

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**“Metabolismo e expressão gênica no fígado durante o período de transição de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir”**

Aluna: Juliana Guimarães Laguna

Belo Horizonte,  
2015

**Juliana Guimarães Laguna**

**“Metabolismo e expressão gênica no fígado durante o período de transição de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir”**

**Tese apresentada ao programa de pós graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.**

**Área: Produção Animal.**

**Orientador: Helton Mattana Saturnino.**

Belo Horizonte,  
Escola de Veterinária - UFMG  
2015

Laguna, Juliana Guimarães, 1982.

**Metabolismo e expressão gênica no fígado durante o período de transição de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir. – 2015.**

Orientador: Helton Mattana Saturnino  
Tese – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

**Tese defendida e aprovada em 25 de setembro de 2015 pela comissão examinadora  
composta por:**

---

**Helton Mattana Saturnino**  
**Orientador**

---

**Breno Mourão de Sousa**

---

**Cláudia Teixeira Guimarães**

---

**Renata Guerra de Sá**

---

**Ronaldo Braga Reis**



DEDICATÓRIA a todos  
que ajudaram na execução  
deste projeto.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG por ter financiado o projeto APQ-00558-13

À Fazenda Experimental Hélio Barbosa, por ter permitido o uso das vacas e instalações e ter podido contar com os colaboradores que atuam na fazenda.

À professora Santuza Maria Ribeiro Teixeira por acreditar no projeto por permitir o uso do Laboratório de Gênomica e Genética Molecular de Parasitos (ICB-UFMG) e pelos ensinamentos tanto práticos como teóricos relacionados à biologia molecular.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador por acreditar no projeto e por me orientar em todas as etapas.

À minha mãe, pai e irmãos pelo carinho.

À Juliana Aparecida Melo por me ajudar durante as biópsias realizadas na fazenda.

À Mariana Santos Cardoso por também me ensinar e ajudar em todos os procedimentos envolvendo a biologia molecular.

À todos que me ajudaram a executar o projeto e a realizar meu sonho.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>Resumo</b> .....	13
	<b>Abstract</b> .....	14
<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	15
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b> .....	16
<b>3.</b>	<b>Revisão de literatura</b> .....	16
<b>3.1.</b>	Período de transição.....	16
<b>3.2.</b>	Metabolismo hepático da glicose.....	18
<b>3.3.</b>	Etapas de controle da expressão dos genes em mamíferos.....	23
<b>1.3.1.</b>	Controle transcricional: características e importância dos promotores em eucariotos.....	24
<b>1.3.2.</b>	Alterações na estrutura da cromatina.....	27
<b>3.4.</b>	Metabolismo e expressão gênica no tecido hepático durante o período de transição.....	30
<b>3.5.</b>	Fatores de transcrição que são controladores da expressão gênica no fígado.....	33
<b>3.6.</b>	PPAR – ativador transcricional no tecido hepático de vacas leiteiras.....	36
<b>4.</b>	<b>Material e métodos</b> .....	39
<b>4.1.</b>	Dados do experimento.....	39
<b>4.2.</b>	Análises bromatológica.....	39
<b>4.3.</b>	Colheita de tecido hepático.....	40
<b>4.4.</b>	Extração e purificação do RNA.....	42
<b>1.4.1.</b>	Preparo do ambiente e homogeneização do tecido hepático.....	42
<b>1.4.2.</b>	Extração do RNA.....	43
<b>1.4.3.</b>	Análise da integridade e qualidade do RNA.....	44
<b>1.4.4.</b>	Tratamento do RNA com a DNase.....	45
<b>1.4.5.</b>	Síntese da fita de DNA complementar (cDNA).....	47
<b>1.4.6.</b>	Reação de polimerização em cadeia convencional.....	48
<b>1.4.7.</b>	Reação de polimerização de cadeia em tempo real (RT-PCR).....	49
<b>4.5.</b>	Parâmetros sanguíneos.....	50
<b>4.6.</b>	Análise da produção de leite e coleta de amostras para mensurar a composição..	51
<b>5.</b>	<b>Análise estatística</b> .....	51
<b>6.</b>	<b>Resultados e discussões</b> .....	52
<b>1.6.1.</b>	Produção e composição do leite.....	52
<b>1.6.2.</b>	Perfil metabólico.....	54
<b>1.6.3.</b>	Análise da expressão gênica: qualidade e integridade do RNA purificado do tecido hepático de vacas das raças Holandês e F1 Holandês-Gir.....	60
<b>1.6.4.</b>	Remoção do DNA nuclear.....	62
<b>1.6.5.</b>	Amplificação por RT-PCR e a curva de dissociação dos genes.....	64
<b>1.6.6.</b>	Genes que foram expressos no tecido hepático.....	70
<b>7.</b>	<b>Conclusões</b> .....	81
<b>8.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	82
<b>9.</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	82
<b>10.</b>	<b>Apêndice: Resultado estatístico</b> .....	99

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b>	Alguns genes controlados pelo hormônio insulina.....	32
<b>Tabela 2.</b>	Análises de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), Cinzas (CZ), Cálcio (Ca), Fósforo (P), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida para lactação (Mcal/kg) (ELI) da silagem de milho (SM) e do concentrado fornecido às vacas no pré e no pós parto.....	40
<b>Tabela 3.</b>	Composição de leite de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gira os 11°, 25°, 39°, 53° e 67° dias em lactação.....	54
<b>Tabela 4.</b>	Sequencia de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR, o número de acesso ao GenBank/EMBL, eficiência, correlação e o número de pares de bases dos produtos de PCR.....	68

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Ilustração do mecanismo da ativação da transcrição pelo PPAR. A formação do complexo co-ativador e sua ligação ao elemento PPRE situado acima do promotor de genes codificadores de enzimas do metabolismo de glicose resulta na ativação da expressão desses genes.....	37
<b>Figura 2.</b>	Figura adaptada do trabalho de Barros <i>et al.</i> , (2007) publicada na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	41
<b>Figura 3:</b>	Médias da produção de leite de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir aos 11°, 25°, 39°, 53° e 67° dias em lactação.....	53
<b>Figura 4.</b>	Concentrações médias de glicose no plasma de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir.....	55
<b>Figura 5.</b>	Concentrações médias de glicose no plasma de vacas da raça Holandês (H) ne F1 Holandês-Gir aos -15,+6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto.....	55
<b>Figura 6.</b>	Concentrações médias de betahidroxibutirato no plasma de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir aos -15,+6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir.....	56
<b>Figura 7.</b>	Concentrações médias de ácidos graxos não esterificados no plasma de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir aos -15,+6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir .....	57
<b>Figura 8.</b>	Foto das amostras de RNA total extraídas do fígado de vacas e analisadas por eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta. As bandas representativas dos RNAs ribossômicos indicadas no gel como rRNA 28S e 18S, mostram a boa qualidade do RNA purificado. As amostras nas canaletas 1, 2, 3 e 4 correspondem ao RNA total extraído das vacas da raça Holandês (440/1) e das F1 Holandês-Gir (2061/5, 2055/6 e 2055/1) e apresentam qualidades similares à de todas as amostras purificadas e que foram utilizadas no projeto.....	61
<b>Figura 9.</b>	Foto de fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose e corados com Syber-Safe após a amplificação por PCR convencional do cDNA obtido a partir de RNA extraído de vacas da raça Holandês (357/3, 440/6, 382/6 e 440/1) e F1 Holandês-Gir (2043/3 e 2054/4) com o par de primers para GADPH. As PCRs foram feitas com cada amostra incubada anteriormente na presença (+RT) ou na ausência (-RT) da enzima transcriptase reversa (RT). A ausência de banda nas canaletas correspondentes as amostras sem RT indica que o RNA utilizado não estava contaminado com DNA nuclear. Figura que representa todas as amostras utilizadas neste projeto.....	64

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 10.** Figura que representa a padronização da reação de RT-PCR em tempo real. Diluição em série das amostras de cDNA da vaca F1 Holandês-Gir (2055/5) obtida após a extração do RNA total do tecido hepático. O nível de fluorescência computado para cada amostra é suficiente para atingir um limiar (traço horizontal) de detecção igual para cada *primers*/amostra testado e a reação de amplificação é realizada de forma exponencial, portanto observa-se que a cada diluição do cDNA, o número de ciclos (Ct) aumenta uma vez. A emissão de luz será proporcional a quantidade de produto gerado em cada tubo da reação. Nesta figura foi utilizado o *primer* do gene G6PC, a qual está representando todas as diluições feitas com os diferentes *primers* dos genes-alvo testados neste projeto..... 67
- Figura 11.** Figura que determina a curva de dissociação ou “melting” na reação de RT-PCR em tempo real da amostra de cDNA da vaca F1 Holandês-Gir (2055/5) obtida após a extração do RNA total do tecido hepático. Nesta figura foi utilizado o *primer* do gene G6PC, a qual está representando todas as amostras testadas neste projeto..... 69
- Figura 12.** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) da enzima glicose 6-fosfatase (G6PC) aos -15, +6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir ..... 71
- Figura 13.** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) do fator de transcrição, receptor peroxissomo proliferador ativador alfa (PPARA) aos -15, +6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir ..... 72
- Figura 14.** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) do gene da enzima metilmalonil Coa mutase (MUT) aos -15, +6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir ..... 76
- Figura 15.** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) do gene da enzima metilmalonil Coa mutase (MUT) entre as vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir..... 77
- Figura 16.** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) para o gene SLC2A2 (transportador de glicose-Glut2) aos -15, +6, +21, +36, +51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir..... 79

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AGV</b>	Ácidos graxos voláteis
<b>ACACA</b>	Acetil-Coa Carboxilase
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AGNE</b>	Ácidos graxos não esterificados
<b>BHBA</b>	Betahidroxibutirato
<b>CMS</b>	Consumo de matéria seca
<b>CPT1B</b>	Carnitina palmitoiltransferase-1B
<b>CPT2</b>	Carnitina palmitoiltransferase-2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FBPase-1</b>	Frutose-1,6-bifosfatase-1
<b>FBPase-2</b>	Frutose-1,6-bifosfatase-2
<b>G6PC</b>	Glicose-6-fosfatase
<b>Glut2</b>	Transportador de glicose
<b>HMGCR</b>	3-hidroxi-metilglutaril-Coa redutase
<b>HMGs1</b>	3-hidroxi-metilglutaril-Coa sintase 1
<b>HMGs2</b>	3-hidroxi-metilglutaril-Coa sintase 2
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>MUT</b>	Metilmalonil-Coa Mutase
<b>Pb</b>	Pare de bases
<b>PC</b>	Piruvato Carboxilase
<b>PCCA</b>	Propionil-Coa-Carboxilase
<b>PDV</b>	Visceras drenadas pelo sistema porta hepático
<b>PEPCKc</b>	Fosfoenolcarboxiquinase citosólica
<b>PEPCKm</b>	Fosfoenolcarboxiquinase mitocondrial
<b>PFK-1</b>	Fosfofrutoquinase-1
<b>PFK-2</b>	Fosfofrutoquinase-2
<b>PPARA</b>	Receptor peroxissomo proliferador alfa
<b>PPRE</b>	Peroxisome proliferador response element
<b>RNA</b>	Ácido rebonucleico
<b>RXR</b>	Rceptor do ácido retinóico
<b>SLC2A2</b>	Transportador de glicose

## **Metabolismo e expressão gênica no fígado durante o período de transição de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir**

### **RESUMO**

Os objetivos desta pesquisa foram os de avaliar a expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos; a expressão gênica do principal transportador de glicose no fígado e a expressão gênica de um fator de transcrição envolvido no controle da expressão gênica de enzimas envolvidas nos metabolismos de carboidrato no tecido hepático e as concentrações dos metabólitos glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e betahidroxibutirato (BHBA) no sangue de vacas da raça Holandês (n=6) e F1 Holandês-Gir (n=6) submetidas ao mesmo manejo no pré- e no pós-parto. Amostras de tecido hepático e de sangue foram colhidas 15 dias pré-parto e aos 6, 21, 36, 51 e 66 dias de lactação. A produção de leite e amostras para avaliar a composição do leite foram colhidas aos 11°, 25°, 39°, 53° e 67° dias da lactação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. A concentração de glicose diferiu entre os grupos genéticos, mas não diferiu durante o período de transição. As concentrações de BHBA e AGNE no sangue não diferiram entre os grupos genéticos. As concentrações de glicose não diferiram durante o período analisado. Entretanto, do pré para o pós parto, as concentrações de BHBA aumentaram até 21 dias da lactação nas vacas da raça Holandês e até 6 dias em lactação nas vacas F1. As concentrações de AGNE aumentaram até 06 dias da lactação na vacas da raça Holandês e até 21 dias da lactação nas vacas F1. As concentrações de AGNE reduziram do dia 6 até o dia 66 da lactação nas vacas da raça Holandês e do dia 21 até o dia 66 da lactação nas vacas F1. A expressão dos genes glucose-6-fosfatase (G6PC), receptor proliferador de perossimo alfa (PPARA) e do transportador de glicose (Glut2) não diferiram entre os grupos genéticos porém o nível do gene G6PC reduziu ao comparar o nível pré-parto com 21 e/ou 36 dias de lactação, bem como ao comparar 36 com 51 e 66 dias. Para o gene MUT, os níveis de mRNA diferiram quando comparou-se os grupos genéticos e ao comparar 21 e 36 dias com 51 dias em lactação. Este estudo revelou que as vias metabólicas estão diretamente relacionadas ao mérito genético. A partir destas observações, a comparação dos genes diferencialmente expressos entre os animais parece uma abordagem promissora para desvendar a resposta molecular influenciada pelas concentrações de metabólitos sanguíneos.

