MONICA URIO

EFEITOS DE UMA MESMA DOSE DE CLA TRANS-10, CIS-12 EM OVELHAS LACTANTES DE DIFERENTES PESOS VIVOS E O EFEITO NO CULTIVO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA

Tese apresentada ao programa de pós- graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira.

LAGES, SC
2016

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

Urio, Monica
Efeitos de uma mesma dose de CLA trans-10, cis-12 em ovelhas lactantes de diferentes pesos vivos e o efeito no cultivo in vitro de explantes de glândula mamária/ Monica Urio. – Lages, 2016.
103p.: il.; 21 cm

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

Inclui bibliografia.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1 CLA 2 in vivo 3 in vitro 4 ovelha 5 lactação I. Urio, Monica. II. Oliveira, Dimas Estrasulas de. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

MONICA URIO

EFEITOS DE UMA MESMA DOSE DE CLA TRANS-10, CIS-12 EM OVELHAS LACTANTES DE DIFERENTES PESOS VIVOS E O EFEITO NO CULTIVO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE GLÂNDULA MAMÁRIA

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros: _____
Prof. Dr. João Pedro Velho
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

: _____
Prof. Dr. Ricardo Kazama
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

_____
Prof. Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

_____
Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 12 de julho de 2016.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de poder a cada dia aprender mais.

Agradeço aos meus pais, Dalcir e Eloí, pelo amor incondicional, pelos mais valiosos ensinamentos. À minha irmã, Camila, pelo seu amor, sua amizade e também a todos os meus familiares.

Agradeço em especial ao meu noivo, Marlon, por todos os momentos que passamos juntos, pelo crescimento, amadurecimento juntos, pela força nos momentos difíceis, pela paciência enorme e por fazer parte da minha vida.

Ao Professor Dimas Estrasulas de Oliveira pela orientação, ensino, oportunidade, apoio e amizade incondicionais, dispensadas a mim neste período.

Ao Professor Luis Claúdio Milleti, por contribuir no meu aprendizado, por auxiliar com uso dos equipamentos durante a execução do projeto.

Aos professores do CEDIMA, Ubirajara, Eliana, Sandra e por seus orientados propiciarem um ótimo ambiente de trabalho e principalmente a todos do Laboratório de Virologia Animal – CEDIMA, local que realizei toda a parte laboratorial dos experimentos.

Ao Elvis, Eveline, Gregory, Maurício, Camila, Ana Paula que não mediram esforços em me auxiliar nos experimentos e se tornaram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

A amizade e apoio dos novos integrantes do grupo Nutriger, Evelyn, Priscila e Wagner.

Aos amigos de laboratório pelos momentos de descontração e pela ajuda nos momentos de dúvida: Cláudia, Fernanda, Paula e Ricardo.

À Fazenda Pinheiro Seco que possibilitou a condução do experimento.

Ao doutorando Cleverson de Souza, pelo auxílio na correção das concentrações dos tratamentos em função dos pesos dos explantes do experimento *in vitro*.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, agradeço de coração a todos que direta o indiretamente torceram por mim... muito obrigada por tudo.

RESUMO

Urio, M. **Efeitos de uma mesma dose de CLA trans-10, cis-12 em ovelhas lactantes de diferentes pesos vivos e o efeito no cultivo *in vitro* de explantes de glândula mamária**. 2016, 103p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

O CLA *trans*-10, *cis*-12 é conhecido por inibir a síntese da gordura do leite, através da diminuição da expressão gênica de fatores de transcrição e genes lipogênicos, *in vivo* e *in vitro.* O objetivo do estudo *in vivo* foi avaliar a expressão de genes e fatores de transcrição envolvidos na depressão da gordura do leite em ovelhas leiteiras com diferentes pesos vivos, recebendo a mesma dose de CLA e do estudo *in vitro* os objetivos foram avaliar os explantes mamários de ovelhas lactantes como um modelo para estudos de expressão gênica e dos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12. No experimento *in vivo* foram utilizadas doze ovelhas lactantes cruza Lacaune/Texel, foram separadas em dois grupos de acordo com peso vivo (PV): a) Controle: com 51,0 ± 2,0 kg e, b) Pesadas: com 69,0 ± 4,0 kg, os quais receberam 27g/d de CLA contendo 29,9% de trans-10, cis-12. O CLA foi dosado oralmente por 10 dias. Foram coletadas amostras de leite para composição nos dias “zero”, 3 e 10, e realizadas biópsias de glândula mamária e tecido adiposo nos dias 3 e 10. Foi extraído o RNA, feito o cDNA e realizado PCR em tempo real. Os dados foram analisados usando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial e utilizada a média geométrica dos genes housekeeping como covariável. A produção de leite e o teor dos componentes do leite foram analisados da mesma maneira, utilizando como covariável a produção e a composição do dia "zero". O CLA trans-10, cis-12 reduziu a síntese de gordura no

leite entre os dias 3 e 10, mas não entre os animais de diferentes pesos. Comparado ao grupo Controle, no grupo dos animais Pesados houve uma maior expressão gênica da SCD e S14 na glândula mamária e da ACC-α PI, SREBP1 e leptina no tecido adiposo. Com relação aos dias de suplementação, não se observou mudança na expressão dos genes mamários aos 10 dias, apesar da ocorrência de depressão de gordura no leite, enquanto que no tecido adiposo todos os genes avaliados aumentaram a sua expressão. Assim, a resposta dos animais com diferentes pesos pode ser dependente da dose de CLA trans-10, cis-12 fornecido. No experimento *in vitro* os explantes foram cultivados em meio de crescimento de células epiteliais mamárias e submetidos aos seguintes tratamentos: CLA: meio de cultivo + 315 μmol de CLA trans-10, cis-12 complexado a albumina sérica bovina e; Controle (meio de cultivo), por 3 e 24h. Após, foi realizado o Ensaio do Cometa, foi extraído o RNA, o cDNA foi sintetizado e qRTPCR realizado. Os dados foram analisados com o mesmo procedimento do experimento *in vivo*. O ensaio do cometa mostrou que não houve fragmentação do DNA em 3 e 24h de cultivo. Os genes da estearoil CoA-dessaturase (SCD) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPARy) no tratamento CLA foram reduzidos, respectivamente, em 70 e 90% de 3 para 24 h. O cultivo de explantes de glândula mamária lactante por 24h pode ser utilizado para estudos moleculares avaliando a expressão gênica.

Palavras-chave: CLA, *in vivo*, *in vitro*, ovelha, lactação.

ABSTRACT

Urio, M. **Effects of the same dose of trans-10, cis-12 CLA in lactating ewes of different body weights and the effect in vitro in cultured mammary explants**. 2016, 103p. Thesis (Ph.D. in Animal Science) –Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2016.

The trans-10, cis-12 CLA is known to inhibit the synthesis of milk fat by reducing the gene expression of transcription factors and lipogenic genes in vivo and in vitro. The objective this in vivo study in vivo study was to evaluate the expression of genes and transcription factors involved in milk fat depression in dairy ewe with different body weights, receiving the same dose of CLA and in vitro study objectives were to evaluate mammary gland explants lactating ewe as model for gene expression and studies of the effects of CLA trans-10, cis-12.. The in vivo experiment used twelve lactating crossbred Lacaune/Texel ewes divided in two treatments according to body weight (BW): a) Control: with 51.0 ± 2.0 kg and b) Heavy: with 69.0 ± 4.0 kg receiving 27 g/day of CLA containing 29.9% of *trans*-10, *cis*-12, dosed orally for 10 days. Milk samples were collected for composition on days "zero", 3 and 10. Mammary gland and adipose tissue biopsies were taken on days 3 and 10. RNA was extracted, cDNA synthesized and qt-RTPCR carried out. Data were analyzed using a completely randomized design in a factorial arrangement, used the geometric mean of housekeeping genes as covariate. Milk production and content of milk components were analyzed in the same way, using as covariate on the production and composition of "zero". The trans-10 , cis-12 CLA reduced the fat in milk synthesis between 3 and 10 but not between animals of different weights. Compared to the control group, the animals of group Heavy there was higher gene expression of

SCD and S14 in the mammary gland and ACC-α PI, SREBP1 and leptin in adipose tissue. In the days of supplementation, there was no change in the expression of genes to mammary gland in the 10 days, in tissue adipose all analyzed genes increased their expression. Thus, the response of animals of different weights can be dependent on the dose of CLA trans-10, cis-12 supplied. In the in vitro experiment explants were cultured in growth medium mammary epithelial cells and subjected to the following treatments: CLA: culture medium + 315 μmol of CLA trans-10, cis-12 complexed with bovine serum albumin and Control (culture medium), for 3 and 24 hours. After the times of cultivation, it was held the Comet Assay. RNA was extracted and cDNA was synthesized qRTPCR performed. Data were analyzed using the same procedure as in vivo experiment. The comet assay showed no DNA fragmentation at 3 and 24 h of culture. The gene of stearoyl CoA desaturase (SCD) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARy) treatment in the CLA were reduced respectively by 70 and 90% from 3 to 24 h. The explants cultivation for 24h lactating mammary gland can be used for molecular studies assessing gene expression

.**Key - words:** CLA, in vivo, in vitro, ewe, lactation

LISTAS DE FIGURAS

Figura – 1	Representação da configuração cis e trans na cadeia de ácidos graxos.	32
Figura – 2	Vias da bio-hidrogenação do ácido linoleico (A) e α-linolênico (B)	37

4 CAPÍTULO – Experimento *In Vitro*

Figura – 1	Ensaio do Cometa em células isoladas a partir dos explantes mamários cultivados por 3 e 24h (a) CLA e (b) Controle.	93

LISTAS DE TABELAS

3 CAPÍTULO – Experimento *In Vivo*

Tabela – 1	Sequência (5’ para 3’) e eficiência dos primers utilizados na transcrição reversa quantitativa PCR.	64
Tabela – 2	Produção e composição do leite de ovelhas leiteiras suplementadas com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12.	68
Tabela – 3	Expressão gênica na glândula mamária de ovelhas suplementadas com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12.	71
Tabela – 4	Expressão gênica no tecido adiposo de ovelhas suplementadas com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12.	72

4 CAPÍTULO – Experimento *In Vitro*

Tabela – 1	Sequência (5’ para 3’) e eficiência dos primers utilizados na transcrição reversa quantitativa PCR.	89
Tabela – 2	Expressão gênica nos explantes de glândula mamária cultivados *in vitro.*	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC-α	Acetil-CoA carboxilase alfa
AG	Ácido graxo
AGPAT	Acilglicerol 3-fosfato aciltransferase
β-ACT	Beta actina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLA	Ácido linoleico conjugado
CCS	Contagem de células somáticas
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DGL	Depressão da gordura do leite
DMSO	Dimetil sulfóxido
D-PBS	Solução salina tamponada com fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELCCS	Escore linear de contagem de células somáticas
FASN	Ácido graxo sintase
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
INRA	Instituto Nacional Francês de Pesquisa Agronômica
INSIG	Proteína indutora de insulina
LPL	Lipoproteína lipase
MAC-T	Linhagem de células mamárias epiteliais bovinas
MEGM	Meio de crescimento de célula epitelial mamária
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Matéria seca
NaCl	Cloreto de sódio
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
P	Promotor

