

GRÉGORY JOAQUIM CARDOSO

**REGULAÇÃO GÊNICA DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA
SÍNTESE LIPÍDICA NO TECIDO MAMÁRIO E ADIPOSEO AO
LONGO DA LACTAÇÃO EM OVELHAS LACTANTES**

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

Orientador: Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira.

**LAGES, SC
2016**

Cardoso, Grégory Joaquim

Regulação gênica das enzimas envolvidas na síntese lipídica no tecido mamário e adiposo ao longo da lactação em ovelhas lactantes/ Grégory Joaquim Cardoso - Lages, 2016.

69 p.: il.; 21 cm

Orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira

Bibliografia: p. 62-69

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Lipogênese. 2. Biologia da Lactação. 3. Regulação Gênica. I. Cardoso, Grégory Joaquim. II. Oliveira, Dimas Estrasulas. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

GRÉGORY JOAQUIM CARDOSO

**REGULAÇÃO GÊNICA DA SÍNTESE LIPÍDICA NO TECIDO
MAMÁRIO E ADIPOSEO AO LONGO DA LACTAÇÃO EM
OVELHAS LACTANTES**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina
(UDESC), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Banca examinadora

Orientador: _____

Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____

Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: _____


Prof. Dr. João Pedro Velho
Universidade Federal de Santa Maria

Lages, SC, 15 de junho de 2016

AGRADECIMENTOS

Não há quem vença sozinho e graças a Deus em minha caminhada acadêmica tive a honra de ser guarnecido por grandes amigos e estar sobre a tutela de docentes que acreditaram em meu potencial, me orientaram e possibilitaram que minha caminhada culminasse aqui, portanto agradeço:

À minha amada esposa Amanda T. de Souza que mesmo distante esteve tão próxima, por acreditar em mim agora me inspira a querer ser mais que fui até hoje!

À Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC por me conceder esta oportunidade, em especial aos professores do curso de Ciência Animal e ao meu orientador Dimas E. de Oliveira, por me aceitar como orientado mesmo com todas as dificuldades e pelas horas dispendidas conversando, ora sobre meu projeto de pesquisa, ora sobre assuntos diversos.

Aos meus amigos Zootecnistas, que me apoiaram, incentivaram agradeço as risadas, as ideias e as oportunidades, não me esqueci de vocês Moisés Rodrigues e Karina A. Mateus, vocês acreditaram mais em mim do que eu mesmo. Aos meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, Evelyn Drielle, Wagner Broggin Jr, Monica Urio e Maurício Camera, que se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelos exemplos, por demonstrarem a importância da união e do amor, devo um grande Obrigado.

À Secretaria de Educação do Estado de Santa Catarina pela concessão da bolsa de estudos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

CARDOSO, GRÉGORIO JOAQUIM. **Regulação gênica das enzimas envolvidas na síntese lipídica no tecido mamário e adiposo ao longo da lactação em ovelhas lactantes**. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

A biossíntese de lipídeos é dependente de uma ação coordenada de várias enzimas lipogênicas, como a acetil-CoA carboxilase alfa (ACC- α) e a ácido graxo sintase (FASN) em diferentes tecidos. Este estudo mensurou a expressão gênica dos transcritos tecido-específicos oriundos de diferentes regiões promotoras I, II e III (PI, PII e PIII) do gene da ACC- α e transcritos da FASN, leptina e da SREBP1 na glândula mamária e no tecido adiposo de ovelhas lactantes em três diferentes estágios de lactação. Oito ovelhas mestiças Lacaune/Texel pesando $62 \pm 1,8$ kg (média \pm SE), com média de parições de $3,1 \pm 0,23$ e produzindo $0,94 \pm 0,12$ kg leite/d foram utilizadas em três diferentes estágios de lactação (Dias em lactação - DEL): a) Inicial (15 DEL), b) Intermediário (70 DEL) e c) Final (120 DEL). As biópsias da glândula mamária e do tecido adiposo foram coletadas após a ordenha da manhã, o RNA total foi extraído, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado e análises de qRT-PCR foram realizadas. A expressão gênica foi analisada utilizando o procedimento MIXED do SAS usando a média geométrica de dois housekeeping genes, proteína ribossomal S18 (RPS18) e beta-actina (β -ACT), como covariável. No tecido mamário os transcritos do PII reduziram 82% entre os períodos inicial e intermediário, 93% inicial e final e 59% entre o período intermediário e final. Os transcritos do PIII decresceram respectivamente 73, 89 e 59% entre os períodos inicial e

intermediário, inicial e final e intermediário e final. A expressão gênica da FASN na glândula mamária reduziu respectivamente 54 e 83% quando o período inicial foi comparado com os períodos intermediário e final. No tecido mamário a expressão da SREBP1 decresceu 33 e 42% entre o período inicial e final e entre o intermediário e final. No tecido adiposo a expressão do transcrito PI aumentou mais de 30 vezes entre os períodos inicial e intermediário. Há uma adaptação para a síntese de ácidos graxos nos tecidos adiposo e mamário a fim de suprir as demandas fisiológicas da lactação, associada à mudanças na expressão gênica dos fatores de transcrição e genes envolvidos na síntese de lipídeos em ambos os tecidos.

Palavras chave: Enzimas lipogênicas, transcritos da ACC- α , FASN, leptina, SREBP1

ABSTRACT

CARDOSO, GRÉGORIO JOAQUIM. Genic regulation of enzymes involved in lipid synthesis in mammary and adipose tissue throughout lactation in lactating ewes. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

The biosynthesis of lipids is dependent of a coordinated action of several lipogenic enzymes, such as acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) and fatty acid synthase (FASN), in different tissues. This study evaluated the gene expression of acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) transcripts tissue-specific expressed from promoters I, II and III (PI, PII and PIII), fatty acid synthase (FASN), leptin and sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) in mammary gland and adipose tissues of lactating ewes at three different stages of lactation. Eight crossbred Lacaune/Texel ewes weighing 62 ± 1.8 kg (mean \pm SE), with mean parity number of 3.1 ± 0.23 and producing 0.94 ± 0.12 kg milk/d were used in three different stages of lactation (days in milk-DIM): a) Early, (15 DIM), b) Mid, (70 DIM) and; c) Late (120 DIM). Biopsies were taken after the morning milking, the total RNA was extracted, complementary DNA (cDNA) synthesized and qRT-PCR analysis carried out. The gene expression data were analyzed using the MIXED procedure of SAS using the geometric mean of two housekeeping genes, ribosomal protein S18 (RPS18) and beta actin (β -ACT), as a covariate. In mammary tissue, PII transcripts were reduced 82, 93 and 59% between early and mid, early and late and mid and late stages of lactation. PIII transcripts were decreased 73, 89 and 59% between early and mid, early and late and mid and late, respectively. Gene expression of FASN was reduced respectively, 54 and 83% in

mid and late stages compared to early lactation. In mammary tissue SREBP1 was decreased 33 and 42% between early and late and mid to late lactation. In adipose tissue, the expression of PI transcripts was increased more than 30 fold between early and mid lactation. There is an adaptation for fatty acid synthesis in adipose and mammary tissues to meet the demands of lactation is associated with changes in gene expression of the transcription factor and codifying genes involved in fat synthesis in both tissues.