**Palavras chaves:** expressão gênica, grupo genético, metabolismo, F1 Holandês x Gir

## **Metabolism and Gene expression in the liver during transition period of cows Holstein and F1 Holstein-Gir**

### **ABSTRACT**

The aim of the search was to investigate hepatic gene expression of enzymes involved on carbohydrate metabolism (glucose-6- phosphatase (G6PC), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA), glucose transporter (Glut2) and methylmalonyl-CoA mutase (MUT)) and blood concentrations of glucose, non-esterified fatty acid (NEFA) e beta-hydroxybutyric acid (BHBA). For the study, Holsteins cows (n=6) and F1 Holstein x Gir Cows (n=6), under the same pre and postpartum management conditions were used. Liver biopsies samples (to measure G6PC, PPARA, GLUT2 and MUT gene expression) and blood samples (to measure glucose, NEFA and BHBA concentrations), were taken at 15 days pre and at 6, 21, 36, 51 e 66 postpartum. Milk production and milk samples (to evaluate milk composition) were taken at 11°, 25°, 39°, 53° and 67° days of lactation. The experimental design was a completely randomized. Glucose concentration was differed between genetic groups, but it was not differed during transition period. BHBA and NEFA concentrations did not differ between genetic groups. The glucose concentration did not differ during the study. However, concentrations of BHBA and NEFA increased from prepartum to 06 days in milk in the Holstein cows, and to 21 days in milk in the F1 cows. The blood NEFA concentrations reduced from 6 to 51 days and from 21 to 66 days of lactation in Holstein and F1 cows, respectively. The expression of genes G6PC, PPARA and the Glut2 did not differ between genetic groups, but G6PC gene reduced when comparing the pre delivery with 21 and/or 36 days of lactation and 36 vs. 51 and 66 days of lactation. For the MUT gene, mRNA levels differed when compared to the genetic groups and at 21 and 36 days compared with 51 days in milk. This study revealed that specific metabolic pathways are directly related to genetic merit. Starting from these observations, the comparison of differentially expressed genes among animals seems a promising approach to unravel molecular response influenced by blood metabolite concentrations.

**Keywords:** gene expression, genetic group, metabolism, F1 Holstein x Gir

## 1. INTRODUÇÃO

A concretização do projeto do genoma humano em 2003 marcou uma nova era de estudos biológicos, os quais foram baseados nas características genômicas resultando em informações complexas que podem revolucionar, por exemplo, a agropecuária. A aplicação da tecnologia molecular possibilitou estudos avançados e conhecimento mais detalhado dos mecanismos fisiológicos dos animais, dos vegetais e dos micro-organismos (Dawson, 2006). Segundo Garrick *et al.*, (2012), o sequenciamento do genoma de espécies de animais de interesse zootécnico permitiu que houvesse maiores informações sobre a localização dos genes nos cromossomos, como também a localização de polimorfismos como os polimorfismos de uma única base ou “Single Nucleotide Polimorfism (SNP)”, e assim identificar genes que causam variações sobre a produção animal.

A genômica nutricional é o estudo sobre a interação entre nutriente-gene e o efeito desta interação. Fatores da dieta e relacionados às interações metabólicas tem efeitos diretos e indiretos, influenciando a regulação e a expressão de genes específicos (efeitos da nutrigenômica). Esta regulação parece ser no nível transcricional e/ou pós transcricional, controlando a produção ou a estabilidade nas células do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) (Walker e Blackburn, 2004).

Alterações genéticas provocando mutações, rearranjo e/ou alterações no número de cópias dos transcritos, podem ocorrer devido a influência dos componentes da dieta (efeitos da nutrigenética), os quais influenciam nas concentrações dos metabólitos circulantes e, conseqüentemente, no metabolismo (Walker e Blackburn, 2004).

Nos últimos 25 anos muitos foram os progressos na área da nutrição animal devido ao conhecimento do metabolismo que ocorre nos órgãos, tecidos, células, a nível molecular e das possíveis influências da genética, do ambiente, da dieta e da fase fisiológica em que os animais se encontram. Assim, embora o conhecimento ainda esteja longe do ideal ou pleno, existem informações que podem ser seguidas com o objetivo de melhorar o desempenho e o entendimento do metabolismo. A aplicação das técnicas de biologia molecular, por exemplo, para o melhor entendimento do metabolismo, resulta na identificação das

condições nas quais ocorre a síntese de várias cópias de mRNA, o qual conduz a síntese de proteínas necessárias para os processos fisiológicos. Embora, os estudos no campo da biologia molecular estejam bem avançados, os estudos da nutrigenômica ainda estão em crescimento (Drackley *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

Com isso, os objetivos desta pesquisa foram os de avaliar no tecido hepático de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir no pré e no pós-parto:

- 1) A produção e os componentes do leite nos dois grupos genéticos;
- 2) As concentrações dos metabólitos glicose, ácidos graxos não esterificados e betahidroxibutirato;
- 3) A expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos;
- 4) A expressão gênica do principal transportador de glicose no fígado;
- 5) A expressão gênica de um fator de transcrição envolvido no controle da expressão gênica de enzimas envolvidas nos metabolismos de carboidrato e lipídeo;

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Período de transição**

O período de transição corresponde ao período de 21 dias antes do parto até 21 dias após o parto (Drackley, 1999), durante o qual ocorrem várias alterações hormonais, metabólicas e imunológica que interferem nos processos fisiológicos da vaca (Van Dorland *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo em que estas alterações estão ocorrendo, a ingestão de alimentos nos últimos dias do pré-parto reduz em aproximadamente 50%, alcançando o ponto mais baixo um dia antes das vacas parirem. Após o parto, o consumo de alimentos começa a aumentar, no entanto, não é o suficiente para suprir as exigências nutricionais para o aumento rápido da produção de leite (Grummer, 1993). Então, as vacas leiteiras entram em balanço energético negativo durante as primeiras quatro a oito semanas (Bauman e Currie, 1980) e

precisam utilizar as reservas de energia corporal para suprir essas exigências (Grummer, 1993 e Drackey, 1999).

A mobilização das reservas corporais tem como objetivo compensar o balanço energético negativo (Grummer, 1993). Assim, devido ao aumento da mobilização das reservas corporais, o ácido graxo não esterificado (AGNE) antes na corrente sanguínea chega ao fígado em grandes concentrações, podendo seguir vários destinos, como: 1- ser convertido em lipídeos, ocasionando o fígado gorduroso; 2- ser oxidado gerando acetil-Coa, o qual posteriormente fornecerá energia ou o excesso de acetil-Coa pode gerar os corpos cetônicos (acetoacetato ou betahidroxibutirato - BHBA), os quais também podem ser utilizados como fonte de energia para outros tecidos ou se acumular ocasionando cetose (Church, 1993, Duffield *et al.*, 2003, 2008 e Lehninger, 2014). Segundo Van Dorland *et al.*, (2009), após o parto as concentrações de AGNE e BHBA aumentaram e a de glicose reduziu. Este complexo sistema de adaptação ocorre gradualmente e pode diferir consideravelmente entre vacas.

Os ruminantes são capazes de utilizar os ácidos graxos voláteis (AGV), tais como acetato, propionato e butirato, os quais são produtos finais da fermentação ruminal, como fonte de energia (Church, 1993 e Kozloski, 2002). O propionato, por exemplo, é o maior precursor de glicose (Larson e Smith, 1974), e a glicose, por sua vez, é a maior fonte de energia para os tecidos, tais como o fígado e o cérebro (Lehninger, 2014).

Durante o início da lactação e com o balanço energético negativo, a vaca entra em um estado insulino-resistente (insensibilidade em relação à ação da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo), ou seja, a concentração de glicose e insulina no sangue reduz, aumentando a oxidação dos ácidos graxos pelos tecidos e reduzem a remoção da glicose pelos hepatócitos, por exemplo. Este estágio fisiológico permite que a glicose circulante seja removida eficientemente pela glândula mamária para a síntese de lactose, proteínas e gordura (Butler *et al.*, 2003 e Hayirli, 2006).

Na tentativa de melhorar o balanço energético nesta fase, alguns autores recomendam maximizar o consumo de energia no pré-parto (Curtis *et al.*, 1985 e Grummer, 1995), porém muitos grupos de pesquisas vem divulgando que a superalimentação nesta fase poderia ter efeito negativo para o metabolismo (Grummer, 1995). Reduzir o consumo seria negativo devido ao aumento de AGNE circulante durante o período de transição, provocado pela intensa mobilização das reservas corporais, causando o fígado gorduroso e/ou cetose. Porém, estudos vêm sugerindo que avaliar o escore da condição corporal (ECC) pode não ser uma adequada ferramenta para avaliar a alimentação sobre o metabolismo da vaca no período de transição (Drackley *et al.*, 1999 e Dann *et al.*, 2006). A insulina e as mudanças no tecido adiposo, por exemplo, em resposta a este hormônio, podem ser a chave para o conhecimento destas alterações no metabolismo de energia em vacas leiteiras.

O glucagon e a insulina são hormônios liberados pelo pâncreas e essenciais para o metabolismo animal em geral, bem como no período de transição (Velez e Donkin, 2005). Nos ruminantes, o glucagon aumenta a síntese de glicose hepática, como também aumenta a oxidação dos ácidos graxos e a síntese de corpos cetônicos. Já a insulina, remove a glicose para os tecidos extra hepático (Brockman, 1979, Gross *et al.*, 2013). Ambos são hormônios importantes no controle e na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de energia, pois a insulina, por exemplo, pode influenciar as atividades das enzimas pela fosforilação e/ou desfosforilação e também inibir ou estimular a expressão de genes (Lehninger, 2014).

### **3.2. Metabolismo hepático da glicose**

O fígado tem um papel central no processamento, na distribuição e no abastecimento de todos os outros órgãos e tecidos com nutrientes via corrente sanguínea. Durante a digestão, três classes principais de nutrientes (carboidratos, proteínas) sofrem hidrólise enzimática em seus constituintes mais simples. A veia porta é uma via direta dos órgãos digestivos para o fígado, por isso, é o primeiro órgão a ter acesso aos nutrientes digeridos. Nele há dois tipos celulares principais, as células de Kupffer, que são importantes na função imunológica e os hepatócitos, que são de maior interesse nos estudos sobre metabolismo,

pois transformam os nutrientes da dieta em combustíveis e precursores necessários para outros tecidos (Lehninger, 2014).