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPARγ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama
PPER	Elemento de resposta ao proliferador de peroxissomo
PV	Peso vivo
RSP18	Proteína ribossomal S18
RXR	Receptor retinoide X
S14	Hormônio responsivo da tireoide spot 14
SCAP	Proteína de clivagem-ativação da SREBP
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SFB	Soro fetal bovino
SRE	Elemento regulatório de esterol
SREBP	Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol
TAG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
µmol	Micromol
C	Carbonos
d	Dia
g/dia	grama/dia
h	Hora
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
ng	Nanograma
ºC	Graus célsius
P	Probabilidade
s	Segundo
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 31
2.1 Lipídios 31
2.1.1 Estrutura dos ácidos graxos 31
2.1.2 Armazenamento de lipídios em ruminantes 32
2.2 Lipogênese Mamária em Ruminantes 32
2.2.1 Síntese *de novo* 33
2.2.1.1 Acetil Coa carboxilase alfa (ACC-α) 33
2.2.1.2 Ácido Graxo Sintase (FASN) 33
2.2.1.3 Estearoil-CoA dessaturase (SCD) 34
2.3 Hormônio responsivo da tireoide spot 14 (S14) 34
2.4 Metabolismo lipídico no rúmen 35
2.4.1 Captação e circulação de AG 37
2.5 Síntese de triglicerídeos 38
2.6 Fatores de transcrição envolvidos na síntese de lipídios 39
2.6.1 Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1 (SREBP1) 39
2.6.2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR-γ) 40
2.7 Ácido linoleico conjugado – CLA 41
2.8 Metabolismo em ovelhas leiteiras 44
2.9 Estudos *in vitro* 45
2.10 REFERÊNCIAS 47
3 CAPÍTULO – EXPERIMENTO *IN VIVO* 58
3.1 RESUMO 58
3.2 ABSTRACT 59
3.3 INTRODUÇÃO 60

3.4 MATERIAL E MÉTODOS 61
3.4.1 Animais e tratamentos 61
3.4.2 Amostras de leite e análises.....62
3.4.3 Biópsias de tecidos 62
3.4.4 Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e quantificação de PCR em tempo real e primers utilizados...63
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....66
3.6 RESULTADOS 66
3.6.1 Consumo e Composição do Leite 66
3.6.2 Expressão Gênica 70
3.7 DISCUSSÃO 73
3.8 CONCLUSÃO.....76
3.9 REFERÊNCIAS.....76
4 CAPÍTULO – EXPERIMENTO *IN VITRO* 82
4.1 RESUMO.....82
4.2 ABSTRACT.....83
4.3 INTRODUÇÃO.....84
4.4 MATERIAL E MÉTODOS 85
4.4.1 Biópsia do tecido, cultivo dos explantes e tratamentos ..86
4.4.2 Separação das células dos explantes.....86
4.4.3 Ensaio do Cometa.....87
4.4.4 Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e quantificação de PCR em tempo real e primers utilizados...87
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....91
4.6 RESULTADOS 91
4.7 DISCUSSÃO 95
4.8 CONCLUSÃO.....98
4.9 REFERÊNCIAS.....98

1 INTRODUÇÃO

Os estudos da função e nível de expressão dos genes demonstram uma complexa e coordenada sequência de eventos moleculares de adaptações mamárias para a lactação em bovinos, caprinos, ovinos e suínos (Baumgard et al., 2002; Ollier et al., 2007; Ticiani et al., 2016; Tramontana, et al., 2008), respectivamente, trazendo novas percepções sobre a regulação gênica.

Os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 demonstrados nesses estudos, envolvem a redução na produção de ácidos graxos (AG) da síntese *de novo* e pré-formados, sugerindo uma regulação coordenada de enzimas da síntese lipídica. De forma geral, há redução do mRNA para acetil-CoA carboxilase alfa (ACC-α), ácido graxo sintase (FASN), estearoil-CoA dessaturase (SCD) e lipoproteína lipase (LPL) (PETERSON et al., 2003).

Além disso, os mecanismos moleculares envolvidos nessa inibição não são bem esclarecidos, 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 de muitos genes envolvidos na síntese lipídica (EBERLÉ et al., 2004). Outro potencial mecanismo foi divulgado por Harvatine; Bauman (2006), que identificaram o elemento responsivo a hormônios tireoidianos Spot 14 (S14) como um gene que codifica uma proteína nuclear que está intimamente associada com a regulação da síntese de ácidos graxos em tecidos lipogênicos e responsivo ao tratamento com CLA *trans*-10, *cis*-12.

Em um experimento *in vivo* conduzido pelo nosso grupo (Baldin, 2012) observou-se que cabras mais pesadas poderiam necessitar de uma maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 para ocasionar a uma mesma intensidade na depressão de

gordura no leite, ou seja, a magnitude dessa redução no conteúdo de gordura do leite mostrou-se positivamente correlacionada com a ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 e com a concentração deste isômero no leite.

Os trabalhos realizados *in vitro*, como o estudo pioneiro de Bauman et al. (1973) utilizando tecido mamário bovino para investigar o metabolismo celular e a síntese *de novo* de ácidos graxos, usando 3h de incubação com acetato marcado mostrou que neste período de tempo é possível identificar mudança na lipogênese.

O cultivo de tecido (explantes) de glândula mamária lactante permite avaliar o efeito de moléculas bioativas em um ambiente controlado desde que o tecido se mantenha com as atividades celulares normais como ocorreria no animal vivo. Sobre esse aspecto, Keys et al. (1997) avaliaram linhagens de células e explantes de tecido mamário de vacas lactantes, cultivados *in vitro* em vários tempos de incubação e verificaram que tanto em células como em explantes a viabilidade foi mantida porque não ocorreram danos ao DNA até 24h de cultivo. Entretanto, há uma escassez de estudos com explantes de tecido(s) ovino.

Com relação ao cultivoc da linhagem de célula epitelial bovina (MAC-T) com CLA *trans*-10, *cis*-12, Peterson et al., (2004) verificaram a diminuição da expressão gênica das enzimas lipogênicas e da nSREBP1 (forma nuclear ativa da proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol).

Dessa maneira, a realização de trabalhos *in vivo* e *in vitro*, com CLA *trans*-10, *cis*-12, visam a contribuir no entendimento da expressão dos genes lipogênicos na glândula mamária lactante.

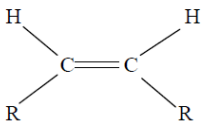
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídios

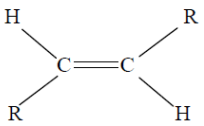
Os lipídios são insolúveis em água e, classificados em: gorduras, óleos, fosfolipídios e esteróis, cada um apresentando diferentes funções: gorduras e óleos (compostos por ácidos graxos - AG) são as principais formas de energia armazenada, enquanto que os fosfolipídios e os esteróis são constituintes de membranas biológicas.

2.1.1 Estrutura dos ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são constituídos por um grupo carboxila (COOH) ligado a uma cadeia de hidrocarboneto, a qual pode ser de qualquer comprimento: cadeia curta/média entre 2 e 16C (carbonos) e cadeia longa com mais de 16C. Além disso, os ácidos graxos podem variar o seu grau de saturação: saturados não contêm ligações duplas e os insaturados contêm uma ou mais ligações duplas e apresentam duas configurações diferentes em relação à cadeia de AG: *cis* (os átomos de hidrogênio estão do mesmo lado) e *trans* (os átomos de hidrogênio em lados opostos), (Figura 1).



cis



trans

Figura 1 – Representação da configuração *cis* e *trans* na cadeia de ácidos graxos (R – cadeia de ácidos graxos) (Adaptado de Gurr et al., 2002)

2.1.2 Armazenamento de lipídios em ruminantes

A maioria dos lipídios é armazenada na forma de triglicerídeos. Nos adipócitos é produzido o hormônio leptina que atua como um regulador lipostático do metabolismo energético de todo o organismo, sendo um dos melhores marcadores fisiológicos da ingestão de alimentos, composição do corpo e do gasto de energia (NKRUMAH et al., 2005).

2.2 Lipogênese Mamária em Ruminantes

Os AG presentes na gordura do leite têm duas origens: da circulação (± 60%) e da síntese *de novo* (± 40%) (CHILLIARD et al., 2000). Os precursores da síntese *de novo* são o acetato e o butirato, produzidos durante o processo de fermentação ruminal pelas bactérias.

Na glândula mamária o acetato e o β-hidroxibutirato produzem os AG de 4 a 16C. Parte dos AG com 16C e os de cadeia longa são provenientes da circulação sanguínea como componentes das lipoproteínas oriundas da absorção intestinal e/ou ligados à albumina plasmática na forma de ácidos graxos não esterificados (NEFA) mobilizados da gordura corporal (BAUMAN; GRIINARI, 2003; SHINGFIELD et al., 2010)

2.2.1 Síntese *de novo*

A síntese *de novo* dos AG envolve duas enzimas: a acetil CoA carboxilase alfa (ACC-α) e a ácido graxo sintase (FASN). Na primeira etapa da biossíntese dos lipídios, o acetato é transformado em acetil-CoA para a formação do malonil-CoA, enquanto o β-hidroxibutirato é ativado para butiril-CoA (SHINGFIELD et al., 2010). A acetil-CoA carboxilase catalisa a formação de malonil-CoA a partir de um grupo etil, enquanto que FASN catalisa os ciclos de condensação de malonil-CoA com acetil-CoA ou butiril-CoA (CHILLIARD et al., 2000).

2.2.1.1 Acetil Coa carboxilase alfa (ACC-α)

A acetil-CoA carboxilase alfa (ACC-α) é a enzima chave na regulação da síntese de AG (KIM, 1997; BARBER et al., 1997). Durante a lactação a ACC-α facilita a entrega de precursores de AG para a glândula mamária para a síntese de gordura no leite, sintetizando malonil-CoA apartir do acetil-CoA, passo considerado limitante na síntese (BARBER et al., 2005).

O gene da ACC-α tem várias regiões promotoras (P) gerando transcritos que são expressos de forma tecido específica (TRAVERS, BARBER, 1997). Nos transcritos do promotor I (PI) apresenta expressão limitada ao tecido adiposo e ao fígado, os transcritos do promotor II (PII) são expressos em todos os tecidos e, os transcritos do promotor III a expressão é na glândula mamária ovina (TRAVERS, BARBER, 2001).

2.2.1.2 Ácido Graxo Sintase (FASN)

É um complexo enzimático multifuncional, desempenhando um papel central na síntese *de novo* (Palmquist, 2006; Roy et al., 2006), contendo sete domínios catalíticos que proporcionam o alongamento da cadeia de AG. O produto principal é a formação do ácido palmítico (16:0), embora na glândula mamária podem ser formado ácidos graxos de 4 a 16C.

2.2.1.3 Estearoil-CoA dessaturase (SCD)

É uma enzima ligada à membrana do retículo endoplasmático envolvida na síntese de AG monoinsaturados a partir de AG saturados oriundos da síntese *de novo* ou derivados da dieta (PATON; NTAMBI, 2009). É responsável por catalisar a oxidação de ésteres de ácido graxo acil CoA que resulta na introdução de uma ligação dupla *cis* entre o carbono 9 e 10 (SHINGFIELD et al., 2008). Como consequência, regula a fluidez do leite nos animais (CHILLIARD et al., 2000).

O ácido esteárico (C18:0) e o ácido palmítico (C16:0), são os substratos preferidos pela SCD, os quais são convertidos em C18:1 *cis*-9 (oleico) e C16:1 *cis*-9 (palmitoleico), respectivamente (NTAMBI, 1999).

2.3 Hormônio responsivo da tireoide spot 14 (S14)

O hormônio responsivo da tireoide spot 14 (S14) é uma pequena proteína, sem motivos funcionais conhecidos e a sua função bioquímica ainda não foi completamente estabelecida. Foi identificada pela primeira vez em triagem do tecido

hepático (Seelig et al., 1981), sendo expressa somente em tecidos lipogênicos e o seu nível de mRNA é positivamente correlacionado com a taxa lipogênica de cada tecido (JUMP; OPPENHEIMER, 1985; ZHU et al., 2005). Além disso, o gene S14 tem sido associado com a síntese *de novo* de AG (SEELIG et al., 1981; CUNNINGHAM et al., 1998).

Kinlaw et al. (1995) realizaram um experimento utilizando RNA de interferência e sugeriram que o S14 regula a ativação da transcrição de enzimas da síntese lipídica por estímulos, tais como a ingestão de carboidratos e administração de hormônios da tireoide.

