTGAA and reverse Acc_ex5r: 5'-CACGGAGCCAATTATGAATCG; the PII primers were Acc_ex2_5f: 5'-GCCTTGAGCTCTGAGGGGCTC and reverse Acc_ex5r; and PIII primers were Acc_5Af: 5'-CTGCAGCAGGAGGACGAACT and reverse Acc_5Ar: 5'-TCCGCAGAACCCTCCATATC. Expression of FASN was also performed only on samples from mid lactation (f: 5'-

GGCCGTCTTTCTGACCAAGA and r:
5'CGTGACGCCTTGCTTTTTG).

PCR amplification was performed in triplicate in a 15μL reaction with 30 ng of cDNA and SYBR Green Select Master Mix (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) in a StepOne Real-Time machine (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA). The level of expression of ribosomal protein S18 (RPS18) gene was used to normalize the amount of message in all samples (f: 5'-GCCTTTGCCATCACTGCAAT and r: 5'-TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG). The data were analyzed with StepOne software v2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Dissociation curves were generated at the end each run to verify the presence of a single product. Message level of the sample was determined, in relation to a dilution curve of pooled cDNA from mammary or adipose tissue (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001).

Statistical Analysis

Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The housekeeping gene (ribosomal protein S18) was used as a covariate in the model. Data points with Studentized Residuals below -2.0 or above 2.0 were considered outliers and excluded from analysis. Milk yield and milk components were analyzed by MIXED procedure using ewe as random effect and milk yield on the day zero as covariate. LSMEANS were used to compare the treatments effects at 5% of significance.

RESULTS

Performance and milk composition in response to treatments are shown in Table 1. Milk yield was unaffected by

CLA supplementation, while milk fat content and yield were reduced in all lactation periods ($p=0.001$ and $p=0.003$ respectively), but there were different levels of response at different lactation stages (Table 1). Milk fat concentration in Control animals increased linearly as lactation progressed and milk fat yield increased 50% from the early to mid lactation, and 4.5% between mid and late lactation. When expressed in grams per day the decrease compared to the Control, CLA inhibited milk fat yield 14.8, 16.8 and 28.4g/day in early, mid, and late lactation, respectively.

Milk protein content was not altered by CLA supplementation in early and mid lactation (Table 1), but was decreased by CLA in late lactation ($p=0.02$).

In early lactation, CLA reduced PIII ACC α transcripts by 29.1% in the mammary gland ($p=0.04$; Figure 1), but no changes in PII-derived transcripts were observed ($p=0.34$). In adipose tissue, transcripts from PI increased by 380% ($p=0.03$) when ewes received the CLA treatment in early lactation. There was no treatment effect on transcripts from promoters II and III in the adipose tissue during early lactation ($p>0.05$).

Similarly to early lactation, mammary gland ACC α transcripts from PIII were reduced 32% ($p=0.04$) by CLA treatment during mid lactation (Figure 2). There was no difference in the expression of ACC α transcripts from PII in the mammary gland ($P=0.26$). In adipose tissue, it was observed that overall ACC α transcripts from PI and PII were upregulated by CLA supplementation ($P<0.05$) during mid lactation. Effect of CLA on ACC α transcripts was different in late lactation (Figure 3), as CLA did not change expression from PIII in the mammary gland ($p=0.74$). However, transcripts from PII were reduced 39.9% by CLA in mammary tissue ($p=0.05$). During late lactation, CLA had no effect on ACC α transcripts in adipose tissue (Figure 3).

To verify the expression of other important lipogenic enzyme, expression of FASN was determined during mid lactation. As expected, FASN gene expression was reduced in the mammary gland and increased in adipose tissue by CLA during mid lactation (Figure 4).

Table 1 - Performance and milk composition of dairy ewes supplemented with 28g day⁻¹ of CLA at different stages during the lactation.