O tipo e a quantidade de nutrientes fornecidos para o fígado variam devido a diversos fatores, incluindo a dieta e o intervalo das refeições. Quando a dieta fornecida aos animais é rica em proteína, os hepatócitos se abastecem com altas concentrações de enzimas para o catabolismo dos aminoácidos e para a gliconeogênese. Algumas horas após uma mudança para dietas ricas em carboidratos, as concentrações destas enzimas começam a reduzir e os hepatócitos aumentam a síntese de enzimas essenciais para o metabolismo de carboidratos. As enzimas hepáticas apresentam uma taxa de renovação de 5 a 10 vezes maior que a de outros tecidos (Bauman e Currie, 1980 e Reynolds, 2003).

O fígado tem grande flexibilidade metabólica (Van Dorland *et al.*, 2009 e Graber *et al.*, 2010), pois nesta fase as citoquinas produzem proteínas, como a proteína reativa C (CRP) e a haptoglobina (HP), as quais competem com a síntese de proteínas essenciais ao fígado, como enzimas, carreadores, albuminas e lipoproteínas, prejudicando as funções hepáticas, principalmente quando o órgão está sobrecarregado metabolicamente (Bertoni *et al.*, 2008 e Trevisi e Bertoni, 2008).

O tecido hepático também é capaz de armazenar energia na forma de polímeros de glicose, o glicogênio, o qual é estimulado pelos hormônios reguladores (insulina ou glucagon) a ser formado ou a ser degradado. Assim, quando a concentração de glicose aumenta na corrente sanguínea, a concentração de insulina também aumenta. Agindo por meio de receptores na membrana plasmática no tecido hepático, a insulina ativa a glicogênio-sintase e inativa a glicogênio fosforilase, de modo que grande parte da glicose-6-fosfato é canalizada para formar o glicogênio. Já a concentração do glucagon aumenta quando baixa a concentração de glicose sanguínea. Isto estimula a degradação do glicogênio hepático por ativar a glicogênio fosforilase e inativar a glicogênio-sintase (Bucher e Swaffield, 1975 e Lehninger, 2014). Em ruminantes, a glicose disponível é dependente da gliconeogênese no fígado e de nutrientes gliconeogênicos como: ácido propiônico, aminoácidos glicogênicos e ácido láctico (Danfaer *et al.*, 1994).

Devido às alterações fisiológicas e metabólicas que ocorrem nas vacas durante o período de transição, o fígado e os tecidos esplânicos (trato gastrointestinal, baço, pâncreas e as gorduras do mesentério e omento), os quais são drenados pelo sistema porta (PDV), também passam por transformações que alteram a absorção dos nutrientes (Reynolds *et al.*, 1988a e b; Reynolds *et al.*, 2003 e Doepel *et al.*, 2009).

Reynolds *et al.*, (2003) estudaram o metabolismo das vísceras drenadas pelo sistema porta e do fígado de vacas da raça Holandês durante o período de transição e concluíram que o fluxo sanguíneo em litros/hora aumentou na veia porta, no fígado e na artéria hepática do pré para o pós parto sendo significativamente maior após os 21 dias do que aos 11 dias de lactação. No mesmo estudo os autores observaram aumento no consumo de matéria seca, na concentração arterial dos metabólitos glicose, lactato, BHBA, glicerol, valerato e dos AGVs e na produção de leite durante o avançar da lactação até os 33 dias após o parto. O aumento no fluxo sanguíneo hepático foi de 36% nos estudos conduzidos por Doepel *et al.*, (2009) durante a fase de transição, no entanto, os autores concluíram que a concentração arterial dos aminoácidos foi menor no pós que no pré parto, possivelmente devido à redução na remoção hepática dos aminoácidos no pós parto com o objetivo de preservá-los para suprir a demanda da síntese de proteína no leite.

Quase todos os metabólitos mencionados foram absorvidos pelo fígado e utilizados, exceto parte dos aminoácidos no pós-parto, pois foram direcionados a outros tecidos (Doepel *et al.*, 2009 e Reynolds *et al.*, 2003). Reynolds *et al.*, (2003) concluíram que as concentrações de lactato e glicerol reduziram e a de glicose aumentou no fluxo sanguíneo para os demais tecidos no pós-parto em relação ao pré-parto, pois o propionato, o lactato e o glicerol contribuíram com 57,6; 15,6 e 1,5% para formar toda a glicose liberada quando as vacas estavam aos 33 dias de lactação.

A remoção pelo fígado dos ácidos graxos propionato, butirato e valerato que chegaram pela artéria foi 94,5; 85,6 14,9%, respectivamente aos 33 dias de lactação, confirmando que esses são utilizados e não são liberados para outros tecidos. Porém, o acetato aumentou de concentração no fluxo hepático durante a lactação (Reynolds *et al.*, 1988 a e b). Existe

produção líquida de acetato no tecido hepático e na PDV, pois este metabólito representa importante fonte de carbono oxidável disponível como fonte de energia para outros tecidos, poupando a glicose para a glândula mamária (Reynolds *et al.*, 1888b).

As principais enzimas envolvidas na gliconeogênese são a piruvato carboxilase e a fosfoenolcarboxiquinase citosólica ou mitocondrial. Após o parto estas aumentam a atividade e estimulam a produção de glicose (Velez e Donkin, 2005 e Van Dorland *et al.*, 2009). A reação de gliconeogênese utiliza várias das enzimas que atuam na glicólise, porém não é simplesmente o seu reverso. Sete reações glicolíticas são livremente reversíveis, atuando também na gliconeogênese. No entanto, três reações da glicólise são tão exergônicas que são essencialmente irreversíveis, tais como: a reação catalisada pela hexoquinase IV, fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e pela piruvato quinase. A reação inversa é catalisada pelas enzimas regulatórias glicose-6-fosfatase, frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e pela piruvato carboxilase.

Para formar a glicose, o fosfoenolpiruvato precisa passar por duas etapas diferentes, pois não pode ser realizada pela reação contrária utilizando a enzima piruvato quinase. Assim, as fosforilações das reações ocorrem em dois compartimentos diferentes das células, (citosol e mitocôndria). Primeiramente, o piruvato é transportado do citosol para a mitocôndria, onde ao receber um carbono pela enzima piruvato carboxilase, primeira enzima regulatória da reação, sendo convertido em oxaloacetato. O oxaloacetato é então, convertido em malato pela malato desidrogenase mitocondrial, sendo removido para o citosol. No citosol, o malato é reoxidado pela reação inversa formando um novo oxaloacetato pela enzima malato desidrogenase citosólica. Este novo oxaloacetato é convertido em fosfoenolpiruvato pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica, por uma reação de descarboxilação, formando o fosfoenolpiruvato que seguirá na reação de síntese de glicose. Quando na reação o lactato é utilizado, este é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase no citosol e seguirá as mesmas etapas descritas anteriormente, porém, a formação do fosfoenolpiruvato ocorre diretamente do oxaloacetato e dentro da mitocôndria (Greenbaum *et al.*, 1971 e Lehninger, 2014).

O segundo ponto de controle entre as reações de glicólise/gliconeogênese é a conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato, a qual é catalisada pela enzima FBPase-1 que é fortemente inibida (alostericamente) pela concentração de adenina monofosfato (AMP). Quando o suprimento de adenina trifosfato (ATP) da célula é baixo, a síntese de glicose é reduzida, pois a enzima precisa de ATP para a reação ocorrer. Esta reação é coordenada reciprocamente (Greenbaum, *et al.*, 1971 e Lehninger, 2014).

A regulação hormonal (insulina ou glucagon) da glicólise/gliconeogênese é mediada pelo metabólito frutose-2,6-bifosfato, o qual é um efetor alostérico das enzimas PFK-1 e FBPase-1. Quando este metabólito se liga ao sítio alostérico da PFK-1, aumenta a afinidade desta enzima pelo substrato frutose-6-fosfato, fosforilando o carbono 1 e formando a frutose-1,6-bifosfato. A atividade da PFK-1 é praticamente inativa na ausência da frutose-2,6-bifosfato, porém, na enzima FBPase-1 o efeito é oposto, o qual reduz a afinidade desta enzima pelo substrato, reduzindo a gliconeogênese. A concentração celular do regulador alostérico frutose-2,6-bifosfato é ajustado pelas taxas relativas de sua formação e degradação. A frutose-2,6-bifosfato é formada pela fosforilação da frutose-6-fosfato, catalisada pela fosfofrutoquinase-2 (PFK-2) e é degradada pela frutose-2,6-bifosfatase (FBPase-2). Estas enzimas são distintas da PFK-1 e a PBPase-1, as quais catalisam, respectivamente, a síntese e a degradação da frutose-1,6-bifosfato. O equilíbrio das duas atividades no fígado determina a concentração celular da frutose-2,6-bifosfato, a qual é regulada pelos hormônios glucagon e insulina (Greenbaum *et al.*, 1971 e Lehninger, 2014).

O glucagon estimula a adenil-ciclase no fígado a sintetizar o AMP cíclico (AMPc) à partir do ATP. O AMP cíclico ativa a proteína-quinase dependente de AMPc, a qual transfere um grupo fosforil do ATP para a proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2. A fosforilação desta proteína aumenta a atividade de FBPase-2 e inibe a atividade de PFK-2. Desta forma, o glucagon reduz a concentração celular da frutose-2,6-bifosfato inibindo a glicólise e estimulando a gliconeogênese. A insulina faz o efeito oposto, estimulando a atividade de uma fosfoproteína-fosfatase que catalisa a remoção do grupo fosforil da proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2, ativando a PFK-2, aumentando a concentração da frutose-2,6-bifosfato, estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese. O último ponto de

regulação do metabolismo da glicose é catalisado pelas enzimas hexoquinase IV e glicose-6-fosfatase, as quais são ativadas conforme a necessidade (Lehninger, 2014).

No hepatócito, a via metabólica do ácido propiônico é essencial para vacas leiteiras, pois é a maneira mais comum para produzir glicose. Quando o ácido propiônico é absorvido pelas paredes ruminais, entra na via porta-hepática e chega ao fígado, onde no hepatócito é carboxilado para formar o metilmalonil-Coa, o qual entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) formando o succinil-Coa pela enzima metilmalonil-Coa mutase (Larson e Smtih, 1974, Kozloski, 2002 e Rigout *et al.*, 2003). Do succinil-Coa, por algumas reações, o malato é formado e ao sair da mitocôndria segue os caminhos já descritos nas reações da gliconeogênese (Kozloski, 2002 e Lehninger, 2014).

A glicose é removida do hepatócito pelo transportador de glicose (GLUT2), o qual é tão eficiente que a concentração deste açúcar em um hepatócito é essencialmente a mesma daquela no sangue, pois o fígado tem a função de manter a homeostasia da glicose sanguínea enquanto o músculo e glândula mamária a consome (Danfaer *et al.*, 1994 e Zhao *et al.*, 2007).

### **3.3. Etapas de controle da expressão dos genes em mamíferos**

O ácido desoxirribonucléico (DNA) presente no núcleo das células codifica todas as moléculas de ácido ribonucléico (RNA) e, com isto, a expressão gênica sempre ocorre quando uma sequência de nucleotídeos presente na molécula de DNA é transcrita em uma molécula de mRNA (Lehninger, 2014). O DNA genômico não direciona a síntese protéica diretamente, mas utiliza o RNA como uma molécula intermediária. Assim, quando a célula necessita de uma proteína específica, a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA de um cromossomo é primeiramente copiada sob a forma de mRNA (transcrição). O transcrito formado é utilizado como molde para que, posteriormente, ocorra a síntese de proteína (tradução) (Alberts *et al.*, 2008).