Keywords: Lipogenic enzymes, ACC- α transcripts, FASN, leptin, SREBP1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 - Acetyl-CoA carboxylase α (ACC- α) transcripts from Promoter II (A) and III (B) in mammary tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different. 49

Figure 2 - Acetyl-CoA carboxylase α (ACC- α) transcripts from Promoter I (A), II (B) and III (C) in adipose tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different. 50

Figure 3 - Sterol regulatory element binding protein (SREBP1) in (A) mammary and (B) adipose tissues from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different. 51

Figure 4 - Fatty acid synthase in mammary (A) and adipose (B) tissues from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different. 52

Figure 5 - Leptin in adipose tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different. 53

LISTA DE TABELAS

Table 1 Ingredients and chemical composition of the concentrate.	45
Table 2 Performance, milk composition and DMI of dairy ewes at different stages of lactation.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBP	Proteína de ligação de acil-CoA
ACC- α	Acetil-CoA carboxilase alfa
ACP	Proteína carregadora de acila
AG	Ácido graxo
AGNE	Ácido graxo não-esterificado
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C _{16:0}	Ácido palmítico
CD36	Translocador de ácido graxo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
DGL	Depressão da gordura do leite
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELL	Energia líquida de lactação
FABP	Proteína ligadora de ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
HCO ₃	Bicarbonato
INSIG	Gene induzido por insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
P	Promotor
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SCAP	Proteína de clivagem-ativação da SREBP
SCD	Estearoil-CoA-dessaturase
SLC27A	Proteínas de transporte de ácidos graxos
SNC	Sistema Nervoso Central

SREBP	Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol
TAG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

ARTICLE

ACC- α	Acetyl-CoA carboxylase alpha
B-ACT	β -actin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DIM	Days in milking
DMI	Dry matter intake
FA	Fatty acid
FASN	Fatty acid synthase
mRNA	Ribonucleic acid Messenger
P	Promoter
qRT-PCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
RPS18	Ribosomal protein S18
SREBP	Sterol regulatory element binding protein

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
B	Beta
%	Porcentagem
C	Carbonos
kg	Quilograma
°C	Graus célsius
D	Dia
mL	Mililitro
Mg	Miligrama
μ L	Microlitro
V	Volts
mM	Millimolar
UV	Ultravioleta
P	Probabilidade
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
2.1	LIPOGÊNESE MAMÁRIA	32
2.1.1	Síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos	34
1.1.1.1	Acetil-CoA Carboxilase Alfa (ACC- α).....	32
1.1.1.2	Ácido Graxo Sintase (FASN)	34
1.1.1.3	Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP)	36
1.1.1.4	Leptina	37
2.1.2	Ácidos graxos pré-formados	40
3	CHAPTER ONE – ARTICLE	43
3.1	ABSTRACT	43
3.2	INTRODUCTION	44
3.3	MATERIALS AND METHODS	45
3.3.1	Animals and treatments design	45
3.3.2	Milk sampling and analysis.....	46
3.3.3	Tissue biopsies, RNA extraction, transcription to a complementary DNA (cDNA) and real-time PCR analysis.....	46
3.3.4	Statistical Analysis	47
3.4	RESULTS.....	47
3.5	DISCUSSION.....	53
3.6	ACKNOWLEDGEMENTS.....	56
3.7	REFERENCES.....	56
4	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	58
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O início e a manutenção da lactação são fenômenos complexos e ainda não totalmente esclarecidos. A síntese e secreção do leite têm instigado diversos pesquisadores como o cientista francês Boussingault que em 1845 descreveu pela primeira vez a síndrome da baixa gordura do leite (DGL) caracterizada pela redução de até 50% na produção de gordura do leite (VAN SOEST, 1994).

Estudos posteriores, até 1980, procuraram definir e quantificar aspectos metabólicos da glândula mamária como a síntese *de novo* e a captação de ácidos graxos (AG) da corrente sanguínea. Estudos mais recentes tem se preocupado em manipular a composição de AG através da nutrição e focado em estudos genômicos que destacam a complexidade e a coordenação dos eventos moleculares assim como as adaptações pela qual a glândula mamária passa durante a lactação (BIONAZ; LOOR, 2008). Houve muitos avanços na biologia da lactação durante o século XX ainda que diversos aspectos moleculares associados com a síntese de gordura do leite continuem desconhecidos (BAUMAN et al., 2006).

A gordura do leite é um componente importante no fornecimento de energia e influencia a qualidade organoléptica do leite e de seus derivados impactando na remuneração obtida pelo produtor, sendo assim fundamental para a cadeia produtiva e a indústria de lácteos. Sob o ponto de vista do que ocorre com o animal, a habilidade secretória da glândula mamária é determinada por eventos que iniciam durante o desenvolvimento embrionário, continuam na puberdade (mamogênese), e principalmente durante a gestação onde este tecido tem seu desenvolvimento concluído mediante a ação de diversos hormônios e adquire a capacidade de sintetizar e secretar os componentes do leite (GARNSWORTHY, 1988).

A gordura sintetizada durante a lactação não é o resultado apenas do aumento das taxas de síntese de ácidos graxos no tecido mamário, mas também da redução da síntese no tecido adiposo e aumento no tecido hepático (VERNON, FLINT, 1983). Essa mudança ocorre devido à demanda energética para a síntese dos componentes do leite e esses processos estão sob o controle coordenado de vários hormônios e fatores de transcrição. Os ácidos graxos que compõe a gordura secretada pelas células epiteliais do alvéolo mamário provêm de duas fontes: ácidos graxos pré-formados provenientes da corrente sanguínea, oriundos dos adipócitos ou absorvidos da dieta, e ácidos graxos originados pela síntese *de novo* da própria célula do epitélio mamário.

Os ácidos graxos de cadeia curta (até a C_{10:0}) e média (C_{12:0} a C_{14:0}) são sintetizados através da síntese *de novo*, assim como cerca de metade do ácido palmítico (C_{16:0}) é também produzido por esta via. A síntese de ácidos graxos é aumentada no início da lactação, portanto a ação das duas enzimas responsáveis pela síntese, acetil-CoA carboxilase alfa (ACC- α) e ácido graxo sintase (FASN), também é acentuada neste período (TRAVERS; VERNON; BARBER, 1997). A ACC- α catalisa o primeiro passo na síntese dos ácidos graxos, formando malonil-CoA, que é considerado o passo limitante na velocidade do processo, já a FASN catalisa uma sequência de reações que adicionam dois carbonos a uma cadeia até a formação do C_{16:0}. Logo a atividade e expressão da ACC- α e FASN estão intimamente correlacionadas com o grau de atividade lipogênica nos tecidos.

Há diversos hormônios e fatores de transcrição coordenando a síntese de leite. As proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP) são importantes reguladores da expressão de genes envolvidos na síntese lipídica, como a ACC- α e FASN (BIONAZ; LOOR, 2008).

A expressão gênica dos promotores da ACC, FASN, SREBP1 são coordenadamente reguladas afim de suprir as

demandas de síntese em diferentes tecidos durante a lactação. Assim espera-se que a expressão gênica do transcrito PIII da ACC- α , da FASN e da SREBP1 seja aumentada na glândula mamária durante o período inicial de lactação, enquanto a expressão destes seja reduzida no tecido adiposo nos períodos iniciais. No período final da lactação espera-se que o PI da ACC- α , a FASN e a leptina sejam mais expressos no tecido adiposo enquanto ocorra uma redução do PIII, PII, FASN e da SREBP1 na glândula mamária.

Assim, o objetivo deste estudo foi mensurar a expressão gênica de diferentes isoformas tecido-específicas da acetil-CoA carboxilase alfa (ACC- α), da ácido graxo sintase (FASN), leptina e proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP1) na glândula mamária e no tecido adiposo de ovelhas lactantes em três diferentes estágios de lactação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPOGÊNESE MAMÁRIA

O fígado, os adipócitos e a glândula mamária são os principais tecidos lipogênicos do organismo dos mamíferos. Para sintetizar seu produto a glândula mamária passa por uma profunda mudança celular e enzimática que inicia durante a gestação e se sucede durante todo seu período produtivo (MELLENBERGER; BAUMAN; NELSON, 1973). Essa diferenciação permite que o animal sintetize e secrete diversas moléculas orgânicas, entre elas os lipídeos e esse mecanismo está sob o controle de vários hormônios e fatores de transcrição que atuam coordenadamente garantindo a lactogênese (LARSON, 1985; AKERS, 2002).

A síntese de gordura do leite necessita de uma coordenada ação enzimática envolvendo a captação dos AG da corrente sanguínea, regulação da transcrição, síntese *de novo*, transporte e ativação intracelular de AG, dessaturação, esterificação, síntese, transporte e excreção da gotícula lipídica (BIONAZ; LOOR 2008).

Em ruminantes, os AG secretados no leite são oriundos de duas fontes, que em situações de balanço energético positivo são igualmente importantes: AG provenientes da síntese *de novo* formados nas células do epitélio mamário e AG pré-formados captados da circulação sanguínea, oriundos principalmente da dieta (BAUMAN; GRIINARI, 2003).

