

**WAGNER BROGIN JUNIOR**

**EFEITO DE UM AGONISTA DOS RECEPTORES ATIVADOS POR  
PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR $\gamma$ ) SOBRE OS EFEITOS  
DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA, TRANS-10, CIS-12 E CIS-9, TRANS-  
11) NA TRANSCRIÇÃO DE GENES LIPOGÊNICOS EM EXPLANTES MAMÁRIOS  
DE OVELHAS LACTANTES.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dimas Estrásulas de Oliveira

**Lages, SC  
2017**

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

Brogin Junior, Wagner  
EFEITO DE UM AGONISTA DOS RECEPTORES ATIVADOS  
POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR?)  
SOBRE OS EFEITOS DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA,  
TRANS-10, CIS-12 E CIS-9, TRANS-11) NA TRANSCRIÇÃO  
DE GENES LIPOGÊNICOS EM EXPLANTES MAMÁRIOS DE  
OVELHAS LACTANTES. / Wagner Brogin Junior. - Lages  
, 2017.  
48 p.

Orientador: Dimas Estrásulas de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Expressão gênica. 2. Lipogênese. 3. Receptor  
nuclear. 4. Tiazolinediona. I. Estrásulas de  
Oliveira, Dimas. II. Universidade do Estado de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III.  
Título.

**WAGNER BROGIN JUNIOR**

**EFEITO DE UM AGONISTA DOS RECEPTORES ATIVADOS POR  
PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR $\gamma$ ) SOBRE OS EFEITOS  
DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA, TRANS-10, CIS-12 E CIS-9, TRANS-  
11) NA TRANSCRIÇÃO DE GENES LIPOGÊNICOS EM EXPLANTES MAMÁRIOS  
DE OVELHAS LACTANTES.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.  
Orientador: Prof. Dimas Estrásulas de Oliveira

**Banca Examinadora**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Dimas Estrásulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Kazama  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

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

**Lages, 22 de Fevereiro de 2017**



Este trabalho é dedicado a todos os que me acompanharam na trajetória do mestrado e me auxiliaram em meu crescimento e desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

Gostaria de exaltar um grupo de pessoas, minha família, meus pais Wagner e Sandra, e meus irmãos Anthoni e Bruna, que me apoiaram, auxiliaram e me deram meios e força para mais esta conquista.

A todos esses, dedico.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a oportunidade de crescer e me desenvolver, em todos os aspectos, mas especialmente durante minha pós-graduação a nível de mestrado, em sabedoria e conhecimento.

Agradeço a todos os magistrados pelo afincô e dedicação a mim e a todos os alunos, dando-nos a graça do conhecimento e tornando-nos mais sábios.

Gostaria de agradecer também a todos os que colaboraram para o desenvolvimento e execução deste trabalho. De modo especial o professor Dimas Estrásulas de Oliveira, e também a toda a equipe do Grupo de Estudos em Nutrigenômica de Ruminantes (NUTRIGER), ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), e ao Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV), que me acompanharam e auxiliaram em todas as etapas deste trabalho.

A todos, o meu sincero, Muito Obrigado!



“Na ciência, não há pontos finais. Tudo é uma sequencia interminável de eventos que mutuamente co-interferem. Por isso, não há resposta completa em ciência e, muito menos, há resposta completa na aplicação dos pensamentos procurando examinar suas próprias origens, seus próprios processos de construção, limites, alcance, práxis, enfim, compreender a própria fonte que os gera. Na ciência, cada resposta é o começo de novas perguntas...”

(Dr. Augusto Jorge Cury, 2006).



## RESUMO

A busca pela otimização dos sistemas produtivos com animais conduz para além do fator animal, e nos mostram que os componentes “micro” são que sustentam os fatores de produção. Deste modo a nutrigenômica animal ganha cada vez mais importância e destaque na busca pela eficiência de recursos. Com isso, o presente trabalho visou analisar o efeito dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ) na transcrição de genes lipogênicos e sua resposta ao ácido linoleico conjugado (CLA, com os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11), através de um agonista químico específico (TZD, thiazolinediona). No experimento foram realizados cultivos de explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes, submetidos aos seguintes tratamentos: 1) Controle: meio de cultivo, 400 $\mu$ L; 2) TZD: 40mL (10  $\mu$ Mol/Lt); 3) CLA: (50% de *trans*-10, *cis*-12 e 50% de *cis*-9, *trans*-11): 30mL (315  $\mu$ Mol/Lt) e; 4) TZD + CLA: 40mL TZD (10  $\mu$ Mol/Lt) + 30mL (315  $\mu$ Mol/Lt). Foi extraído o RNA, sintetizado o DNA complementar (cDNA) e realizado a reação da cadeia da polimerase em tempo real (PCR Real Time) e medida a expressão gênica da isoforma PIII da acetil-CoA-carboxilase alfa (ACCa), ácido graxo sintase (FASN), receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ), proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol 1 (SREBP1), proteína de ativação de clivagem da SREBP1 (SCAP), estearoil-CoA-dessaturase (SCD), gene-1 induzido pela insulina (INSIG1), gene-2 induzido pela insulina (INSIG2). Comparado ao Controle, o TZD aumentou a expressão dos genes, sendo SREBP1 (1.010%), INSIG1 (789%), INSIG2 (849%), FASN (7831%), ACCa (8753%), SCD (6272%) e PPAR $\gamma$  (620%). Comparado ao tratamento TZD+CLA o TZD, aumentou a expressão dos genes SREBP1 (237%), ACCa (1729%), INSIG1 (7142%) e PPAR $\gamma$  (2480%). Em comparação ao tratamento CLA, o TZD aumentou a expressão da FASN (275%), SCAP (916%), SCD (206%) e INSIG2 (1700%). Conclui-se que o uso do agonista químico TZD em explantes da glândula mamária de ovelhas lactantes aumenta a expressão do PPAR $\gamma$  e o CLA reduz a expressão gênica da FASN, ACCa, SCD e SCAP. No tratamento TZD+CLA, o TZD não supera a capacidade de redução da expressão gênica do CLA para os genes PPAR $\gamma$ , FASN, SCD, SCAP, INSIG1 e INSIG2.

**Palavras-chave:** Expressão gênica. Lipogênese. Receptor nuclear. Tiazolinediona.



## ABSTRACT

The search for optimization of production systems with animals leads to besides the animal factor, and show us that the micro components are the ones which sustain the production factors. On this way the nutrigenomic animal gains more importance and prominent in the search for resource efficiency. Thereby the aim of this work was to analyse the effects of peroxisome proliferator activated gamma receptors (PPAR $\gamma$ ) in the transcription of lipogenic genes and its response to conjugated linoleic acid (mixture of isomers trans-10, cis-12 and cis-9, trans-11) through a specific chemical agonist (TZD, thiazolinedione). 1) Control: growing medium, 400 $\mu$ l; 2) TZD: 40ml (10 $\mu$ Mol/Lt); 3) CLA (50% of CLA trans10, cis-12 and 50% of CLA cis-9, trans-11): 30ml (315 $\mu$ Mol/Lt) and 4) TZD+CLA: 40ml TZD (10 $\mu$ Mol/Lt) + 30ml (315 $\mu$ Mol/Lt). It was extracted the RNA, synthesized the complementary DNA (cDNA), and carried out the polymerase chain reaction in Real Time (PCR – Real Time), measured the genetic expression of isoform PIII of acetyl-CoA-carboxylase alpha (ACC $\alpha$ ), fatty acid synthase (FASN), peroxisome proliferator activated gamma receptors (PPAR $\gamma$ ), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), cleavage activation protein of SREBP1 (SCAP), stearoyl-CoA-desaturase (SCD), insulin induced gene 1(INSIG1), insulin induced gene 2(INSIG2). Compared to control, the treatment TZD increased the genes expression being SREBP1(1010%), INSIG1 (789%), INSIG2 (849%), FASN (7831%), ACC $\alpha$  (8753%), SCD (6272%) and PPAR $\gamma$  (620%). Compared to the TZD+CLA treatment, the TZD treatment increased the expression of the genes SREBP1 (237%), ACC $\alpha$  (1729%), INSIG1 (7142%) and PPAR $\gamma$  (2480%). Compared to CLA treatment, TZD increased the expression of FASN (275%), SCAP (916%), SCD (206%) and INSIG2 (1700%). It was concluded that the use of chemical agonist TZD in explants of the mammary gland of ewes, grown in vitro has acted to induce a greater expression of PPAR $\gamma$  and CLA reduces the genes expression FASN, ACC $\alpha$ , SCD and SCAP. In the TZD+CLA treatment, the TZD does not exceed the capacity of reducing CLA gene expression for the PPAR $\gamma$ , FASN, SCD, SCAP, INSIG1 and INSIG2.

**Key-words:** Genetic Expression. Lipogenesis. Nuclear Receptor. Thiazolinedione.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração esquemática da regulação de genes mediada por PPARy .....	28
Figura 2 - Amostras de tecido glandular mamário mantidas no gelo durante a homogeneização com a probe .....	41
Figura 3 - Separação do RNA após centrifugação.....	41
Figura 4 - Kit comercial para extração do RNA.....	41
Figura 5 - Quantificação da concentração de RNA (Aparelho NanoDrop) .....	42
Figura 6 - Amostras e componentes do kit comercial em resfriamento durante a análise.....	42
Figura 7 - Amostras no termociclador.....	42
Figura 8 - Equipamento StepOne Real-Time.....	43
Figura 9 - Abundância de RNAm do gene PPARg em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	47
Figura 10 - Abundância de RNAm do gene FASN em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	48
Figura 11 - Abundância de RNAm do gene ACC em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	48
Figura 12 - Abundância de RNAm do gene SCD em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	49
Figura 13 - Abundância de RNAm do gene SREBP1 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	50
Figura 14 - Abundância de RNAm do gene SCAP em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	50
Figura 15 - Abundância de RNAm do gene INSIG1 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	51
Figura 16 - Abundância de RNAm do gene INSIG2 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos.....	51



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Primers ovinos utilizados nas análises de real-time PCR (5' para 3').....44



