

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/11/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES
ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE**

Gabriela Facholi Bomfim

Zootecnista

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES
ENTRE ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE**

Gabriela Facholi Bomfim

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Zootecnia**

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B713p Bomfim, GabrielaFacholi
Produção de leite em cabras Sannen:relações entre estresse, IGF-1 e apoptose / Gabriela Facholi Bomfim. -- Jaboticabal, 2016
xix, 78 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: João Alberto Negrão

Banca examinadora: Luís Felipe Prada e Silva, Lenira El Faro Zadra, Kênia Cardoso Bicego , Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes

Bibliografia

1. Cabra em Lactação. 2. Célula Epitelial Mamária. 3. Cortisol. 4. IGF-1 I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 637.12:636.39

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



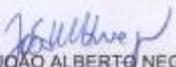
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

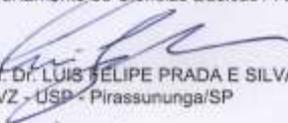
TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE

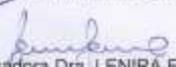
AUTORA: GABRIELA FACHOLI BOMFIM

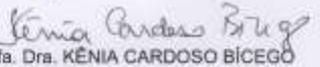
ORIENTADOR: JOÃO ALBERTO NEGRÃO

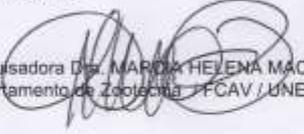
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO ALBERTO NEGRÃO
Departamento de Ciências Básicas / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. LUIS FELIPE PRADA E SILVA
FMVZ - USP - Pirassununga/SP


Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA
IZ - Sertãozinho/SP


Prof. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / SP


Pesquisadora Dra. MARIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIELA FACHOLI BOMFIM – nascida em 05 de Novembro de 1986 em Barra do Garças – MT, Brasil, filha de Maria Inês Facholi Bonfim e Hermelino Pereira Bonfim. Ingressou na Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Campo Grande/MS, no curso de graduação em Zootecnia em Agosto de 2004, concluindo-o em Agosto de 2008. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da PROAP (Pró-reitoria de assuntos comunitários e políticas): de Agosto de 2005 a Março 2008, sob orientação da Profa. Dra. Maria da Graça Moraes. Iniciou sua atividade profissional como supervisora da garantia da qualidade no frigorífico JBS/SA, de Outubro de 2008 a Junho de 2009. Foi bolsista de treinamento técnico do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, de Julho de 2009 a Fevereiro de 2010, sob orientação da Profa. Dra. Izabelle A. M. A. Teixeira. Iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Zootecnia na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP em Março de 2010, sendo bolsista em Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior: CAPES, sob orientação do Prof. Dr. João Alberto Negrão, obtendo o título de Mestre em Novembro de 2012. Ingressou no curso de doutorado pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal em Março de 2013 com bolsa no Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, sob orientação do Prof. Dr. João Alberto Negrão, submetendo-se a defesa da Tese em Setembro de 2016.

**“Para tudo o que for fazer na vida tenha Paciência, Fé que terá sua
Recompensa”.**

Livro de Jó

DEDICO

Aos meus pais, **Maria Inês Facholi Bonfim e Hermelino Pereira Bonfim**, pela confiança, apoio e ensinamentos durante todo meu caminho.

Ao meu companheiro de vida, **Tarley Araujo Barros**, por sempre estar ao meu lado nas horas boas e ruins, por sempre estar me mostrando o caminho a seguir e que diariamente me doa seu amor, carinho e respeito.

As minhas irmãs, **Graziely Facholi Bonfim, Gisele Facholi Bonfim e Thais Araújo Barros** pelo apoio, pelos momentos divertidos e pela torcida sempre.

Aos meus sobrinhos, **Felipe, Luisa e Rafaela** que são minha razão de sorrir.

A minha filha de coração **Duda** que me ensina a amar ao próximo sem ver a quem.