Quando o animal se encontra em balanço nutricional positivo aproximadamente 15% dos AG secretados são de cadeia longa (predominantemente C_{18:0}), derivados da alimentação, estando relacionado à quantidade e tipo de gordura na dieta. Enquanto os AG de cadeia curta e média, C_{4:0} ao C_{14:0}, são oriundos da síntese *de novo*, os ácidos graxos de cadeia média (C_{16:0}) podem ser captados tanto da circulação

sanguínea ou sintetizados via síntese *de novo* (PALMQUIST, 2006). Caso contrário, em balanço energético negativo, a contribuição de ácidos graxos mobilizados dos adipócitos aumenta proporcionalmente ao nível de privação de energia (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Durante a síntese *de novo* a ACC- α desempenha atividade fundamental regulando a repartição dos nutrientes entre o tecido hepático e os tecidos periféricos. Esse controle está relacionado com a estratégia adaptativa para atender às demandas fisiológicas criadas durante situações como alimentação, jejum e lactação (ZAMMIT, 1996; LOFTUS et al., 2000).

Os ácidos graxos da corrente sanguínea são captados pelas células epiteliais do tecido mamário e utilizados para a síntese de gordura do leite. Estes, são derivados da mobilização das reservas dos adipócitos e de lipoproteínas circulantes, principalmente lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) originada da absorção de lipídeos da dieta, que libera ácidos graxos devido à ação da enzima lipoproteína lipase (LPL) no núcleo das lipoproteínas circulantes (BARBER et al., 1997).

Embora, os processos bioquímicos envolvidos na síntese de lipídeos do leite sejam conhecidos há décadas (NEVILLE; WALSH, 1995) a identificação dos genes envolvidos só foi possível devido ao sequenciamento genético combinado as técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, essa técnica permitiu quantificar quando a funcionalidade dos genes estava sendo alterada pelos nutrientes ingeridos (nutrigenômica) (BIONAZ; LOOR, 2008). Além disso, o conhecimento da fisiologia mamária e das adaptações moleculares à dieta ou ao estado nutricional dos animais é necessário para a manipulação da síntese dos componentes do leite.

2.1.1 Síntese *de novo* de ácidos graxos

Em ruminantes cerca de metade dos AG são derivados da síntese *de novo* (BAUMAN; DAVIS, 1974) sabendo que ruminantes e não-ruminantes não compartilham as mesmas vias metabólicas para síntese de lipídeos na glândula mamária. Os não-ruminantes utilizam a glicose como precursor dos AG, enquanto que para os ruminantes o acetato e butirato são os substratos mais importantes na síntese *de novo* pela glândula mamária (Sutton, 1985). O acetato utilizado provém da fermentação ruminal dos carboidratos da dieta e constitui a maior fonte dos carbonos utilizados na síntese *de novo*. O butirato absorvido pelo epitélio do rúmen produz β -hidroxibutirato que fornece cerca de metade dos primeiros quatro carbonos da síntese *de novo* dos AG em ruminantes (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

A biossíntese dos AG requer a participação de um intermediário de três carbonos (C), o malonil-CoA e sua formação é um processo irreversível catalizado pela acetil-CoA carboxilase alfa. Esse substrato será utilizado para construção dos AG em uma sequência de reações repetidas que adicionam dois C na cadeia do grupo acila, catalisados por um sistema coletivamente conhecido como ácido graxo sintase (FASN) (NELSON; COX, 2011).

2.1.1.1 Acetil-CoA Carboxilase Alfa (ACC- α)

Nos mamíferos os ácidos graxos são sintetizados a partir dos excedentes da dieta, proteínas e principalmente carboidratos. Sua síntese e oxidação ocorrem por vias metabólicas distintas, sendo catalisada por conjuntos de diferentes enzimas e compartimentos (NELSON; COX, 2011).

A síntese da gordura secretada no leite é coordenada por uma sequência de eventos moleculares e por diversos mecanismos de controle em condições de homeostase e quando

a carga energética celular é alta (relação ATP/ADP) (TRAVERS; VERNON; BARBER, 1997). Esses processos ocorrem no citosol, mas seu principal substrato, o acetil-CoA, é formado na mitocôndria e transportado com gasto de ATP, para o citosol produzindo os agentes redutores deste processo o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) (MARZZOCO; TORRES, 2007).

A síntese *de novo* é um processo cíclico sequencial na qual a enzima ACC- α desempenha papel fundamental, a carboxilação biotina-dependente do acetil-CoA para malonil-CoA. Esta enzima nas células animais contém três subunidades polipeptídicas separadas (biotina-carboxilase, proteína carreadora de biotina e transcarboxilase), que formam um único polipeptídeo multifuncional, tendo como grupo prostético a biotina covalentemente ligada a um resíduo de lisina (NELSON; COX, 2011).

A reação catalizada por esta enzima é dividida em duas etapas: transferência ATP dependente do grupo carboxil derivado do bicarbonato (HCO_3) para a biotina e o transporte e transferência de CO_2 para o acetil-CoA, gerando malonil-CoA. Assim o aumento da atividade da ACC- α resulta em um *pool* aumentado de seu produto, malonil-CoA, precursor da síntese *de novo* e substrato para ação de outras enzimas que sintetizam a gordura do leite.

Em função da demanda energética aumentada durante a lactação e a importância desta enzima nesse processo e em diversos tecidos simultaneamente, a atividade da ACC- α é controlada de forma acurada em um mecanismo agudo e outro crônico. O primeiro envolve a modulação alostérica em múltiplos sítios específicos de fosforilação (KIM *et al.*, 1989) enquanto o segundo mecanismo atua através de mudanças na expressão gênica (KIM; TAE, 1994). Essa regulação transcricional da acetil CoA carboxilase alfa é complexa e possível através de vários promotores (P) tecido-específicos

(LOPEZ-CASILLAS, *et al.* 1991; BARBER; TRAVERS, 1998)

Os três diferentes transcritos foram caracterizados em diferentes tecidos. O promotor I (PI) foi caracterizado no tecido adiposo e fígado, em condições lipogênicas, o promotor II (PII) é expresso ubiquamente, enquanto o promotor III (PIII) foi caracterizado na glândula mamária lactante de ovinos. Posteriormente o PI foi detectado na glândula mamária bovina (MAO *et al.*, 2001), mas não na glândula mamária de ovinos (TRAVERS *et al.* 2001).

Apesar da expressão do PII ser ubíqua, este é abundantemente estimulado na glândula mamária durante a lactação (MAO; SEYFERT, 2002). Este promotor é expresso em menores taxas no coração e nos músculos esqueléticos (BROWNSEY, 2006). Na glândula mamária de ovelhas lactantes há um aumento dos transcritos dos promotores II e III, sendo estes dois determinantes na síntese de lipídeos neste tecido. (BARBER; TRAVERS, 1998). O PIII foi caracterizado no pulmão, fígado, rim, cérebro e glândula mamária, mas não em outros tecidos, tais como adiposo, linfático e muscular. Os transcritos do PIII são distintos, pois codificam uma ACC- α com uma sequência N-terminal alternativa (BARBER; TRAVERS, 1998).

A significância fisiológica dos promotores tecido-específico ou dos diversos transcritos não é clara, mas esta heterogeneidade pode ser uma estratégia adaptativa do organismo como resposta as demandas fisiológicas distintas em diferentes tecidos. Dessa forma, o organismo prioriza a repartição dos nutrientes entre tecidos acuradamente e concomitantemente (TRAVERS; BARBER, 2001).

2.1.1.2 Ácido Graxo Sintase (FASN)

A síntese de AG é catalizada por um sistema enzimático denominado ácido graxo sintase (FASN) e sua estrutura varia

nos diferentes organismos, mas não as reações catalisadas. Também faz parte desta enzima uma pequena proteína não enzimática, designada proteína carregadora de acila, ou ACP (acyl-carrier protein), a qual está sempre ligada a uma cadeia crescente de AG. A ACP possui um grupo prostético derivado do ácido pantotênico, a fosfopanteteína, também componente da coenzima A e essa proteína não enzimática transporta o substrato entre os diferentes centros ativos da FASN (MARZOCCO; TORRES, 2007).