Originalmente identificada como uma proteína que de forma aguda é responsiva a hormônios da tiroide, a S14 é principalmente uma proteína nuclear que interage com os fatores de transcrição (COLBERT et al., 2010). A região promotora da S14 também contém um sítio de ligação ao elemento regulatório de esterol (SRE) (Corl et al., 2002) e a sua expressão é altamente sensível à SREBP1 na sua forma nuclear (CHOUINARD et al., 1999). Talvez a mais forte evidência da função do S14 vem de estudos em hepatócitos de ratos, onde os hepatócitos foram transfectados com oligonucleotídeo anti-S14 e impediram a expressão de enzimas lipogênicas (CORL al., 2002; CHOU et al., 2008). Adicionalmente, Zhu et al. (2005) reportaram que o S14 nocauteado em ratas alimentadas com uma dieta moderada em gordura mostrou uma redução de 62% na síntese mamária de lipídios, mas não houve redução na atividade das enzimas lipogênicas.

2.4 Metabolismo lipídico no rúmen

Os lipídios da dieta são metabolizados através de dois processos principais: a lipólise e a bio-hidrogenação. Os lipídios sofrem ação de lipases microbianas, que hidrolisam as ligações do tipo “éster” e liberam ácidos graxos livres, sendo este evento denominado de lipólise. Posteriormente, os ácidos graxos livres são submetidos à bio-hidrogenação ruminal, convertendo os ácidos graxos insaturados para saturados.

A bio-hidrogenação do ácido linolênico envolve a isomerização da dupla ligação *cis*-12 para *trans*-11, produzindo o C18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15, por ação da enzima linoleato isomerase. Em seguida, há hidrogenação da dupla ligação *cis*-9 e formação do ácido C18:2 *trans*-11, *cis*-15. A partir deste último ácido graxo formado, pode ocorrer a formação dos seguintes intermediários: C18:1 *trans*-11, C18:1 *cis*-15 e C18:1 *trans*-15. O C18:1 *trans*-11 é reduzido até esteárico (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997) (Figura 2 B).

Já a bio-hidrogenação do ácido linoleico (C18:2), é a via de origem ruminal dos isômeros de CLA. O primeiro passo é a isomerização da dupla ligação *cis*-12 a *trans*-11 para formar o isômero *cis*-9, trans-11 e a enzima que catalisa esta reação é uma isomerase (linoleato isomerase). Na segunda etapa, há a redução da ligação *cis*-9 para formar o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) e a etapa final é a hidrogenação da ligação *trans*-11, convertendo o ácido vacênico em ácido esteárico (C18:0) (BAUMAN et al., 2003). (Figura 2 A).

Em condições de decréscimo no pH ruminal ocorre mudança no padrão de fermentação, há a formação do isômero *trans*-10, *cis*-12 por um processo similar. Assim, a enzima isomerase forma *trans*-10, *cis*-12 na primeira etapa da reação, posteriormente ocorre a formação do *trans*-10 (C18:1) e a

reação final é a redução da ligação *trans*-10 para formar o ácido esteárico (C18:0).

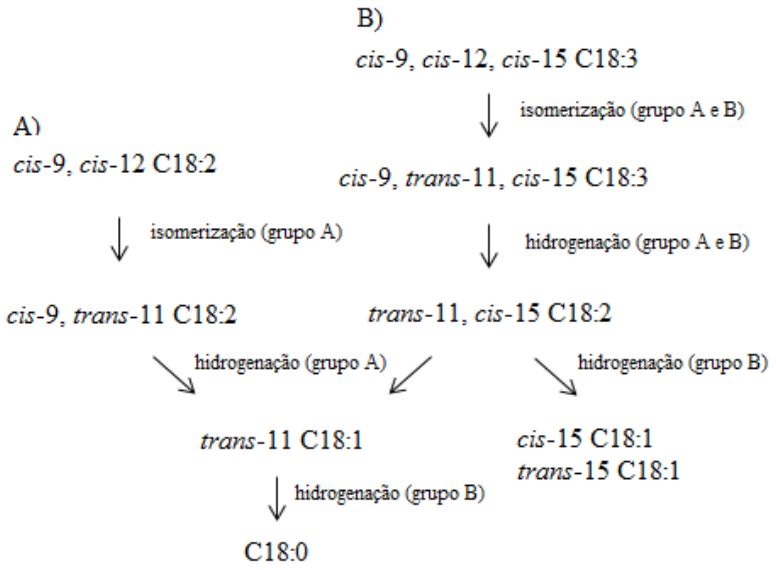


Figura 2 - Vias da bio-hidrogenação do ácido linoleico (A) e linolênico (B). Adaptado de Harfoot e Hazlewood (1997).

2.4.1 Captação e circulação de AG

Os AGs da gordura do leite podem ser oriundos da circulação, derivados da mobilização de reservas ou da absorção da dieta (BAUMAN; GRIINARI, 2001). Eles são absorvidos no duodeno, esterificados nos enterócitos e circulam principalmente na forma de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) ou quilomicrom (Noble, 1981) sendo ancorados nos capilares, pela lipoproteína lipase (LPL), uma enzima localizada na superfície das células endoteliais

mamárias (Christie, 1981) que hidrolisa os triglicerídeos no núcleo da lipoproteína liberando AG desesterificados para serem absorvidos.

O restante dos AG circulantes é originado a partir da mobilização das reservas de gordura corporal, o que corresponde a menos de 10% dos AG do leite (SHINGFIELD; GRIINARI, 2007). No entanto, a contribuição de AG mobilizados aumenta quando as vacas estão no início da lactação e/ou no balanço negativo de energia (BAUMAN; GRIINARI, 2003).

2.5 Síntese de triglicerídeos

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 (BAUMAN; GRIINARI, 2003).Os ácidos graxos utilizados na biossíntese dos triglicerídeos são originários da síntese *de novo* na glândula mamária ou absorvidos a partir da circulação sanguínea (CHILLIARD; FERLAY, 2004).

A síntese de triglicerídeos requer as ações de várias enzimas para esterificar três ácidos graxos à um glicerol (COLEMAN; LEE, 2004). A primeira enzima envolvida na síntese do TAG é a glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), produzindo a primeira de três acilações formando o ácido lisofosfatídico na posição sn-1. Posteriormente, a enzima acilglicerol 3-fosfato aciltransferase (AGPAT) é responsável pela conversão do ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico e após ocorre a segunda acilação na posição sn-2 formando

diacilglicerol. Por último, a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) é responsável pela última acilação na posição sn-3 formando TAG.

2.6 Fatores de transcrição envolvidos na síntese de lipídios

2.6.1 Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1 (SREBP1)

A família de fatores de transcrição SREBP1 (proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1) funciona como regulador global da síntese de lipídios (Eberlé et al., 2004), ligando-se à sequência de DNA dos genes responsivos ao elemento regulatório de esterol. A SREBP1 e sua reguladora (acompanhante), a proteína de clivagem-ativação da SREBP1 (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., 2003). O passo principal da regulação é a migração da SREBP, a partir do retículo endoplasmático (onde está ancorada por outra proteína, a proteína indutora de insulina 1, INSIG1, ou proteína indutora de insulina 2, INSIG2) para o complexo de Golgi. Esse processo é governado pela SCAP, que conduz os SREBPs inativos para o complexo de Golgi onde são ativados por duas proteases e liberados para o citoplasma indo, após, para o núcleo para 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, assim, limitando a indução da transcrição de genes dependentes de SREBP1 (RUDOLPH et al., 2010).

2.6.2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR-γ)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs) talvez componham o melhor sistema celular de reconhecimento de AG (especialmente AG poli-insaturados) (GEORGIADI; KERSTEN, 2012). Os PPARs são membros da superfamília de receptores de hormônios nucleares, que também incluem os receptores da vitamina lipossolúvel A e de hormônios esteroides (KERSTEN et al., 2000).

Os receptores nucleares funcionam como um fator de transcrição ligador/ativador ao se ligar à pequenas moléculas lipofílicas. Eles compartilham uma estrutura modular que consiste de um domínio de ligação ao ligante (molécula lipofílica) e ao DNA com efeito em um grande número de processos biológicos (MANGELSDORF et al., 1995). Três diferentes subtipos de PPAR foram clonados, caracterizados por um padrão de expressão único nos tecidos. O PPARα é encontrado em vários tecidos, mas é predominante em tecidos oxidantes, tais como o adiposo marrom, músculo cardíaco, músculo esquelético e fígado. O PPARβ é encontrado na maioria das células (ESCHER et al., 2001; BOOKOUT et al., 2006), enquanto a expressão do PPARγ é maior no tecido adiposo. Entretanto, na glândula mamária de ruminantes, foi observado aumento na sua expressão em vacas, entre a prenhez e a lactação (BIONAZ; LOOR, 2008).

A ligação à molécula lipofílica é feita para desencadear a associação física dos PPARs à sequências específicas de DNA, denominados elementos responsivos à PPAR, que ficam

em torno de genes alvos. Além disso, a ligação à molécula lipofílica leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras e perda de proteínas co-repressoras, resultando na ativação da transcrição do DNA (KERSTEN et al., 2000).

Enfim, os PPARs são dependentes de ligantes, regulando a expressão de genes alvos através da ligação aos elementos de resposta do proliferador de peroxissomo (PPERs) do gene regulado. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero formado junto com o receptor retinóide X (RXR). Com a ligação ao ligante natural ou sintético, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, permitindo a ligação com o gene alvo, resultando na transcrição do mesmo (BERGER; MOLLER, 2002). Os ligantes naturais de preferência do PPARγ são ácidos graxos polinsaturados (XU et al 1999).

2.7 Ácido linoleico conjugado – CLA

O termo ácido linoleico conjugado foi estabelecido quando foi isolado e caracterizado um componente antimutagênico da fração lipídica da carne bovina e observado a presença de quatro isômeros do ácido linoleico, que apresentavam uma dupla ligação conjugada (Há; Grimm; Pariza, 1987), tornando-se conhecido como CLA. O termo CLA é utilizado para denominar isômeros geométricos e posicionais do ácido octadecadienóico (C18:2) que podem apresentar duplas ligações conjugadas com a geometria *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* e *trans-trans* em diferentes posições da cadeia carbônica (ex: 7-9, 9-11, 10-12); ao todo, mais de 25 diferentes isômeros de CLA já foram identificados na gordura do leite de ruminantes (BAUMAN et al., 2008).

Estudos posteriores demonstraram que a posição da dupla ligação e o seu tipo de isomeria geométrica podem determinar o efeito do CLA no metabolismo. Os isômeros CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12 representam entre 75 e 90% e 3 e 5%, respectivamente, do CLA encontrado nos produtos oriundos de ruminantes (PARODI, 2003). O isômero CLA *cis*-9, *trans*-11 foi identificado como um anticarcinogênico natural (PARIZA; HA, 1990), enquanto o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 está relacionado com metabolismo de lipídios (BAUMGARD et al., 2000).

A teoria da bio-hidrogenação durante a depressão da gordura do leite (DGL) descreve que a inibição da síntese de gordura na glândula mamária ocorre por ação de AGs específicos, produzidos como intermediários da bio-hidrogenação no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2001). Estudos realizados em vacas leiteiras com infusões pós-ruminal (abomasal e/ou duodenal) com misturas de isômeros de CLA resultaram em uma acentuada redução na secreção de gordura no leite, voltando a níveis normais quando a suplementação foi suspensa.

O CLA *trans*-10, *cis*-12 é um dos ácidos graxos que atua na redução da gordura do leite (Baumgard et al., 2000; Baumgard et al., 2001), formado no rúmen sob algumas condições dietéticas caracterizadas por fornecer grandes quantidades de carboidratos de rápida fermentação e baixo conteúdo de fibra e/ou por dietas suplementadas com fontes ricas em óleos insaturados que favorecem a redução do pH ruminal, associado ou não à presença de ácidos graxos poli-insaturados no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Como consequência, há uma alteração na rota da bio-hidrogenação

ruminal ocorrendo uma redução no teor e produção de gordura do leite (KADEGOWDA et al., 2008).

A DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 é marcada pela redução da secreção dos ácidos graxos de todos os tamanhos, embora a maior redução ocorra sobre os AG oriundos da síntese *de novo* (C4 a C14 e parte dos C16) (BAUMGARD et al., 2001). A ação inibitória do CLA *trans*-10, *cis*-12 na secreção da gordura do leite é observada poucos dias após o seu fornecimento, com a redução alcançando o seu valor máximo por volta do 3° ao 5° dia de suplementação e/ou infusão, e retornando aos níveis normais no mesmo período ao final da suplementação (BAUMGARD et al., 2000). Entretanto, quando a DGL é induzida pela dieta o retorno aos níveis normais é em torno de 18 dias (RICO; HARVATINE, 2013).

Sobre os mecanismos de ação do CLA *trans*-10, *cis*-12 que resultam na redução da gordura do leite, pelo menos em parte há diminuição da expressão gênica de enzimas lipogênicas importantes como a ACC-α, FASN, SCD e LPL (Baumgard et al., 2002), além disso, o metabolismo lipídico é regulado pelo fator de transcrição SREBP. O trabalho de Peterson et al. (2004), cultivando a linhagem de células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T) com CLA *trans*-10, *cis*-12, mostrou redução na quantidade de mRNA das enzimas ACC-α, FASN e SCD, e da forma nuclear da SREBP1. Posteriormente, Harvatine; Bauman (2006) confirmaram em estudos *in vivo* em vacas que receberam uma dieta que induziu a DGL, ocasionou a diminuição na expressão das enzimas lipogênicas FASN, LPL, SCD e do fator de transcrição SREBP1.

2.8 Metabolismo em ovelhas leiteiras

De acordo com Lock et al. (2006), Sinclair et al. (2010) e Oliveira et al. (2012), para essa espécie, a magnitude da depressão da gordura do leite em relação a dose fornecida se assemelha a observada em vacas, quando a dose é equivalente em peso metabólico. Da mesma forma que nos bovinos, há uma redução da secreção de todos os ácidos graxos, mas aqueles provenientes da síntese *de novo* são os que sofrem maior efeito. Como consequência dessas diferenças na magnitude de redução entre os grupos de ácidos graxos, o perfil da gordura do leite é modificado em direção a um aumento da proporção de ácidos graxos de cadeia longa.

Ovelhas em lactação suplementadas com 24g/d de CLA *trans* 10, *cis* 12 fornecido na dieta em uma forma protegida da bio-hidrogenção, reduziu em 23% o conteúdo de gordura do leite e 16% na produção da gordura (LOCK et al., 2006). Outro estudo realizado com ovelhas leiteiras suplementadas com CLA encapsulado contendo 2,4 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12, houve redução 33 % da gordura do leite (WEERASINGHE et al., 2012). Já Oliveira et al. (2012) utilizaram uma dose de 8,7g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal e obtiveram uma redução de 31,3% da gordura do leite e 38% da produção de gordura. O estudo realizado por Husvéth et al. (2010) observou que as ovelhas e as vacas leiteiras respondem de forma semelhante ao isomêro de CLA *trans*-10, *cis*-12.

2.9 Estudos *in vitro*

Várias tentativas foram feitas para repetir a função da glândula mamária *in vitro* (Blum; Wicha, 1988, Ip; Darcy, 1996, Matitashvili, et al., 1997) pois o cultivo celular é útil para ajudar a responder questões básicas da biologia da glândula mamária (IP; DARCY, 1996).

As células primárias ou explantes de tecidos podem ser utilizadas para o maior conhecimento da glândula mamária lactante, porém, desenvolvimento celular *in vitro* pode resultar na perda da função do tecido, devido a célula parar de sintetizar os componentes do leite (Blum,Wicha , 1988). Além disso, a viabilidade dos explantes é por um curto período de tempo, em torno de 24 horas (IP; DARCY, 1996, KEYS et al., 1997).

O cultivo de explantes deve ser similar ao que ocorre no do tecido *in vivo*. Porém, é difícil inferir no que ocorre *in vivo*, ou seja, transferir os efeitos do animal para o explante em cultivo incluindo fatores de crescimento e hormônios e, a dificuldade para determinar as mudanças que ocorrem em cada tipo de célula (ROSE; MCCHONOCHIE, 2006).

As células MAC-T foram utilizadas para estudos de expressão de genes (Keating et al., 2008; Kadegowda et al., 2009) em estudos *in vitro* para avaliar os efeitos de AG, sobre o crescimento, alterações morfológicas, apoptose e efeitos de hormônios.

O estudo de Peterson et al., (2004) utilizou as células MAC-T para estudar os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12, causador da depressão gordura de leite (DGL), sobre a abundância de mRNA de enzimas lipogênicas. Nesse estudo relataram que a lipogênese foi inibida em 56% quando as células foram incubadas com 75 µmol/L de CLA *trans*-10, *cis*-12. Já Keating et al. (2008) relataram que o aumento nas concentrações de CLA *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11 têm

impacto negativo sobre o crescimento da célula, induzindo a apoptose das células mamárias. Eles observaram que em doses mais elevadas que 35 µM de CLA o crescimento das células foi inibido.

2.10 REFERÊNCIAS

BALDIN, M **Desempenho, composição do leite e balanço Energético de cabras leiteiras suplementadas com Ácido linoleico conjugado (CLA) não protegido da biohidrogenação Ruminal**, Dissertação, p.79, 2012.

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

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

BAUMAN, D.E. et al. Factors affecting *in vitro* lipogenesis by bovine mammary tissue slices. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p.1520-1525, 1973.

BAUMAN, D. E. et al. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants, **Proceedings Cornell Nutrition Conference**, p. 175-189, 2003.

BAUMAN, D.E. et al. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 403–409, 2008.

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., GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low fat milk syndrome. **Livestock Production and Science** v.70, p.15–29, 2001.

BAUMGARD, L.H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology,** v. 278, p. 179–184, 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.1764–69, 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.

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

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

BLUM J.L., WICHA M.S. Role of the cytoskeleton in laminin induced mammary gene expression. **Journal Cellular Physiology**, v. 135, p.13–22, 1988.

BOOKOUT, A.L. et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical Transcriptional network. **Cell**, v.126, p.789–99, 2006.

CHILLIARD, Y. et al. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, TRANS and conjugated fatty acids. **Annales Zootechnie**, v. 49, p. 181-205, 2000.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. **Reproduction Nutrition Development**., v. 44, p.467-492, 2004.

CHOU, W.Y. et al. Human Spot 14 protein is a p53-dependent transcriptional coactivator via the recruitment of thyroid receptor and Zac1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.1826-1834, 2008.

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

CHRISTIE, W. W. (1981). **The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals.** *In* Lipid metabolism in ruminant animals. W. W. Christie, *ed.* Pergamon Press. New York. NY.

COLBERT, C.L. et al. Crystal structure of Spot 14, a modulator of fatty acid synthesis. **Production National Academic Science USA**, v.107, p.18820-18825, 2010.

COLEMAN, R.A. e LEE, D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 134-76, 2004.

CORL, B.A. et al.Trans-7, cis-9 CLA is synthesized endogenously by delta-9-desaturase in dairy cows. **Lipids**, v.37, p.681-688, 2002.

CUNNINGHAM, B.A. et al. “Spot 14” protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. **Thyroid**, v. 8, p. 815–25, 1998.

EBERLE, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, p. 839–48, 2004.

ESCHER, P. et al. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation factor SREBP-1. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2523–27, 2001.

GEORGIADI, A., KERSTEN, S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. **American Society for Nutrition. Advances in Nutrition**, v.3, p. 127–134, 2012.

GURR, M.I. et al. The biosynthesis of fatty acids. In: *Lipid Biochemistry, 5th ed.* Blackwell Science. 21, 2002.

HA, Y.L., GRIMM, N.K., PARIZA, M.W. Anticarconogens from fried ground beef: heataltered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.8, p.1881-1887, 1987.

HARFOOT, C.G., e HAZLEWOOD, G. P. **Lipid metabolism in the rumen**. The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson, and Stewart, C. S. Blackie Academic & Professional. London (UK) 382-426, 1997.

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.

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, 2003.

HUSVÉTH, F. et al. Milk production, milk composition, liver lipid contents and C18 fatty acid composition of milk and liver lipids in Awassi ewes fed a diet supplemented with protected cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers. **Small Ruminant Research**, v. 94, p. 25–31, 2010.

IP, M.M., DARCY, K.M. Three-dimensional mammary primary culture model systems. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, p. 91-110, 1996.

JUMP, D. B., OPPENHEIMER, J. H. High basal expression and 3,5,3Vtriiodothyronine regulation of messenger ribonucleic acid S14 in lipogenic tissues. **Endocrinology**, v. 117, p. 2259 – 2266, 1985.

KADEGOWDA, A. K. et al. Peroxisome proliferatoractivated receptor-γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents, **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4276–4289, 2009.

KADEGOWDA, A.K. et al. Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression. **Journal of Dairy Science** , v. 91, p. 749–59, 2008.

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

KERSTEN, S. et al., DESVERGNE, B., WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v.4, p. 405-421, 2000.

KEYS, J.E. et al. Bovine mammary explant versus primary cell cultures: effect of bovine somatotropin and insulin like growth factor-i on DNA content and protein synthesis**. In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal**, v. 133, p. 206-211, 1997.

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

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.

LOCK, A.L. et al. A Conjugated Linoleic Acid Supplement Containing trans-10, cis-12 Reduces Milk Fat Synthesis in Lactating Sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 89 p., 1525–1532, 2006.

MANGELSDORF, D.J. et al. The nuclear receptor super family: the second decade. **Cell**, v. 9, p. 83-835, 1995.
MATITASHVILI, E. et al. "An in vitro approach to ruminant mammary gland biology." **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 17-41, 1997.

NKRUMAH, J.D. et al. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science,** v. 83, p. 20-8, 2005.

NOBLE, R.C. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. **Progress in Lipid Research**, v. 17, p. 55-91, 1978.

NTAMBI, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **The Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1549–1558, 1999.

OLIVEIRA, D.E. et al. An unprotected conjugated linoleic acid supplement decreases milk production and secretion of milk components in grazing dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 1437-1446, 2012.

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.

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

PARIZA, M.W., HA,Y.L. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens.**Medical oncology and tumor pharmacotherapy**, v.7(2-3), p. 169-71, 1990.

PARODI, P.W. **Conjugated linoleic acid in food**. In: SEBEDIO, J.; CHRISTINE, W.W.; ADOLF, R. Advances in Conjugated Linoleic Acid research. 2ed. Champaign, IL: AOCS PRESS, 2003. p.101-121.

PATON, C.M., NTAMBI, J.M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase.**American journal of physiology, endocrinology and metabolism**, v. 29, p.28-37, 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. 2523–27, 2004.

RICO, D.E., HARVATINE, K.J. Induction of and recovery from milk fat depression occurs progressively in dairy cows switched between diets that differ in fiber and oil concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.6621-30, 2013.

ROSE, M. T., MCCONOCHIE, H. "The Long Road to a representative in vitro model of bovine lactation". **Journal of Integrated Field Science**, v. 3, p.67-72, 2006.

ROY, R. et al. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. Animal **Genetics**, v. 37, p. 215–218, 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.

SEELIG, S. et al. Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 78, p. 4733–4737, 1981.

SHINGFIELD, K.J. et al. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p.1140-1166, 2010.

SHINGFIELD, K.J. et al. Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 606, p. 3-65, 2008.

SHINGFIELD, K.J., GRIINARI, J.M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p. 799-816, 2007.

SINCLAIR, L. et al. A supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat yield but does not alter organ weight or body fat deposition in lactating ewes. **The Journal of Nutrition**, v.140, p.1949-1955, 2010.

TICIANI et al. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase α isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. **Animal,** p.1-7, 2016.

TRAMONTANA, S. et al. Mamm-Omics™ in Susscrofa: uncovering genomic adaptationsunderlying mammary development during pregnancy and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3057-3066, 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.

WEERASINGHE, W.M. et al. Effect of a supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the performance of dairy ewes fed 2 levels of metabolizable protein and at a restricted energy intake.**Journal of Dairy Science** , v. 95, p. 109–116, 2012.