A minha querida e amada avó **Italina Itália Ferrari Facholi** que mesmo longe sempre orou por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo pela oportunidade e pelas conquistas até hoje me foram proporcionadas.

Agradeço a UNESP e a USP pela oportunidade em cursar o doutorado e em ceder o espaço para realização do meu experimento.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão pela oportunidade, pelos anos de convivência agradáveis e pelos ensinamentos.

Aos meus mestres de faculdade Gumerindo Lorian Franco, Charles Kiefer e Maria da Graça Moraes, pelos ensinamentos, direção e por confiarem em meu potencial.

A Prof. Dra. Izabelle A. M. A. Teixeira pela amizade, pelos ensinamentos, pelas broncas e pela convivência sempre agradável e divertida.

Aos professores que participaram da minha qualificação, Prof. Dra. Kênia Cardoso Bicego e Izabelle A. M. A. Teixeira, Prof. Dr. Renato Luís Furlane Mauro Dal Secco de Oliveira, pelos ensinamentos, pelos esclarecimentos e pelo direcionamento.

A técnica de laboratório Giovana Krempel Fonseca Merighepela parceria, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e pelas risadas.

Aos funcionários e estagiários do laboratório de fisiologia animal: Sandra Aparecida de Oliveira, Antonio Fernandes dos Santos Júnior (China), Fernando Carlos Rohwedder Filho, Iago Carraschi e Flávia Mallaco Moreira, obrigada pelo apoio, pela dedicação e pelos momentos agradáveis. Aos pós-graduandos Henrique Hooper e Priscila Silva pelo agradável convívio.

A minha querida sogra Ivone Maria Araujo que me apoiou durante todo esse momento conturbado me dando teto e momentos agradáveis.

A querida dona Maria Araújo pelos crochês, pelas conversas animadas e pelo todo carinho.

Aos meus cunhados queridos e amados Alan, Douglas e Adilson que sempre foram muito parceiros e divertidos e que aguentam minhas irmãs.

As tias e tio de consideração mais animados que alguém pode ter: Zélia, Sônia, Marlene, Nonô e Valter muito obrigada por sempre me animarem, apoiarem e me entenderem mesmo que nos momentos mais conturbados.

A minha família Facholi e Bomfim que sempre me apoiaram e me proporcionaram momentos agradáveis.

Aos meus amigos de infância Laís e Diego por sempre estarem disponíveis quando eu preciso e sempre me apoiarem.

Aos meus parceiros de faculdade Ibrahim, Marcela e Ricardo por sempre estarem por perto e pelas parcerias.

A querida Carolina Tobias por sempre me dar força e apoiar quando precisei.

Aos amigos de Pirassununga, Xibungo, Tais, Cadu, Frodo, Novilha, Nataly, Caio e a todos os outros que serem estiveram presentes e sempre nos divertimos muito.

As minhas queridas e amadas amigas de Jaboticabal Pomba e Mel que sempre estão comigo em todos os momentos e me proporcionam momentos muito divertidos. Ao Faiado que sempre foi um grande amigo e companheiro.

SUMÁRIO	Páginas
PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE	xiii
RESUMO	xiii
MILK PRODUCTION IN GOATS SAANEN: STRESS RELATIONS, IGF-1 AND APOPTOSIS	xiv
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 –Considerações Gerais.....	01
1.INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO GERAL	01
2.1 Objetivos específicos.....	02
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	02
3.1 Cabra leiteira.....	02
3.2 Glândula mamária.....	04
3.3 Ciclo lactacional.....	07
3.4 Células epiteliais e produção de leite.....	08
3.5 Qualidade do leite	09
3.6 Microbiologia e contagem das células somáticas (CCS).....	11
3.7 Importância do IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e seu receptor na glândula mamária.....	13
3.8 Proteínas ligantes ao IGF (IGFBPs).....	14
3.9 Apoptose e proliferação celular.....	17
3.10 Estresse animal e cortisol.....	19
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2 –Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais in vivo e in vitro aos 60 dias de lactação.....	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33

MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 3 - Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> no final da lactação.....	56
RESUMO.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS	59
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

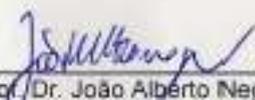
Pirassununga, 29 de agosto de 2009.