	<u>Early Lactation</u>				<u>Mid Lactation</u>				<u>Late Lactation</u>			
	CLA	CON. ¹	S.E. ²	P value	CLA	CON.	S.E.	P value	CLA	CON.	S.E.	P value
Milk Yield	1700	1709	110	0.93	1283	1199	111	0.46	839	612	111	0.06
Fat (%)	2.66	3.67	0.13	0.001	4.89	6.59	0.28	0.001	5.21	8.98	0.13	0.001
Fat (g day ⁻¹)	39.95	54.80	5.76	0.05	61.54	78.39	5.56	0.04	53.56	81.93	1.43	0.01
Protein (%)	4.31	4.26	0.15	0.74	4.91	5.04	0.24	0.59	5.11	5.97	0.32	0.02
Protein (g day ⁻¹)	74.38	74.71	5.04	0.97	62.49	59.27	5.37	0.56	48.54	54.45	2.91	0.06
Lactose (%)	4.63	4.80	0.13	0.20	4.62	4.63	0.10	0.91	4.32	4.21	0.16	0.49
Total solids (%)	13.00	14.83	0.57	0.01	15.38	16.86	0.37	0.01	15.58	19.85	0.51	0.01

¹ Control; ² Standard error; ³ Interaction between stage of lactation and treatment; n = 6 (Control) and 6 (CLA).

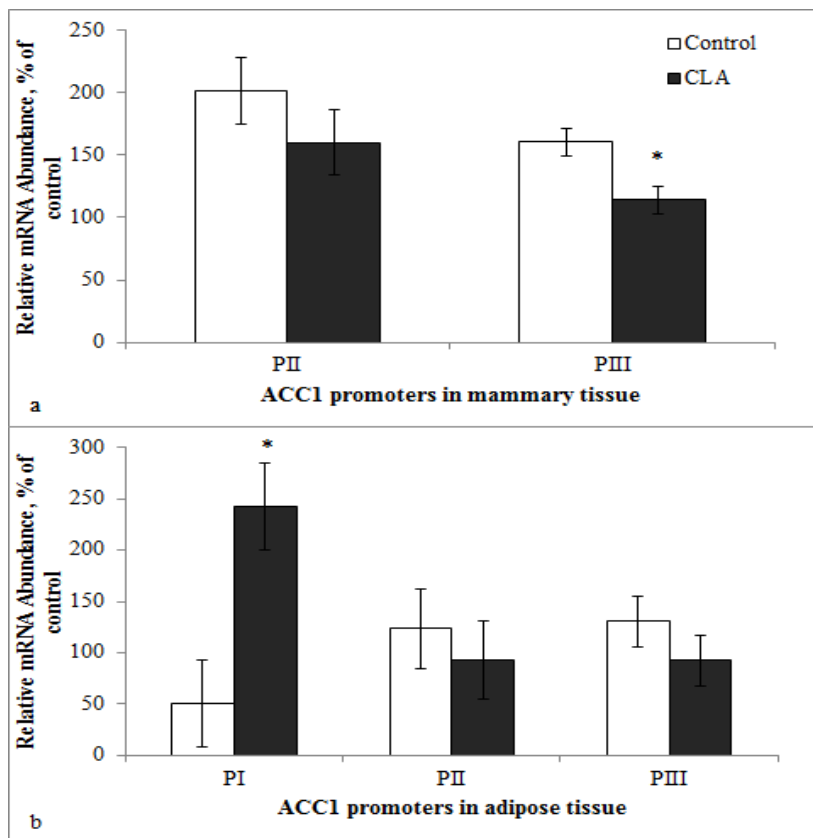
Source: Own author.

DISCUSSION

In this study we used primers specific for each promoter to measure expression of specific ACC transcripts to

investigate the tissue and promoter specific regulation of ACC α during milk fat depression induced by *trans*-10, *cis*-12 CLA. BARBER *et al.* (2003) identified PIII as being highly important to milk fat synthesis because its expression is dramatically increased in mammary tissue during lactation. In the current experiment, only PIII transcripts were decreased in the mammary gland by CLA treatment in early and mid lactation.