XU, H.E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular Cell**, v. 3, p. 397–403, 1999.

ZHU, Q. et al. The spot 14 proteinis required for de novo lipid synthesis in the lactating mammary gland. **Endocrinology**, v. 146, p. 3343-3350, 2005.

3 CAPÍTULO – Experimento *In Vivo*

Efeito de uma mesma dose de ácido linoleico conjugado (CLA) trans-10, cis-12 na transcrição de genes envolvidos na depressão da gordura do leite em ovelhas lactantes de diferentes pesos vivos

3.1 RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a expressão de genes e fatores de transcrição envolvidos na depressão da gordura do leite em ovelhas leiteiras com diferentes pesos vivos, recebendo a mesma dose de CLA. Doze ovelhas lactantes cruza Lacaune/Texel, foram separadas em dois grupos de acordo com peso vivo (PV): a) Controle: com 51,0 ± 2,0 kg e, b) Pesadas: com 69,0 ± 4,0 kg, os quais receberam 27g/d de CLA contendo 29,9% de trans-10, cis-12. O CLA foi dosado oralmente por 10 dias. Foram coletadas amostras de leite para composição nos dias “zero”, 3 e 10, e realizadas biópsias de glândula mamária e tecido adiposo nos dias 3 e 10. Foi extraído o RNA, feito o cDNA e realizado PCR em tempo real. Os dados foram analisados usando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial e utilizada a média geométrica dos genes housekeeping como covariável. A produção de leite e o teor dos componentes do leite foram analisados da mesma maneira, utilizando como covariável a produção e a composição do dia "zero". O CLA trans-10, cis-12 reduziu a síntese de gordura no leite entre os dias 3 e 10, mas não entre os animais de diferentes pesos. Comparado ao grupo Controle, no grupo dos animais Pesados houve uma maior expressão gênica da SCD e S14 na glândula mamária e da ACC-α PI, SREBP1 e leptina no

tecido adiposo. Com relação aos dias de suplementação, não se observou mudança na expressão dos genes mamários aos 10 dias, apesar da ocorrência de depressão de gordura no leite, enquanto que no tecido adiposo todos os genes avaliados aumentaram a sua expressão. Assim, a resposta dos animais com diferentes pesos pode ser dependente da dose de CLA trans-10, cis-12 fornecido.

Palavras – chave: Expressão gênica, lactação, ovinos

3.2 ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the expression of genes and transcription factors involved in milk fat depression in dairy sheep with different body weights, receiving the same dose of CLA.Twelve lactating crossbred Lacaune/Texel ewes divided in two treatments according to body weight (BW): a) Control: with 51.0 ± 2.0 kg and b) Heavy: with 69.0 ± 4.0 kg receiving 27 g/day of CLA containing 29.9% of trans-10, cis-12, dosed orally for 10 days. Milk samples were collected for composition on days "zero", 3 and 10. Mammary gland and adipose tissue biopsies were taken on days 3 and 10. RNA was extracted, cDNA synthesized and qt-RTPCR carried out. Data were analyzed using a completely randomized design in a factorial arrangement, used the geometric mean of housekeeping genes as covariate. Milk production and content of milk components were analyzed in the same way, using as covariate on the production and composition of "zero".The trans-10, cis-12 CLA reduced the fat in milk synthesis between 3 and 10 but not between animals of different weights. Compared to the control group, the animals of group Heavy there was higher gene expression of SCD and S14 in the mammary gland and ACC-α PI, SREBP1 and leptin in adipose tissue. In the days of supplementation, there was no change in

the expression of genes to mammary gland in the 10 days, in tissue adipose all analyzed genes increased their expression. Thus, the response of animals of different weights can be dependent on the dose of CLA trans-10, cis-12 supplied.

Key - words: CLA, gene expression, lactation

3.3 INTRODUÇÃO

O isômero trans-10, cis-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) é capaz de reduzir o teor e a produção de gordura do leite, com efeitos observados em camundongos (WARREN et al., 2003), ovelhas (OLIVEIRA et al., 2012), cabras (FERNANDES et al., 2014) e vacas (BAUMGARD et al., 2000). A ação do CLA trans-10, cis-12, ocorre, pelo menos em parte, pela redução na expressão gênica de fatores de transcrição e genes que codificam enzimas lipogênicas envolvidas na síntese “de novo”, na captação, tráfego intracelular e dessaturação de ácidos graxos e na síntese de triglicerídeos (BAUMGARD et al., 2002).

Em um experimento conduzido por Baldin (2012) foi observado que cabras com maior peso vivo necessitavam uma maior dose de CLA trans-10, cis-12 para demonstrarem a mesma magnitude de depressão da gordura do leite. Assim, objetivamos avaliar a expressão de genes e fatores de transcrição envolvidos na síntese de gordura do leite em ovelhas leiteiras com diferentes pesos vivos, recebendo a mesma dose de CLA.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais e tratamentos

A comissão de ética de em experimentação animal da Universidade do Estado de Santa Catarina aprovou todos os procedimentos de manejo e cuidados com os animais (protocolo nº 1.66.13).

Doze ovelhas cruza Lacaune/Texel, multíparas, lactantes com 70 ± 3 dias em lactação, foram separadas em dois grupos de acordo com peso vivo (PV): a) Controle: com 51,0 ± 2,0 kg e; b) Pesadas com 69,0 ± 4,0 kg. Ambos grupos receberam 27g/d de CLA (Luta-60, BASF AG, São Paulo, Brazil) que consistia de ácidos graxos como ésteres metílicos com a seguinte composição: 4,1% de ácido palmítico, 3,6% de ácido esteárico, 27,4% de ácido oleico, 1,2 % de ácido linoleico, 29,8% de CLA *cis*-9, *trans*-11, 29,9% CLA de *trans*-10, *cis*-12 e 3,0% outros ácidos graxos. O CLA usado foi o mesmo suplemento relatado por Oliveira et al. (2012), Baldin et al. (2013a), Baldin et al. (2013b), Baldin et al. (2014), Fernandes et al. (2014), e que de Veth et al. (2004) relataram que os ésteres metílicos de CLA tem o mesmo efeito que o ácido graxo livre de CLA para reduzir a síntese de gordura do leite. O CLA foi dosado oralmente, com o auxílio de uma seringa (30 mL), uma vez ao dia durante 10 dias. Procedimento semelhante em ovelhas resultou numa transferência de 3,2 ± 0,6% (0,28 g / dia) de CLA *trans*-10, *cis*-12 para o leite (OLIVEIRA et al., 2012).

Todos os animais pastejaram trevo branco (*Trifolium repens* L.) e festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) durante o dia, com acesso livre a água e, em cada ordenha os animais recebiam 0,3 kg de matéria seca (MS) de concentrado, composto por 56 % de milho, 39% de farelo de soja e 5% de premix mineral/vitamínico. À noite, todos os animais foram

mantidos em baias cobertas e receberam 0,3 kg de MS de silagem de milho. O cálculo para a estimativa do consumo dos animais foi realizado utilizando a equação do INRA (2007), que leva em consideração o peso vivo, a produção e a composição do leite.

3.4.2 Amostras de leite e análises

Nos dias zero (d0), três (d3) e dez (d10), a produção de leite foi medida individualmente, proveniente das ordenhas da manhã e tarde, e uma amostra de cada animal foi armazenada. As amostras foram proporcionalmente compostas da ordenha da manhã e da tarde, armazenadas a 4°C com conservante (bronopol tablet; D & F Control Systems Inc., San Ramon, CA, USA) antes de serem analisados os componentes do leite: gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS). Os componentes do leite foram determinados por meio de análise de infravermelho (AOAC, 2000) a CCS por citometria de fluxo e os valores transformados para escore linear de acordo com NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1996).

3.4.3 Biópsias de tecidos

As biópsias de glândula mamária e tecido adiposo foram realizadas nos dias 3 e 10 entre 1 e 4h após a ordenha da manhã, com duração média de 15 min/ovelha, de acordo com procedimentos descritos por TICIANI et al. (2016).

3.4.4 Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e quantificação de PCR em tempo real e primers utilizados

O RNA total foi extraído das amostras de glândula mamária e do tecido adiposo, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) e foi medida a reação da cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), de acordo com a metodologia descrita por TICIANI et al. (2016).

Todos os primers foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems, v. 3.0) utilizando as sequências dos genes de interesse, publicados no GenBank [National Center for Biotechnology Information (NCBI); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/]. Detalhes incluíndo sequências dos primers e desempenho são apresentados na Tabela 1.

Um ensaio preliminar foi realizado para demonstrar a formação de um único produto e as eficiências de amplificação de cada par de primers dos genes alvos e housekeeping, utilizando o método de curva padrão do “pool” de cDNA do tecido mamário e do tecido adiposo onde a curva é graficamente representada como uma linha de regressão dos valores CT (cicle treshold) versus o log dos ácidos nucleicos e o coeficiente angular dessa reta determina a eficiência da reação.

Tabela 1. Sequência (5’ para 3’) e eficiência dos primers utilizados na transcrição reversa quantitativa PCR.

Símbolo[1]	**Forward (F) and reverse (R)**	**Nº de acesso**	**Amplicon, pb**	**R^2**	**Eficiência**
PI ACC-α	F:TCCCAGACGCGACCTGAA R:CACGGAGCCAATTATGAATCG	NM_001009256.1	100	0.99	101.3
PIII ACC-α	F: CTGCAGCAGGAGGACGAACT R: TCCGCAGAACCCTCCATATC	NM_001009256.1	100	0.99	99.6
FASN	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	XM_012186804.1	100	0.99	98.6
LEPTINA	F: CAGAGTCAGACCTGGTCGAGAA R: CTAGTGCCATGCCAGGCT	XM_012177092.1	100	0.98	99.3
SCD	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG	NM_001009254.1	100	0.99	100.6

	R: CATGAGGATGATGTTTCTCCAAAC				
S14	F:CCTCACCCATCTTACCCTGA R:TTGCAGGTCCAGGTCTTTC	Hussein et al. 2013	100	0.99	100.2
SREBP1	F:TCCATCAATGACAAGATCGTTGA R: GGATGTAGTCGATGGCTTTGC	Hussein et al. 2013	100	0.99	97.5
β-ACT	F:GCCTTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	NM_001009784.1	100	0.99	102.6
RPS18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: CGGATGTCGACGTCACACTT	XM_012100477.1	100	0.99	98.1

[1]ACC-α = acetil CoA carboxilase alfa promotores I e III; FASN = ácido graxo sintase; SCD = estearoil-CoA dessaturase 1; S14 = hormônio responsivo da tireoide spot 14; SREBP1 = proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1; β-ACT = Beta actina; RPS18 = proteína ribossomal S18.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial utilizando o software SAS (SAS Institute, 2009). O modelo incluiu o efeito do tratamento, do dia de coleta, e a interação entre o tratamento x dia de coleta. Foi utilizada como covariável a média geométrica dos genes housekeeping proteína ribossomal S18 (RPS18) e beta-actina (β-ACT) conforme descrito por VANDESOMPELE et al. (2002) e excluída do modelo quando não significativa. A análise dos resíduos estudentizados (Studentized Residuals) com observações fora do intervalo ± 2,5 foram consideradas “outliers” e excluídas da análise. Os dados foram transformados para log2 quando necessário e reportados transformados de volta. A produção de leite e o teor dos componentes do leite foram analisados da mesma maneira, utilizando como covariável a produção e a composição do dia "zero" (removida quando não significativa). As médias foram comparadas através da opção PDIFF do comando LSMEANS e o efeito foi declarado significativo quando $P<0,05$.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Consumo e Composição do Leite

Na Tabela 2 são apresentados os dados de desempenho e composição do leite. O consumo estimado de matéria seca e os teores de lactose e proteína foram, respectivamente, 18,8, 4,9 e 7,7% maiores para os animais Pesados.