A FASN dos mamíferos possui sete sítios ativos para reações distintas que estão presentes em domínios separados. As subunidades parecem agir independentemente, assim, quando todos os sítios ativos de uma unidade são inativados por mutação, a síntese de AG é apenas levemente reduzida (NELSON; COX, 2011). O principal produto da FASN é o ácido palmítico (C_{16:0}) onde os carbonos C₁₆ e C₁₅ do ácido palmítico são derivados dos átomos de C dos grupos metil e carboxil, respectivamente, provenientes de um acetil-CoA utilizado para iniciar o sistema. Os demais átomos de C da cadeia são originados da acetil-CoA via malonil-CoA (NELSON; COX, 2011).

A síntese do C_{16:0} inicia com a transferência de um radical acetil da acetil-CoA para a ACP, catalisada pela acetil-CoA-ACP-transacilase; esse radical é então transferido para o grupo SH de um resíduo de cisteína de outra enzima da síntese, a β-cetoacil-ACP-sintase. A ACP, agora livre, pode receber o radical malonil da malonil-CoA, formando malonil-ACP, por ação da malonil-CoA-ACP transacilase (NELSON; COX, 2011). Segue-se uma condensação dos grupos malonil e acetil, catalisada pela β-cetoacil-ACP sintase ou enzima de condensação, com liberação de CO₂ e formação da β-cetoacil-ACP que sofre redução, desidratação e nova redução catalisada pelas enzimas β-cetoacil-ACP redutase, β-hidroxiacil-ACP desidratase e enoil-ACP redutase. Assim termina o primeiro

ciclo da síntese de C₁₆ formando butiril-ACP (MARZOCCO; TORRES, 2007).

O alongamento da cadeia se dá pela adição de unidades de dois carbonos fornecidos por malonil-CoA, sendo o radical butiril transferido para o grupo SH da β -cetoacil-ACP sintase liberando o ACP para então receber outro radical malonil (NELSON; COX, 2011). O ciclo repete-se por mais cinco voltas, somando ao final sete voltas, formando o palmitoil-ACP, o produto final da síntese de ácidos graxos. Finalmente este produto pode ser hidrolisado por uma tioesterase liberando o ácido palmítico, ou transferido para o CoA, formando o palmitoil-CoA, substrato da síntese de triglicerídeos e fosfolípídeos (MARZOCCO; TORRES, 2007).

A FASN é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas associadas em um dímero, que sintetiza duas moléculas de C_{16:0} simultaneamente, uma em cada monômero. Após a dissociação dos monômeros a FASN deixa de ser funcional, porque o passo de condensação depende da interação entre as duas subunidades (NELSON; COX, 2011).

2.1.1.3 Proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP)

As proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP) são fatores de transcrição, ou seja, proteínas que induzem a transcrição de seus genes alvo (VOET, et al. 2014). As SREBP's funcionam como reguladores globais da síntese de lipídeos, ligando-se à sequência de DNA dos genes responsivos ao elemento regulatório de esterol (EBERLÉ et al. 2004).

A SREBP contém três domínios: 1) um domínio de transcrição NH₂-terminal; 2) uma região intermediária hidrofóbica e 3) um domínio regulador COOH terminal (NELSON; COX, 2011).

Três isômeros da SREBP foram identificados (SREBP1a, SREBP1c e SREBP2) (HUA et al., 1993). Os isômeros “a e c” da SREBP1 são transcritos a partir do mesmo gene via um “splicing” alternativo, possuindo o primeiro exon distinto, enquanto a SREBP2 é transcrita de um gene diferente. A SREBP1c e SREBP2 são importantes na regulação da biossíntese de AG e colesterol respectivamente, já o SREBP1a está relacionado a ambos processos (EBERLÉ et al., 2004).

O SREBP1 é sintetizado na forma de precursor inativado no retículo endoplasmático, onde fica ancorado pela proteína indutora de insulina (INSIG). Sob certas condições, como na presença de esterol, a proteína ativadora de clivagem do SREBP1 (SCAP) transloca o SREBP1 até o complexo de Golgi, onde se torna ativa pela clivagem da porção N-terminal (nSREBP1). Uma vez ativa a SREBP1 se desloca até o núcleo e liga-se a sequência de DNA da região promotora do gene alvo (HUSSEIN et al., 2013). Assim a SREBP1 e sua reguladora, a proteína SCAP, combinam-se para regular a expressão de mRNA de enzimas que sintetizam os AG e colesterol a partir de moléculas precursoras (HORTON, 2002; GOLDSTEIN *et al.*, 2006).

2.1.1.4 Leptina

A leptina é um hormônio produzido predominantemente nos adipócitos. Entretanto, outros órgãos podem auxiliar na produção da leptina em menor quantidade tais como: estômago, placenta e tecido adiposo marrom (BADO, et al., 1998; MASUZAKI, et al., 1997).

Os níveis circulantes de leptina são proporcionais à massa do tecido adiposo e podem servir como um indicador de que o organismo está com reserva energética (OTERO, 2004). Há décadas têm-se evidências para a existência de um sistema regulatório da homeostase fisiológica do peso corporal. Para tal, a quantidade de energia armazenada na massa adiposa

representa o equilíbrio entre as calorias ingeridas e o gasto energético (incluindo o da lactação). Portanto, há um mecanismo homeostático que monitora mudanças nos estoques de energia e provoca mudanças compensatórias na ingestão de alimentos e no gasto de energia para manter o tecido adiposo (AHIMA; FLIER, 2000). Esse mecanismo homeostático está sob controle da leptina, que possui a função de ser uma aferência para o sistema nervoso central (SNC) dentro de uma alça de retroalimentação negativa que regula a massa de tecido adiposo, ou seja, a leptina informa o cérebro que os estoques de energia em forma de gordura estão adequados (NEGRÃO; LICINIO, 2000).

A leptina tem efeito sobre a ingestão, o gasto energético e a eficiência energética. Este hormônio ainda é responsável por várias funções biológicas como metabolismo de carboidratos e lipídeos, síntese de glicocorticoides, insulina e diversos outros hormônios relacionados ao sistema imune e a resposta inflamatória (OTERO, 2004).

2.1.2 Ácidos graxos pré-formados

A taxa de síntese e secreção do leite depende da disponibilidade dos precursores para utilização pelas células epiteliais dos alvéolos mamários. A proporção dos precursores disponibilizados está relacionada com o fluxo sanguíneo e com a capacidade de captação na glândula mamária (LARSON, 1985). Logo, o controle do fluxo sanguíneo é um possível mecanismo que auxilia na repartição dos nutrientes, pois a captação de diversos nutrientes é primeiramente limitada por sua passagem no tecido mamário.

Os ácidos graxos pré-formados captados pela glândula mamária e diretamente utilizados para a síntese de gordura do leite são derivados de lipoproteínas circulantes (VLDL) e de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (BARBER et al., 1997). Esses substratos, se originam da absorção de lipídeos a

partir do trato digestivo ou das reservas corporais de gordura mobilizadas quando necessário (BARBER *et al.*, 1997).

Em balanço energético positivo a mobilização de gordura corporal contribui em menos de 10% dos ácidos graxos na gordura do leite (BAUMAN; GRINARI, 2003). Em situação de balanço energético negativo, a contribuição de ácidos graxos mobilizados aumenta em proporção direta com o nível do déficit de energia (BAUMAN; GRINARI, 2001). Segundo o NRC, (2001) a produção da gordura do leite representa aproximadamente 50% da energia líquida de lactação (ELL), logo contribui significativamente com o balanço energético negativo.

Os triglicerídeos consumidos na dieta são hidrolisados no rúmen por ação de lipases bacterianas que atuam no meio extracelular, liberando ácidos graxos livres, monoglicerídeos e glicerol. O glicerol e os açúcares liberados são rapidamente fermentados a ácidos graxos voláteis (AGV) e absorvidos pelo epitélio ruminal. Os ácidos graxos não esterificados com ligações duplas (insaturados) passam pelo processo de bio-hidrogenação, onde são saturados. Os lipídeos que deixam o rúmen são predominantemente ácidos graxos livres (80-90%) e fosfolipídeos (10-15%) como parte das membranas celulares das bactérias (JENKINS, 1993).