Figure 1 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in early lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA).

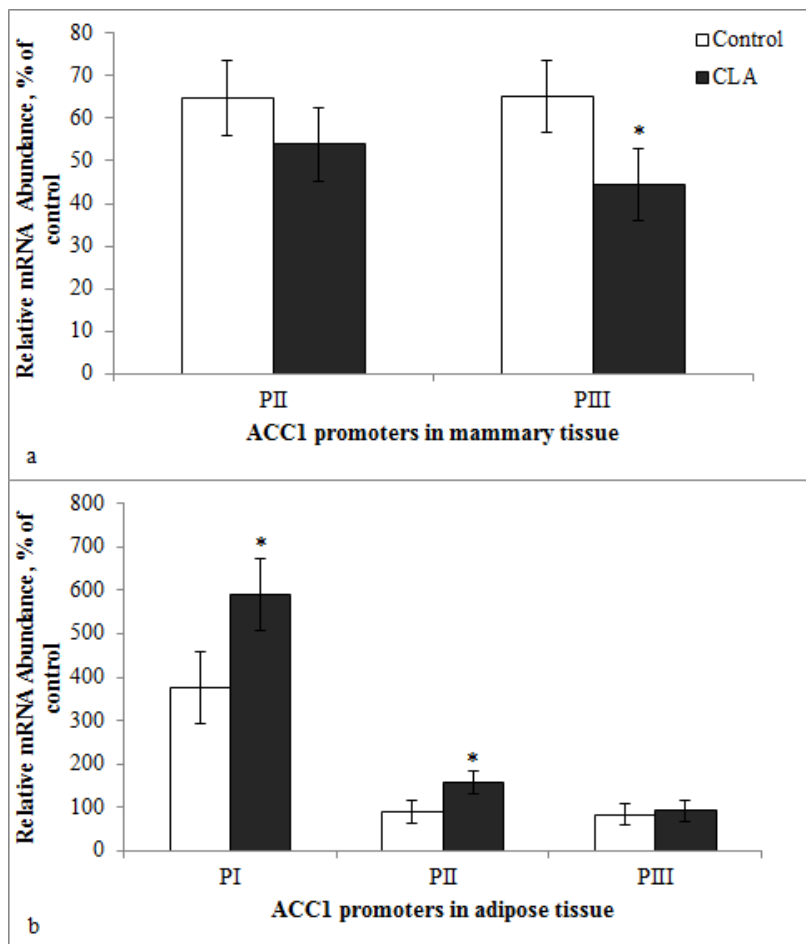


Source: Own author.

In contrast, P_I is not thought to be crucial for milk fat synthesis in sheep and expression of the P_I transcript was not quantifiable on mammary tissue in the current study. Similarly, Travers *et al.* (2001) established that the contribution of P_I to mammary ACC α expression is low in sheep because expression is low at all stages of lactation and does not change from pregnancy to lactation. The importance of mammary P_I-derived transcripts for synthesis of milk fat has also been questioned in cows, although P_I transcripts were highly

abundant in adipose tissue (MAO *et al.*, 2001). Transcripts from PI are also prominent in the mammary gland of the cow, but its concentration does not increase during lactation. Considering the high conservation for the sequence between bovine and sheep for exon 1 (92.3%) and even though the bovine lactating mammary gland has little adipose tissue it may contain some adipocytes which may explain the low level of PI-derived transcripts (MAO *et al.*, 2001).

Figure 2 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in mid lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA).