Com relação aos dias de análise, entre o dia 3 e 10 de suplementação com CLA trans-10, cis-12, os teores de gordura,

lactose e sólidos totais foram reduzidos em 39, 5,5 e 19%, respectivamente e, a produção de gordura em 31%.

Tabela 2. Desempenho e composição do leite de ovelhas leiteiras suplementada com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 *.

	Tratamento (TRT)		**Dia**			**Valor P**		
Variável	**Controle**	**Pesada**	**3**	**10**	**SEM**	**TRT**	**Dia**	**TRT x Dia**
Produção de leite, g/day	1139.2	1088.9	1032.1	1196.1	124.1	0.77	0.36	0.45
Gordura (%)	6.0	6.1	7.6	4.6	0.21	0.81	0.001	0.38
Proteína (%)	5.2	5.6	5.5	5.3	0.09	0.007	0.17	0.99
Lactose(%)	4.1	4.3	4.4	4.1	0.05	0.01	0.003	0.71
Sólidos totais (%)	16.5	17.1	18.6	15.1	0.21	0.09	0.001	0.52
Produção de gordura, g/day	64.3	65.2	76. 7	52.9	7.34	0.93	0.04	0.52
Produção de proteína, g/day	57.5	62.0	56. 8	62.8	6.22	0.62	0.50	0.44

Produção de lactose, g/day	50.2	47.9	44.6	53.6	4.42	0.72	0.16	0.12
Produção de sólidos totais, g/day	179.8	188.9	188.9	177.7	19.44	0.79	0.68	0.45
CCS, escore linear *	4.4	4.2	3.1	5.4	0.44	0.76	0.001	0.71
DMI (Kg) **	1.6	1.9	1.7	1.7	0.03	0.005	0.45	0.26

* n= 6(Controle) and 6 (Pesada)
** Escore linear de células somáticas (CCS): [LNSCC = LN(SCC/100)/(0.693147) + 3] (National Mastitis Council, 1996)
*** DMI = consumo de máteria seca

3.6.2 Expressão Gênica

Não houve efeito da interação entre os pesos e dias de biópsia na glândula mamária e no tecido adiposo (Tabelas 3 e 4).

Na glândula mamária houve uma maior expressão gênica da SCD (69,8%) e S14 (163%) nos animais Pesados (Tabela 3). No tecido adiposo a expressão gênica da ACC-α PI e da leptina foram, respectivamente, 175 e 167% maiores nos animais Pesados (Tabela 4).

Tabela 3. Expressão gênica na glândula mamária de ovelhas suplementadas com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 *.

	Tratamento (TRT)		**Dia**			**Valor P**		
Gene	**Controle**	**Pesada**	**3**	**10**	**SEM**	**TRT**	**Dia**	**TRT x Dia**
ACCα PIII	104.2	142.6	109.8	136.9	20.4	0.20	0.36	0.34
FASN	94.9	133.3	115.4	112.9	17.8	0.15	0.92	0.40
SCD	115.3	195.8	133.6	177.5	25.1	0.04	0.23	0.34
S14	114.3	300.8	179.9	235.3	47.2	0.01	0.41	0.81
SREBP1	134.3	144.7	153.2	125.9	12.5	0.56	0.14	0.22

* n= 6 (Controle) and 6 (Pesada)

Tabela 4. Expressão gênica no tecido adipos de ovelhas suplementadas com a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 *.

	Tratamento (TRT)		**Dia**			**Valor P**		
Gene	**Controle**	**Pesada**	**3**	**10**	**SEM**	**TRT**	**Dia**	**TRT x Dia**
ACCα PI	158.3	434.8	111.9	481.2	91.8	0.05	0.01	0.31
FASN	192.8	182.1	107.1	267.7	52.9	0.88	0.05	0.61
SCD	299.1	343.5	167.0	485.6	68.4	0.58	0.003	0.87
S14	93.1	101.0	42.6	220.8	1.59	0.51	0.001	0.96
SREBP1	195.3	285.3	177.9	302.7	33.9	0.07	0.01	0.28
Leptin	77.7	207.7	82.6	195.2	1.2	0.001	0.004	0.17

* n= 6 (Controle) and 6 (Pesada)

3.7 DISCUSSÃO

Como mostrado em estudos prévios, o CLA trans-10, cis-12, reduz o teor e a produção de gordura do leite de ovelhas lactantes (Lock et al., 2006; Sinclair et al., 2007; Oliveira et al., 2012), entretanto, não temos conhecimento de trabalhos que tenham investigado os efeitos de uma mesma dose de CLA trans-10, cis-12 em ovelhas lactantes de diferentes pesos vivos.

Neste estudo, os grupos de animais apresentaram uma diferença média de peso de 18 kg (P=0.01) que não foi suficiente para permitir a manifestação dos efeitos do CLA trans-10, cis-12 sobre o teor e/ou produção de gordura do leite, diferentemente do que ocorreu no trabalho do Baldin (2012) com cabras leiteiras, onde a diferença média de peso vivo entre os animais pesados e leves que receberam o CLA trans-10, cis-12 foi de 32 kg.

A utilização de duas doses de CLA trans-10, cis-12 (alta e baixa) em vacas com mesmo de peso vivo, 9 semanas pós parto, reduziu o conteúdo e a produção de gordura em 21% na alta dose de CLA, enquanto que na dose baixa a redução foi de 11% (CASTÃNEDA-GUTIERREZ et al., 2005). Nesse estudo citado, observou-se também que tanto o peso vivo dos grupos de animais como o escore de condição corporal não foram diferentes (P>0.05), sugerindo que a resposta pode ser dependente da dose fornecida de CLA trans-10, cis-12.

Em alguns casos quando há redução na gordura do leite, os nutrientes que seriam usados para síntese de gordura podem ser direcionados para a síntese de leite e proteína (HARVATINE et al., 2009). No entanto, no presente trabalho, apesar de não ter ocorrido diferença na depressão da gordura

nos dois grupos, o teor de proteína e lactose aumentaram nos animais Pesados, sem modificar a produção de leite.

Em função do bem estabelecido efeito do CLA na glândula mamária de ruminantes domésticos lactantes, optamos pela não utilização de um tratamento controle nesse estudo e isso foi uma limitação. Entretanto, a redução no teor e a produção de gordura do leite entre o dia 3 e 10, confirma o efeito do CLA embora não tenha tido diferença na expressão gênica da ACCα PIII e FASN entre os grupos e, essa evidência pode ser corroborada pelo tempo da meia-vida dessas duas enzimas que é de 48 à 76h (CRAIG et al., 1972; VOLPE; VAGELOS, 1973). O aumento da CCS entre os dias 3 e 10, sem apresentar sinais clínicos de mastite pode ter ocorrido em função da apoptose das células epiteliais mamárias pelo efeito do CLA trans-10, cis-12 conforme já demonstrado nos estudos de Bell; Kennely (2003), Keating et al. (2008) e Oliveira et al. (2012), sendo maior ao final (dia 10) já que as células estariam expostas ao CLA trans-10, cis-12 por mais tempo.

A SCD é responsável pela fluidez do leite, suprindo a glândula mamária com ácidos graxos insaturados através da introdução de uma dupla ligação “cis” entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos e sua expressão gênica foi maior nos animais Pesados. A redução da expressão gênica pela ação do CLA trans-10, cis-12 nos animais Controle e a ausência de diferença no teor e/ou produção de gordura entre os grupos de animais, pode ter ocorrido considerando-se que houve um efeito de diluição do CLA trans-10, cis-12 nos animais Pesados os quais necessitariam uma maior dose para igualar à redução do grupo Controle, mostrando que uma redução na expressão gênica da

SCD não é fundamental para alterações no teor e/ou produção de gordura.

De forma semelhante, o gene da S14 foi mais expresso na glândula mamária dos animais do grupo Pesados. O gene da S14 codifica uma proteína nuclear que está intimamente associada com a regulação da síntese de ácidos graxos em tecidos lipogênicos (KINLAW et al., 1995; ZHU et al., 2005). Embora a sua exata função bioquímica não seja conhecida ela é encontrada no núcleo das células e é um coativador da transcrição (Cunningham et al., 1998, Chou et al., 2007, Chou et al., 2008) e Harvatine; Bauman (2006) identificaram o S14 como responsivo ao CLA trans-10, cis-12.

No tecido adiposo, a expressão do gene da leptina foi maior nas ovelhas pesadas, sugerindo que os animais utilizados, além dos diferentes pesos vivos, apresentavam adiposidade distinta entre os grupos. Como a síntese de leptina em ruminantes é estimulada, a longo prazo, pela gordura corporal e, a médio prazo, pelo nível de alimentação (Chilliard et al., 2001), o aumento que se observou no consumo estimado de matéria seca no grupo dos animais Pesados pode ter refletido também na maior expressão gênica.

Além disso, tanto a leptina quanto os demais genes avaliados no tecido adiposo aumentaram a expressão gênica no dia 10. Isso corrobora, em parte, com os resultados encontrados por Havartine et al. (2009), que observaram que em vacas infundidas abomasalmente com o trans-10, cis-12 a expressão das enzimas envolvidas na síntese de lipídeos (FASN, SCD), dos fatores de transcrição (SREBP1 e PPARy) e da leptina também aumentaram no tecido adiposo, frente a redução da síntese de gordura no leite. Nesse caso, o que pode haver é o

redirecionamento da energia que seria utilizada para a síntese de gordura no leite para o tecido adiposo, no entanto, no nosso estudo, a expressão dos genes mamários não foi reduzida, apesar do aumento da expressão dos genes no tecido adiposo e da ocorrência de depressão da gordura no leite entre os dias 3 e 10.

3.8 CONCLUSÃO

A suplementação de uma mesma dose de CLA trans-10, cis-12 para animais com diferentes pesos vivos não promoveu a redução do teor e produção de gordura do leite, assim como não modificou a expressão dos genes envolvidos na lipogênese da glândula mamária, sugerindo que a resposta é dependente da dose de CLA trans-10, cis-12 fornecida de acordo com o peso dos animais.

3.9 REFERÊNCIAS

BALDIN, M. **Desempenho, composição do leite e balanço Energético de cabras leiteiras suplementadas com Ácido linoleico conjugado (CLA) não protegido da biohidrogenação Ruminal**, Dissertação, p.79, 2012.

BALDIN, M. et al. Dose–response relationship in dairy ewes fed a rumen unprotected CLA supplement. **Livestock Science**, v.158, p. 91-94, 2013a.

BALDIN, M. et al. A rumen unprotected conjugated linoleic acid supplement inhibits milk fat synthesis and improves energy balance in lactating goats. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3305-3314, 2013b.

BALDIN, M. et al. CLA induced milk fat depression reduced dry matter intake and improved energy balance in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 116, p. 44-50, 2014.

BAUMGARD, L.H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 278, p. 179–184, 2000.

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.

BELL, J.A.; KENNELLY, J.J. "Short communication: Postruminal infusion of conjugated linoleic acids negatively impacts milk synthesis in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1321-1324, 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. 1078–1089, 2005.

CHILLIARD, Y. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. Domestic Animal Endocrinology, v. 21, p. 271-295, 2001.

CHOU, W.Y. et al. Human spot 14 protein interacts physically and functionally with the thyroid receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 25, p. 133-8, 2007.

CHOU, W.Y. et al. Human Spot 14 protein is a p53-dependent transcriptional coactivator via the recruitment of thyroid receptor and Zac1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.1826-1834, 2008.

CRAIG, M.C. et al. Effect of dietary change on the rates of synthesis and degradation of rat liver fatty acid synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 152, p. 619–630, 1972.

CUNNINGHAM, B.A. et al. “Spot 14” protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. **Thyroid**, v. 8, p. 815–25, 1998.

DE VETH, M.J. et al. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: Comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. **Lipids**, v. 39, p. 365-372, 2004.

FERNANDES, D. et al. Milk fat depression and energy balance in stall-fed dairy goats supplemented with increasing doses of conjugated linoleic acid methyl esters. **Animal**, v. 8, p. 587-595, 2014.

HARVATINE, K.J. et al. Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 849–854, 2009.