Os transcritos em mamíferos, após serem sintetizados, são submetidos a uma série de etapas de processamento no núcleo, antes que o mesmo saia deste núcleo, bem como alguns pontos de controle que influenciam a expressão de um certo gene. A transcrição e a tradução são os meios, pelos quais as células leem, ou expressam, as informações gênicas. Como muitas cópias idênticas de RNA podem ser produzidas a partir do mesmo gene, muitas moléculas de proteínas podem ser formadas, dependendo da necessidade celular. Assim, a transcrição e a tradução podem ser eficientes, permitindo que a célula produza enormes quantidades de certas proteínas e mínimas quantidades de outras (Alberts *et al.*, 2008).

A expressão de um gene pode ser alterada em resposta a sinais extracelulares, como por exemplo, quando o fígado é exposto ao hormônio insulina ou glucagon (Alberts *et al.*, 2008 e Lehninger, 2014) ou aos metabólitos, glicose, AGNE e BHBA, podendo aumentar ou reduzir a expressão de vários genes e, conseqüentemente, a produção de proteínas, as quais estão envolvidas no metabolismo dos mesmos (Van Dorland *et al.*, 2009 e Li *et al.*, 2012). Ao longo da evolução, os organismos adquiriram muitos mecanismos regulatórios para a manutenção da homeostasia sobre as concentrações moleculares, celulares e do organismo (Lehninger, 2014). A concentração de uma proteína é determinada por um delicado equilíbrio entre sete processos, cada um com seus vários pontos potenciais de regulação, que são:

- 1- Síntese do transcrito primário e RNA (transcrição);
- 2- Modificação pós-transcricional do mRNA e transporte núcleo/citoplasma;
- 3- Degradação do mRNA;
- 4- Síntese da proteína (tradução);
- 5- Silenciamento gênico;
- 6- Modificação pós-traducional das proteínas;
- 7- Transporte proteico e endereçamento;
- 8- Degradação proteica.

### **1.3.1. Controle transcricional: características e importância dos promotores em eucariotos**

A iniciação da transcrição é o ponto fundamental na regulação da expressão gênica. Primeiramente, a RNA polimerase II eucariótica se liga ao DNA e inicia o processo de transcrição junto aos promotores. Neste momento, a regulação do início da transcrição ocorre devido a mudanças no modo pelo qual a RNA-polimerase interage com o promotor. As sequências nucleotídicas dos promotores são variadas e podem afetar a afinidade entre a ligação da RNA polimerase II e o promotor, alterando a frequência de iniciação da transcrição (Smale e Kadonaga, 2003; Kodonga, 2004).

Muitos promotores contêm as sequências TATA Box e INR (iniciador) como padrão. Para que haja sucesso no processo de transcrição a ligação da enzima RNA-polimerase II precisa reconhecer o promotor, entretanto, normalmente é necessária a ação de outras proteínas, como os: ativadores da transcrição, os quais se ligam às sequências regulatórias na região 5' do gene, facilitando o processo. Muitos ativadores podem se ligar em posições distantes do promotor da sequência TATA Box e isto ocorre, quando é formada uma ALÇA com o DNA, para que o complexo de proteínas possa interagir diretamente. A formação destas alças é promovida por certas proteínas não histônicas, que são abundantes na cromatina e se ligam de modo não específico ao DNA (Alberts *et al.*, 2008; Smale e Kadonaga, 2003; Kodonga, 2004).

Ocorre também, participação de proteínas de modificação e remodelagem da cromatina, dos coativadores, que atuam como intermediários entre os ativadores da transcrição e o complexo da polimerase II, da proteína de ligação TBP, a qual é o primeiro componente que se liga ao complexo de pré-iniciação (PIC) no promotor eucarioto e dos fatores de transcrição basais (TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIF; RNA-polimerase II e a TFIIA) (Kodonga, 2004).

A ligação do ativador pode deslocar gradativamente alguns nucleossomos, facilitando o processo. Desse modo, um ativador ligado pode mover outros componentes necessários

para uma remodelagem maior na cromatina, permitindo a transcrição de genes específicos. Os ativadores ligados interagem com o complexo mediador, que consiste de 20, 30 ou mais polipeptídios, o qual proporciona a ligação com a TBP (TFIID) e depois ao fator TFIIB, seguido pelos outros fatores de transcrição basal mais a RNA-polimerase II (Serfling et. al 1985, Alberts et al. 2008 e Kadonaga, 2004).

Ativadores da transcrição, tipicamente, possuem um domínio estrutural distinto para a ligação específica no DNA e um ou mais domínios adicionais para a ativação transcricional ou para interações com outras proteínas reguladoras. A interação de proteínas reguladoras é mediada, muitas vezes, por domínios contendo zíperes de leucina ou hélice-alça-hélice. A SP1, por exemplo, é um ativador da transcrição para um grande número de genes. Seu sítio de ligação ao DNA, um GC Box (sequência consenso GGGCGG), geralmente se localiza próxima ao TATA Box. O domínio de ligação ao DNA, na proteína SP1, está próximo da porção carboxiterminal e contém 3 dedos de zinco. As SP1, funcionam na ativação e são notáveis pelo fato de que 25% de seus resíduos de aminoácidos serem glicina (Serfling et. al 1985, Pedersen et. al 1999, Smale e Kadonaga, 2003 e Lehninger, 2014) .

O fator 1 de transcrição de ligação à CCAAT (CTF1) pertence à família dos ativadores transcricionais que ligam a sequência chamada de sítio CCAAT (sequência consenso é TGGN6GCCAA, em que N é qualquer nucleotídeo). O domínio de ligação entre o DNA e o fator CTF1, contém muitos resíduos de aminoácidos básicos, sendo rico em prolina, não possui hélice-volta-hélice, nem dedo de zinco e seu mecanismo de ligação ao DNA ainda não está claro.

Pelo menos três tipos de proteínas interferem regulando a iniciação da transcrição pela RNA-polimerase: os fatores de especificidade, pois alteram a especificidade da RNA-polimerase por um dado promotor ou conjunto de promotores. Os repressores, os quais impedem o acesso da RNA-polimerase ao promotor, enquanto os ativadores facilitam. Os repressores se ligam a um local específico no DNA. Em células bacterianas, estes locais são chamados de operadores (operons) que estão próximos ao promotor. Já em eucariotos, não existem sequências específicas, no entanto, a regulação é mediada por uma proteína

repressora que bloqueia a transcrição, sendo o processo chamado de regulação negativa. Uma ligação do repressor ao DNA é regulada por sinais moleculares (efetores), que geralmente são pequenas moléculas ou proteínas que se ligam ao repressor e causam uma mudança conformacional. Em alguns casos, a mudança conformacional resulta na dissociação do repressor ligado ao DNA. Nesta condição, a iniciação pode prosseguir desimpedida e em outros casos, a interação pode fazer com que o repressor se ligue a uma sequência, inibindo a reunião ou a atividade do complexo de transcrição junto ao promotor. Em células eucariotas, o sítio de ligação do repressor pode estar distante do promotor (Serfling *et al.*, 1985; Pedersen *et al.*, 1999; Smale e Kadonaga, 2003).

Os controles da iniciação da transcrição gênica são as formas predominantes de regulação na maioria dos genes. Existem, porém outras formas de controles que podem atuar adiante até formar as proteínas, com o objetivo de modelar a quantidade de produto gênico que será produzido (Serfling *et al.*, 1985; Pedersen *et al.*, 1999; Smale e Kadonaga, 2003; Kodonga, 2004 e Lehninger, 2014). Esses são mecanismos de controle pós-transcricionais e podem atuar regulando os níveis de mRNA por meio de proteínas e pequenos RNAs (microRNAs) que afetam a estabilidade e/ou a tradução dos transcritos de um gene. Apesar de também importantes, esses mecanismo, entretanto, não serão tratados nessa Tese.

### **1.3.2. Alterações na estrutura da cromatina**

Em células de mamíferos, os acessos aos promotores são restringidos pela estrutura da cromatina. Portanto, a ativação da transcrição está associada a muitas mudanças sobre a estrutura da cromatina.

Várias formas de cromatina podem ser encontradas ao longo dos cromossomos. Cerca de 10% da cromatina em uma célula está na forma condensada, ou seja, mais compactada, na forma de heterocromatina, a qual é transcricionalmente inativa, por estar associada a estruturas cromossômicas, como os centrômeros. O restante, menos condensada está na forma mais ativa (eucromatina). A transcrição de um gene é fortemente reprimida quando o DNA está condensado dentro da heterocromatina. As regiões de cromossomos ativos são

caracterizadas não apenas por uma estrutura da cromatina mais relaxada, mas também pela presença dos nucleossomos com composição e modificações peculiares. A cromatina transcricionalmente ativa tende a ser deficiente em histona H1, a qual tem a função de se ligar ao DNA (Rose e Klose, 2014; Moreno *et al.*, 2015).

As histonas dentro da cromatina ativa diferem daquelas da heterocromatina, devido aos padrões de modificações covalentes. As histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4), as quais são proteínas que estão fortemente envolvidas com a estrutura do DNA, são modificadas por metilação nos resíduos de lisina ou arginina, fosforilação nos resíduos de serina ou treonina ou por acetilação ou ubiquitinação. Cada uma das histonas centrais possui dois domínios estruturais distintos. Um domínio central está envolvido na interação histona-histona e no enrolamento do DNA ao redor do nucleossomo. Já o segundo, o domínio aminoterminal, é rico em lisina e está posicionado próximo ao exterior das partículas dos nucleossomos. As modificações covalentes ocorrem em resíduos específicos, concentrados na região do domínio aminoterminal. As modificações associadas à ativação transcricional, (metilação e acetilação), são reconhecidas por enzimas que tornam a cromatina mais acessível aos mecanismos de transcrição (Kadonaga, 1998; Feng e Shen, 2014; Rose e Klose, 2014; Moreno *et al.*, 2015).

As mudanças na estrutura da cromatina associadas à transcrição são chamadas de remodelagem da cromatina. A remodelagem pode envolver enzimas, as quais promovem modificações covalentes nas histonas do nucleossomo, podem utilizar a energia química do ATP para reposicionar os nucleossomos no DNA ou podem alterar a composição das histonas. A acetilação e a metilação das histonas aparecem nos processos que ativam a cromatina para a transcrição. Os domínios aminoterminais das histonas centrais são ricos em resíduos de lisina e arginina. Durante a transcrição, a histona H3 é metilada (por metilases) na lisina4 próximo à extremidade 5' da região codificadora e na lisina36 ao longo da região codificadora. Estas metilações facilitam as ligações entre a histona-acetiltransferases (HATs), a qual é capaz de acetilar resíduos específicos de lisina. HATs citosólicas (tipo B) acetilam histonas recentemente sintetizadas, antes que sejam importadas

para o núcleo (Kadonaga, 1998; Alberts *et al.*, 2008; Feng e Shen, 2014; Moreno *et al.*, 2015).

Nas regiões onde a cromatina está sendo ativada, as histonas nucleossômicas são adicionalmente acetiladas pelas HATs nucleases (tipo A). A acetilação de múltiplos resíduos de lisina nos domínios aminoterminais das histonas H3 e H4 pode reduzir a afinidade de todo o nucleossomo pelo DNA. A acetilação de determinados resíduos de lisina é fundamental para que ocorra a interação entre os nucleossomos e outras proteínas. Quando a transcrição de um gene não é mais necessária, a extensão da acetilação nos nucleossomos é reduzida pela atividade da enzima histona-desacetilase (HDAC), a qual promove o silenciamento gênico, restaurando a cromatina para o estado transcricionalmente inativo (Kadonaga, 1998; Alberts *et al.*, 2008).

Há cinco famílias conhecidas dos complexos de enzimas que movem ou deslocam-se nos nucleossomos ativos, hidrolisando o ATP. Três delas são importantes para a ativação transcricional. Por exemplo, o complexo SWI/SNF contém 6 polipeptídeos centrais, que juntos, remodelam a cromatina, de modo que os nucleossomos ficam mais irregularmente espaçados e propiciam a ligação dos fatores de transcrição. Neste complexo inclui um componente chamado de bromodomínio, perto da porção carboxiterminal da subunidade ATPasica, a qual interage com as histonas acetiladas. O SWI/SNF não é necessário para a transcrição de todos os genes. Outro complexo é o NURF, o qual é capaz de remodelar a cromatina de forma a complementar, e até sobrepor à atividade da SWI/SNF. Esses dois complexos enzimáticos são cruciais na preparação da cromatina para a transcrição ativa (Alberts *et al.*, 2008).