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA-carboxilase
ACCa	Acetil-CoA-carboxilase alfa
AGPAT6	Acil glicerol-3-fosfato aciltransferase 6
BACT	Beta actina
CD36	Cluster de diferenciação 36
cDNA	DNA complementar
CEDIMA	Centro de diagnóstico microbiológico animal
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
CLA	Ácido linoleico conjugado
CPT2	Carnitina palmitoiltransferase 2
CRAT	Carnitina acetiltransferase
CT	Ciclo limite
DGAT1	Diacilglicerol aciltransferase 1
DGL	Depressão da gordura do leite
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FABP4	Proteína de ligação a ácidos graxos 4
FASN	Ácido graxo sintase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
INSIG1	Gene 1 induzido pela insulina
INSIG2	Gene 2 induzido pela insulina
LABHEV	Laboratório de bioquímica de hemoparasitas e vetores
LEP	Leptina
LIPIN1	Lipina 1
LPL	Lipoproteína lipase
MAC-T	Células alveolares mamárias bovinas T
MDBK	Células renais epiteliais bovina
NCBI	Centro nacional de informações biotecnológicas
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
PCR RT	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PIII	Promotor III do gene da Acetil-CoA-carboxilase alfa
PPARs	Proliferadores de peroxissomo
PPAR $\alpha$	Proliferador de peroxissomo alfa
PPAR $\beta/\delta$	Proliferador de peroxissomo beta ou delta
PPAR $\gamma$	Proliferador de peroxissomo gama
PPAR $\gamma$ 1	Proliferador de peroxissomo gama 1
PPAR $\gamma$ 2	Proliferador de peroxissomo gama 2
PPRE	Elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomo
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Quantitativo PCR-RT

RXR	Receptor de ácido retinóico
S18	Proteína ribossomal S18
SCAP	Proteína de clivagem-ativação da SREBP1
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SCD1	Estearoil-CoA dessaturase 1
SNC	Sistema nervoso central
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1
SREBP2	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 2
TERF2	Fator de ligação de repetição telomérica 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TZD	Tiazolidinediona
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	23
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	27
2.1	<b>SÍNTESE E METABOLISMO LIPÍDICO .....</b>	27
2.2	<b>RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR<math>\gamma</math>) .....</b>	27
2.2.1	<b>Identificação e isoformas.....</b>	27
2.2.2	<b>Efeitos biológicos do PPAR<math>\gamma</math>.....</b>	29
2.2.2.1	<i>Em não ruminantes.....</i>	29
2.2.2.2	<i>Em ruminantes .....</i>	30
2.2.3	<b>Resposta do PPAR<math>\gamma</math> a agonistas naturais e sintéticos .....</b>	30
2.3	<b>EFEITOS DO CLA SOBRE O PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	31
2.4	<b>ESTUDOS REALIZADOS COM PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	32
2.4.1	<b>Estudos <i>in vivo</i> com PPAR<math>\gamma</math>.....</b>	32
2.4.2	<b>Trabalhos <i>in vitro</i> com PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	33
3	<b>HIPÓTESE .....</b>	35
4	<b>OBJETIVOS .....</b>	37
4.1	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	37
4.2	<b>OBJETIVO ESPECÍFICO .....</b>	37
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	39
5.1	<b>PROCEDIMENTOS COM OS ANIMAIS E LOCAL.....</b>	39
5.2	<b>BIÓPSIAS DE TECIDO MAMÁRIO .....</b>	39
5.3	<b>CULTIVO DOS EXPLANTES .....</b>	39
5.4	<b>EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E PCR QUANTITATIVO REAL TIME (RT-qPCR). .....</b>	40
5.5	<b>DESENHO DOS PRIMERS .....</b>	43
5.6	<b>CÁLCULOS DE AJUSTE.....</b>	45
5.7	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	45
6	<b>RESULTADOS .....</b>	47
6.1	<b>EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS NA GLÂNDULA MAMÁRIA.....</b>	47
6.1.1	<b>Gene PPAR<math>\gamma</math>.....</b>	47
6.1.2	<b>Genes envolvidos na via da síntese de novo de ácidos graxos.....</b>	47
6.1.3	<b>SREBP1 e genes associados .....</b>	49
7	<b>DISCUSSÃO .....</b>	53
8	<b>CONCLUSÃO.....</b>	57
9	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	59



## 1 INTRODUÇÃO

Com a consciência global de otimização dos recursos, a produção animal segue o rumo para melhorar a eficiência de todo o processo produtivo, do campo a mesa do consumidor, de modo mais acentuado no que diz respeito aos produtos lácteos, devido ao intensivo modo de criação de animais para a produção de leite, o que leva a intensificação de estudos com animais em lactação (BIONAZ, 2014).

Deste modo estudos e pesquisas são realizados a fim de encontrar maior compreensão e progresso, principalmente no que se refere a biologia da lactação, com a finalidade de explicar os processos que permeiam o metabolismo dos principais constituintes do leite (BIONAZ e LOOR, 2011).

Deste modo, a compreensão da bioquímica da síntese de lipídios do leite torna-se importante bem como sua regulação e sinalização celular na glândula mamária mesmo que essas vias não sejam totalmente compreendidas pela ciência (BAYL e STEIN, 2003). Em relação aos ácidos graxos, de modo especial os poliinsaturados, são capazes de exercer efeitos mais evidentes na expressão gênica de algumas enzimas que estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos e lipídios (SALTER e TARLING, 2007).

Já sabido a algum tempo, a gordura produzida durante o processo de lactação, não resulta apenas de um aumento das taxas de síntese de ácidos graxos pelo tecido mamário, mas também da redução da síntese que ocorre no tecido adiposo (VERNON e FLINT, 1983). Essa mudança, é devida à grande demanda de energia para sintetizar os componentes do leite, sendo que esses processos são controlados por diversos hormônios e fatores de transcrição.

Mesmo com o conhecimento dos processos bioquímicos que permeiam a síntese de lipídios do leite (NEVILLE e WALSH, 1995), a identificação e quantificação dos genes quanto a sua funcionalidade teve início na década de 1970, com a técnica de Northern Blot, mas a popularização da quantificação da expressão dos genes foi possível quando da aplicação da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta identificação é influenciada diretamente pelos nutrientes ingeridos pelo animal, ação esta, estudada através da nutrigenômica (BIONAZ e LOOR, 2008).

Estudos recentes demonstraram que o isômero *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) é um potente inibidor da síntese de gordura sendo

estudado pelo meio científico (BAUMAN et al., 2008). Os mecanismos pelo qual o isômero do CLA *trans*-10, *cis*-12 causa redução na síntese de lipídios do leite envolve, ao menos em parte, a redução coordenada da expressão de genes que codificam fatores de transcrição e enzimas lipogênicas (BAUMGARD et al., 2002; KADEGOWDA et al., 2009), sendo esse efeito observado em ruminantes (BAUMGARD et al., 2002) e monogástricos (PARK et al., 1997; OSTROWSKA et al., 2000).

Em relação à síntese de gordura do leite, devemos considerar não só a depressão, mas também a possibilidade de elevação do teor de gordura no leite. Alguns estudos sugerem que, agonistas do PPAR $\gamma$  podem aumentar a expressão gênica de genes correlacionados à síntese lipídica, via estimulação de fatores de transcrição, podendo ser deste modo um importante regulador desse processo (STRAUS e GLASS 2007).

Pesquisas com esses agonistas em animais em lactação em conjunto as técnicas de análise molecular envolvendo a expressão gênica, podem promover um avanço no conhecimento dos mecanismos relacionados à regulação nutricional da lipogênese mamária em ruminantes. Uma das ferramentas utilizadas é o cultivo de explantes de glândula mamária lactante, que 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, Urio (2016) realizou a avaliação da integridade do DNA através do “Teste do Cometa”, para verificar a viabilidade de explantes mamários de ovelhas lactantes cultivados *in vitro*, por 3 e 24h, e mostrou que não houve fragmentação do DNA em ambos tempos, concluindo que explantes da glândula mamária lactante por até 24h podem ser utilizados para estudos moleculares avaliando a expressão gênica.

Dessa maneira, o presente trabalho visou avaliar os efeitos de um agonista sintético dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ), do ácido linoleico conjugado (CLA) e de ambos na expressão dos genes e fatores de transcrição lipogênicos, acetil-CoA carboxilase alfa (ACCa), ácido graxo sintase (FASN), estearyl-CoA dessaturase (SCD), proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP1), proteína de clivagem-ativação da SREBP1 (SCAP), gene-1 induzido pela insulina (INSIG1), gene-2 induzido pela insulina (INSIG2) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ), através de

cultivos de explantes mamários de ovelhas lactantes tratados com o ácido linoleico conjugado (CLA) e com a Tiazolinediona (TZD).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SÍNTESE E METABOLISMO LIPÍDICO

A síntese de gordura do leite necessita de uma coordenada ação enzimática envolvendo a captação da circulação e a síntese *de novo* de ácidos graxos, transporte e ativação intracelular, dessaturação, esterificação, síntese, transporte e secreção da gotícula lipídica pela célula epitelial mamária.

Em ruminantes, os AG secretados no leite são oriundos de duas fontes, que em situações de balanço energético positivo são igualmente importantes, primeiramente ácidos graxos provenientes da síntese *de novo*, formados nas células do epitélio mamário, e ácidos graxos pré-formados oriundos da dieta e captados da circulação sanguínea. Na síntese *de novo* a ACC $\alpha$  forma malonil-CoA a partir do Acetil-CoA e a FASN catalisa uma sequência de reações que adicionam dois carbonos a uma cadeia até a formação do C16:0. Da circulação sanguínea temos a disponibilização de ácidos graxos provenientes da mobilização de reservas corporais ou da absorção da dieta. Esses ácidos graxos serão esterificados no glicerol formando triglycerídios que é a principal forma em que a gordura se apresenta no leite.

Todos os processos que envolvem desde a síntese de ácidos graxos até a formação do triglycerídio na glândula mamária, envolvem os genes ACC, FASN, SCD, PPAR $\gamma$ , SREBP1, SCAP, INSIG1 e INSIG2 nas diferentes vias metabólicas que serão abordados na sequência.

### 2.2 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR $\gamma$ )

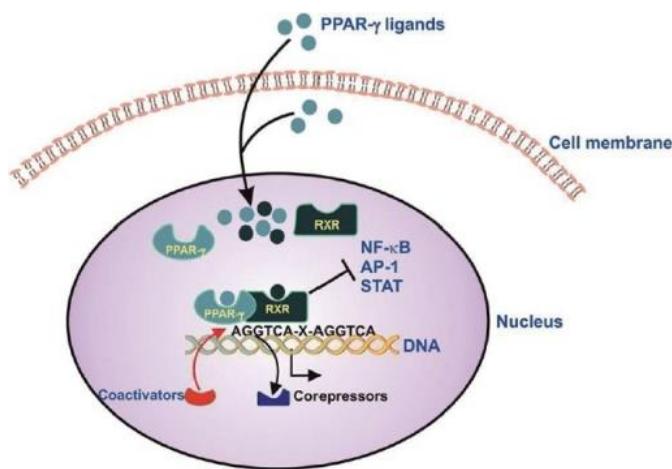
#### 2.2.1 Identificação e isoformas

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs) são parte da família dos fatores de transcrição induzíveis por ligantes, e que pertencem à superfamília de receptores nucleares tireoidianos, esteroidais e retinoicos (DESVERGNE e WAHLI 1999; STRAUS e GLASS, 2001). Esses receptores nucleares ligam-se diretamente ao DNA e regulam a expressão gênica de seus

genes alvos através de co-ativação transcrecional (BERGER e MOLLER 2002; CASTRILLO e TONTONOZ 2004).