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.

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

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA. **Alimentation des bovins, ovins et caprins: Besoins des animaux - Valeurs des aliments** - Tables Inra Versailles: Ed. Quae, 2007; 310p.

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

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.

LOCK, A.L. et al. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1525-32, 2008.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current Concepts of Bovine Mastitis**, 4ed. Arlington, VA. 1996. 64p.

OLIVEIRA, D.E. et al. An unprotected conjugated linoleic acid supplement decreases milk production and secretion of milk components in grazing dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 1437-1446, 2012.

SAS Institute 2009. **SAS/STAT: user’s guide, version 9.2**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SINCLAIR, L.A et al.Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on ovine milk fat synthesis and cheese properties. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 3326-35, 2007.

TICIANI, E. et al. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase α isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. **Animal**, v. 26, p.1-7, 2016.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometricaveraging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3,research0034, 2002.

VOLPE, J.J.; VAGELOS, P.R. Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.42, p.21–60, 1973.

WARREN, J.M. et al. Trans-10, cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. **Lipids**, v. 38, p. 497-504, 2003.

ZHU, Q. et al. The spot 14 proteinis required for de novo lipid synthesis in the lactating mammary gland. **Endocrinology**, v.146, p. 3343-3350, 2005.

4 CAPÍTULO – Experimento *In Vitro*

Explantes de glândula mamária ovina para estudos moleculares dos efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12 sobre fatores de transcrição e genes lipogênicos

4.1 RESUMO

O cultivo de explantes de glândula mamária em lactação permite avaliar o efeito de moléculas bioativas em ambiente controlado, desde que mantenha as características do tecido como encontrado in vivo. Os objetivos deste estudo foram avaliar explantes mamários de ovelhas lactantes cultivados in vitro como um modelo para estudo da expressão gênica e avaliar o efeito do CLA trans-10, cis-12 sobre a expressão gênica dos fatores de transcrição e dos genes lipogênicos envolvidos na síntese da gordura de leite. Os explantes foram cultivados em meio de crescimento de células epiteliais mamárias e submetidos aos seguintes tratamentos: CLA: meio de cultivo + 315 μmol de CLA trans-10, cis-12 complexado a albumina sérica bovina e; Controle (meio de cultivo), por 3 e 24h. Após os tempos de cultivo, foi realizado o Ensaio do Cometa e extraído o RNA, sintetizado o cDNA e realizado o qRTPCR. Os dados foram analisados usando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial eutilizada a média geométrica dos genes housekeeping como covariável. As médias foram comparadas e o efeito foi declarado significativo quando P<0,05. O ensaio do cometa mostrou que não houve fragmentação do DNA em 3 e 24h de cultivo. Os genes da

estearoil CoA-dessaturase (SCD) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPARy) no tratamento CLA foram reduzidos, respectivamente, em 70 e 90% de 3 para 24 h. O cultivo de explantes de glândula mamária lactante por 24h pode ser utilizado para estudos moleculares avaliando a expressão gênica.

Palavras-chave: ovelha lactante, ensaio do cometa, expressão gênica

4.2 ABSTRACT

The cultivation of mammary gland explants lactating allows to evaluate the effect of bioactive molecules in a controlled environment, maintains the characteristics of the fabric as found in vivo. The objectives of this study were to evaluate breast explants cultured lactating ewes in vitro as a model for the study of gene expression and evaluate the effect of CLA trans-10, cis-12 on gene expression of transcription factors and lipogenic genes involved in the synthesis of milk fat. The explants were cultured in growth medium mammary epithelial cells and subjected to the following treatments: CLA: culture medium + 315 µmol of trans-10, cis-12 CLA complexed with bovine serum albumin and; Control (culture medium), for 3 and 24 hours. After the times of cultivation, was held the Comet Assay and extracted RNA, cDNA was synthesized and qRTPCR performed. Data were analyzed using a completely randomized design in a factorial arrangement, used the geometric mean of housekeeping genes as covariate. Means were compared and the effect was declared significant when $P < 0.05$. The comet assay showed no DNA fragmentation at 3

and 24 h of culture. The gene of stearoyl CoA desaturase (SCD) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARy) treatment in the CLA were reduced respectively by 70 and 90% from 3 to 24 h. The explants cultivation for 24h lactating mammary gland can be used for molecular studies assessing gene expression.

Keywords: lactating ewe, comet assay, gene expression

4.3 INTRODUÇÃO

A linhagem de células epiteliais bovinas MAC-T tem sido utilizada em estudos de cultivos *in vitro* para avaliar os efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12, como demonstrado por PETERSON et al. (2004). Entretanto, não é do conhecimento destes autores a existência de linhagens de células ovinas para cultivo *in vitro* o que torna o uso de explantes de tecido mamário objetos para a investigação. Adicionalmente, sabe-se que o cultivo de tecido (explantes) de glândula mamária de animais em lactação permite avaliar o efeito de moléculas bioativas, desde que o tecido mantenha a atividade celular normal, tal como ocorreria em animais vivos (Keys et al., 1997) permitindo estudar a glândula mamária lactante sem a interferência do metabolismo em geral (IP; DARCY, 1996; HU et al., 2009). Keys et al. (1997) avaliaram por 96h, células primárias isoladas de tecido mamário e explantes de tecido mamário de vacas lactantes, cultivados *in vitro* conjuntamente com tecido adiposo e hepático, e verificaram que tanto em células como nos explantes, até 24h

de cultivo, a viabilidade foi mantida porque não ocorreu mudanças na quantidade de DNA.

O isômero do CLA *trans*-10, *cis*-12 foi identificado como potente inibidor da síntese da gordura do leite (Baumgard et al., 2000), sendo um dos mecanismos causadores desta inibição a redução da expressão gênica de fatores de transcrição e genes lipogênicos que codificam as enzimas que atuam na síntese "*de novo*" dos ácidos graxos, na captação, transporte intracelular, dessaturação de ácidos graxos e na síntese de triglicerídeos (BAUMGARD et al., 2002).

Desde modo, os objetivos deste estudo foram avaliar explantes mamários de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* como um modelo para estudo da expressão gênica e avaliar o efeito do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a expressão gênica dos fatores de transcrição proteína de ligação ao elemento regulatório esterol 1 (SREBP1) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPARγ) e dos genes da acetil-CoA carboxilase alfa transcritos da região promotora três (ACC-α PIII), da sintase de ácidos graxos (FASN) e da estearoil-CoA dessaturase (SCD), envolvidos na síntese de gordura de leite.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (protocolo nº 1.66.13).

4.4.1 Biópsia do tecido, cultivo dos explantes e tratamentos

Os explantes de glândula mamária foram obtidos através de biópsia de uma ovelha cruza Lacaune/Texel com 120 dias em lactação. Para a biópsia foram realizados os procedimentos descritos por Ticiani et al. (2016). Os explantes pesaram 12 ± 1.86) e foram cultivados em placas de quatro poços (Nunclon-Nunc, Roskilde, Denmark), com 400 µL de meio de cultivo (MEGM; Lonza, Walkersville, MD, USA) adicionado dos seguintes reagentes: extrato de pituitária, insulina, eGF, hidrocortisona, gentamicina, anfotericina e 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Campinas, SP, Brasil), incubados a 37ºC com 5% CO_2 e umidade saturada. Os tratamentos foram: a) CLA: meio de cultivo + 315 µmol de CLA *trans*-10, *cis*-12 (Nuchek Prep, In, Elysian, MN, USA) complexado a albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA) e; b) Controle (meio de cultivo), por 3 e 24h, em sextuplicata. A concentração de CLA trans-10, cis-12 utilizada foi 4 vezes maior que aquela descrita por Peterson et. al (2004) por se tratar de tecido e pela escassez de referências.

Os dados de expressão gênica foram corrigidos no tratamento CLA conforme segue: a expressão gênica dos genes de interesse foi dividida pelo peso do explante e, este resultado, foi dividido pela concentração do CLA e, posteriormente, o valor obtido foi multiplicado pelo resultado final da expressão dos genes de interesse.

4.4.2 Separação das células dos explantes

Depois de 3 e 24h, foi removido o meio de cultivo e os explantes foram imersos no meio Accumax (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA) por 10 min para a desintegração do

tecido. Após parte do tecido ter se desintegrado, as células isoladas foram centrifugadas e suspendidas em 100 µL de meio de cultivo, coradas na concentração de 1:4 com azul de tripan (Vetec Chemistry Ldta, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, BR) sendo retirado 20 µL para a contagem em câmara de Neubauer.

4.4.3 Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa (eletroforese de células isoladas) foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações feitas por SILVA (2007). Brevemente, as lâminas contendo as células foram imersas por 2h em 100 mL na solução de lise composta pelos seguintes reagentes: NaCL 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10 e Triton X-100 1%, dimetil sulfóxido (DMSO) 10%. Posteriormente, as lâminas foram removidas da solução de lise e imersas em 1,5 L da solução de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH 13) a 4°C por 20 min. Em seguida, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica de 25 volts e 300 mA por 20 min, após fixadas em etanol 100% e coradas com Hoechst (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA), e foram visualizadas em microscópio de epifluorescência com comprimento de onda de 465 nm para verificar a fragmentação do DNA

4.4.4 Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e quantificação de PCR em tempo real e primers utilizados

Depois de 3 e 24h de tratamentos, o RNA total foi extraído dos explantes mamários, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) e foi medida a reação da cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), de acordo com a metodologia descrita por TICIANI et al. (2016).

Todos os *primers* foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems, v. 3.0) utilizando as sequências dos genes de interesse, publicados no GenBank [National Center for Biotechnology Information (NCBI); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/]. Detalhes incluíndo sequências dos primers e desempenho são apresentados na Tabela 1.

Um ensaio preliminar foi realizado para demonstrar a formação de um único produto e as eficiências de amplificação de cada par de primers dos genes alvos e housekeeping, utilizando o método de curva padrão do “pool” de cDNA do tecido mamário onde a curva é graficamente representada como uma linha de regressão dos valores CT (cicle treshold) versus o log dos ácidos nucleicos e o coeficiente angular dessa reta determina a eficiência da reação.

Tabela 1. Sequência (5’ para 3’) e eficiência dos primers utilizados na transcrição reversa quantitativa PCR.

Símbolo[1]	**Forward (F) e reverse (R)**	**Nº de acesso**	**Amplicon, bp**	**R^2**	**Eficiência**
PIII ACC-α	F: CTGCAGCAGGAGGACGAACT R: TCCGCAGAACCCTCCATATC	NM_001009256.1	100	0,99	99,7
FASN	F: GGCCGTCTTTCTGACCAAGA R: CGTGACGCCTTGCTTTTTG	XM_012186804.1	100	0,99	96,3
SCD	F: CCGCCCTGAAATGAGAGATG R: CATGAGGATGATGTTTCTCCAAAC	NM_001009254.1	100	0,99	96,6
SREBP1	F:TCCATCAATGACAAGATCGTTGA R: GGATGTAGTCGATGGCTTTGC	Hussein et al. 2013	100	0,98	95,6
PPARγ	F:CCAAGAATATCCCCGGCTTT R:AGGCCAGCATCGTGTAAATGA	NM_001100921.1	100	0,95	100,4
β-ACT	F:GCCTTTGCCATCACTGCAAT R: TGAGCTCTCCTGCCCTCTTG	NM_001009784.1	100	0,99	97,4
RPS18	F: GCCCTGAGGCTCTCTTCCA	XM_012100477.1	100	0,99	95,4

R: CGGATGTCGACGTCACACTT

[1]ACC-α= acetil CoA carboxilase alfa - promotor III; FASN= ácido graxo sintase; SCD= estearoil-CoA dessaturase 1; SREBP1= proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1; PPARγ= receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama; β-ACT= Beta actina; RPS18= proteína ribossomal S18.