Estima-se que 5 a 10% da capacidade codificante do genoma de mamíferos são dedicados à síntese de proteínas de regulação gênica, estando presente em menos do que 0,01% do total das proteínas nas células. A maioria reconhece a sequência específica no DNA, já outras se associam primeiro a outras proteínas que se ligam ao DNA. Devido ao número de genes nos eucariotos e a complexidade da regulação, tem sido difícil formular regras simples que se apliquem a todas as formas de regulação. Porém, há algumas generalizações a respeito

de como as proteínas, uma vez ligadas ao DNA, controlam a taxa de transcrição (Kadonaga, 1998; Alberts *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2015).

### **3.4. Metabolismo e expressão gênica no tecido hepático durante o período de transição**

Muitos podem ser os genes expressos no fígado durante o período de transição, principalmente aqueles envolvendo genes codificadores de enzimas dos metabolismos de carboidratos, lipídeos e proteínas (Van Dorland *et al.*, 2009; Graber *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2011e Weber *et al.*, 2013b).

Graber *et al.*, (2010) fizeram um estudo sobre a expressão gênica das enzimas fosfoenolcarboxiquinase citosólica (PEPCK-C), fosfoenolcarboxiquinase mitocondrial (PEPCK-M), piruvato carboxilase (PC), glicose-6-fosfatase (G6PC), propionil-coa carboxilase (PCCA), carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1B) e 2 (CPT2), acetil-Coa carboxilase (ACACA), 3-hidrox-3-metilglutaril-Coa redutase (HMGCR) e HMGCS1 e 2, argininosuccinato sintetase (ASS1) e a ornitina transcarbamilase (OTC), as quais estão envolvidas no metabolismo hepático, incluindo a gliconeogênese,  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, síntese de ácidos graxos, colesterol e triglicérides, cetogênese e enzimas do ciclo da ureia no tecido hepático de vacas da raça Holandês sem diagnóstico de doenças metabólicas, recebendo a mesma dieta. Neste estudo coletou-se tecido hepático utilizando-se biópsia aos 21 dias do pré-parto e aos 30 e 91 dias do pós-parto. Os autores concluíram que os níveis dos transcritos de todas as enzimas avaliadas foram baixas antes do parto, porém, aumentaram significativamente após o parto. Entretanto, foram maiores os transcritos das enzimas envolvidas na gliconeogênese, na  $\beta$ -oxidação e as do ciclo da ureia aos 30 dias do parto que aos 91 dias. Já os níveis de mRNA das enzimas envolvidas no anabolismo dos ácidos graxos e dos triglicérides mostraram-se reduzidos aos 30 dias e aumentada aos 91 dias do pós parto.

Utilizando vacas da raça Holandês e durante o período de transição, Van Dorland *et al.*, (2009) também encontraram aumento significativo para os genes PEPCK-C, PEPCK-M, CPT1B, CPT2, HMGCS1 e HMGCS2 após parto e concluíram que este aumento foi

influenciado pelas concentrações sanguíneas dos metabólitos BHBA, AGNE, insulina e pelo fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I), os quais também aumentaram após o parto, enquanto a concentração de glicose reduziu. O aumento no número de transcritos foi maior quando as vacas tinham a concentração de BHBA no sangue menor que 75mmol/L no sangue quando comparado ao grupo de vacas com concentrações maiores. White et al. (2012) observaram aumento sobre os níveis de mRNA do gene PC e do PEPCK-C após o parto em relação ao pré-parto, porém, ao compararem as vacas especializadas da raça Holandês norte americanas e as vacas menos produtivas da Nova Zelândia suplementadas com concentrado a base de amido, não observaram diferença significativa. Segundo aos autores, a falta de significância entre os resultados foram devido as semelhantes alterações metabólicas e hormonais entre os grupos genéticos.

No trabalho de Velez e Donkin, (2005), vacas que se alimentaram à vontade por cinco dias, depois sofreram restrição alimentar em 50% do que consumiam por mais cinco dias e por fim foram realimentadas por 10 dias consecutivos, segundo o recomendado pelo NRC, (2001), tiveram maior quantidade dos transcritos de mRNA para a enzima PC e nenhuma alteração sobre a concentração de mRNA dos genes das enzimas PEPCK-C e PEPCK-M, as quais são o ponto chave para a gliconeogênese. Ao induzirem a hipoglicemia em vacas leiteiras por 48 horas, Kreipe et al. (2011) relataram que as concentrações de glicose e BHBA reduziram, enquanto o hormônio insulina aumentou. A baixa concentração de glicose e a alta concentração de insulina afetaram a expressão do gene PEPCK-M, aumentando-o.

A insulina pode influenciar as atividades das enzimas pela fosforilação e/ou desfosforilação e também inibir ou estimular a expressão de genes (Lehninger, 2014). O gene G6P reduziu, enquanto os genes PEPCK-C e PC, envolvidos na gliconeogênese e os genes das enzimas, ácido graxo sintase (FASN), CPT2, HMGCS2, envolvidos no metabolismo dos lipídeos não alteraram quando a concentração de insulina aumentou (She et al. 1999 e Kreipe et al. 2011). A tabela 1 demonstra alguns os genes que são controlados pela insulina.

**Tabela 1:** Alguns genes controlados pelo hormônio insulina.

<b>Alteração na expressão gênica</b>	<b>Via</b>
<b>Expressão aumentada</b>	
Hexoquinase II	Glicólise
Hexoquinase IV	Glicólise
Fosfofrutoquinase-1 (PFK-1)	Glicólise
Piruvato-quinase	Glicólise
PFK-2/FBPase-2	Regulação glicólise/gliconeogênese
Glicose-6-fosfato-desidrogenase	Via das pentoses-fosfato (NADPH)
6-fosfogliconato-desidrogenase	Via das pentoses-fosfato (NADPH)
Piruvato desidrogenase	Síntese dos ácidos graxos
Acetil-coa-carboxilase	Síntese dos ácidos graxos
ATP citrato-liase	Síntese dos ácidos graxos (fornece acetil-coa)
Complexo sintase de ácidos graxos	Síntese dos ácidos graxos
Esteroil-coa-desidrogenase	Insaturação dos ácidos graxos
Acil-coa-glicerol transferases	Síntese de triacilglicerol
<b>Expressão reduzida</b>	
PEP carboxiquinase	Gliconeogênese
Glicose-6-fosfatase	Glicose liberada para o sangue

Fonte: Adaptado Lehninger, (2014).

Distúrbios metabólicos que podem acontecer durante o período de transição, podem aumentar o anabolismo dos lipídeos no fígado de vacas (Bode *et al.*, 2004) que ao se acumularem podem causar o fígado gorduroso e/ou cetose, os quais estão associados ao excesso de mobilização de gordura (Gruffat *et al.*, 1997). Ao chegarem nos hepatócitos, os ácidos graxos acumulam-se devido ao aumento na síntese de triglicerídeos e o acúmulo altera a estrutura e as funções do fígado ou aumenta a concentração de BHBA circulante (Grummer, 1993). Concentrações no sangue maiores que 1,2 mmol/L de BHBA, glicose menor que 2,5 mmol/L e AGNE maior que 500 µmol/L, em vacas que possuem sinais de cetose, segundo Li *et al.*, (2012), foram determinantes em influenciar os níveis dos transcritos HMC GS1, CPTB1 e CPT2, sendo menores do que em vacas com a concentração de BHBA menor que 0,60 mmol/L, glicose maior que 3,75 mmol/L e AGNE menor que 400 µmol/L. Ao se comparar o tecido hepático de vacas saudáveis com as em estado de cetose, Loo *et al.*, (2007) observaram aumento nos níveis de mRNA das enzimas envolvidas na síntese de corpos cetônicos e colesterol pelos hepatócitos, acúmulo de gordura no tecido e redução na gliconeogênese e na glicólise. Entretanto esses autores também relataram que o

processo de fosforilação oxidativa foi o mais prejudicado durante o estado de cetose em relação às vacas sem o distúrbio metabólico, pois ocorreu redução na síntese de ubiquinona, que é um importante transportador de elétrons durante a fosforilação oxidativa, reação que realiza a síntese de ATP (Adenosina trifosfato) (Lehninger, 2014).

Baixa ou alta concentração de gordura no tecido hepático foi quantificada por análise feita após biópsia em vacas multíparas com produção superior a 10000 kg em uma lactação, recebendo uma dieta à base de silagem de milho, feno e concentrado. Schaff *et al.*, (2012) encontraram níveis menores de mRNA dos genes envolvidos no transporte de lipídeos, metabolismo de oxidação dos ácidos graxos, aminoácidos, no TCA, na cadeia respiratória e no metabolismo de carboidrato quando a porcentagem de gordura no tecido hepático foi maior.

Durante o período de transição de vacas da raça Holandês que receberam o mesmo manejo e consumiram a mesma dieta, Weber *et al.*, (2013b) coletaram tecido hepático por biópsia aos 56 e 15 dias antes do parto e ao 1°, 14°, 28° e 49° dias após o parto e separaram as vacas em 3 grupos, que foram determinados pelo acúmulo de gordura no tecido hepático, ou seja, no primeiro grupo o acúmulo médio foi de 159 mg/g, o segundo 250mg/g e o terceiro de 351 mg/g na matéria seca do tecido. Os autores concluíram que todos os genes quantificados envolvidos no metabolismo de carboidratos, tais como PC, PEPCK-C, PEPCK-M, G6PC e a PCCA aumentaram do pré-parto para o pós-parto. Porém, à medida que aumentou o acúmulo de gordura no tecido, somente o mRNA dos genes da PC, PEPCK-M e PEPCK-C reduziram, enquanto os outros não diferiram.

### **3.5. Fatores de transcrição que são controladores da expressão gênica no fígado**

A ativação de um fator de transcrição, às vezes, é o resultado de sua interação com um ligante específico ou de sua fosforilação ou desfosforilação. Cada gene é controlado por um ou mais elementos de resposta, os quais são reconhecidos por fatores de transcrição específicos. Alguns genes têm vários elementos de resposta e por isso são controlados por vários fatores de transcrição diferentes. Grupos de genes que codificam proteínas que

atuam em conjunto, como as enzimas da glicólise/gliconeogênese, frequentemente compartilham sequências de elementos de resposta comuns, de modo que um único sinal, agindo por meio de um determinado fator de transcrição, ativa ou reprime todos os genes em conjunto (Lehninger, 2014 e Weake e Workman, 2010).

O SREBP-1 é um fator de transcrição expresso no fígado, o qual é membro da família das proteínas de ligação ao elemento de resposta aos esteróis. Ativa a síntese da piruvato-quinase, hexoquinase IV, lipase lipoproteica, acetil-Coa-carboxiquinase e o complexo de reações que envolvem a enzima ácido graxo sintase, o qual converte a acetil-Coa em ácidos graxos para o armazenamento nos adipócitos. A síntese da SREBP-1, por exemplo, é estimulada pela insulina, inibida pelo glucagon e regula a expressão de várias enzimas gliconeogênicas, tais como a glicose-6-fosfatase, fosfoenolcarboxiquinase e a frutose-1,6-bifosfatase (Haas *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2014).

O fator de transcrição CREB (proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc) ativa a síntese da glicose-6-fosfatase e da fosfoenolcarboxiquinase em resposta ao aumento na concentração de AMPc, desencadeado pelo glucagon. Em contraste, a inativação de outros fatores de transcrição, estimulada pela insulina, inibe a síntese de várias enzimas gliconeogênicas no fígado, tais como a fosfoenolcarboxiquinase, frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase (Wen *et al.*, 2015).