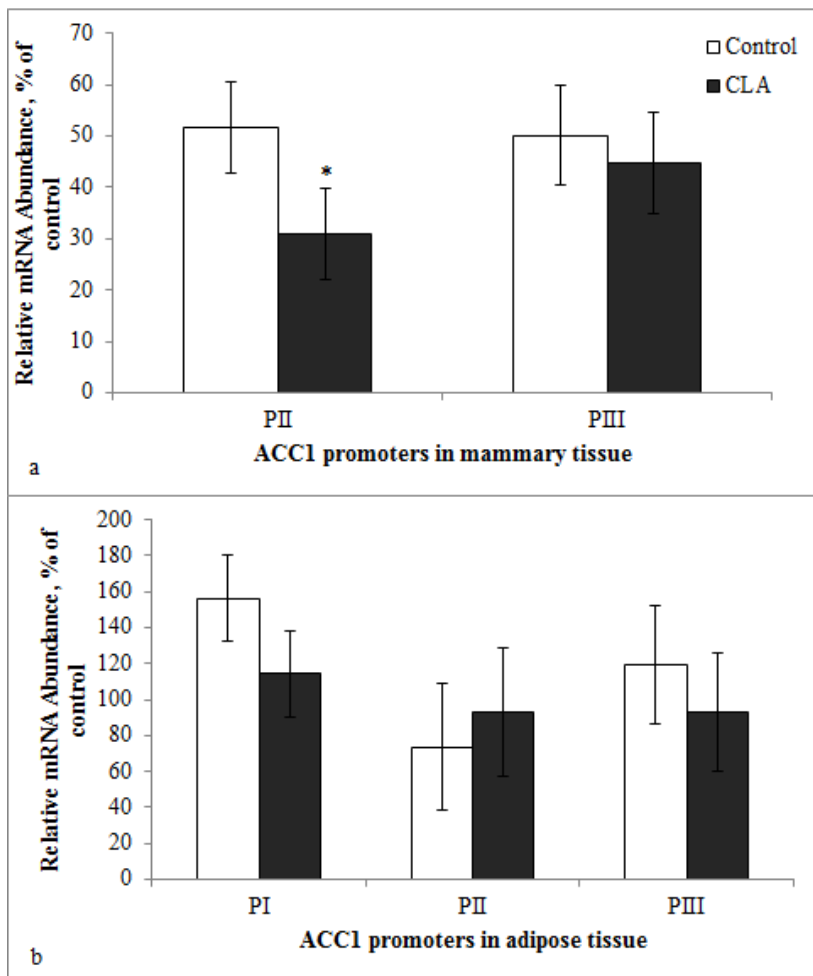
Source: Own author.

Tissue specific expression of ACC α may explain different responses in adipose tissue and the mammary gland during some treatments. Harvatine *et al.* (2009) reported that expression of lipogenic enzymes and transcription factors were increased in adipose tissue during CLA-induced milk fat

depression in the cows. In the current experiment, it is noteworthy that the promoters downregulated in mammary gland did not increase in adipose tissue in the same lactation period. In adipose tissue the main promoter upregulated was PI in early and mid lactation.

Interestingly, in late lactation a larger magnitude of depression of milk fat was observed but PIII-derived transcripts were not changed when compared to control. The larger decrease may be due to the higher milk fat during this phase. The opposite was found with PII-derived transcripts were they were downregulated. Also, in late lactation no changes in gene expression of ACC α transcripts were observed in adipose tissue. There may be two possible explanations: first, would be an increase in hepatic lipid synthesis and subsequent transport to storage in adipose tissue, even though ruminants have low capacity for hepatic lipid synthesis. Secondly, would be a reduction in feed intake by animals CLA supplemented and so, even with a lower energy requirement for milk synthesis, there would not be greater synthesis in adipose tissue, because the energy intake would be lower. A finding that corroborates this assertion is a meta-analysis performed by Harvatine *et al.* (2009) who observed reduced feed intake with CLA treatment. Other possible way to explain the difference for PII and PIII transcripts in late stage of lactation can come from changes in cells type during the involution of mammary gland where in a late stage these changes could result in a reduction for transcripts from PIII but with some of residual ACC α from PII as shown by Molenaar *et al.* (2003).

Figure 3 - Effects of supplementation with CLA on acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC α) transcripts from Promoter II and III in (a) mammary and (b) adipose tissues from ewes in late lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA).