.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial utilizando o software SAS (SAS Institute, 2009). O modelo foi composto por o efeito do tratamento, tempo de cultivo e interação tratamento x tempo de cultivo. Foi utilizada como covariável a média geométrica dos genes housekeeping proteína ribossomal S18 (RPS18) e beta-actina (β-ACT) conforme descrito por Vandesompele et al. (2002) e excluída do modelo quando não significativa. A análise dos resíduos estudentizados (Studentized Residuals) com observações fora do intervalo ± 2,5 foram consideradas “outliers” e excluídas da análise. Os dados foram transformados para log2 quando necessário e reportados transformados de volta. As médias foram comparadas através da opção PDIFF do comendo LSMEANS e o efeito foi declarado significativo quando $P<0,05$.

4.6 RESULTADOS

O Ensaio do Cometa utilizado para determinar a integridade do DNA foi realizado às 3 e 24h, nos tratamentos CLA e Controle. De acordo com a escala de danos ao DNA descrita por Collins (2004), o resultado foi classificado como "zero" indicando ausência de fragmentação do DNA que levaria a formação da “cauda” do Cometa pela marcação dos fragmentos do DNA, conforme pode-se observar na Figura 1.

Com relação, a expressão gênica, na Tabela 2 são mostrados os genes avaliados e os efeitos dos tratamentos nos cultivos às 3 ou 24 horas. Houve uma redução de 90 e 70% na

expressão gênica, respectivamente, para os genes da SCD e PPARγ, nos explantes tratados com CLA de 3 para 24 horas.

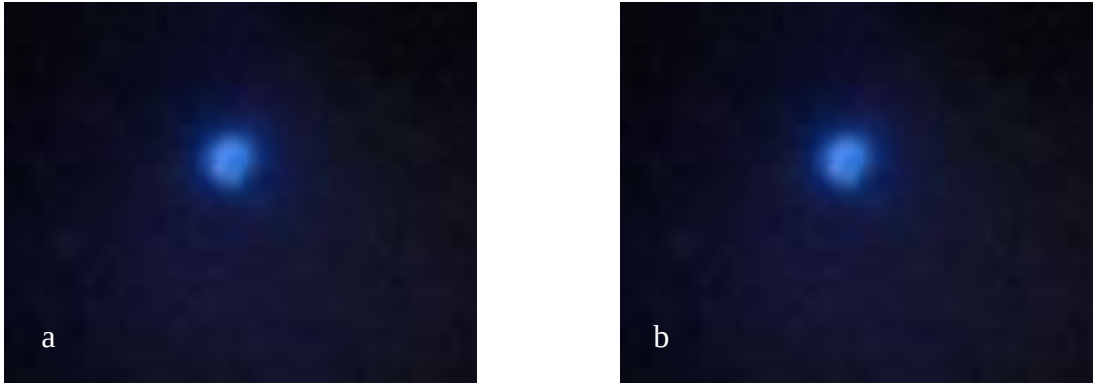


Figura 1. Ensaio do Cometa em células isoladas a partir dos explantes mamários cultivados por 3 e 24h (a) CLA e (b) Controle.

Tabela 2. Expressão gênica nos explantes de glândula mamária cultivados *in vitro**.

	Tratamento (TRT)		**Tempo**			**Valor de P**		
Gene	**CLA**	**Controle**	**3**	**24**	**SEM**	**TRT**	**Tempo**	**TRT x Tempo**
ACCα PIII	19.92	40.79	60.95	13.33	1.53	0.23	0.004	0.17
FASN	93.42	106.55	81.83	130.36	1.67	0.85	0.35	0.86
SCD	50.02	63.07	65.94	47.85	1.24	0.42	0.19	0.005
SREBP1	46.85	39.87	71.19	26.3	1.18	0.47	0.001	0.11
PPARγ	94.01	67.91	175.35	36.41	1.16	0.11	0.001	0.001

***** CLA n=6, Controle n=6

4.7 DISCUSSÃO

Observa-se na Figura 1 que não houve a formação da "cauda" do Cometa, ou seja, não houve a fragmentação do DNA no teste sugerindo que o tecido estava íntegro durante o cultivo por até 24h e, portanto, o cultivo de explantes é uma ferramenta que pode ser utilizada em estudos avaliando a expressão gênica de fatores de transcrição e genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lipídeos na glândula mamária, submetidos a diferentes tratamentos. Sobre essa metodologia, ela é de execução simples e pode ser aplicada em diferentes tecidos dos quais se obtêm suspensões de células (Tice et al., 2000; Collins, 2004; Dhawan et al., 2009), além de ser considerada um ensaio de alta sensibilidade e especificidade (Rojas et al., 1999).

O mesmo foi observado no cultivo dos explantes por 3h. Este tempo foi usado no nosso trabalho para servir de comparação já que é utilizado em estudos que medem a lipogênese em explantes mamários conforme inicialmente descrito por Bauman et al. (1973) e depois por Baumgard et al. (2002) em estudo com medidas de expressão gênica. É importante salientar que a manutenção dos explantes de tecido lactante por longos períodos em cultivo como é feito com linhagens de células não é possível porque se a célula epitelial mamária não secretar a gordura ela se torna inviável (Bauman et al., 2011).

A mudança da expressão gênica para alguns dos genes avaliados, de 3 para 24h de cultivo está relacionada com a adaptação do explante mamário às condições de incubação e aos componentes do meio de cultivo, como já descrito por

Fresnhey (2011) ou devido ao tempo necessário para absorção de ácidos graxos por células mamárias conforme mostrado por Kinsella (1970). Assim, podemos sugerir que com 3h de cultivo ainda não há CLA trans-10, cis-12 nas células epiteliais do explante mamário capaz de elicitar os efeitos em nível molecular o que acontece somente às 24h.

Com relação à expressão gênica, o tratamento com o CLA trans-10, cis-12 reduziu a expressão gênica, conforme mostrado na Tabela 2. Durante a síntese de gordura na glândula mamária, a ACC-α transcrita da região promotora III (PIII) é predominante em ovinos e catalisa a formação de malonil-CoA a partir do acetil-CoA para posteriormente a FASN fazer o alongamento da cadeia de carbonos durante a síntese de ácidos graxos. Neste estudo era esperado que a expressão gênica da ACC-α PIII e da FASN não fosse reduzida tendo em vista que estas enzimas possuem meia-vida de 48 à 72h (Craig et al., 1972; Volpe e Vagelos, 1973) e que ainda estariam ativas no tecido sob cultivo acima das 24h utilizadas como tempo limite neste estudo.

Já nos estudos in vitro utilizando a linhagem de células epiteliais bovinas (MAC-T) o CLA trans-10, cis-12 reduziu a expressão dos genes ACC, FASN, SCD e do fator de transcrição SREBP1, envolvidos no metabolismo lipídico (Peterson et al., 2004; Ma e Corl, 2012). A diferença entre explantes e linhagens de células epiteliais é que neste último modelo de estudo as células precisam ser induzidas pelos hormônios lactogênicos para que se tornem funcionais e sintetizem a gordura, diferente dos explantes onde as células no animal já estão naturalmente lactantes e a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de lipídeos

também já estaria ocorrendo. É conveniente ressaltar que as enzimas e proteínas codificadas pelos genes avaliados, têm meia-vida com tempos diferentes de duração (SREBP1 ~ 1h, Ponugoti et al., 2010; SCD e PPARγ ~ 3 a 4h, respectivamente, Toyama et al., 2007 e Bruedigam et al., 2008) o que corrobora em ser um tempo superior às 3h para que o tratamento com CLA trans-10, cis-12 tivesse efeito.

Sobre esse aspecto, embora a meia-vida da SREBP1 seja relativamente curta, conforme já mencionado, ela e sua reguladora, a proteína de clivagem-ativação da SREBP1 (SCAP) combinam-se para regular a expressão de RNA de enzimas que sintetizam os ácidos graxos, podendo ocorrer a redução da sua forma nuclear (nSREBP1) sem redução da síntese de RNA ou da própria proteína conforme demonstrado por Peterson et al. (2004).Esse pode ser o motivo de não encontrarmos a redução na expressão gênica da SREBP1 em 24h de cultivo já que não medimos a forma nuclear da SREBP1.

Bionaz e Loor (2008) sugeriram que o PPARγ regula, pelo menos em parte, a síntese de gordura do leite em vacas lactantes em função da sua expressão gênica ser aumentada no tecido mamário entre os estados fisiológicos de gestação e lactação e por haver, neste mesmo período, um aumento da expressão de genes lipogênicos alvos do PPARγ.

Por ser um fator de transcrição dependente do ligante, para o PPARγ se tornar ativo, alguns ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o CLA, podem agir como agonistas naturais. Esse efeito tem sido observado nos tecidos lipogênicos em não-ruminantes, porém, em ruminantes, o PPARγ parece ter uma resposta diferente. No seu estudo,

Kadegowda et al. (2009) cultivaram células epiteliais bovinas (MAC-T) com o isômero trans-10, cis-12 e observaram redução da expressão dos genes alvos do PPARγ, também com 24 horas de cultivo mas não observaram alteração na expressão gênica do PPARγ.

Isso possivelmente ocorre porque o trans-10, cis-12 compete ou reduz a síntese de outros ligantes endógenos ou suprime a atividade do PPARγ por meio de sua fosforilação e consequente redução da afinidade aos seus ligantes (Brown e McIntosh, 2003; Kennedy et al., 2008), contudo, esses mecanismos não estão totalmente esclarecidos e não talvez não possam ser aplicados ao nosso estudo, uma vez que o mesmo se trata de cultivo de explantes e não das células propriamente ditas.

4.8 CONCLUSÃO

O cultivo de explantes de glândula mamária lactante por 24h pode ser utilizado para estudos moleculares avaliando a expressão gênica. O tratamento com CLA trans-10, cis-12 por 24h reduziu a expressão gênica da PPARγ e SCD.

4.9 REFERÊNCIAS

BAUMAN, D.E. et al. Factors affecting *in vitro* lipogenesis by bovine mammary tissue slices. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p. 1520-1525, 1973.

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 Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 278, p. 179–184, 2000.

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.

BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity, The **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3041-3046, 2003.

BRUEDIGAM, C. et al., Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. **FEBS Lett**., v. 14, p.1618-24, 2008.

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

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CRAIG, M.C. et al. Effect of dietary change on the rates of synthesis and degradation of rat liver fatty acid synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 152, p. 619–630, 1972.

DHAWAN, A. et al. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

HU, H. et al. In Vitro culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow. **PLoS ONE**, v. 4, p. 7636, 2009.

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

IP, M.M.; DARCY, K.M. Three-dimensional mammary primary culture model systems.**Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, p. 91-110, 1996.

KADEGOWDA, A. K. et al. Peroxisome proliferatoractivated receptor-γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents, **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4276–4289, 2009.

KENNEDY, A. et al. *Trans*-10, *cis*-12 Conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARγ activity in primary

cultures of human adipocytes, **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 455-461, 2008.

KEYS, J.E. et al. Bovine mammary explant versus primary cell cultures: effect of bovine somatotropin and insulin like growth factor-i on DNA content and protein synthesis**. In Vitro Cellular & Developmental Biology** , v. 133, p. 206-211, 1997.

KINSELLA, J.E. The absorption of fatty acids by functional bovine mammary cells. **Lipids**, v.5, p. 892-895, 1970.

MA, L., CORL, B.A. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 3743-55, 2012.

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. 2523–27, 2004.

PONUGOTI, B., et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 33959–33970, 2010.

ROJAS, E. et al. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography** B: Biomedical Sciences and Applications, v. 5, p 225-54, 1999.

SAS Institute 2009. **SAS/STAT: user's guide, version 9.2**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na Escola**, v. 02, p. 30-33, 2007.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-91, 1988.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

TICIANI, E. et al. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase α isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. **Animal**, v. **26**, p.1-7, 2016.

TOYAMA, T. et al Stearoyl-CoA desaturase activity is elevated by the suppression of its degradation by clofibric acid in the liver of rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 103, p. 383-90, 2007.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometricaveraging of

multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3,research0034, 2002.

VOLPE, J.J.; VAGELOS, P.R. Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.42, p.21–60, 1973.