Já o fator de transcrição ChREBP (proteína de ligação do elemento de resposta aos carboidratos) é um importante fator do metabolismo de carboidratos, o qual coordena a síntese de enzimas necessárias na síntese de carboidratos e gorduras. Em seu estado inativo, é fosforilada e se localiza no citosol. Quando a fosfoproteína-fosfatase (PP2A) remove o grupo fosforil do fator, este pode entrar no núcleo, onde uma PP2A nuclear remove outro grupo fosforil, permitindo que o fator se ligue a proteína (MLx), assim ativando a síntese de várias enzimas, tais como a piruvato-quinase, ácido graxo-sintase e acetil-Coa-carboxilase. A xilulose-5-fosfato, a qual é um metabólito intermediário da via da pentose-fosfato, controla a atividade da PP2A. A PP2A desfosforila a ChREBP, permitindo a ativação dos

genes das enzimas da glicólise e da síntese de gorduras (Dentin *et al.*, 2006 e Denechaud *et al.*, 2008).

A regulação dos genes que codificam as enzimas do metabolismo dos carboidratos e das gorduras vem a ser muito complexa e mais refinada do que descrito. Múltiplos fatores de transcrição podem agir sobre um mesmo promotor, múltiplas proteína-quinases e fosfatases podem ativar ou inativar estes fatores. Grande variedade de fatores acessórios protéicos, também podem modular as atividades dos fatores de transcrição. Esta complexidade pode ser vista, por exemplo, no gene que codifica a fosfoenolcarboxiquinase, pois na região promotora tem mais de 15 elementos de resposta que são reconhecidos por pelo menos, uma dúzia de fatores de transcrição. Assim agem em associação sobre a região promotora, e em centenas de outros promotores, para regular de forma exata as concentrações de centenas de enzimas metabólicas, coordenando suas atividades no metabolismo dos carboidratos e das gorduras (Lehninger, 2014).

As proteínas de uma família de fatores de transcrição ativadores, os receptores ativadores por proliferadores de peroxissomos (PPARs) respondem às alterações na composição das dietas, levando a mudanças sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo de gordura e de carboidratos (Basu-Modak, 1999). Esses fatores são:

O PPAR $\gamma$  - é expresso principalmente no fígado e no tecido adiposo, esta envolvido na ativação de genes necessários para a diferenciação de fibroblastos em adipócitos e de genes que codificam proteínas necessárias para síntese e armazenamento de lipídeos nos adipócitos.

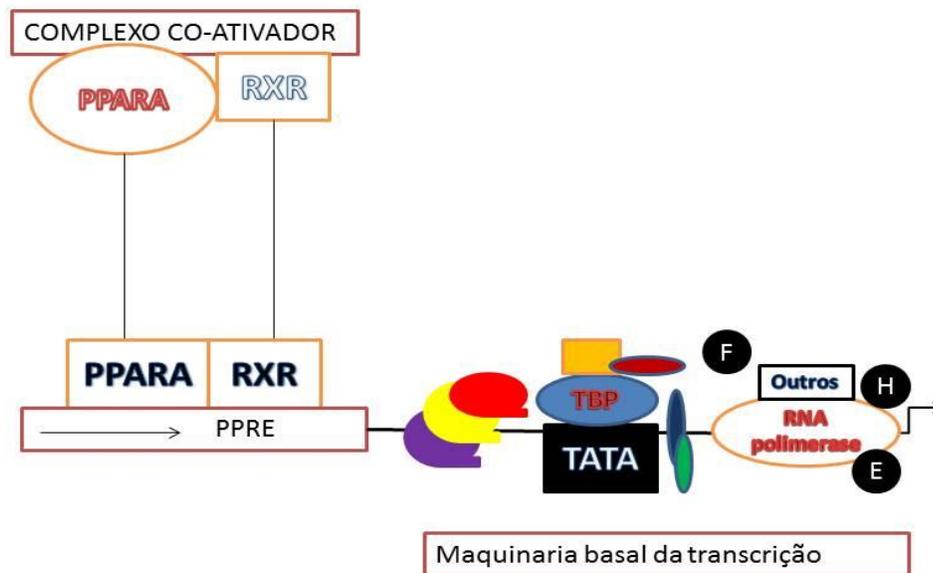
O PPAR $\alpha$  - é expresso no fígado, rins, coração, tecido adiposo marrom e no músculo esquelético. Os ligantes que ativam este fator incluem os eicosanóides e aos ácidos graxos livres. Nos hepatócitos ativam os genes necessários para a captação, para a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e a formação dos corpos cetônicos durante o jejum.

O PPAR $\delta$  – é fator regulador chave da oxidação da gordura, o qual age detectando alterações da dieta lipídica. Age no fígado e no músculo, estimulando a transcrição de pelo menos 9 genes que codificam proteínas envolvidas na  $\beta$ -oxidação (Basu-Modak, 1999).

### **3.6. PPAR – ativador transcricional no tecido hepático de vacas leiteiras**

A função dos PPAR como fatores de transcrição é ligante dependente, pois quando ativados por ligantes, modulam a expressão de genes pela ligação com elemento responsivo ao PPAR (PPRE – “Peroxisome proliferator response element”), os quais são sequências repetidas diretas de hexanucleotídeos, separadas por 1 base (DR1) e localizadas na região regulatória (promotor) dos genes que estão sob seu controle transcricional. O elemento regulatório PPRE foi primeiramente identificado no promotor do gene que codifica a enzima acil-coa oxidase, a qual esta envolvida na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. Para ligar-se ao PPRE com alta afinidade e para uma ativação efetiva da transcrição, o PPAR requer o fator receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR), o qual é um receptor nuclear e é descrito como o outro fator protéico adicional necessário. O PPAR e o RXR formam um heterodímero e este complexo é capaz de se ligar ao PPRE e assim ativar a transcrição de genes alvos. A sequência consenso do PPRE é 5'-AACTAGGNCAAAGGTCA-3', onde os PPAR ocupam metade do sítio de ligação da extremidade 5' e os RXR a outra metade, na extremidade 3' (Kanunfre, 2002).

O gene PPARA é um ativador transcricional para os genes G6PC e PC em células hepáticas de camundongos e bovinos (Hazelton *et al.*, 2011; Seung-Soon *et al.*, (2011). Este mecanismo está ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Ilustração do mecanismo da ativação da transcrição pelo PPAR. A formação do complexo co-ativador e sua ligação ao elemento PPRE situado acima do promotor de genes codificadores de enzimas do metabolismo de glicose resulta na ativação da expressão desses genes.

PPARA = Receptor proliferador de peroxissomos alfa; PPRE = elemento responsivo a proliferadores de peroxissoma; RXR = receptor do ácido retinóico; TATA = promotor TATA box; TBP = proteína que se liga ao promotor durante a iniciação da transcrição; F= fator de transcrição F; H = fator de transcrição H; E= fator de transcrição E. Adaptado: Kanunfre (2002).

Para ligar-se ao PPRE com alta afinidade e para uma ativação efetiva da transcrição, o PPAR requer o fator receptor do ácido retinóico (RXR), o qual é um receptor nuclear. Assim, o PPAR e o RXR formam um heterodímero, o qual é capaz de ligar ao PPRE e ativar a transcrição de genes alvos. A sequência consenso do PPRE é 5'-AACTAGGNCAAAGGTCA-3', onde os PPAR ocupam metade do sítio de ligação da extremidade 5' e os RXR a outra metade, na extremidade 3'.

O gene que codifica a enzima PC, a qual está envolvida na gliconeogênese foi caracterizado por Hazelton *et al.*, (2008) por conter 3 distintos promotores, sendo que o promotor P1 está localizado próximo a região codificadora da enzima PC, P2 localizado entre os promotores P1 e P3 e o promotor P3 localizado mais distante da região codificadora. O promotor P1 contém sítios de ligação a proteína regulatória, como fatores de transcrição, as quais controlam a expressão gênica da enzima. Os genes PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$  foram identificados como sendo os elementos regulatórios, que influenciam a região promotora P1 no controle da expressão do gene PC. Nos estudos do White *et al.*, (2011) os elementos PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$  também foram identificados como fatores de transcrição que influenciam o promotor P1 na transcrição do gene PC. O metabólito ácido graxo esteárico (C18:0) influenciou a atividade do P1 suprimindo-a, e aumentando a atividade do P2 e P3 em relação aos outros perfis de ácido graxo (ácido oléico C18:1 ou linoléico – C18:2). Estes resultados demonstraram a habilidade do C18:0 em controlar (aumentando ou suprimindo) a atividade de dois promotores simultaneamente, havendo interações entre os tratamentos e o promotor da PC. Elevadas concentrações de C18:0 tem sido notado no sangue de vacas durante o parto (Rukkwamsuk *et al.*, 1999).

Durante o período de transição, vacas foram suplementadas com uma dieta controle (sem óleo), ou com óleo de peixe (rico em ácidos graxos insaturados) ou com uma fonte de ácidos graxos de cadeia longa saturado (Schmitt et al. 2011). Segundo os autores, o óleo de peixe disponibilizou grande quantidade dos ácidos graxos C20:5n3, C22:5n3 e C22:6n3, enquanto o outro suplemento com ácido graxo de cadeia longa saturado forneceu mais os ácidos graxos C16:0 e o C18:1. Assim, os mesmos concluíram que o óleo de peixe regulou a expressão do gene PPAR $\gamma$ , porém em menor proporção em relação ao outro tratamento. O fornecimento de 1,5 à 1,9% de ácidos graxos de cadeia longa saturado ou ácidos graxos polinsaturados foram o suficientes para regular os genes envolvidos na regulação e no metabolismo de lipídeos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Dados do experimento**

O experimento teve duas fases: primeira foi a de campo e a segunda foi a de análises laboratoriais. A fase de campo foi conduzida na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG em Igarapé/MG, iniciando em março de 2014 e finalizando em dezembro de 2014. As fases de análises laboratoriais foram conduzidas nos laboratórios de Nutrição Animal e Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, no Laboratório de Genômica e Genética Molecular de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As análises do concentrado foram feitas no laboratório 3R. As análises laboratoriais iniciaram em agosto de 2014 e finalizaram em abril de 2015.

Na fase de campo foram utilizadas doze vacas multíparas, sendo seis da raça Holandês e seis F1 Holandês-Gir, que foram manejadas em um sistema de semiconfinamento, recebendo silagem de milho como suplementação volumosa, e concentrado à base de milho e soja. Todas as vacas receberam o mesmo manejo, incluindo neste, os componentes da dieta, cujas composições bromatológicas se encontram na tabela 2. O fornecimento do volumoso foi à vontade, entretanto, o concentrado foi fornecido conforme a produção do leite, porém respeitando um mínimo de 6 kg por animal/dia.

### **4.2. Análises bromatológicas**

Foram colhidas amostras do concentrado a cada mistura (batida) realizada pela fábrica de ração na Fazenda Experimental prof. Hélio Barbosa, nos meses de março a novembro de 2014. A cada novo silo aberto, amostras de silagem de milho foram colhidas, durante o mesmo período conforme o recomendado AOAC, 1997. As amostras dos componentes da dieta foram armazenadas em sacos plásticos e depois mantidas a -20°C até as análises bromatológicas. Primeiramente, as amostras colhidas foram pré-secas em estufas de ventilação forçada a aproximadamente 55°C, por 72h. As amostras foram moídas em moinho usando peneira de 1,0 mm para posterior realização das análises.

**Tabela 2:** Análises de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), Cinzas (CZ), Cálcio (Ca), Fósforo (P), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida para lactação (Mcal/kg) (ELI) da silagem de milho (SM) e do concentrado fornecido às vacas no pré e no pós parto.