Assunto: Parecer da Comissão de Ética da FZEA.

A quem possa interessar,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa "Respostas Zootécnicas e Fisiológicas em cabras e cabritas Saanen submetidas a diferentes situações de manejo consideradas estressantes" coordenado pelos Docentes do Laboratório de Fisiologia Animal recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área de experimentação animal. Do este modo, a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA considerou-o **aprovado**.

Atenciosamente,



Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Ao Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA
Departamento de Ciências Básicas
FZEA/USP

SUMÁRIO DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de leite nas últimas 3 décadas no mundo e produção de leite mundial por espécies (FAO, 2015)..... 3
- Figura 2.** Composição da glândula mamária da cabra, adaptado de GENETICS, 2012..... 5
- Figura 3.** Estrutura interna da glândula mamária dando ênfase ao alvéolo e as células epiteliais responsáveis pela secreção do leite, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015..... 6
- Figura 4.** Estrutura interna do alvéolo e observação microscópica das células epiteliais, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015..... 6
- Figura 5.** Representação de 2 populações celulares. Os círculos brancos representam as populações iniciais de células, as novas células formadas por proliferação de células são representadas por círculos com sombreado ondulado, e as células que morrem durante este período são representadas por círculos pretos (CAPUCO et al., 2001). 9
- Figura 6.** Esquema que ilustra como o GH sintetiza o IGF-1 no estroma da glândula mamária (MARSHMAN e STREULI, 2002). 14
- Figura 7.** Esquema que demonstra a relação das IGFBPs com o IGF na matriz extracelular do alvéolo, bem como sua ação no receptor de IGF (JAMES BEATTIE et al., 2006) 16
- Figura 8.** Esquema ilustrando que as células do estroma originam IGF-1 e células epiteliais originam IGFBP-5, elas interagem para regular a função da célula epitelial mamária durante a lactação (BEATTIE et al., 2006). 17
- Figura 9.** Esquema da regulação da apoptose das células epiteliais mamárias, adaptado Zarzynska e Motyl, 2008. 18
- Figura 10.** Esquema ilustrando a ação do cortisol sobre a Bax na mitocôndria da célula epitelial e a ação do IGF-1 que mantém o balanço entre as proteínas Bax e Bcl-2 189
- Figura 11.** Esquema de como acontece e em que lugar ocorre a sinalização do cortisol quando um indivíduo é submetido ao estresse. 21

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Os maiores efetivos rebanhos caprino no mundo e sua participação no rebanho mundial de caprinos, 2014.....	4
Tabela 2. Composição do leite de diferentes espécies	11

PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE

RESUMO - O aumento da produção leiteira no início de lactação depende do número e capacidade de síntese das células epiteliais mamárias. Porém, alguns estudos indicam que a partir do pico da lactação, o processo de apoptose das células mamárias aumentam gradualmente até o final da lactação, reduzindo progressivamente o número de células epiteliais bem como sua capacidade de síntese de leite. Alguns estudos sugerem que as alterações metabólicas causadas pelo estresse durante a lactação, podem via ação do cortisol, intensificar o processo de apoptose na glândula mamária. Inicialmente presumimos que o cortisol reduz a liberação de IGF-1 (que tem sido visto como hormônio anti-apoptótico, prolongando assim a lactação) e acelera o processo apoptose das células epiteliais. Neste contexto, o estudo da liberação do cortisol e sua relação com o IGF-1 são ferramentas importantes para avaliar o efeito do estresse na apoptose das células mamárias durante a lactação. Ao estudar via respostas zootécnicas e fisiológicas a associação entre o cortisol e IGF-1 será possível entender as relações entre a apoptose e proliferação celular durante a lactação. Utilizando como modelo experimental cabras Saanen em lactação, esse projeto propõe estudar se o aumento de cortisol reduz a liberação de IGF-1 acelerando a apoptose das células epiteliais bem como, se o IGF-1 realmente possui efeito anti-apoptótico nas células epiteliais. Os estudos foram realizados *in vivo* (Experimento I) e *in vitro* (Experimento II). Para tanto, as cabras experimentais foram desafiadas via administração exógena de ACTH (estresse fisiológico padrão).