No intestino delgado, por ação dos sais biliares os ácidos graxos formam as micelas e assim são absorvidos através das células do intestino. As células intestinais, os enterócitos, absorvem o ácido graxo livre e o monoacilglicerol por difusão simples e estes no interior da célula da mucosa intestinal, seguem até o retículo endoplasmático e são re-esterificados ao glicerol e adicionados com colesterol, fosfolipídeos e proteínas específicas (apoproteínas) formando principalmente VLDL que são liberados nos vasos linfáticos. Os VLDL's são transportados pela corrente sanguínea aos tecidos e tem parte de seus componentes captados, então os remanescentes são encaminhados para o fígado (FIELDING;

FRAYN, 1998). Os VLDL's ou quilomícrons são ancorados ao endotélio dos vasos e capilares dos tecidos pela lipoproteína lipase (LPL) que hidrolisa os triglicerídeos no núcleo da lipoproteína, liberando AG livres para serem absorvidos. A atividade da LPL é aumentada nos períodos iniciais de lactação em ruminantes, exatamente em um momento onde o animal enfrenta um período de balanço energético negativo (LIESMAN et al., 1988).

Após a liberação dos AG da lipoproteína se dá início a passagem para o interior da célula, sendo que esse processo ainda não é bem compreendido (PALMQUIST, 2006).

Dos AG sintetizados pela glândula mamária, uma parte é insaturada e a importância destes é garantir a fluidez da secreção. A principal enzima envolvida na síntese de AG monoinsaturados (AGMI) é a esteroil-CoA-dessaturase (SCD). Presente em vários tecidos animais, a SCD1 é abundantemente expressa na glândula mamária e desempenha um papel importante na produção de gordura do leite (BIONAZ; LOOR, 2008). A SCD é uma enzima ligada à membrana do retículo endoplasmático que introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10, em uma ampla gama de AG. Os substratos preferidos pela SCD são o ácido esteárico (C_{18:0}) que é convertido a C_{18:1 cis-9} (oleico) e, em menor grau, o palmítico (C_{16:0}) que é convertido em C_{16:1 cis-9} (palmitoleico) (NTAMBI; MIYAZAKI, 2004).

O triacilglicerol é sintetizado nas proximidades do retículo endoplasmático liso, onde as gotículas lipídicas aumentam de tamanho e se movem através do citoplasma em direção a membrana apical, por mecanismos ainda não completamente compreendidos, mas que podem estar relacionados às proteínas citoplasmáticas (AKERS, 2002). As gotículas maiores são então secretadas para a luz do alvéolo da glândula mamária, envoltas em um envelope de membrana apical.

3 CHAPTER ONE – ARTICLE

Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) transcripts are differentially expressed in mammary gland and adipose tissues of lactating ewes at different stages of lactation

3.1 ABSTRACT

During lactation acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) is a key regulator of fatty acid synthesis and it is expressed in a tissue-specific way from three promoters (PI, PII and PIII) in the ovine genome. This study evaluated the gene expression of promoter specific acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) transcripts, fatty acid synthase (FASN), leptin and sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) in mammary gland and adipose tissue of lactating ewes at three different stages of lactation: a) Early, [15 days in milk (DIM)], b) Mid, (70 DIM) and; c) Late (120 DIM). Biopsies were taken after the morning milking and gene expression measured by quantitative Real-Time qRT-PCR. In mammary tissue, PII transcripts were reduced 82, 93 and 59% between early and mid, early and late and mid and late stages of lactation. PIII transcripts were decreased 73, 89 and 59% between early and mid, early and late and mid and late, respectively. Gene expression of FASN was reduced respectively, 54 and 83% in mid and late stages compared to early lactation. In mammary tissue SREBP1 was decreased 33 and 42% between early and late and mid to late lactation. In adipose tissue, the expression of PI transcripts was increased more than 30 fold between early and mid lactation. Our findings suggest that ACC- α promoter specific regulation could be a homeorhetically regulated adaptive strategy to respond to the changes in physiological demands across lactation.

Key words: fatty acid synthesis, gene expression, milk fat synthesis

3.2 INTRODUCTION

During lactation, acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) (EC 6.4.1.2) is a key regulator of fatty acid synthesis catalyzing a rate-limiting step in de novo synthesis of fatty acids (Barber & Travers, 1995) and its transcription is coordinately decreased in adipose tissue and increased in the mammary gland at the initiation of lactation prioritizing milk fat synthesis over increasing adiposity as shown by Travers et al. (1997). Additionally, ACC- α is expressed from three promoters (PI, PII and PIII) in the ovine genome in a tissue-specific way (Lopez-Casillas et al., 1991; Barber & Travers, 1998). Fatty acid synthase (FASN) (EC 2.3.1.85) is the other key regulated enzyme in fatty acid synthesis by adding two carbons derived from malonyl-CoA to the growing fatty acyl-CoA (Smith, 1994).

In mammary gland and adipose tissue, most of lipogenic genes are under the control of transcription factors and in respect to, Eberlé et al. (2004) suggested that the transcription factor sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) plays a major role in controlling expression of lipogenic genes such as ACC- α and FASN.

This study evaluated the expression of promoter specific acetyl-CoA carboxylase alpha (ACC- α) transcripts, fatty acid synthase (FASN), leptin and sterol regulatory element binding proteins 1 (SREBP1) in mammary and adipose tissue of lactating ewes at three stages of lactation. To our knowledge this is the first study to show tissue specific changes in expression of ACC- α transcripts across lactation in lactating dairy ewes.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Animals and treatments design

Santa Catarina State University ethical committee approved all management and animal care procedures. Eight crossbred Lacaune/Texel ewes weighing 62 ± 1.8 kg (mean \pm SE), with mean parity of 3.1 ± 0.23 and producing 0.9 ± 0.12 kg milk/d were used. All animals grazed six paddocks of festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) and white clover (*Trifolium repens* L.) with free access to water and, in a dry matter basis, were individually supplemented with 0.9 kg of concentrate (Table 1) and 0.3 kg of corn silage. The diet was calculated to meet or exceed the nutrient requirements for lactation according to NRC (2007).

Table 1 - Ingredients and chemical composition of the concentrate.

Ingredient	%
Corn ground	56
Soybean meal	39
Mineral/vitamin mix*	5
Chemical composition	
DM, %	92.2
CP, % DM	19.5
NDF, % DM	17.7
ADF, % DM	6.5
Lignin, % DM	2.3

*Sheep mineral and vitamin premix (Nutrimasa Agroindustrial Feeds, Chapecó, Brasil). Major minerals (g/kg) were Ca, 190; Na, 35; Mg, 30; S, 18 and P, 69. Trace minerals (mg/kg) were Zn, 1,440; Fe, 840; Mn, 1,550; Co, 3.4; and Se, 22. Vitamins (IU/kg) were vitamin A, 125; vitamin D3, 10; and vitamin E, 500.

Each experimental period lasted 14 days and tissue samples were collected from all animals at three different stages of lactation: a) Early [15 days in milk (DIM)], b) Mid (70 DIM) and c) Late (120 DIM). Pasture dry matter intake (DMI) was predicted based on INRA (2007) for each stage of lactation while accounting for live weight, milk yield and milk composition.

3.3.2 Milk sampling and analysis

Milk yield was individually measured in a milk parlor designed for ewes. On day 14th in each experimental period, milk samples were collected at the a.m. and p.m. milkings, proportionally composited and stored at 4°C with a preservative (bronopol tablet; D & F Control Systems Inc., San Ramon, CA, USA) before being analyzed for components (fat, protein, lactose, and total solids) using infrared analysis (AOAC, 2000; method 972.160).