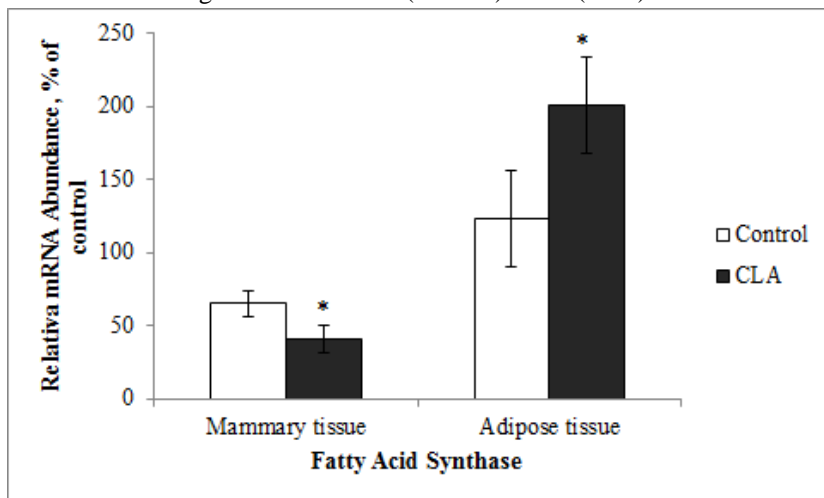
Source: Own author.

The response observed in behavior of the ACC α transcripts in the mammary gland during lactation might be explain by the different magnitude of milk fat depression, in which the effect on transcripts PII-derived could have a greater impact on fatty acids from *de novo* synthesis. In cows, previous

work with higher dose of *trans*-10, *cis*-12 CLA is required for the same milk fat depression in early lactation compared to mid and late lactation (GUTIERREZ-CASTANEDA *et al.*, 2005; ODENS *et al.*, 2007). Oliveira *et al.*, (2014) found that ACC α transcripts from PII and PIII were downregulated in mid lactation cows, corroborating the finding of the present study, where the magnitude of the milk fat depression was greater when the PII-derived transcripts were downregulated.

Fatty acid synthase is responsible for fatty acid elongation and also had reduced gene expression in mammary tissue of CLA supplemented animals during mid lactation in the current experiment. As a result of the relocation of lipid synthesis, FASN gene expression was increased in adipose tissue.

Figure 4 – Effects of supplementation with CLA on fatty acid synthase in mammary and adipose tissue from lactating ewes in mid lactation. Values are means \pm Standard Error. * P value < 0.05 among treatments. n = 6 (Control) and 6 (CLA).



Source: Own author.

CONCLUSION

This study showed that ACC α is downregulated in the mammary gland and upregulated in adipose tissue of lactating ewes during CLA induced milk fat depression through dynamic promoter tissue-specific regulation. The finding that not all ACC α transcripts are downregulated in the mammary gland is a breakthrough in the study of milk fat depression and future studies should investigate the differences between PI-derived transcripts and those from PII and PIII of ACC α .

REFERENCES

AOAC. Official methods of analysis of AOAC International, (17th ed.), Gaithersburg, MD, USA: AOAC. 2000.

APPLIED BIOSYSTEMS: 2001. ABI Prism 7900HT User Manual.

BARBER, M. C. *et al.* Lipid metabolism in the lactating mammary gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1347, p. 101-126, 1997.

BARBER, M. C.; TRAVERS, M. T. Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl-CoA carboxylase a with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. **Biochemistry Journal**, v. 333, p. 17-25, 1998.

BARBER, T. *et al.* Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase- α 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. **Biochemistry Journal**, v. 375, p. 489-501, 2003.

CASTANEDA-GUTIERREZ, E. *et al.* Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1078-89, 2005.

HARVATINE, K. J.; PERFIELD II, J. W.; BAUMAN, D. E. Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 139, p. 849-854, 2009.