Palavras-chave: Cabra em Lactação, célula epitelial mamária, cortisol, IGF-1

MILK PRODUCTION IN GOATS SAANEN: STRESS RELATIONS, IGF-1 AND APOPTOSIS

ABSTRACT - The increase in milk production in early lactation depends on the number and capacity of synthesis of mammary epithelial cells. However, some studies indicate that from the peak of lactation the process of apoptosis of mammalian cells gradually increases until the end of the same progressively reducing the number of epithelial cells as well as their milk synthesis capability. Some studies suggest that the metabolic alterations caused by stress during lactation can via cortisol action to intensify the process of apoptosis in mammary gland. At first, we assume that cortisol reduces the release of IGF-1 (which has been seen as anti-apoptotic hormone, thus prolonging lactation) and accelerates the apoptosis of epithelial cells. In this context, the study of the release of cortisol and its relationship with the IGF-1 are important tools to evaluate the effect of stress on apoptosis of mammalian cells during lactation. By studying via zootechnical and physiological responses to the association between cortisol and IGF-1, it will be possible to understand the relationship between apoptosis and cell proliferation during lactation. Using an experimental Saanen goats lactating model, this project proposes to study the increase of cortisol reduces the release of IGF-1 accelerating the apoptosis of epithelial cells as well as IGF-1 actually has anti-apoptotic effect on epithelial cells, studies will be conducted in vivo (Experiment I) and in vitro (Experiment II). Therefore, the experimental goats will be challenged via exogenous administration of ACTH (standard physiological stress).

Keywords: Dairy goat, mammary epithelial cell, cortisol and IGF-1

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Embora boas práticas de criação tenham por objetivo propiciar o bem-estar dos animais (MORMEDE et al., 2007), algumas atividades de manejo (por exemplo: secagem, desmame, vacinação, vermifugação, pesagem, mudança de instalações, entre outros), podem ser consideradas estressantes, sendo inclusive associadas à redução da produtividade e à qualidade do leite (MAYER e LEFCOURT, 1987; MOBERG, 1987; MACUHOVA et al., 2002).

De fato, o aumento do metabolismo animal causado pelo estresse, aumenta a formação de células reativas de oxigênio e acelera o processo de oxidação de diferentes células (STEFANON et al., 2002; SU et al., 2002). Aparentemente, estas alterações resultantes do estresse são mediadas pela ação do cortisol, hormônio que acelera o metabolismo celular e aumenta a taxa de apoptose (HOUGH et al., 2015).

Atualmente postula-se que o IGF-1 protege as células epiteliais evitando sua apoptose (STEFANON et al., 2002; MURNEY et al., 2015). Alguns trabalhos demonstraram que o IGF-1 acelera a diferenciação e proliferação das células epiteliais mamárias (MCGRATH et al., 1991; ACCORSI et al., 2002; TE PAS et al., 2004). Além disso, o aumento dos níveis de IGF-1 durante o período seco aumentou significativamente a produção na lactação seguinte (FLINT et al., 2005).

Em seu conjunto, as informações anteriores permitem atestar que o IGF-1 pode reduzir o efeito do estresse sobre a apoptose das células epiteliais mamárias. Neste contexto, o estudo da liberação do cortisol e sua relação com o IGF-1 são ferramentas importantes para avaliar o efeito do estresse sobre a apoptose das células epiteliais mamárias e do IGF-1 sobre a proliferação das mesmas durante a lactação.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do cortisol sobre: o IGF-1, a proliferação e taxa de apoptose das células epiteliais mamárias de cabras.