3.3.3 Tissue biopsies, RNA extraction, transcription to a complementary DNA (cDNA) and real-time PCR analysis

All procedures for mammary and adipose tissues biopsies, total RNA extraction, transcription to a complementary DNA (cDNA), primers sequences used and real-time PCR analysis were described in details by Ticiani et al. (2016). Primers were designed using Primer Express software (PE Applied Biosystems, v. 3.0) using gene sequences publically available in GenBank [National Center for Biotechnology Information (NCBI); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]. Briefly, promoter specific primers to amplify ACC- α PI-transcripts included the

forward primer in exon 1 and reverse in exon 5, ACC- α PII-transcripts included the forward primer at the junction of exons 2 and reverse primer in exon 5, and ACC- α PIII primers were both in exon 5A.

3.3.4 Statistical Analysis

Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute, 2009). The model for milk yield and milk components included the fixed effect of animal and stage of lactation and the day before observation in each period as a covariate (removed if not significant). The model for gene expression data included the fixed effect of animal and stage of lactation and the geometric mean of the housekeeping genes ribosomal protein S18 (RPS18) and beta-actin (β -ACT) as a covariate (removed if not significant). Data points with Studentized Residuals outside of ± 2.0 were considered outliers and excluded from analysis. The PDIF option in LSMEANS statement was used to compare stages of lactation. Significance was declared at $P < 0.05$ and a trend when $P < 0.10$.

3.4 RESULTS

The performance, milk composition and DMI at each stage of lactation are shown in Table 2. Milk yield (g/d) was higher at early and mid lactation than late lactation. The concentration of fat, protein and total solids increased throughout lactation. In contrast, lactose content decreased during the same period. Dry matter intake was not different between lactation stages.

Table 2 - Performance, milk composition and DMI of dairy ewes at different stages of lactation.

	Early	Mid	Late	S.E. ¹	P value
Milk yield (g/d)	1117.1 ^a	1137.1 ^a	610.6 ^b	45.6	0.0001
Fat (%)	4.2 ^a	6.5 ^b	8.9 ^c	0.2	0.0001
Fat (g/d)	78.9 ^a	76.1 ^a	54.8 ^b	4.9	0.004
Protein (%)	4.2 ^a	5.0 ^b	5.9 ^c	0.2	0.0001
Protein (g/d)	78.5 ^a	56.2 ^b	35.8 ^c	2.3	0.0001
Lactose (%)	4.9 ^a	4.6 ^b	4.2 ^c	0.07	0.0001
Lactose (g/d)	91.1 ^a	52.2 ^b	38.3 ^c	1.9	0.0001
Total solids (%)	14.4 ^a	16.9 ^b	19.8 ^c	0.2	0.0001
Total solids (g/d)	155.19 ^a	198.3 ^b	181.1 ^b	7.4	0.002
DMI ² (kg/d)	1.62	1.75	1.79	0.05	0.12

¹S.E. Standard error, n = 6; Means that do not share a letter are significantly different. ²Total Dry matter intake.

Mammary PII and PIII ACC- α transcripts changed according to stage of lactation (P=0.001) with higher expression in early lactation and decreasing thereafter. The PII transcripts were reduced 82% between early and mid (P=0.001), 93% between early and late (P=0.001) and 59% between mid and late lactation (P=0.02). In addition, PIII transcripts were decreased 73, 89 and 59% between early and mid, early and late and mid and late, respectively (Figure 1).

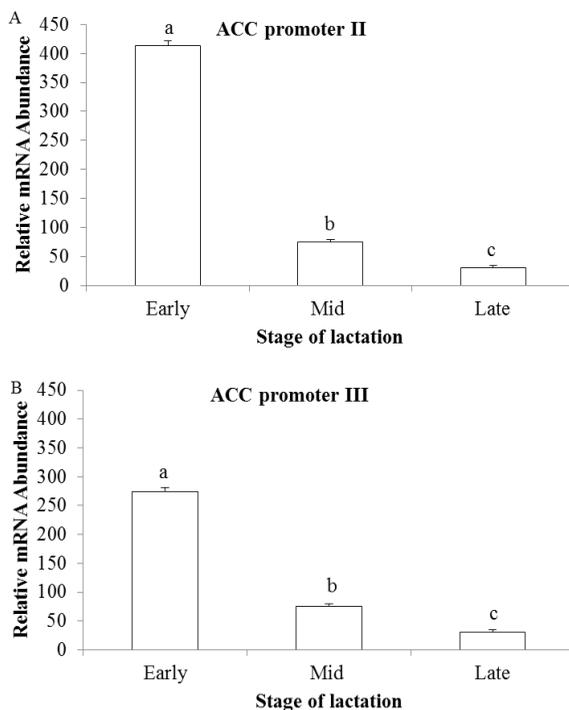


Figure 1 - Acetyl-CoA carboxylase α (ACC- α) transcripts from Promoter II (A) and III (B) in mammary tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different.

In adipose tissue there was a trend for modification of PI transcripts across lactation ($P=0.06$). The expression of PI transcripts was increased more than 30 fold between early and mid lactation ($P=0.02$). There were no changes in PII ($P=0.50$) and PIII ($P=0.70$) transcripts in adipose tissue across the three stages of lactation (Figure 2).

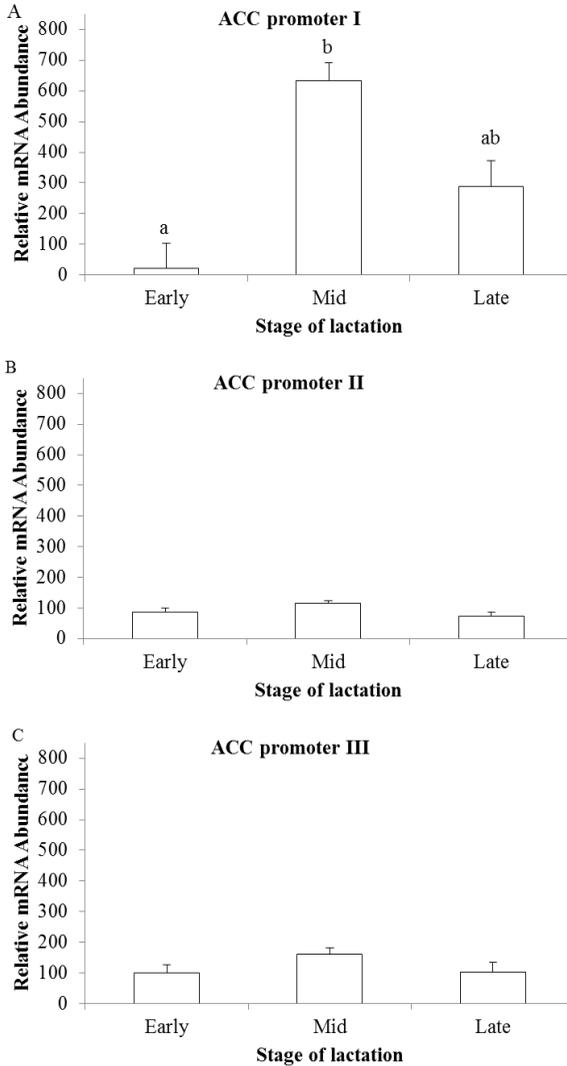


Figure 2 - Acetyl-CoA carboxylase α (ACC- α) transcripts from Promoter I (A), II (B) and III (C) in adipose tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different.

To further characterize lipogenesis the gene expression of FASN and SREBP1 were determined in mammary and adipose tissues and leptin only in adipose tissue. In mammary tissue SREBP1 was decreased 33% in late lactation compared to early lactation ($P=0.01$) and decreased 42% between mid to late lactation ($P=0.004$). In adipose tissue there was a trend for a ~3 fold increase in SREBP1 expression from mid to late stage (Figure 3; $P=0.09$).