A família dos PPARs é constituída por três isoformas, sendo elas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , as quais são estruturalmente homólogas (BISHOP-BAILEY 2000; BUCHAN e HASSALL 2000; STRAUS e GLASS, 2001) e são ativadas por compostos/ligantes lipofílicos, formando heterodímeros com o receptor do ácido retinoico (RXR) no citoplasma (VAN NEERVEN e MEY 2007). Após a heterodimerização no citoplasma, há uma migração para o núcleo, onde se encontra o DNA, então o heterodímero PPAR-RXR liga-se à sequência específica de DNA, que possuem elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomo (PPRE) na região promotora de genes alvo para o PPAR (GREEN, et al., 2011) (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração esquemática da regulação de genes mediada por PPAR $\gamma$ .



Fonte: GREEN, et al., 2011.

Lipídios dietéticos e seus metabólitos, ácidos graxos e eicosanoides são os ligantes naturais dos PPARs. Entretanto, também são ativados por ligantes sintéticos, tais como as glitazonas (PPAR $\gamma$ ) e fibratos (PPAR $\alpha$ ) (DESVERGNE e WAHLI 1999; STRAUS e GLASS 2007). Em não-ruminantes, os principais ligantes endógenos são o ácido linoleico, ácido linolênico, ácido araquidônico e seus derivados (FORMAN et al., 1996). Os três compostos pertencentes ao grupo de agonistas sintéticos, TZD's, são a pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona, as quais são potentes e altamente seletivos para o PPAR $\gamma$ , (MAYERSON et al., 2002; BAYS et al., 2004).

O PPAR $\alpha$  é predominantemente expresso no cérebro humano (KAO et al., 2012), fígado, coração, rim, mucosa intestinal, e tecido adiposo marrom em ratos e camundongos (BECK et al., 1992; BRAISSANT et al., 1996), e regula o metabolismo dos lipídios e apolipoproteínas em seres humanos (CHUNG et al., 2009). A expressão do PPAR $\beta/\delta$  é abundante no cérebro, intestino, músculo esquelético, baço, macrófagos, fígado e adrenal em camundongos (TONTONOZ et al., 1994).

Já o PPAR $\gamma$  é expresso em diversas estruturas do sistema nervoso central (SNC) (CULLINGFORD et al., 1998; MORENO et al., 2004), tecido adiposo, músculo esquelético e fígado (SUGII et al., 2009). Este subtipo de PPAR é dividido em 2 isoformas: PPAR $\gamma$ 1, expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço e, PPAR $\gamma$ 2 sendo expresso no tecido adiposo (FAJAS et al., 1997). O PPAR $\gamma$  está envolvido na regulação da diferenciação dos adipócitos (adipogênese), metabolismo da glicose, sensibilidade à insulina e no crescimento celular e é ativado por ligantes naturais, bem como ligantes sintéticos como as glitazonas.

## **2.2.2 Efeitos biológicos do PPAR $\gamma$**

### *2.2.2.1 Em não ruminantes*

O PPAR $\gamma$  tem sido identificado nos mais diversos animais não ruminantes e no homem, com principal foco de estudos em seres humanos, camundongos e ratos, atuando como um dos reguladores do metabolismo lipídico. O PPAR $\gamma$  funciona como um fator de transcrição ligador/ativador ao se ligar a pequenas moléculas lipofílicas, e promove o armazenamento lipídico no tecido adiposo, onde regula a diferenciação dos adipócitos (MORAS e GRONEMEYER, 1998; LEHRKE e LAZAR, 2005; TONTONOZ e SPIEGELMAN, 2008), síntese de ácidos graxos através do controle da expressão de enzimas lipogênicas tais como ACC $\alpha$  e FASN, e a dessaturação pela ação da SCD (WAY et al., 2001; RISERUS et al., 2005), a esterificação de ácidos graxos nos triglicerídeos, através da regulação direta da glicerol quinase de adipócitos, e controla também a expressão das proteínas da família de pirilipinas, que estão envolvidas na organização estrutural das gotículas lipídicas (GUAN et al., 2002; DALEN et al., 2004). Outro papel importante do PPAR $\gamma$  é atuar como regulador da sensibilidade a insulina, entretanto os mecanismos

envolvidos nesse processo ainda não são totalmente conhecidos (DESVERGNE et al., 2004; EVANS et al., 2004).

#### 2.2.2.2 *Em ruminantes*

Em ruminantes o PPAR $\gamma$  desempenha também um papel fundamental na adipogênese, de modo bastante acentuado em ovinos e bovinos (SORET et al., 1999; GARCÍA-ROJAS 2010) e, em vacas leiteiras sua expressão é alta no tecido adiposo e parece controlar a lipogênese respondendo ao nível de energia na dieta (SCHOENBERG e OVERTON, 2011; Ji et al., 2012).

Apesar de possuir maior expressão no tecido adiposo de ruminantes, o metabolismo lipídico na glândula mamária parece ser controlado, ao menos em parte, pelo PPAR $\gamma$ , uma vez que em vacas, se observou aumento na sua expressão entre a prenhez e lactação (BIONAZ et al., 2013; BIONAZ e LOOR, 2008).

Kadegowda et al. (2009) encontraram aumento da expressão do PPAR $\gamma$  em cultivos de uma linhagem de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) com o uso do agonista sintético rosiglitazona e aumentos da expressão de fatores de transcrição e genes potencialmente regulados pelo PPAR $\gamma$  e envolvidos na síntese de ácidos graxos e triglicerídos (ACACA, FASN, LIPIN1, AGPAT6, DGAT1, SREBF1, SREBF2 e INSIG1). Deste modo, pode-se sugerir que via PPAR $\gamma$  e seus genes alvos pode representar um ponto de controle da síntese de gordura no leite desses animais.

#### 2.2.3 Resposta do PPAR $\gamma$ a agonistas naturais e sintéticos

O PPAR $\gamma$  possui a capacidade de promover ou suprimir a transcrição de genes dependendo da sua interação com o ligante, o qual irá alterar e estabilizar a conformação do receptor junto ao DNA (XU et al., 1999). No caso da ligação de agonistas, ocorre um reposicionamento do receptor, formando o sítio de ligação à co-ativadores, acarretando assim a montagem de um complexo multiproteico de fatores co-regulatórios que ativam a transcrição de genes alvos (ZOETE et al., 2007; GLASS, 2006).

A diversidade de funções nas quais o PPAR $\gamma$  está envolvido é refletida pela diversidade de ligantes que podem ligar-se a ele. Os PPARs são ativados por uma

grande quantidade de lipídios derivados da dieta ou provenientes dos processos de sinalização intracelular, o que inclui ácidos graxos insaturados, saturados (em ruminantes), e derivados como prostaglandinas e leucotrienos, ou pode ser alterado pela ação do TZD, modificando desta forma a resposta metabólica (KREY et al., 1997; BERGER e MOLLER, 2002).

Ligantes naturais do PPAR $\gamma$ , tais como cannabinóides, flavonóides, ácidos graxos poliinsaturados *cis* ou prostaglandinas, têm, relativamente, uma menor afinidade de ligação comparada aos ligantes sintéticos (KENNEDY et al., 2008). Em contraste, certos ácidos graxos *trans*, como o CLA *trans-10, cis-12*, possuem a capacidade de reduzir a produção de gordura. No caso do *trans-10, cis-12*, possivelmente reduz a expressão do PPAR $\gamma$  e vários de seus genes alvos (BROWN et al., 2004; KANG et al., 2003; GRANLUND et al., 2003).

### 2.3 EFEITOS DO CLA SOBRE O PPAR $\gamma$

Em não ruminantes os isômeros do CLA atuam como ligantes para o PPAR $\gamma$ , de modo mais acentuado o isômero *trans-10, cis-12*, esta afirmação foi confirmada quando da administração do mesmo via oral para ratos, camundongos, hamsters, seres humanos e suínos (XU et al., 1999 e MERSMANN et al., 2002), com consequente capacidade de induzir sua expressão (KAHN e VANDEN, 2003), ou reprimir genes envolvidos na diferenciação de células epiteliais, homeostase lipídica e imunoregulação em camundongos (BASSAGANYA–RIERA et al., 2004 e KANG et al., 2003).

É sabido que o ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12* causa a deslipidação dos adipócitos humanos, resistência à insulina (GRANLUND et al., 2003) e inflamação, em parte atenuando a expressão dos genes alvos do PPAR $\gamma$ . Estudos mostraram que o CLA *trans-10, cis-12*, mas não o CLA *cis-9, trans-11*, suprimiu o potencial de ativação produzido pelo ligante a um elemento de resposta do proliferador de peroxissomo (SHIRAKI et al., 2006 e BROWN et al., 2004).

Ao contrário do que se tem observado em não-ruminantes, em que o CLA *trans-10, cis-12* estimula o PPAR $\gamma$ , aumentando sua expressão, em ruminantes este parece não ser ativado pelo mesmo, especialmente nas células epiteliais mamárias de bovinos, mas sim causando uma depressão na síntese lipídica na glândula mamária bovina (BAUMAN et al., 2008). Em paralelo, a expressão do PPAR $\gamma$  e de

seus genes alvo, em ruminantes, são reduzidos pelo CLA *trans-10, cis-12* e não pelo isômero CLA *cis-9, trans-11*.

Existem algumas divergências em relação ao papel do PPAR $\gamma$  na regulação da síntese de gordura no leite, e sua associação aos mecanismos pelos quais o CLA causa a depressão da gordura do leite (BAUMAN et al., 2008). Todavia, em tecidos extra mamários onde a família dos fatores de transcrição do PPAR são altamente expressos e são reguladores chave da diferenciação de tecidos específicos, eles podem ser importantes nas respostas funcionais provocadas pelo CLA *trans-10, cis-12*, o qual previne, em camundongos, o desenvolvimento da obesidade *in vivo* e o acúmulo de triglicerídeos em adipócitos *in vitro* (PARK et al., 1999).