KIM, K. H. *et al.* Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for **Experimental Biology**, v. 3, p. 2250-2256, 1989.

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

KIM, K. H.; TAE, H. J. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. **The Journal of nutrition**, v. 124, p. 1273S-1283S, 1994.

LOPEZ-CASILLAS, F.; PONCE-CASTANEDA, M. V.; KIM, K. H. In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene. **Endocrinology**, v. 129, p. 1049-1058, 1991.

MAO, J. *et al.* Genomic distribution of three promoters of the bovine gene encoding acetyl-CoA carboxylase α and evidence that the nutritionally regulated promoter I contains a repressive element different from that in rat. **Biochemistry Journal**, v. 358, p. 127-135, 2001.

MOLENAAR, A. *et al.* All three promoters of the acetyl-coenzyme-A carboxylase α -encoding gene are expressed in mammary epithelial cells of ruminants. *Journal of Histochemistry & Citochemistry*, v.51, p.1073-1081, 2003.

ODENS, L. J. *et al.* Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 293–305, 2007.

OLIVEIRA, D.E.; BAUMAN, D. E.; HARVATINE, K.J. Conjugated linoleic acid (CLA) trans-10, cis-12 decreases ACC- α gene expression in lactating mammary gland by decreasing specific transcripts from different promoters. In: JOINT ANNUAL MEETING, 2014, Kansas City. **Abstracts...** Indianapolis: ADSA/ASAS, 2014. p. 607. Published in *Journal Animal of Science*, v. 97; *Journal Dairy Science*, v. 97, E-Suppl. 1, 2014.

SAS Institute Inc. SAS/STAT: User's guide. Version 9.2.ed. Cary, NC, 2009. 240p.

TRAVERS, M. T. *et al.* Asymmetric expression of transcripts derived from the shared promoter between the divergently oriented *ACACA* and *TADA2L* genes. **Genomics**, v. 85, n. 1, p. 71-84, 2005.

TRAVERS, M. T. *et al.* Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- α gene: an E-box motif at- 114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes. **Biochemistry Journal**, v. 359, p. 273-284, 2001.

TRAVERS, M. T.; BARBER, M. C. Tissue-specific control of the acetyl-CoA carboxylase gene. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, p. 1215-1219, 1997.

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O trabalho permitiu descrever que a ACC α pode ser reprimida na glândula mamária e aumentada no tecido adiposo de ovelhas suplementadas com CLA de uma forma tecido-específica via expressão de diferentes isoformas. A verificação de que nem todos os transcritos da ACC α são reduzidos na glândula mamária é um avanço no estudo da depressão de gordura do leite e os futuros estudos devem investigar o que difere os transcritos derivados do PI em razão dos transcritos oriundos do PII e PIII da ACC α .

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S. M. *et al.* Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: It's not just about milk protein synthesis. **Breast Cancer Research**, v. 9, p. 204, 2007.

ANNISON, E. F. Energy utilization in the body. In: SWAN, H.; BROSTER, W.H. **Principles of Cattle Production**. London: Butterworths, p. 169–199, 1976.

BARBER, M. C.; TRAVERS, M. T. Cloning and characterisation of multiple acetyl-CoA carboxylase transcripts in ovine adipose tissue. **Gene**, v. 154, p. 271-275, 1995.

BARBER, M. C.; TRAVERS, M. T. Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl-CoA carboxylase α with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. **Biochemistry Journal**, v. 333, p. 17-25, 1998.

BARBER, M. C. *et al.* Lipid metabolism in the lactating mammary gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1347, p. 101-126, 1997.

BARBER, T. *et al.* Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase- α 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. **Biochemistry Journal**, v. 375, p. 489-501, 2003.

BARBER, M. *et al.* Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1733, p. 1-28, 2005.

BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In. LARSON, B. L.; SMITH, V. R. **Lactation: A Comprehensive Treatise**. 2. ed. New York, NY: Academic, 1974, 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.

BAUMAN, D. E, *et al.* Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 299–319, 2011.