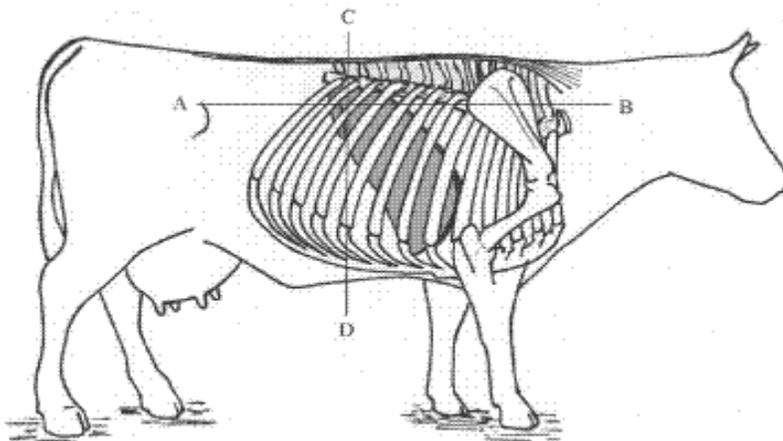
<b>Itens</b>	<b>SM</b>	<b>Concentrado</b>
<b>MS</b>	34,51	92,42
<b>PB</b>	6,20	29,46
<b>FDN</b>	62,14	9,11
<b>FDA</b>	34,48	6,46
<b>EE</b>	-	2,69
<b>CZ</b>	-	8,96
<b>Ca</b>	-	1,26
<b>P</b>	-	0,77
<b>CNF</b>	-	49,77
<b>NDT</b>	-	78,31
<b>ELI</b>	-	1,94

Foram executadas as análises de matéria seca (MS) em estufa a 105°C, proteína bruta (PB) utilizando o método Kjeldhal, extrato etéreo (EE) (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2000) e as análises de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (Van Soest, 1991). O teor de matéria mineral (MM) foi determinado pela queima total da matéria orgânica (MO) em mufla a 600°C por quatro horas. O teor de matéria orgânica foi calculado pela diferença entre a matéria seca e o conteúdo de cinzas. Foi utilizada, com base na % de MS, a equação para determinar os carboidratos não fibrosos (CNF):  $CNF\% = 100 - (MM - PB - EE - FDN)$ . Os resultados dos nutrientes digestíveis totais (NDT) foram fornecidos pelo laboratório 3R Lab, conforme NRC, (2001).

### **4.3. Colheita de tecido hepático**

As amostras de tecido hepático das vacas das vacas Holandês e das vacas F1 Holandês-Gir foram colhidas utilizando-se biópsia, 15 dias pré-parto e aos 6°, 21°, 36°, 51° e 66° dias pós parto. O tecido hepático foi colhido após a ordenha da manhã (6h – 7h30 min). A colheita foi feita por procedimento cirúrgico, após a tricotomia local e assepsia com álcool 70% e uma pequena incisão com bisturi. A agulha de biópsia foi introduzida no fígado por acesso percutâneo. Antes do procedimento foi feita anestesia local utilizando 5mL da solução de

cloridrato lidocaína à 2% (Rhoads *et al.*, 2008 e Kreipe *et al.*, 2011). O ponto de introdução da agulha de biópsia foi feita no 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20 cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de uma linha imaginária entre a tuberosidade externa do íleo e a escápula e outra linha perpendicular ao 11º espaço intercostal (ponto no qual corresponde à posição topográfica do lobo direito do fígado) (Figura 2). Foi utilizado a agulha do modelo 14G x 20 cm junta a cânula para biópsia hepática com empunhadura plástica modelo de disparo semi-automático, a qual permitiu a colheita de 70 a 150 mg de tecido (Braga *et al.*, 1985, Barros *et al.*, 2007 e Rhoads *et al.*, 2008). Durante a colheita, o tecido foi retirado da agulha utilizando-se uma pinça (higienizada com RNaseZAP - Ambion®) e depois acondicionado em eppendorf (livre de RNase e DNase), junto ao RNA LATER (Ambion®), segundo a recomendação do fabricante. Posteriormente, a amostra foi transportada da fazenda à Escola de Veterinária da UFMG e foi armazenada em freezer à temperatura de -80°C, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Durante todo o procedimento cirúrgico, foram utilizadas toucas, máscaras e luvas descartáveis.



**Figura 2:** Figura adaptada do trabalho de Barros *et al.*, (2007) publicada na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## **4.4. Extração e purificação do RNA**

### **1.4.1. Preparo do ambiente e homogeneização do tecido hepático**

O ambiente para proceder à extração e purificação do RNA total era refrigerado com ar condicionado. Antes de iniciar o procedimento, a bancada foi limpa com álcool 100% e completamente forrada com papel pardo. A centrífuga refrigerada era ligada para que a temperatura atingisse 4 °C.

Após os cuidados acima, todos os reagentes e os eppendorfs contendo amostras foram colocados no isopor com gelo para começar o processo de homogeneização. As amostras de fígado (70-150mg) foram descongeladas em gelo. Depois o material foi removido do eppendorff com RNA later (Ambion®) utilizando pinça cirúrgica, que foi fornada por 4 horas, em uma estufa a 150 °C. Ao ser removido, o tecido foi adicionado dentro do homogenizador de tecidos moles tipo Douce. Junto com a amostra era adicionado 1 mL do reagente Trizol (Ambion®). O homogenizador também foi fornado antes de todos os procedimentos, por 4 horas em estufa a 150 °C. A maceração do tecido ocorreu manualmente, sendo feito uma pressão com o macerador ao fundo do homogenizador com o tecido e o reagente Trizol (Ambion®), em um tempo de até 35 segundos. Após macerado, a mistura (tecido macerado e Trizol®) foi removida do homogenizador utilizando uma pipeta de 1000 microlitros e a mistura foi acondicionada em um novo eppendorff (livre de RNase e DNase) por 5 minutos. A homogeneização foi feita de forma rápida, pois o calor provocado pelo atrito pode aumentar a atividade da enzima RNase e levar a degradação do material (Maugh, 2006).

Foram utilizados luvas de nitrila, toucas e máscaras descartáveis em todos os procedimentos no laboratório.

### 1.4.2. Extração do RNA

Os reagentes fornecidos pelo kit da Direct-Zol™ MiniPrep (Zymo Research) foram preparados minutos antes de cada procedimento. Foi adicionado 1 mL de etanol 100% para cada 500 µL do reagente RNA Wash Buffer (1 reação) e 175 µL de etanol 100% para cada 700 µL do reagente Direct-Zol™ RNA PreWash (1 reação).

Ao iniciar o procedimento e após a homogeneização do tecido com o reagente Trizol (Ambion®), a amostra foi centrifugada a 12000 g por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf (livre de RNase e DNase) onde também foi adicionado etanol 100% no mesmo volume da amostra homogeneizada (1:1). Após a mistura, a amostra foi transferida para a Zymo-Spin™ IIC column em um tubo coletor e foi centrifugado a 4°C, a 12000 g por 1 minuto. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após esta etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e o anterior foi descartado. Neste ponto, o RNA da amostra fica retido na coluna e começa o processo de purificação e extração do RNA total, feito pelo kit da Direct-Zol™ MiniPrep (Zymo Research).

Antes de iniciar o procedimento de purificação, a amostra foi tratada com uma mistura para a “DNase I reaction”. Assim, primeiramente a amostra foi lavada com 400 µL do reagente RNA Wash Buffer fornecido pelo kit e em seguida foi centrifugado a 12000 g por 1 minuto a 4°C. O líquido preso no tubo coletor foi descartado. A amostra presa na coluna foi tratada com 80 µL da mistura “DNase I reaction” por 15 minutos, à temperatura entre 20-30°C. Após este tempo, o material foi centrifugado a 12000 g por 1 minuto a 4°C e o líquido preso no tubo coletor foi descartado. A mistura “DNase I reaction” era composta pelos reagentes: DNase I (1 U/µL) (5 µL), 10X DNase I reaction buffer (8 µL), água livre de DNase/RNase (3 µL) e RNA Wash buffer (64 µL), fornecidos pelo kit.

Após o procedimento descrito acima, foram adicionados na coluna 400 µL do reagente Direct-Zol™ RNA PreWash. Após a adição, o material foi centrifugado a 12000 g por 1 minuto a 4°C e o líquido preso no tubo coletor foi descartado. Esta etapa foi repetida duas

vezes. Na próxima etapa, foram adicionados na coluna 700  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Buffer e o material foi centrifugado a 12000 g por 1 minuto a 4°C. O líquido preso no tubo coletor foi descartado. Assim, para a completa remoção deste reagente, foi centrifugado novamente o material por 2 minutos. Ao final a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, cuidadosamente.

Para finalizar o procedimento, foram adicionados na coluna 60  $\mu\text{L}$  de água livre de DNase-Rnase para eluir o RNA total preso na coluna. Em seguida foi centrifugado a 12000 g por 1 minuto a 4°C. O material colhido no tubo foi removido e novamente foi adicionado na coluna para uma nova centrifugação. Após esta etapa, o material foi transferido para um tubo eppendorff (livre de DNase-RNase) e imediatamente foi colocado em um freezer - 80°C.

### **1.4.3. Análise da integridade e qualidade do RNA**

Para verificar a qualidade e a concentração em  $\text{ng}/\mu\text{L}$  do RNA total, 1  $\mu\text{L}$  da amostra foi colocada no equipamento NanoDrop Spectrophotometers. Após as informações fornecidas pelo NanoDrop Spectrophotometers, o rendimento em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do RNA total foi calculado para posteriores análises. Para calcular o rendimento multiplicou-se o valor obtido pela quantificação no NanoDrop Spectrophotometers em  $\mu\text{g}$  por 60  $\mu\text{L}$ . Volume utilizado para ressuspender o RNA total após a extração.

Neste projeto foram utilizados 0,72 g de pó de agarose (Invitrogen™), 5,7 mL de 3-(N-Morpholino) ácido propanesulfônico (MOPS) na concentração 10X mais 54,3 mL de água miliQ autoclavada para completar um volume de 60 mL. Após a mistura, este material foi aquecido em forno microondas, com o objetivo de diluir a agarose e homogeneizar a mistura. Ao ficar morno (temperatura próxima de 50°C), foram adicionados ao líquido 3 mL de formaldeído. Esta mistura foi adicionada na cuba junto com uma sequência de pentes (tira de teflon dentada que ficou 1 mm acima do fundo da forma) durante a polimerização do gel, a fim de se formar os poços, onde foi aplicado a amostra (Bitencourt *et al.*, 2011).

Para obter o MOPS na concentração 10X foi feita uma mistura contendo: 41,8g de MOPS em 800 mL de água miliQ livre de RNase; 16,6 mL de ácido anidro (NaAc); 20 mL de EDTA 0,5 M e o pH foi ajustado para 7, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido acético. Após as misturas, o volume foi complementado com mais água miliQ a fim de se obter um volume de 1 litro. Ao final, toda mistura foi autoclavada (Bitencourt *et al.*, 2011).

Depois do gel pronto, foram adicionados em eppendorfs (livre de RNase e DNase) 2µg do RNA total extraído, 5 µL de tampão de amostra para RNA e para completar um volume de 15 µL foi adicionado água livre de RNase e DNase. Esta mistura foi aquecida por 10 minutos no termociclador. Após o aquecimento, foram adicionados 4 µL do corante brometo de etídio (EtBr – C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) (1µg/µL), o qual se intercala nas bases do RNA ou DNA, a fim de observar o RNA no final da corrida utilizando raio ultravioleta (260/360 nm) (Ausubel, 1994). Aparelho fotodocumentador IL LOGIC 1500 que utiliza a luz ultravioleta, junto com o software KODAK, são capazes de transformar em imagem a intensidade relativa da fluorescência emitidas pelas bandas de RNA captadas por uma câmera fotográfica digital (Bitencourt *et al.*, 2011).

#### **1.4.4. Tratamento do RNA com DNase**

Foi utilizado o kit NucleoSpin®RNA da MACHEREY-NAGEL (MN) para remover o DNA genômico.

Foram retiradas de todas as amostras extraídas, 10 µg de RNA total em volumes variáveis das amostras, as quais foram colocadas em novo eppendorff (livre de RNase). Por exemplo: se na extração foram obtidas 22 µg de RNA total em um volume de 60 µL, para retirar 10 µg de RNA, foi necessário remover um volume de 27,3 µL. Os volumes foram completados com água livre de RNase (Ambion®) a fim de se atingir um volume total de 100 µL e em seguida foram adicionados 11,1 µL de acetato de sódio (3M) e 278 µL de etanol 100%. Esta mistura ficou guardada no freezer -80°C por 2 horas. O objetivo de se

fazer esta mistura, foi o de precipitar o RNA total removido e melhorar a eficiência de sua inserção na coluna de purificação.