Uma possível forma pelo qual o CLA *trans-10, cis-12* afeta diretamente o PPAR $\gamma$  seria pela competição com ligantes endógenos ou diminuição da síntese destes ligantes (BROWN et al., 2003). Kennedy et al. (2008) propuseram ainda que o CLA *trans-10, cis-12* pode suprimir a atividade do PPAR $\gamma$  pela sua fosforilação via uma proteína quinase reguladora de sinal extracelular (ADAMS et al., 1997 e BROWN et al., 2004), reduzindo a afinidade aos ligantes e/ou o recrutamento de cofatores (CHUNG et al., 2005), inibindo a heterodimerização com o RXR alterando a ligação do PPRE aos genes alvos (NIE et al., 2005). Porém, a ação do CLA *trans-10, cis-12*, bem como do CLA *cis-9, trans-11*, como ligante do PPAR $\gamma$  ainda não é totalmente esclarecida (HERRMANN et al., 2009).

## 2.4 ESTUDOS REALIZADOS COM PPAR $\gamma$

### 2.4.1 Estudos *in vivo* com PPAR $\gamma$

Kushibiki et al., (2001) demonstraram que a injeção *in vivo* de TZD, inverteu parcialmente a resistência à insulina induzida por TNF (fator de necrose tumoral) em novilhos leiteiros. O fenômeno foi explicado pela ativação do PPAR $\gamma$  no tecido adiposo, onde o TZD restaura a ação da insulina diminuindo a concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e aumentando a sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos.

Segundo Lehrke e Lazar (2005), na ausência de um agonista ou outro potencial ligante sintético, o PPAR $\gamma$  recruta co-repressores para seus genes alvos. Deste modo, camundongos que tiveram o gene do PPAR $\gamma$  nocauteado, tiveram seus

fenótipos normalizados pelo tratamento com o agonista tiazolinediona, aumentando a ação do PPAR $\gamma$ , compensando sua expressão gênica, sendo equivalente aos camundongos que não tiveram o PPAR $\gamma$  no cauteleado (KUBOTA et al., 1999 e MILES et al., 2000).

#### **2.4.2 Trabalhos *in vitro* com PPAR $\gamma$**

Em 1998, um grupo japonês demonstrou que a ativação de PPAR $\gamma$  é central para a diferenciação adipogênica de células estromais vasculares de tecido adiposo bovino (OHYAMA et al., 1998), e células semelhantes a fibroblastos intramusculares (TORII et al., 1998). Já Lengi e Corl (2010) realizaram cultivo de células estromal-vasculares bovinas por um longo período com CLA, e não obtiveram efeitos sobre a expressão gênica da FABP4, PPAR $\gamma$  ou ACC $\alpha$ . Entretanto, houve uma redução na SCD1 em comparação com as células cultivadas com ácido linoleico e o tratamento controle.

Em um experimento com cultivos de células epiteliais mamárias e renais de bovinos (MAC-T e MDBK, respectivamente), com o objetivo de determinar os genes alvo do PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , BIONAZ et al. (2013) demonstraram que em ruminantes os ácidos graxos saturados de cadeia longa, palmitato e estearato, induziram a expressão de genes comprovadamente alvos do PPAR $\gamma$  (CD36, FABP4, LPL, ACC $\alpha$ , FASN, INSIG1, SREBP1, CPT2, CRAT, AGPAT6, DGAT1, LPIN1, SREBP2, LEP, PTGS2, VEGF, GAPDH, TERF2) e tiveram maior ação que os insaturados. Isto sugere uma adaptação evolucionária do PPAR $\gamma$  nos ruminantes em resposta aos ácidos graxos saturados, os quais são mais abundantes na circulação de ruminantes comparados aos não-ruminantes, devido a extensa biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados da dieta (ZACHUT et al., 2010; OR-RASHID et al., 2009; PELTIER et al., 2008).



### 3 HIPÓTESE

A hipótese é que haja um aumento na expressão gênica do PPAR $\gamma$  e de seus genes alvo nos explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes cultivados *in vitro* utilizando o agonista sintético (TZD) e que este supere os efeitos inibitórios do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a expressão gênica do PPAR $\gamma$  e dos seus genes alvo quando utilizados conjuntamente.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de um agonista químico específico do PPAR $\gamma$  e se este agonista (TZD) altera a expressão do PPAR $\gamma$  e de genes envolvidos na síntese lipídica em explantes de glândula mamária cultivados *in vitro*.

### 4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar as alterações na expressão gênica do PPAR $\gamma$ , ACC $\alpha$ , FASN, SCD, SREBP1, SCAP, INSIG1 e INSIG2, sujeitos ao agonista sintético, ao CLA e ambos.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 PROCEDIMENTOS COM OS ANIMAIS E LOCAL

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado de Santa Catarina, protocolado sob o CETEA nº 7267270216 e realizados na Fazenda Pinheiro Seco, Bom Retiro, SC ( $27^{\circ}47'57.11''S$  e  $49^{\circ}29'14.65''W$ ). Foram utilizadas duas ovelhas lactantes da raça Lacaune para a realização da biópsia do tecido mamário, com escore corporal 3 conforme Osório & Osório (2003), com 70 dias de lactação, peso corporal de aproximadamente 60kg e com produção média diária de leite de 1,2 kg. Todos os animais foram mantidos em baias cobertas e receberam, em matéria seca, 1,2 kg silagem de milho e 0,9 kg de concentrado, composto por 56 % de milho, 39% de farelo de soja e 5% de premix mineral/vitamínico, de acordo para suprir as exigências nutricionais conforme descrito no NRC (2007).

### 5.2 BIÓPSIAS DE TECIDO MAMÁRIO

Para a biópsia foi realizada anestesia local com aplicação de cloridrato de lidocaína subdérmica (3 mL) acima do local da incisão. A incisão foi feita na pele no ponto médio da metade direita do úbere, utilizando a agulha co-axial (Hospifer, Porto Alegre, RS, Brasil) e posteriormente foi utilizada a agulha Bard Max-Core Disposable Core Biopsy Instrument (Bard Biopsy Systems, Covington, GA, USA), sendo aplicado antiflamatório (2 mL, Flucortan - Zoetis) imediatamente ao término da biópsia. As amostras de tecido foram colocadas em tubo contendo meio de cultivo, em caixa com gelo e transportadas imediatamente para o Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) da Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV.

### 5.3 CULTIVO DOS EXPLANTES

O cultivo dos explantes mamários foi realizado em placas de seis poços (Nunclon - Nunc, Roskilde, Denmark) em incubadora a  $37^{\circ}C$ , 5% de CO<sub>2</sub> no ar e atmosfera com umidade saturada. Os explantes foram cultivados em sextuplicatas

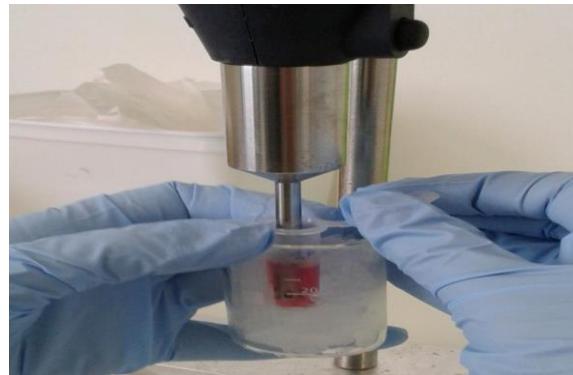
por 24h utilizando os seguintes tratamentos 1) Controle: 400µl de meio de crescimento de célula epitelial mamária (MEGM, Lonza Walkersville, MD, USA) suplementado com seguintes reagentes: extrato de pituitária, insulina, eGF, hidrocortisona, gentamicina e anfotericina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, SP); 2) TZD (40µL, 10 µMol, Troglitazone, SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA); 3) CLA (30µL da mistura de 50% de CLA *trans*-10, *cis*-12 e 50% de CLA *cis*-9, *trans*-11, 315 µMol) e; 4) TZD + CLA (40µL TZD + 30µL CLA - da mistura do CLA).

#### 5.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) E PCR QUANTITATIVO REAL TIME (RT-qPCR).

A extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) foram feitas no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) e o PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV), da Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV.

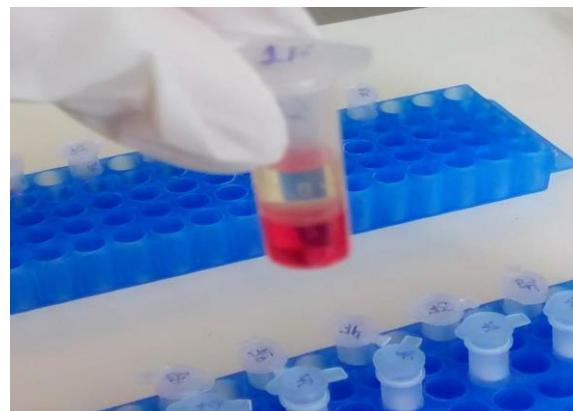
Após 24h de cultivo dos explantes de glândula mamária foi extraído o RNA total com a utilização do Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) e a possível contaminação por DNA foi removida por tratamento com DNase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MI, USA) (Figuras 2, 3 e 4). A pureza do RNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro (ND-2000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) (Figura 5), e a qualidade avaliada considerando-se como adequada quando a razão de absorbância 260/280nm obteve o valor de referência igual a 2,0 ( $\pm 0,1$ ). Posteriormente realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) com “random primers” (Figura 6 e 7).

Figura 2 - Amostras de tecido glandular mamário mantidas no gelo durante a homogeneização com a probe.



Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

Figura 3 - Separação do RNA após centrifugação.



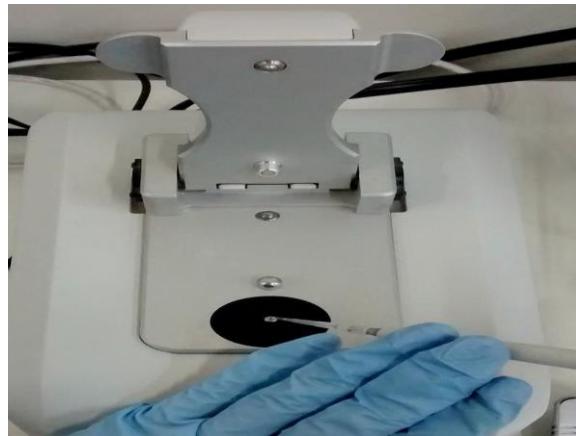
Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

Figura 4 - Kit comercial para extração do RNA.



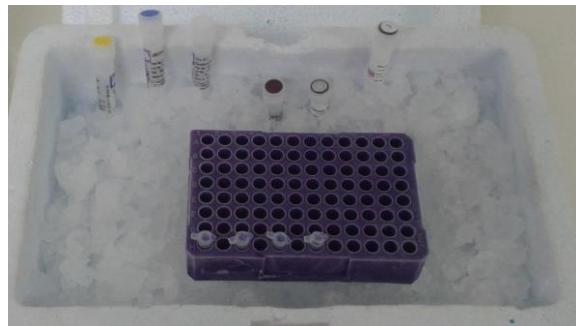
Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

Figura 5 - Quantificação da concentração de RNA (Aparelho NanoDrop).



Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

Figura 6 - Amostras e componentes do kit comercial em resfriamento durante a análise.



Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

Figura 7 - Amostras no termociclador.



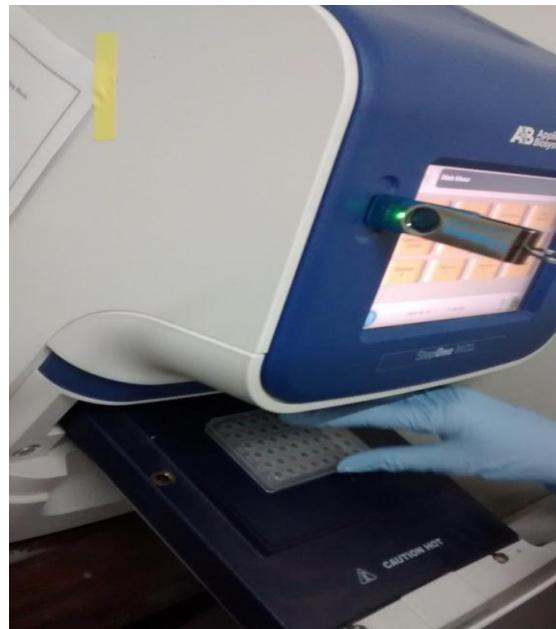
Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

A análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA,

USA) com o uso de *primers* específicos para cada gene, para visualização das curvas de amplificação e quantificação da expressão gênica da acetil-CoA-carboxilase alfa (ACCo), ácido graxo sintase (FASN), receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ), proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol 1 (SREBP1), estearoil-CoA-dessaturase (SCD), proteína de ativação de clivagem da SREBP1 (SCAP), gene-1 induzido pela insulina (INSIG1) e gene-2 induzido pela insulina (INSIG2).

A amplificação por PCR foi realizada em triplicatas em uma placa de 48 poços para reação (MicroAmp @, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) com 15  $\mu$ L de reação em volume, 30 ng de cDNA e SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) em um equipamento de PCR real time - StepOne (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA) (Figura 8).

Figura 8: Equipamento StepOne Real-Time.



Fonte: Cedida por Evelyn Drielle da Silva

## 5.5 DESENHO DOS PRIMERS

A sequência dos primers, bem como as referências dos quais foram retirados, são apresentadas 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 threshold) versus o log dos percentuais da curva padrão e o coeficiente angular dessa reta determina a eficiência da reação.

Tabela 1 - Primers ovinos utilizados nas análises de real-time PCR (5' para 3').

<b>Símbolo<sup>1</sup></b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Nº de acesso</b>
ACCa (PIII)	TTTCCTAAATTTCACGTTCC	AGGCTCCAGGTGACGATACA	Ticiani et al. 2016
FASN	TGGTGACAGATGATGACAGG	GAAGAAGGAAGCGTCAAACC	Ticiani et al. 2016
PPAR $\gamma$	AAGAGCCTCCAACCTCCCTCA	CCGGAAGAACCCCTTGCAT	Hussein et al. 2013
SREBP1	CCAGCTGACAGCTCCATTGA	TGCCGCCACAAGGA	Hussein et al. 2013
SCAP	CCATGTGCACTTCAAGGAGGA	ATGTCGATTTGCGTGTGGAG	Hussein et al. 2013
SCD	CATCAACCCCCGAGAGATA	GGTGTGGTGGTAGTTGTGGA	Ticiani et al. 2016
INSIG1	GTCATGCCACCATCTTCTC	GAAGTGTGATGCAGGGTA	Hussein et al. 2013
INSIG2	TCCAGTGTGATGCGGTGTGA	TGGATAGTGCAGCCAGTGTGA	Hussein et al. 2013
S18	GATCCATTGGAGGGCAAGTCT	GCAGCAATTAAATACGCTATTGG	Ticiani et al. 2016
BACT	GCCCTGAGGCTCTCTCCA	CGGATGTCGACCGTCACATT	Ticiani et al. 2016

<sup>1</sup>ACCa (PIII) = acetil CoA carboxilase alfa promotor III; FASN = ácido graxo sintase; PPAR $\gamma$  = proliferador de peroxissomo gama; SREBP1 = proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1; SCAP = proteína de ativação de clivagem da SREBP1; SCD = estearoil-CoA-dessaturase; INSIG1 = gene-1 induzido pela insulina; INSIG2 = gene-2 induzido pela insulina; S18 = proteína ribossomal s18; BACT = beta actina.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

## 5.6 CÁLCULOS DE AJUSTE

Foram realizados cálculos para o ajuste das expressões gênica em função do peso dos explantes, onde o valor da expressão do gene (A) foi dividido pela concentração do tratamento (B), resultando na equação (C):

$$\frac{A}{B} = C$$

O resultado desta ultima equação nos gerou um fator de correção para cada amostra, de cada gene, em função do peso da amostra. Por fim este fator de correção foi multiplicado pelo valor da expressão encontrado originalmente para cada gene:

$$\text{Fator de correção} = C \cdot A$$

Gerando deste modo um valor da expressão de cada amostra, de cada gene, corrigido pelo peso do explante e concentração do tratamento, retirando deste modo possíveis desvios provenientes dos diferentes pesos das amostras.

## 5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA, versão 9.2, 2009), sendo considerados como efeitos fixos os tratamentos e as amostras. As médias foram comparadas através da opção PDIFF do comando LSMEANS e o efeito foi declarado significativo quando  $P < 0,05$ . Foi utilizada como covariável a média geométrica dos genes *housekeeping* proteína ribossomal S18 (S18) e beta-actina (BACT) 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  $\pm 2,5$  foram consideradas “outliers” e excluídas da análise. Os dados foram transformados para log 2 quando necessário e reportados após a transformação anti-log 2.



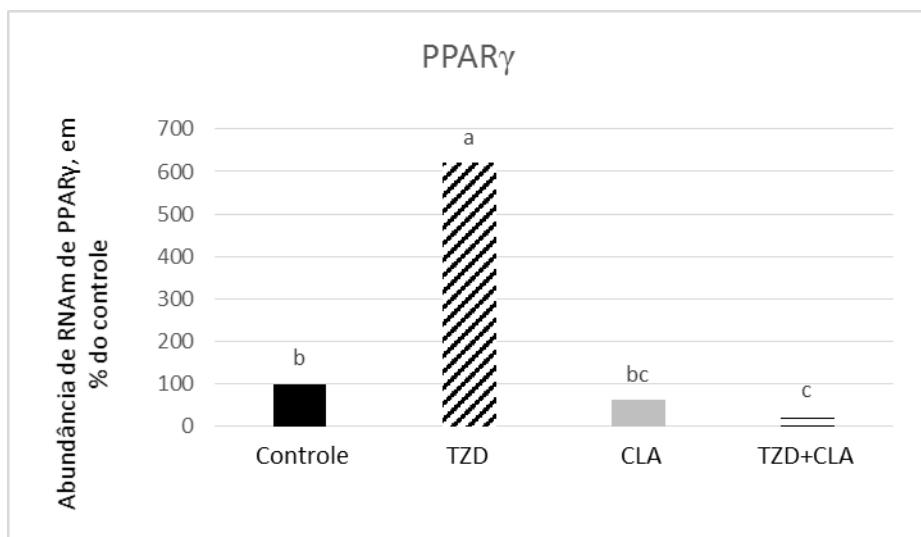
## 6 RESULTADOS

### 6.1 EXPRESSÃO DE GENES LIPOGÊNICOS NA GLÂNDULA MAMÁRIA

#### 6.1.1 Gene PPAR $\gamma$

O tratamento TZD aumentou em 621% ( $P<0,0001$ ) e o tratamento TZD+CLA reduziu em 74% ( $P<0,03$ ) a expressão do PPAR $\gamma$ . Quando da administração conjunta (TZD+CLA) o TZD não superou a capacidade de redução do CLA (Figura 9).

Figura 9 - Abundância de RNAm do gene PPAR $\gamma$  em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (TZD+CLA vs. Controle,  $P<0,03$ ; Controle vs. TZD,  $P<0,0001$ . Erro padrão médio: 0,1).

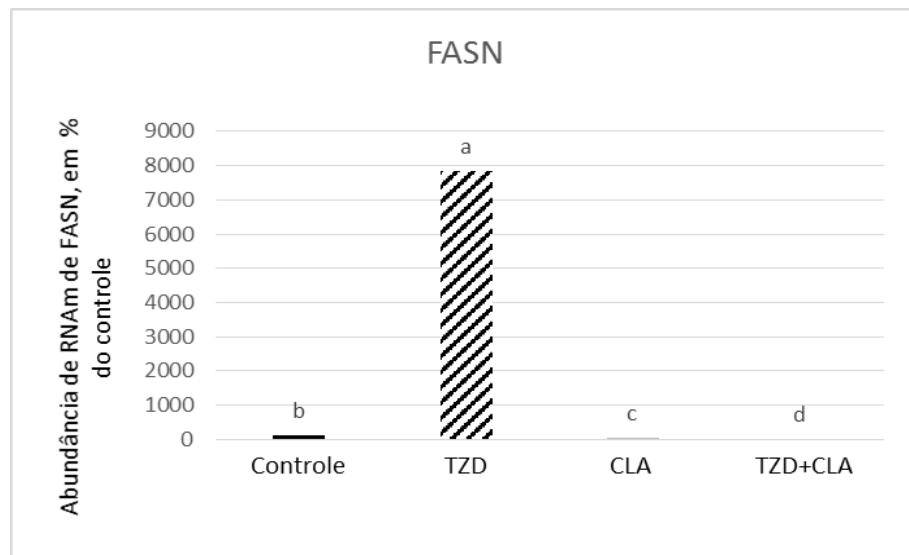


Fonte: Próprio autor, 2017

#### 6.1.2 Genes envolvidos na via da síntese de novo de ácidos graxos

O tratamento TZD aumentou a expressão gênica da FASN em 7831,4% ( $P<0,0001$ ) enquanto o CLA reduziu em 65,2% ( $P<0,04$ ). Já o tratamento TZD+CLA reduziu em 83,7% ( $P<0,0002$ ), sendo esta redução superior à do tratamento que contem apenas o CLA. Quando da administração conjunta (TZD+CLA) o TZD não superou a capacidade de redução do CLA (Figura 10).