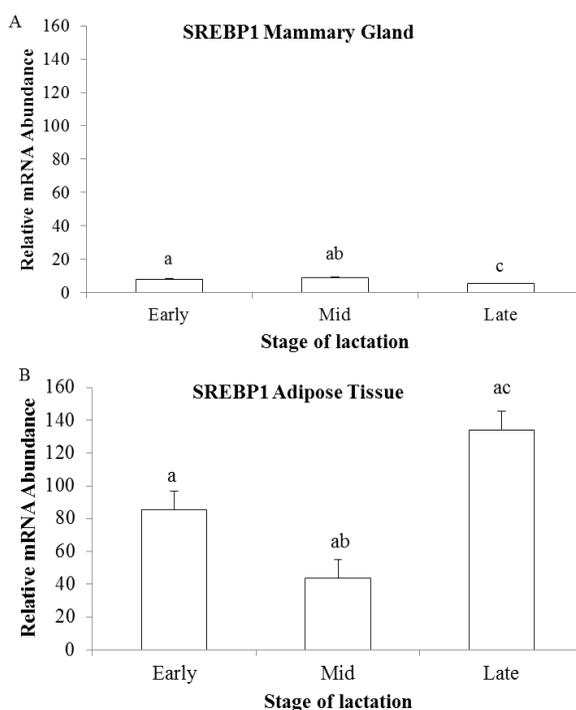


Figure 3 - Sterol regulatory element binding protein (SREBP1) in (A) mammary and (B) adipose tissues from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different.

The gene expression of FASN was reduced in mammary tissue as lactation progressed ($P=0.005$) and was,

respectively, decreased 54 and 83% in mid ($P=0.02$) and late ($P=0.001$) lactation compared to early lactation. Expression of FASN in adipose tissue increased ~ 4 fold between early to late lactation ($P=0.05$; Figure 4).

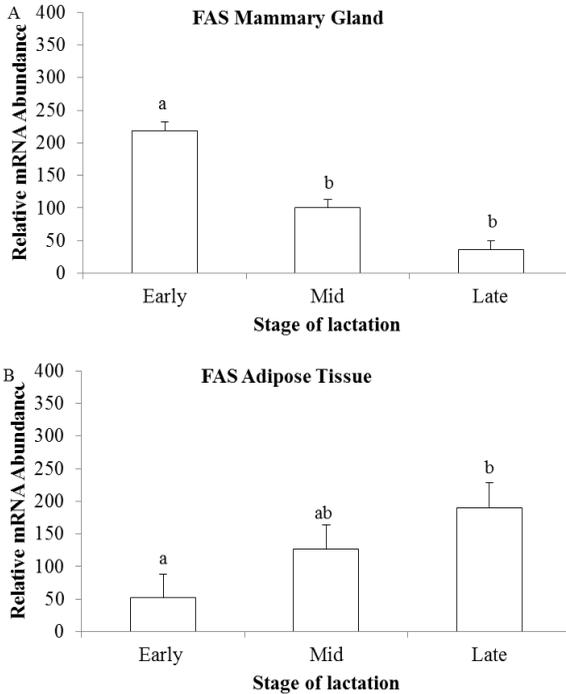


Figure 4 - Fatty acid synthase in mammary (A) and adipose (B) tissues from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different.

Expression of leptin was measured in adipose tissue and was ~6 fold higher in late lactation compared to early lactation ($P=0.01$; Figure 5).

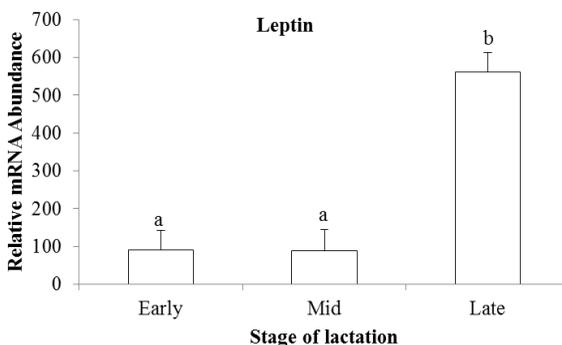


Figure 5 - Leptin in adipose tissue from lactating ewes at three stages of lactation (15, 70 and 120 days in milk). Standard error is indicated by error bars over each column. Means with different superscripts are significantly different.

3.5 DISCUSSION

In this study we used promoters-specific primers to measure the expression of ACC- α transcripts in mammary and adipose tissues at three stages of lactation representing different physiological states. The ACC- α transcripts from PI are thought to not be important for milk fat synthesis in sheep Molenaar et al. (2003) and in this study PI transcripts were below the level of detection in lactating mammary tissue corroborating the previous cited research.

The gene expression from PII of ACC- α is fairly ubiquitous in the body and Mao & Seyfert, (2002) reported increased expression of PII in lactating mammary tissue compared to non-lactating mammary tissue. It is clear that in mammary tissue the gene expression of the PII and PIII transcripts of ACC- α are highly stimulated in early stage of lactation (Figure 1). However, PII transcripts declined 12% more than PIII transcripts between early to mid stages suggesting that promoter II is more important than promoter III for milk fat synthesis at these stages of lactation.

The high gene expression of PII and PIII ACC- α transcripts in early lactation was expected as showed by the upregulation in early stages as described by Barber & Travers (1995), but the stimulus leading to a upregulation in the mammary gland seems to decrease with increased days in milk as showed by the decreased expression of lipogenic genes and the daily milk fat yield at late lactation stage. Interestingly, SREBP1 a known regulator of lipogenic process showed a similar gene expression pattern to the lipogenic genes (ACC- α and FASN) and milk fat yield.

The ACC- α PI transcript is primarily found in adipose tissue and its expression is nutritionally regulated (Lopez-Casillas et al. 1991). In the current experiment, the abundance of the PI transcript was lower in adipose tissue in early lactation, indicating reduced adipose lipogenesis and the priority of the mammary gland over adipose tissue, a very clear example of the concept of homeorhesis described by Bauman & Currie (1980) (Figure 2).

The SREBP1 act as a global regulator of the expression for many genes involved in lipid synthesis (Eberlé, et al. 2004), including ACC- α , FASN, and its expression was coordinately higher in mammary gland and lower in adipose tissue at early stages of lactation as expected to be the action of a regulator of those genes (Harvatine & Bauman, 2006). The SREBP1 may provide a mechanism for the coordinated upregulation of these genes to meet the increased metabolic requirement to milk fat synthesis at early stages of lactation and to replenishing body reserves at late stages.

The tissue specific regulation of ACC- α during lactation could be an adaptive strategy in response to different physiological demands required to the synthesis of fat in milk and/or in adipose tissue and this regulation may play a pivotal role in orchestrating the partitioning of nutrients between tissues (Travers & Barber, 2001). Transcription from different promoters (PI) and (PII; PIII), respectively, are necessary to

differentially regulate ACC- α in the adipocyte and mammary epithelial cells, respectively.

The FASN gene expression at early lactation was higher in mammary gland ~ 7 fold when compared with the late stage (Figure 4). In adipose tissue it was decreased in early stage increasing to late lactation as a result of the relocation of lipid synthesis showing the transcription regulation and the known changes in milk fat synthesis and also changes in lipid synthesis in adipose tissue.

According to an evolutive point of view, the coordinated change in lipid synthesis between mammary and adipose tissues can be explained by the animal energy status where at the beginning of lactation the priority is feed the offspring increasing the energy drain for milk production. As the lactation progress and the progeny is less maternal-dependent and the female is able to replenish the body store preparing for new lactation cycle. Corroborating that, we can see a higher milk and milk fat yield at the early stage of lactation and the increased gene expression of leptin at late stage (Figure 5) showing increasing of energy body stores.

To our knowledge, gene expression of ACC- α transcripts in mammary gland and adipose tissue in different stages of lactation in dairy ewes has not been previously reported. Our results show that first the nutrients are prioritized for milk fat synthesis in early/mid lactation through an increased mammary gene expression of ACC- α PII and PIII transcripts, FASN and SREBP1 and as the lactation progress are redirected toward adipose tissue replenishing body storage. This study provides insights into transcriptional regulation of milk fat synthesis through lactation in mammary and adipose tissues of lactating dairy ewes.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (grant nº 474094/2012-0 to D. E. Oliveira) for the financial support. The authors also would like to thank Mr. Paulo Gregianin manager of Pinheiro Seco farm. The assistance of Ana Povaluk, Mauricio Camêra, Camila Renneberg and Monica Urió were gratefully appreciated.