BAUMGARD, L. H. *et al.* Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 278, p. R179–R185, 2000.

BAUMGARD, L. H, *et al.* Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1764–1769, 2001.

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.

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. *et al.* Mamm-Omics™: transcript profiling of the mammary gland during the lactation cycle in Holstein cows. In: ADSA-PSA-ASAS-AMPA Joint Annual Meeting, 2007. **Journal of Dairy Science**, p. 272, 2007.

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.

CHOUINARD, P. Y *et al.* Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2737–2745, 1999a.

CHOUINARD, P. Y, *et al.* Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1579–1584, 1999b.

DAVIS, C. L.; BROWN, R. E. Low-fat milk syndrome. In. DAVIS, C. L.; BROWN, R. E. **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, Newcastle upon Tyne, UK: Oriel, 1970. p. 545-565.

DeFRONZO, R. A., *et al.* Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **American Journal of Physiology**, v. 237, p. E214–E223, 1979.

DOEGE, H.; STAHL, A. Protein-mediated fatty acid uptake: Novel insights from in vivo models. **Physiology**, v. 21, p. 259–268, 2006.

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.

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.

FLINT, D. J. *et al.* Role of insulin receptors in the changing metabolism of adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. **Biochemistry Journal**. v. 182, p. 421-427, 1979.

FORSBERG, N.E.; BALDWIN, R.L.; SMITH, N.E. Roles of lactate and its interactions with acetate in maintenance and biosynthesis in bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2550–2556, 1985.

FROLOV, A. *et al.* Isoforms of rat liver fatty acid binding protein differ in structure and affinity for fatty acids and fatty acyl CoAs. **Biochemistry**, v. 36, p. 6545-6555, 1997.

GERVAIS, R. *et al.* Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating

dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5167-5177, 2009.

GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v. 124, p. 35-46, 2006.

GRIINARI, J. M. *et al.* *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1251–61, 1998.

HANSON, R.W.; BALLARD, F.J. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. **Biochemical Journal**, v. 105, p. 529-536, 1967.

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. **Advanced dairy chemistry. Lipids**, v. 2, 2nd ed. London, UK: Chapman & Hall, 1995. p. 37-88.

HORTON, J. D. *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. **Production National Academic Science USA**, v. 100, p. 12027-12032, 2002.

IVERSON, S, J.; OFTEDAL, O. T. Philogenetic and ecological variation in the fatty acid composition of milks. In. JENSEN,

R. G. **Handbook of Milk Composition**. New York, NY: Academic, p. 789-826. 1995.

JENNY, B. F. *et al.* Effects of high grain feeding and stage of lactation on serum insulin, glucose and milk fat percentage in lactating cows. **Journal of Nutrition**, v. 104, p. 379–385, 1974.

KALSCHEUR, K. F. *et al.* Effect of fat source on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2115-2126, 1997.

KEENAN, T. W.; MATHER, I. H. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. In. FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: Lipids**. 2. ed. New York, NY: Springer; 2006. p. 137-171.

KIM, K. H. *et al.* Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for **Experimental Biology**, v. 3, p. 2250-2256, 1989.

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

KIM, K. H.; TAE, H. J. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. **The Journal of nutrition**, v. 124, p. 1273S-1283S, 1994.

KIM, T. S.; LEAHY, P.; FREAKE, H. C. Promoter usage determines tissue specific responsiveness of the rat acetyl-CoA

carboxylase gene. **Biochemical and Biophysical Research Commun**, v. 225, p. 647–653, 1996.

KIM, Y. J. *et al.* The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 976-982, 2002.

KINLAW, W. B. *et al.* Direct evidence for role of “spot 14” protein in the regulation of lipid synthesis. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 270, p. 16615-16618, 1995.

LENGI, A. J.; CORL, B. A. Identification and characterization of a novel bovine stearyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5. **Lipids**, v. 42, p. 499-508, 2007.

LOFTUS, T. M. *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. **Science**, v. 288, p. 2379–2381, 2000.