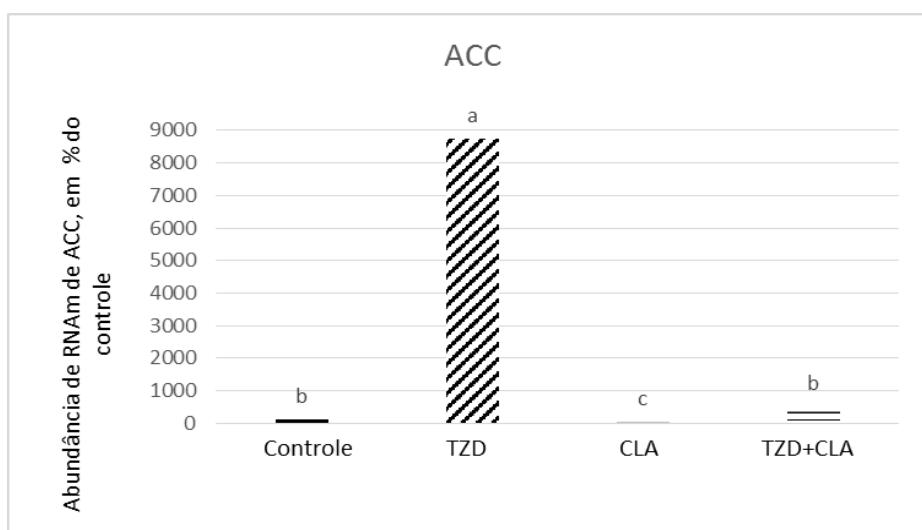
Figura 10 - Abundância de RNAm do gene FASN em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (CLA vs. Controle,  $P<0,04$ ; TZD+CLA vs. Controle,  $P<0,0002$ ; Controle vs. TZD,  $P<0,0001$ ).



Fonte: Próprio autor, 2017

O tratamento TZD aumentou a expressão da ACC $\alpha$  em 8.753,5% ( $P<0,0001$ ) enquanto que o CLA diminuiu em 61,4% ( $P<0,05$ ). Quando da administração conjunta (TZD+CLA) o TZD superou a capacidade de redução do CLA (Figura 11).

Figura 11 - Abundância de RNAm do gene ACC em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (CLA vs. Controle,  $P<0,05$ ; Controle vs. TZD,  $P<0,0001$ . Erro padrão médio: 0,2).

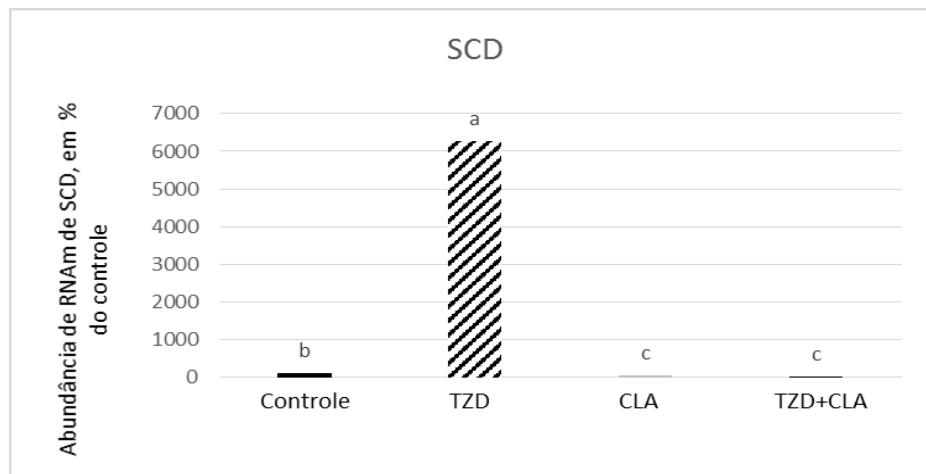


Fonte: Próprio autor, 2017

No gene SCD, o tratamento TZD aumentou 6.272,2% ( $P<0,0001$ ), já o CLA diminuiu a expressão do gene em 65,3% ( $P<0,01$ ). No tratamento TZD+CLA houve

uma redução de 83,1% ( $P<0,0002$ ), o TZD não superou a capacidade de redução do CLA (Figura 12).

Figura 12 - Abundância de RNAm do gene SCD em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (CLA vs. Controle,  $P<0,01$ ; TZD+CLA vs. Controle,  $P<0,0002$ ; Controle vs. TZD,  $P<0,0001$ . Erro padrão médio: 0)

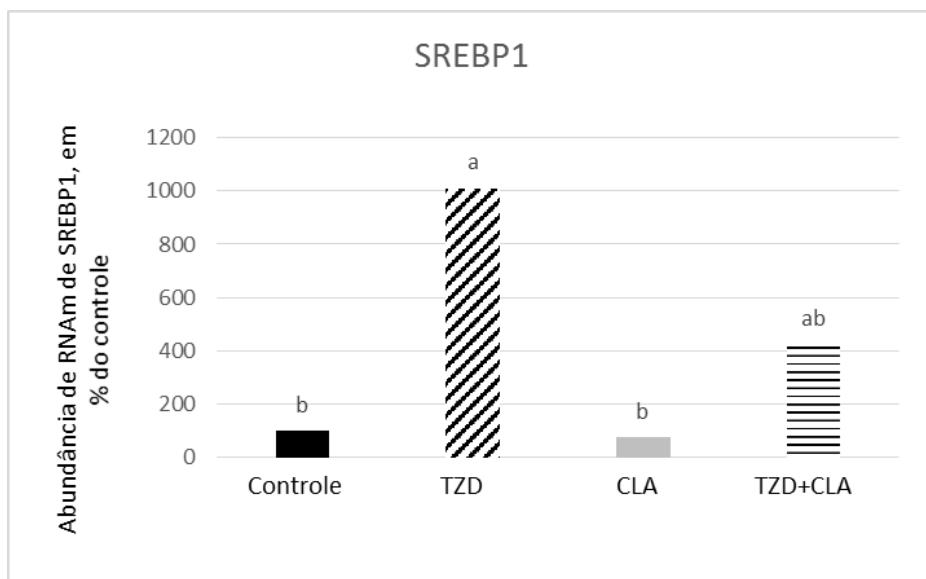


Fonte: Próprio autor, 2017

### 6.1.3 SREBP1 e genes associados

No gene SREBP1, o tratamento TZD aumentou a expressão em 1010,5% ( $P<0,0001$ ). Quando da administração conjunta (TZD+CLA), nem o TZD, nem o CLA tiveram a capacidade superar a ação um do outro (Figura 13).

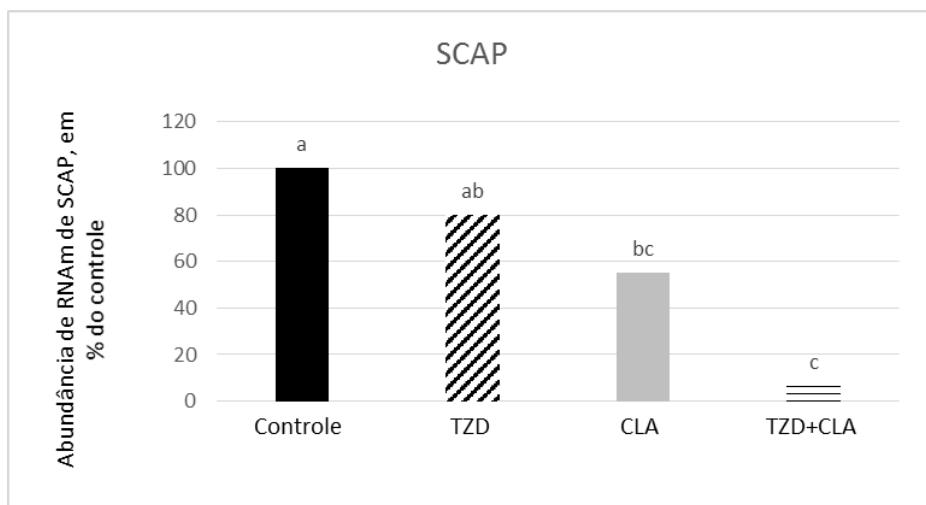
Figura 13 - Abundância de RNAm do gene SREBP1 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (Controle vs. TZD,  $p<0,0001$ . Erro padrão médio: 0,2).



Fonte: Próprio autor, 2017

No gene SCAP o tratamento TZD+CLA reduziu 93,4% ( $P<0,02$ ). Quando da administração conjunta (TZD+CLA) o TZD não superou a capacidade de redução do CLA (Figura 14).

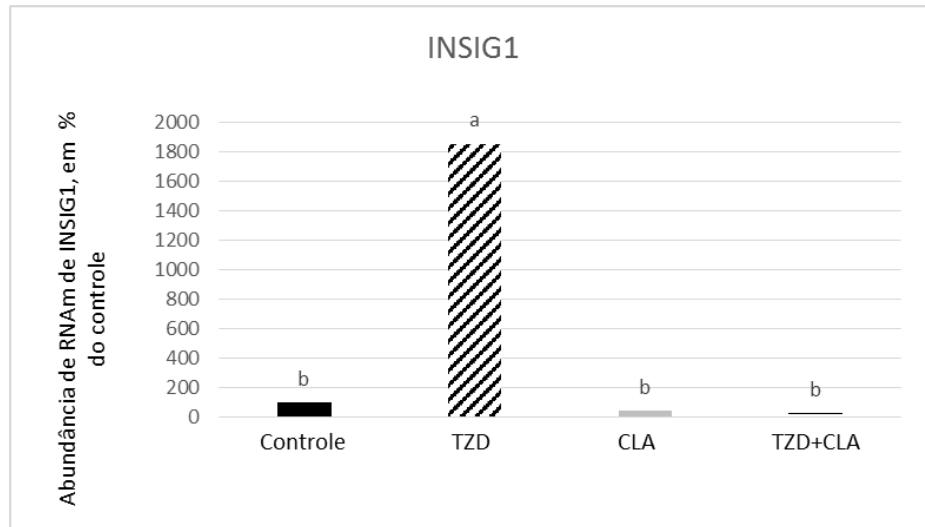
Figura 14 - Abundância de RNAm do gene SCAP em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (TZD+CLA vs. Controle,  $P<0,0277$ ; Erro padrão médio: 0,2).



Fonte: Próprio autor, 2017

No gene INSIG1 o tratamento TZD aumentou a expressão em 1.857,5% ( $P<0,0001$ ) (Figura 15).