3.7 REFERENCES

- Ahima RS, Flier JS** 2000 Leptin. *Annual Review of Physiology* **62** 413–437
- AOAC** 2000 Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.) Gaithersburg MD, USA: AOAC
- Barber MC, Travers MT** 1995 Cloning and characterisation of multiple acetyl-CoA carboxylase transcripts in ovine adipose tissue. *Gene* **154** 271-275
- Barber MC, Travers MT** 1998 Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl-CoA carboxylase a with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. *Biochemistry Journal* **333** 17-25
- Bauman DE, Currie WB** 1980 Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *Journal of Dairy Science* **63** 1514-29
- Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM** 2006 Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions* **34** 223-227

- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fougelle F** 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86** 839-848
- Harvatine KJ, Bauman DE** 2006 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* **136** 2468-2474
- l'institut National de la Recherche Agronomique (INRA)**
2007 *Alimentation des bovines, ovins et caprins*. Éditions Quae, Versailles
- Lopez-Casillas F, Ponce-Castaneda MV, Kim KH** 1991 In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene. *Endocrinology* **129** 1049-1058
- Mao J, Seyfert H** 2002 Promoter II of the bovine acetyl coenzyme A carboxylase- α encoding gene is widely expressed and strongly active in different cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1576** 324-329
- Mellenberger RW, Bauman DE, Nelson DR** 1973 Metabolic adaptations during lactogenesis: fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. *Biochemistry Journal* **136** 741-748
- Molenaar A, Mao J, Oden K, Seyfert H** 2003 All three promoters of the acetyl-coenzyme-A carboxylase- α encoding gene are expressed in mammary epithelial cells of ruminants. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **51** 1073-1081

National Research Council (NRC) 2007 *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids* (1st ed.). National Academy Press, Washington, DC.

Smith S 1994 The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB Journal* **8** 1248-1259

Ticiani E, Urio M, Ferreira R, Harvatine KJ, De Oliveira DE 2016 Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase α isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal* **26** 1-7

Travers MT, Vernon RG, Barber MC 1997 Repression of the acetyl-CoA carboxylase gene in ovine adipose tissue during lactation: the role of insulin responsiveness. *Journal of Molecular Endocrinology* **19** 99-10

Travers MT, Barber MC 2001 Acetyl-CoA carboxylase- α : Gene structure-function relationships. *Journal of Animal Science* **79** 136-143

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A presente pesquisa permitiu a análise do comportamento dos transcritos de ACC- α e da FASN ao longo da lactação em diferentes tecidos, confirmando a hipótese de controle acurado de sua ação devido à heterogeneidade dos promotores. Contudo estudos subsequentes devem focar no perfil lipídico do leite para assim inferir a contribuição de cada uma das vias de síntese de gordura no leite e mensurar a expressão gênica de enzimas envolvidas na captação e secreção dos ácidos graxos mobilizados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. 2000. Leptin. **Annual Review of Physiology**, 2000, v. 62, p. 413–437.

AKERS, R. Michael. **Lactation and the mammary gland**. Ames: A Blackwell Publishing Company, 2002. 278 p.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLUZZI, M.N. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, 1998, v. 394, p. 790-793.

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

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

BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In. LARSON, B. L.; SMITH, V. R. **Lactation: A Comprehensive Treatise**. 2. ed. New York, NY: Academic, 1974, p. 31-75.

BAUMAN, D. E. *et al.* Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, 2006, v. 89, p. 1235-1243.

BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, 2001, v. 70, p. 15-29.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, 2003, v. 23, p. 203-227.

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

BROWNSEY, R. W. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Society Transactions**, 2006, v. 34, p. 223-227.

EBERLÉ, D. HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, 2004 v. 86, p. 839-848.

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

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

GARNSWORTHY, P. C. **Nutrition and lactation in the dairy cow**. Essex: Butterworths, 1988, 428 p.

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

HAJRI, T.; ABUMRAD, N.A. Fatty acid transport across membranes: Relevance to nutrition and metabolic pathology. **Annual Review of Nutrition**, 2002, v. 22, p. 383-415.

HORTON, J. D. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal of Clinical Investigation**. 2002, v.109, p. 1125-1131.

HUA, X., C. YOKOYAMA, J. WU, M. R. BRIGGS, M. S. BROWN, J. L. GOLDSTEIN, AND X. WANG. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1993, v. 90, p. 11603-11607.

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**, 2013, v. 96, p. 3825–3834.

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

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

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

LARSON, Bruce L. et al. **Lactation**. Ames: Iowa State University Press, 1985. 276 p.

LIESMAN, J.S.; EMERY, R.S.; AKERS, R.M.; TUCKER, H.A. Mammary lipoprotein lipase in plasma of cows after

parturition or prolactin infusion. **Lipids**, 1988, v. 23, p. 504–507.

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

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

MA, L. **Regulatory factors of milk fat synthesis in dairy cows**. 128 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Animal Science, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia, 2012.

MAO, J. MARCOS, S.; DAVIS, S. K.; BURZLAFF, J.; SEYFERT, H. M. Genomic distribution of three promoters of the bovine gene encoding acetyl-CoA carboxylase α and evidence that the nutritionally regulated promoter I contains a repressive element different from that in rat. **Biochemistry Journal**, 2001 v. 358, p. 127-135, 2001.

MAO, J.; SEYFERT, H. Promoter II of the bovine acetyl coenzyme A carboxylase- α encoding gene is widely expressed and strongly active in different cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2002, v. 1576, p. 324-329.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y., SAGAWA, N.; HOSODA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, H.; et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived

hormone in humans. **Nature Medicine**, 1997, v. 3, p. 1029-1033

McARTHUR, M. J. *et al.* Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1371-1383, 1999.

MELLENBERGER, R. W.; BAUMAN, D. E.; NELSON, D. R. Metabolic adaptations during lactogenesis: fatty acid and lactose synthesis in cow mammary tissue. **Biochemistry Journal**, 1973, v. 136, p. 741-748.

MIKKELSEN, J.; KNUDSEN, J. Acyl-CoA-binding protein from cow. Binding characteristics and cellular and tissue distribution. **Biochemical Journal**. 1987, v. 248, p. 709–714.

NEGRAO, André B.; LICINIO, Julio. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 2000, v. 44, p. 205-214.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

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

OTERO, M. LAGO, R.; LAGO, F.; CASANUEVA, F.F.; DIEGUEZ, C.; GÓMEZ-REINO, J.J.; GUALILLO, O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett**, 2004, v. 579, p. 295-301.

PALMQUIST, D. L. Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon advanced dairy chemistry, **Lipids**, v. 2, 2006.

RASMUSSEN, J.T.; BO'RCHERS, T.; KNUDSEN, J. Comparison of the binding affinities of acyl-CoA-binding protein and fatty-acid-binding protein for long-chain acyl-CoA esters. **Biochemical Journal**, 1990, v. 265, p. 849–855.

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

SUTTON, J.D. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. **Journal of Dairy Science**, 1985, v. 68, p. 3376-3393.

TRAVERS M. T.; VERNON R. G.; BARBER M. C. Repression of the acetyl-CoA carboxylase gene in ovine adipose tissue during lactation: the role of insulin responsiveness. **Journal of Molecular Endocrinology**, 1997, v. 19, p. 99–10.

TRAVERS, M. T.; VALLANCE, A.; GOURLAY, H. Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- α gene: an E-box motif at 114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes. **Biochemistry Journal**, 2001, v. 359, p. 273-28.

TRAVERS, M. T.; BARBER, M. C. Acetyl-CoA carboxylase- α : Gene structure-function relationships. **Journal of Animal Science**, 2001, v. 79, p. 136-143.

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

VEERKAMP, J.H.; PEETERS, R.A.; MAATMAN, R.G.H.J. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, v. 1081, p. 1–24.

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

VOET, Donald; VOET, Judith; PRATT, Charlotte W. *Fundamentos de bioquímica : a vida em nível molecular*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

WINZ, R.; HESS, D.; AEBERSOLD, R.; BROWNSEY, R.W. Unique structural features and differential phosphorylation of the 280-kDa component (isozyme) of rat liver acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, v. 20, p. 14438-14445.