LOPEZ-CASILLAS, F. *et al.* Characterization of different forms of rat mammary gland acetyl-coenzyme A carboxylase mRNA: analysis of heterogeneity in the 5' end. **Gene**, v. 83, p. 311-319, 1989.

LOPEZ-CASILLAS, F.; PONCE-CASTANEDA, M. V.; KIM, K. H. In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene. **Endocrinology**, v. 129, p. 1049-1058, 1991.

LUO, X. C. *et al.* Structural features of the acetyl-CoA carboxylase gene: mechanisms for the generation of mRNAs with 5' end heterogeneity. **The Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 86, p. 4042-4046, 1989.

MAIA, M.R.G. *et al.* Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiol.**, v. 50, p. 1–10, 2010.

MARSHALL, M. O., KNUDSEN, J. Biosynthesis of triacylglycerols containing short-chain fatty acids in lactating cow mammary gland. **European Journal of Biochemistry**, v. 81, p. 259-266, 1977b.

MARSHALL, M. O.; KNUDSEN, J. Factors influencing the in vitro activity of diacylglycerol acyltransferase from bovine mammary gland and liver towards butyryl-CoA and palmitoyl-CoA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 617, p. 393-397, 1980.

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, 1977a.

MASHEK, D. G.; COLEMAN, R. A. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. **Current Opinion Lipidology**, v. 17, p. 274-278, 2006.

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.

McCLYMONT, G. L., VALLANCE, S.. Depression of blood glycerides and milk-fat synthesis by glucose infusion. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 21, p. 41–42, 1962.

McMANAMAN, J. L. Milk lipid secretion: recent biomolecular aspects. **BioMolecular Concepts**, v. 3, p. 581–591, 2012.

NEVILLE, M. C.; WALSH, C. T. Effects of xenobiotics on milk secretion and composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 687S – 94S, 1995.

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

OCHOA, J. J. *et al.* Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1185-1191, 2004.

OLLIER, S. *et al.* Mammary transcriptome analysis of food-deprived lactating goats highlights genes involved in milk secretion and programmed cell death. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 560-567, 2007:

ONETTI, S. G. *et al.* Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 2751–2759, 2001.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. **American**

Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, v. 297, p. E28-E37, 2009.

PETERSON, D. G. *et al.* Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinated suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3098-3102, 2003.

PETERSON, D. G. *et al.* 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.

REINHARDT, T. A.; LIPPOLIS, J. D. Bovine milk fat globule membrane proteome. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 406-416, 2006.

RUDOLFH, M. C. *et al.* Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. **Endocrinology and Metabolism: American Journal of Physiology**, v. 299, p. E918–E927, 2010.

SHIMANO, H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. **FEBS Journal**, v. 276, p. 616–621, 2009.

STORCH, J.; McDERMOTT, L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. **Journal of lipid research**, 50(Supplement), p. S126-S131, 2009.

SUTTON, J. D. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3376–93, 1985.

TACKEN, P. J. *et al.* Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. **Current Opinion Lipidology**, v. 12, p. 275-279, 2001.

TRAMONTANA, S. *et al.* Mamm-Omics™ in Susscrofa: uncovering genomic adaptations underlying mammary development during pregnancy and lactation. ADSA-PSA-ASAS-AMPA Joint Annual Meeting, 2008. **Journal of Dairy Science**, 2008.

TRAVERS, M. T.; BARBER, M. C. Acetyl-CoA carboxylase- $\{\alpha\}$: Gene structure-function relationships. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. E136-E143, 2001.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca, NY: Comstock Public. 1994. 476 p.

WOLFRUM, C. *et al.* Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α - and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, p. 2323-2328, 2001.

WONSIL, B. J. *et al.* Dietary and ruminally derived trans-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **Journal of Nutrition**, v.124, p.556-565, 1994.

ZAMMIT, V. A. Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. **Biochemistry Journal**, v. 314, p. 1–14, 1996.