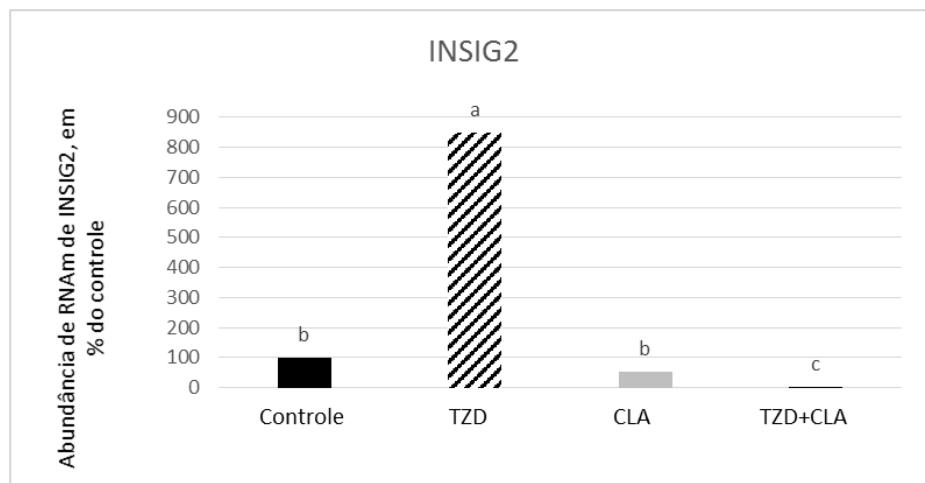
Figura 15 - Abundância de RNAm do gene INSIG1 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (Controle vs. TZD,  $P<0,0001$ . Erro padrão médio: 0,2).



Fonte: Próprio autor, 2017

No gene INSIG2 o tratamento TZD aumentou a expressão em 849,1% ( $P<0,005$ ), o tratamento TZD+CLA reduziu 96,6% ( $P<0,0001$ ), sendo a ação do CLA acentuado quando administrada em conjunto com o TZD, em relação a redução do tratamento CLA. O TZD não superou a capacidade de redução do CLA (Figura 16).

Figura 16 - Abundância de RNAm do gene INSIG2 em explantes mamários cultivados por 24h na presença de CLA, TZD ou ambos. (TZD+CLA vs. Controle,  $P<0,0001$ ; Controle vs. TZD,  $P<0,0056$ . Erro padrão médio: 0,3).



Fonte: Próprio autor, 2017.



## 7 DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, o CLA *trans*-10, *cis*-12 possui a capacidade de reduzir a expressão de alguns genes relacionados a síntese de gordura do leite na glândula mamária *in vivo*, bem como do agonista TZD em aumentar a expressão do PPAR $\gamma$ . Conforme já demonstrado por Kadegowda et al. (2009), o PPAR $\gamma$  tem como genes alvos a ACC, FASN e SCD, envolvidos na síntese *de novo*; e SREBP1, INSIG1 e INSIG2, os quais atuam na síntese de lipídeos. Contudo, a interação entre eles (CLA e TZD), e a capacidade do TZD em superar a ação de redução do CLA é de certo modo desconhecida. É sabido que a expressão gênica de enzimas lipogênicas é estimulada por uma classe de fatores de transcrição que são reguladores primários da síntese lipídica, sendo uma delas o PPAR $\gamma$ , investigado neste estudo.

Já é sabido, que o CLA é um ligante natural do PPAR $\gamma$  que induz alterações na expressão gênica e em taxas lipogênicas em não-ruminantes (BENSINGER e TONTONOZ, 2008, BERGER E MOLLER, 2002). No presente trabalho, o CLA não reduziu a expressão do PPAR $\gamma$ . Entretanto, quando administrado em conjunto com o TZD (TZD+CLA), acentuou a redução da expressão do PPAR $\gamma$  pelo CLA. Uma possível forma pelo qual o CLA afetou diretamente o PPAR $\gamma$  seria pela competição com ligantes endógenos ou diminuição da síntese destes ligantes (BROWN e MCINTOSH, 2003). Kennedy et al. (2008) propuseram ainda que o CLA *trans*-10, *cis*-12 pode suprimir a atividade do PPAR $\gamma$  pela sua fosforilação via quinase reguladora do sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), a qual reduz a afinidade aos ligantes e/ou recrutamento de cofatores, inibição da heterodimerização com o RXR e alteração na ligação do PPRE aos genes alvos, porém, a ação do CLA como ligante do PPAR $\gamma$  ainda não é totalmente esclarecida (HERRMANN et al., 2009).

Resultados compartilhados por Sandri (2015) com um estudo *in vivo*, onde o tratamento TZD aumentou a expressão do PPAR $\gamma$ , bem como no presente estudo. Para Sandri (2015) o tratamento CLA também aumentou a expressão do PPAR $\gamma$ , resultado divergente ao presente trabalho, onde o CLA não altera a expressão do PPAR $\gamma$ , divergiu também no tratamento TZD+CLA, onde este não alterou a expressão do PPAR $\gamma$ . Já no presente trabalho, o tratamento TZD+CLA reduz a expressão do PPAR $\gamma$ . O que leva a discussões mais complexas envolvendo o animal como um todo e possíveis mecanismos e rotas metabólicas.

Além do PPAR $\gamma$ , a SREBP1 é integrante de outra família de fatores de transcrição que regulam as enzimas lipogênicas e síntese de gordura do leite na glândula mamária. Neste trabalho, o aumento da expressão pelo TZD foi confirmado no gene da SREBP1, porém o CLA não reduz a expressão da SREBP1. Possivelmente devido também a não redução da expressão da SCAP, INSIG1 e INSIG2 pela ação do CLA, visto que estes três genes anteriores são essenciais para a efetiva ação da SREBP1, uma vez que o CLA não alterou suas expressões gênicas, a expressão da SREBP1 não foi reduzida pelo mesmo.

Resultado este contrário ao encontrado por Desvergne et al. (2006), onde o CLA *trans-10, cis-12* diminui consistentemente a expressão de SREBP1 e por KADEGOWDA et al. (2013), o qual observou uma redução na expressão de SREBP1 em células epiteliais mamárias bovinas tratadas com CLA *trans-10, cis-12*. O efeito do CLA *trans-10, cis-12* na SREBP1 é considerado como sendo indireto, e ao contrário de outros fatores de transcrição tais como PPAR $\gamma$ , ácidos graxos e colesterol não se ligam a SREBP1 mas sim induzem alterações na expressão deste fator de transcrição, podendo ser este também o motivador da não depressão da SREBP1 pelo tratamento CLA.

A expressão da SREBP1 é dependente da SCAP, INSIG1 e INSIG2, no tratamento TZD a INSIG1 e INSIG2 aumentou sua expressão. Já a SCAP não teve aumento com o TZD. Entretanto quando do tratamento combinado TZD+CLA, houve uma redução na expressão da SCAP, bem como da INSIG2, e sendo a SCAP e INSIG2 genes regulados pelo PPAR $\gamma$ , houve então essa redução. Se o mecanismo da regulação da SREBP1 pelas INSIG1 e INSIG2 aumentou a expressão da SREBP1, como resultado, espera-se que a expressão da ACC $\alpha$ , FASN e SCD aumente paralelamente, porque SREBP1 ativa diretamente suas expressões em tecidos lipogênicos incluindo a glândula mamária (Roder et al., 2007; Ma e Corl, 2012).

Os genes relacionados com a síntese de novo e dessaturação, FASN, ACC $\alpha$  e SCD, estes apresentaram maior expressão quando submetidas ao tratamento TZD. BARBER et al. (2003) identificaram ACC $\alpha$  PIII (promotor III) como sendo altamente importante para a síntese de gordura do leite porque sua expressão é abundante no tecido mamário durante a lactação. Coerente também aos resultados encontrados por Urió (2016), na qual o tratamento com o CLA *trans-10, cis-12*

reduziu a expressão gênica durante a síntese de gordura na glândula mamária, a ACC $\alpha$  transcrita da região promotora III (PIII), a qual é predominante em ovinos.

Do mesmo modo, a FASN teve resultados semelhantes a ACC $\alpha$ , a qual reduziu sua expressão com o tratamento CLA e aumentando no tratamento TZD, sendo estes genes, intimamente correlacionados com o grau de atividade lipogênica no tecido. Concordando com outros estudos *in vitro* onde foi utilizado 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). Apesar de existir diferença entre explantes e linhagens de células epiteliais, sendo que neste último modelo de estudo as células precisam ser induzidas pelos hormônios lactogênicos, para que se tornem funcionais para sintetizarem 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. Já com a interação de TZD+CLA houve uma redução de 83,7% na expressão da FASN, sendo a FASN um gene influenciado pelo PPAR $\gamma$ , houve uma possível redução dependente do PPAR $\gamma$ .

Em relação à expressão do gene SCD, neste trabalho o tratamento com CLA reduz a expressão do gene SCD, concordando com KADEGOWDA et al (2009), onde o tratamento CLA *trans*-10, *cis*-12 reduziu a expressão de SCD em células MAC-T. A inclusão do CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta tem demonstrado inibir a atividade e a expressão gênica da SCD tanto em estudos com cultivo celular de adipócitos de roedores (CHOI et al., 2000), como da glândula mamária de bovinos (BAUMGARD et al., 2002). Contrariamente, o agonista de PPAR $\gamma$ , o TZD, aumentou expressão SCD, confirmando que SCD é um gene alvo de PPAR $\gamma$ . Já no tratamento TZD+CLA houve uma diminuição de 83,1%, e sendo a SCD um gene influenciado pelo PPAR $\gamma$ , houve uma possível redução dependente do PPAR $\gamma$ .



## 8 CONCLUSÃO

O TZD aumenta a expressão do PPAR $\gamma$  e de seus genes alvo em explantes de tecido mamário de ovelhas lactantes cultivados por 24h. O CLA reduz a expressão gênica da FASN, ACC $\alpha$ , SCD e SCAP. Quando da administração conjunta (TZD+CLA) o TZD não superou a capacidade de redução do CLA nos genes PPAR $\gamma$ , FASN, SCD, SCAP, INSIG1 e INSIG2.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. et al. Transcriptional activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.5128–32, 1997.
- BARBER, T. et al. Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  gene in mammary gland is associated with recruitment of SREBP-1 to a region of the proximal promoter defined by a DNase I hypersensitive site. **Biochemistry Journal**, v.375, p.489-501, 2003.
- BASSAGANYA–RIERA, J. et al. Activation of PPAR $\gamma$  and  $\delta$  by Conjugated Linoleic Acid Mediates Protection From Experimental Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.127, p.777–791, 2004.
- 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.
- BAUMGARD, L. H. et al. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1285-1293, 2002.
- BAYS, H. L.; MANDARINO, and R. A.; DEFRONZO. Role of the adipocyte , free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonist provide a rational therapeutic approach. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.2, p.463-78, 2004.
- BAYS, H.; STEIN, E. A. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.4, n.11, p.1901-38, 2003. ISSN 1465-6566.
- BECK, F. et al. The ontogeny of peroxisome-proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.247, p.83-87, 1992.
- BENSINGER, S. J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors, **Nature**, v.454, p.470–477, 2008.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs, **Annual Review of Medicine**, v.53, p.409–435, 2002.
- BIONAZ, M. et al. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation, **PPAR Research**, 2013.
- BIONAZ, M. Nutrigenomics Approaches to Fine-Tune Metabolism and Milk Production: Is This the Future of Ruminant Nutrition. **Advances in Dairy Research**, v.2, 2014.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle, **Bioinformatics and Biology Insights**, v.5, p.83-98, 2011.  
BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle, **BMC Genomics**, v.9, p.366, 2008.

BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.823-834, 2000.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v.137, p.354-366, 1996.

BROWN, J. M. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines, **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.26735–26747, 2004.

BROWN, J. M. et al. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  signaling by CLA in human preadipocytes, **Journal of Lipid Research**, v.44, p.1287-1300, 2003.

BUCHAN, K.W.; HASSALL, D.G. PPAR agonists as direct modulators of the vessel wall in cardiovascular disease. **Medicinal Research Reviews**, v.20, p.350-366, 2000.

CASTRILLO, A.; TONTONOZ, P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.20, p.455-480, 2004.

CHOI, Y. et al. The *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1920-1924, 2000.

CHUNG, S. et al. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NF $\kappa$ B-dependent cytokine production. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.38445–56, 2005.

CHUNG, S.S. et al. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.29, p.20-30, 2009.

CULLINGFORD, T.E. et al. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.70, p.1366-1375, 1998.

DALEN, K. T. et al. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, **Diabetes**, v.53, p.1243–1252, 2004.

DESVERGNE, B. et al. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road, **Molecular Endocrinology**, v.18, p.1321–1332, 2004.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L. and WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological Reviews**, v.86, n.2, p.465–514, 2006.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, **Endocrine Reviews**, v.20, p.649–688, 1999.

ESCHER, P.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions, **Mutation Research**, v.448, p.121–138, 2000.

EVANS, R. M. et al. PPARs and the complex journey to obesity, **Nature Medicine**, v.10, p.355–361, 2004.

FAJAS, L.; AUBOEUF, D.; RASPE, E. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.18779–89, 1997.

FORMAN, B. M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.804, p.266–275, 1996.

FROMENT, P.; et al. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in ovarian folliculogenesis in the sheep. **Biology of Reproduction**, v.69, n.5, p.1665–1674, 2003.

GAO, Y.; et al. Bovine mammary gene expression profiling during the onset of lactation. **PloS One**, v.8, e70393, 2013.

GARCÍA-ROJAS, P.; ANTARAMIAN, A.; GONZÁLEZ-DÁVALOS, L.; et al. Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor  $\gamma$  and peroxisomal proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue. **Journal of Animal Science**, v.88, n.5, p.1801–1808, 2010.

GLASS, C. K. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.3, p.556–60, 2006. ISSN 0021-9738.

GRANLUND, L. et al. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR $\gamma$  modulator, **Journal of Lipid Research**, v.44, p.1441–1452, 2003.

GREEN, D. E.; SUTLIFF, R. L.; HART, C. M. Is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) a therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension? **Pulmonary Circulation**, v.1, n.1, p.33–47, 2011.

GUAN, H. P. et al. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents, **Nature Medicine**, v.8, p.1122–1128, 2002.

HERRMANN, J. et al. Isomer-specific effects of CLA on gene expression in human adipose tissue depending on PPAR $\gamma$ 2 P12A polymorphism: a double blind, randomized, controlled cross-over study, **Lipid in Health and Disease**, v.8, p.1-12, 2009.

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

JI, P.; OSORIO, J. S.; DRACKLEY, J. K.; LOOR, J. J. Overfeeding a moderate energy diet prepartum does not impair bovine subcutaneous adipose tissue insulin signal transduction and induces marked changes in peripartal gene network expression. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.4333–4351, 2012.

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

KADEGOWDA, A. K. G. et al. *Trans*-10, *cis*-12 Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression is associated with inhibition of PPAR $\gamma$  signaling and inflammation in murine mammary tissue. **Journal of Lipids**, 2013.

KAHN, S.; VANDEN HEUVEL, J. P. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. **Journal Of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.554–67, 2003.

KANG, K. et al. *Trans*-10, *cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.795–9, 2003.

KANG, K. et al. *Trans*-10, *cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.795–799, 2003.

KAO, C.H.; HSIANG, C.Y.; HO, T.Y. Assessment of chitosan-affected metabolic response by peroxisome proliferator-activated receptor bioluminescent imaging-guided transcriptomic analysis. **PLoS One**, v.7, p.1-10, 2012.

KENNEDY, A. et al. *Trans*-10, *cis*-12 Conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPAR $\gamma$  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 - Animal**, v.133, p.206-211, 1997.

KREY, G. et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferatoractivated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay, **Molecular Endocrinology**, v.11, p.779–791, 1997.

KUBOTA, N. et al. PPARgamma mediates high-fat dietinduced adipocyte hypertrophy and insulin resistance, **Molecular Cell**, v.4, p.597–609, 1999.

KUSHIBIKI, S. et al. Insulin resistance induced in dairy steers by tumor necrosis factor alpha is partially reversed by 2,4-thiazolidinedione. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, n.1, p.25–37, 2001.

LEE, S.H.; HOSSNER, K.L. Coordinate regulation of ovine adipose tissue gene expression by propionate. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2840-2849, 2002.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPAR  $\gamma$ . **Cell**, v.123, n.6, p.993–999, 2005.

LENGI, A.J. and CORL, B.A. Factors influencing the differentiation of bovine preadipocytes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1999-2008, 2010.

LÖHRKE, B.; et al. Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in lutein cells. **Journal of Endocrinology**, v.159, n.3, p.429–439, 1998.

MA, L and 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, n.7, p.3743–3755, 2012.

MAYERSON, A. B; HUNDAL, R. S.; DUFOUR, S.; LEBEN, V.; BEFROY, D.; CLINE, G. W.; ENOCKSSON, S.; INZUCCHI, S. E.; SHULMAN, G. I.; PETERSEN, K. F. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride contente in patients with type 2 diabetes, **Diabetes**, v.51, n.3, p.797-802, 2002.

MERSMANN, H.J. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. **Journal of Animal Science**, v.80, p.126–134, 2002.

MILES, P. D. et al. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, p.287–292, 2000.

MORAS, D. e GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v.10, p.384-391, 1998.

MORENO, S.; FAROLI-VECCHIOLI, S.; CERÙ, M.P. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. **Neuroscience**, v.123, p.131–145, 2004.

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

NIE, M.; CORBETT L.; KNOX A.; PANG L. Differential regulation of chemokine expression by peroxisome proliferators activated receptor gamma agonists. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.2550–61, 2005.

NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. **National Academy of Science**, Washintgton, D.C. 2007. 347p.

OHYAMA, M; et al. The interaction between vitamin a and thiazolidinedione on bovine adipocyte differentiation in primary culture. **Journal of Animal Science**, v.76, n.1, p.61–65, 1998.

OR-RASHID, M. M. et al. Plasma fatty acid profile of gestating ewes supplemented with docosahexaenoic acid, **Canadian Journal of Animal Science**, v.89, p.138–138, 2009.

OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M. Cadeia produtiva e comercial da carne de ovinos e caprinos: qualidade e importância dos cortes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2003. p.403-416.

OSTROWSKA, E. et al. Effects of dietary fat and conjugated linoleic acid on plasma metabolite concentrations and metabolic responses to homeostatic signals in pigs. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.625-634, 2000.

PARK, Y. et al. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. **Lipids**, v.34, n.3, p.243-8, 1999.

PARK, Y. et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v.32, p.853-858, 1997.

PELTIER, S. et al. Fatty acid profile of plasma and liver lipds in mice depleted in long-chain polyunsaturated (n-3) fatty acids. **International Journal of Molecular Medicine**, v.22, p.559-563, 2008.

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.

RISERUS, U. et al. Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, **Diabetes**, v.54, p.1379-1384, 2005.

RODER, K.; ZHANG, I.; SCHWEIZER, M. SREBP-1c mediates the retinoid-dependent increase in fatty acid synthase promoter activity in HepG2. **FEBS Letters**, v.581, p.2715–2720, 2007.

SANDRI, E. C. **Efeito de um agonista dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR $\gamma$ ) sobre os efeitos anti-lipogênicos do ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12 na glândula mamária de**

**ovelhas lactantes.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 79p, 2015.

SALTER, A. M.; TARLING, E. J. Regulation of gene transcription by fatty acids. **Animal**, v.4, p.1314-1320, 2007.

SCHOENBERG, K. M.; OVERTON, T. R. Effects of plane of nutrition and 2, 4-thiazolidinedione on insulin responses and adipose tissue gene expression in dairy cattle during late gestation. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.12, p.6021–6035, 2011.

SHIRAKI, t. et al. Spectroscopic analyses of the binding kinetics of 15d-PGJ2 to the PPARgamma ligand-binding domain by multi-wavelength global fitting. **Biochemical Journal**, v.393, p.749–55, 2006.

SORET, B.; LEE, H. J.; FINLEY, E.; LEE, S. C.; VERNON, R. G. “Regulation of differentiation of sheep subcutaneous and abdominal preadipocytes in culture” **Journal of Endocrinology**, v.161, n.3, p.517–524, 1999.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v.28, n.12, p.551-8, 2007.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. **Medicinal Research Reviews**, v.21, p.185-210, 2001.

SUGII, S. et al. PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, p.22504-22509, 2009.

TICIANI, E.; URIO, M.; FERREIRA, R.; HARVATINE, K. ; Oliveira, Dimas Estrusulas de . Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. **Animal** (Cambridge. Print), v., p. 1-7, 2016.

TONTONOZ, P. et al. mPPARgamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, **Genes & Development**, v.8, p.1224–1234, 1994.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . **Annual Review of Biochemistry**, v.77, p.289–312, 2008.

TORII, S. I.; et al. Thiazolidinedione induces the adipose differentiation of fibroblast-like cells resident within bovine skeletal muscle. **Cell Biology International**, v.22, n.6, p.421-427, 1998.

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. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade

do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 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, p.34, 2002.

VAN NEERVEN, S.; MEY, J. RAR/RXR and PPAR/RXR Signaling in Spinal Cord Injury. **PPAR Research**, v.2007, p.29275, 2007.

VERNON, R.G.; FLINT, D.J. Control of fatty acid synthesis in lactation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.42, p.315-331, 1983.

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

WAY, J. M. et al. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues, **Endocrinology**, v.142, p.1269–1277, 2001.

ZACHUT, M. et al. Efcts of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid proile in plasma, adipose tissue, and milk fat, **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5877–5889, 2010.