Após 2 horas no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a mistura foi homogeneizada com pipeta de 1 mL e o líquido foi adicionado na coluna de purificação do kit NucleoSpin®RNA da empresa MACHEREY-NAGEL (MN). O material foi centrifugado por 30 segundos a 11000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . Depois da centrifugação, o tubo coletor foi removido e substituído por um novo tubo coletor. Foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  do reagente MDB (Membrane Desalting Buffer) e em seguida o material foi centrifugado a 11000 g por 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação o líquido presente no tubo coletor foi eliminado. Este reagente, segundo o fabricante, tem como objetivo remover possíveis sais que podem estar presente na solução e assim melhorar a eficiência do tratamento para remover o DNA genômico.

O passo seguinte foi preparar a mistura para a reação da enzima DNase recombinante (rDNase), com 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 90  $\mu\text{L}$  de “DNase reaction mixture” em um tubo eppendorf. Esta solução foi aplicada na coluna NucleoSpin®RNA contendo o RNA total e o material foi incubado por 15 minutos à  $25^{\circ}\text{C}$ . A enzima rDNase vem na forma liofilizada no kit, então se faz necessário prepara-la antes de usar adicionando 550  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e DNase, tal como recomenda o fabricante.

Após a incubação foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do reagente RAW2, com o objetivo de inativar a enzima rDNase e o material centrifugado a 11000 g por 30 segundos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  do reagente RA3, o material foi centrifugado a 11000 g por 30 segundos. Novamente foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do reagente RA3 e o material foi centrifugado a 11000 g por 2 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após cada e em todas as centrifugações, o líquido que desceu e ficou contido no tubo coletor da coluna foi descartado. Por fim e para eluir o RNA total preso à membrana de sílica da coluna, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e DNase. Após a adição, o mesmo foi centrifugado a 11000 g por 1 minuto. Este passo foi repetido duas vezes. Após este passo, o RNA total foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop para o cálculo da concentração, em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do RNA total. Todas as amostras de RNA foram guardadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.4.5. Síntese da fita de DNA complementar (cDNA)

Foi utilizado o SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen®) que é uma versão modificada do M-MLV RT com reduzida atividade da RNase H e alta estabilidade térmica. Reduzir a atividade da RNase H é importante, pois esta é capaz de hidrolisar os moldes de RNA, reduzindo o tamanho do cDNA sintetizado. Esta enzima foi usada para sintetizar a primeira cadeia do cDNA complementar em temperaturas mais elevadas que as convencionais M-MLV RT, proporcionando maior especificidade, rendimentos mais elevados de cDNA. Pode ser gerado um cDNA de até 12,3 kb. Nesta reação, o mRNA é utilizado como molde para a síntese do cDNA pela transcriptase reversa. Esta enzima é capaz de ocasionar a polimerização de DNA a partir do RNA, porém um primer com extremidade 3'OH livre é necessário para a síntese acontecer. Neste projeto foi utilizado o oligonucleotídeo de desoxitimidinas (Oligo-dT) que hibridiza-se com a cauda de poli-A do mRNA. Assim, moléculas de DNA/RNA funcionam para a síntese da segunda cadeia de cDNA, como um complexo de moléculas molde (cDNA) e primers (mRNA).

Foram adicionados em um microtubo eppendorf de 0,5 mL (livre de RNase e DNase) 2 µL do Oligo(dT)<sub>18</sub> (0,5 µg/µL), 1,5µg do RNA total, 2µL de dNTP's (10mM cada) e água livre de RNase até completar 26 µL. Esta mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C em um termociclador. O dNTP's (2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate) consiste em 4 desoxinucleotídeos (dATP – desoxi-adenosina trifosfato; dCTP – desoxi-citosina trifosfato; dGTP – desoxi-guanina trifosfato e dTTP – desoxi-timina trifosfato), que podem ser utilizados em diversas reações, tais como: síntese de cDNA, PCR convencional, sequenciamentos, entre outros.

Após o aquecimento, o material foi rapidamente inserido no gelo. Depois foram adicionados 8 µL do tampão 5X first-Strand e 4 µL de 0,1 M DTT (DL-ditiotreitol). O conteúdo do tubo foi bem misturado com pipeta. Depois, este material foi dividido em 2 volumes de 19µL para se ter 2 tubos. Em um tubo foi adicionado 1µL de água livre de RNase para se completar um volume de 20µL. Neste tubo não foi adicionada a enzima

Transcriptase reversa. Após este procedimento, os conteúdos foram incubados por 2 minutos à temperatura de 42°C.

No tubo que não foi adicionado 1 µL de água livre de RNase, foi adicionado 1 µL da enzima SuperScript™ II RT e o material foi gentilmente misturado. Após este procedimento, todo o material foi incubado por 50 minutos a 42°C, como objetivo de inativar a enzima transcriptase reversa pelo calor. Terminada a incubação a 42°C a temperatura foi elevada a 70°C, por 15 minutos. Em seguida o material foi guardado no freezer a -20°C (Gerard *et al.*, 1989 e Nathan *et al.*, 1995).

#### **1.4.6. Reação de polimerização em cadeia convencional**

As reações de PCR foram feitas em um termociclador com tecnologia Peltier e capacidade para 96 poços (Nova Instruments©). Para cada reação, em tubo eppendorfs *baby* livre de RNase e DNase, foram adicionados os seguintes reagentes: 4 µL do Tampão GotaqGreen (5X) (Promega®), 0,4 µL do dNTP's (10mM) (Invitrogen®), 1 µL do primers (10 mM - forward e reverse) do gene GAPDH, 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase (Promega®), 1 µL do cDNA ou 1 µL do conteúdo sem a enzima transcriptase reversa e por fim foi adicionado água livre de RNase e DNase para completar um volume de 20 µL.

Após as reações no termociclador, o produto da PCR foi armazenado em geladeira a 4°C para posterior avaliação. Com o objetivo de avaliar o produto da PCR com e sem a enzima transcriptase reversa, foi feito um gel de agarose com a concentração de 2%, a qual teve como objetivo separar os fragmentos de DNA presentes na amostra. Foram dissolvidos 3g do pó de agarose (Invitrogen®) em 150 mL do tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) (1X). A solução foi aquecida em forno microondas até a solução se tornar homogênea e transparente. Quando a solução ficou morna, foram adicionados na mesma, 15 µL de SYBER® Safe DNA gel (Invitrogen®), com o objetivo de visualizar os fragmentos do DNA em agarose, ao ser exposto a luz ultravioleta. Este componente é mais sensível ao “corar” o DNA e é formulado com componentes menos danosos para saúde que o brometo de etídeo.

Todo este conteúdo foi adicionado em uma cuba junto com uma sequência de pentes (tira de teflon dentada que ficou a 1 mm acima do fundo da forma) até a polimerização do gel, a fim de se formar os poços, onde foi aplicado a amostra. Após polimerizar, o gel foi colocado no interior da cuba de eletroforese, o qual foi mergulhado em tampão de eletroforese. Primeiramente, como mostra na figura 8, para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA, foram aplicados no primeiro poço 7 µL do marcador de peso molecular (Axygen®) de 100 Pb (contém 14 fragmentos que variam de 0,1 a 5 Kb.). Este marcador é uma mistura de diversos fragmentos de DNA com tamanhos e concentrações conhecidas. Ele permite inferir por comparação o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada. Depois foi aplicado em outro poço, uma amostra denominada de branco, ou seja, contém todos os conteúdos mencionados menos o cDNA e a amostra sem a enzima transcriptase reversa (RT). Posteriormente nos poços seguintes, foi inserido uma sequência dupla de amostras, ou seja, amostra 1 com RT e sem RT. Ao finalizar a aplicação, iniciou-se a corrida no gel de agarose 2%. Ao terminar, o resultado do gel foi visualizado pelo fotodocumentador IL LOGIC 1500 utilizando a luz ultravioleta, junto com o software KODAK.

#### **1.4.7. Reação de polimerização de cadeia em tempo real (RT-PCR)**

As análises foram feitas no Núcleo de Análise de genoma (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal Minas Gerais. As leituras da fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento 7900 Real-Time PCR durante as reações de PCR, as quais ocorreram em três passos: Primeiramente ocorre um processo de desnaturação do cDNA, por 2 minutos à uma temperatura de 95°C. Depois a temperatura foi reduzida para 60°C, onde, possivelmente, haverá o anelamento dos *primers* à fita simples e por fim ocorrerá a extensão dos *primers* complementando a fita a uma temperatura de 72°C. A quantificação foi vista, devido a fluorescência emitida pelos ciclos de amplificação que, posteriormente analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v2.4 (Applied Biosystems). As concentrações dos mRNAs dos genes foram determinados utilizando-se o cálculo relativo às médias de concentrações dos três genes de referência.

Alguns *primers* foram desenhados utilizando o programa *PrimerBlast*, fornecido pelo National Center For Biotechnology information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). No entanto, outros foram utilizados dos trabalhos publicados pelos autores Hammon *et al.*, (2003) e Graber *et al.*, (2010) (Tabela 4)

Para as reações foram utilizadas micro placas de 0,1 mL, com 96 poços livres de RNase e DNase, compatível com o equipamento utilizado (Applied Biosystems), onde foram misturados em cada poço, os seguintes componentes: 1 µL de *primers* (forward+reverse) (2 mM), 5 µL do PLATINUM® SYBER®Greenq PCR SuperMix-UDG com ROX (Invitrogen™) e 4µL das amostras de cDNA diluída 20 vezes. Foram utilizados para a análise, três diferentes genes de referência/constitutivo, ou seja, genes altamente expressos no fígado. Os genes considerados como de referência foram o RPS9 (Proteína ribossomal S9), GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase) e a ACTB (β-Actina), utilizados nos estudos feitos por Janovick-Guretzky *et al.*, (2007), Graber *et al.*, (2010) e Weber *et al.*, (2013b) (Tabela 4).

#### **4.5. Parâmetros sanguíneos**

As amostras de sangue na veia jugular foram colhidas após a ordenha da manhã e minutos antes do procedimento de biópsia hepática. As amostras foram colhidas aos 15 dias da data prevista do parto para as vacas das raças Holandês e F1 Holandês-Gir e aos 6°, 21°, 36°, 51° e 66° dias do pós-parto. Foram feitas assepsia local e punção com agulha 21G e tubos vacuolizados (Vacutainer) utilizando-se anticoagulante (EDTA) para as determinações de glicose, AGNE e BHBA. As amostras foram transportadas em isopor com gelo reciclável ao laboratório na Escola de Veterinária da UFMG onde foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 g. Após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em tubos eppendorfs e congelados a -20°C.

Para determinar a concentração de glicose foi utilizado o Kit comercial enzimático colorimétrico (KATAL®). Para a determinação de AGNE foi utilizado o kit comercial

colorimétrico (RANDOX®). Para determinação de BHBA foi utilizado o kit comercial D-3-Hidroxybutyrate (Randox Laboratories Ltda., Ardmore, UK). As mensurações foram feitas no Departamento de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando o aparelho Cobas Miras Plus (Roche®).

#### **4.6. Análise da produção de leite e coleta de amostras para mensurar a composição**

A produção de leite e a coleta de amostras foram feitas em todas as vacas no 11º dias após o parto e após a primeira colheita, de 14 em 14 dias até o 72º dias da lactação.

As amostras de leite para análise da composição foram colhidas nas ordenhas da manhã e da tarde utilizando-se medidores de leite Milk Meter-Mark V, após a homogeneização da amostra, sendo estas proporcionais ao volume de leite produzido em cada ordenha. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos com bromopol (2-bromo 2-nitropropano 1,3-diol), na relação de 10mg de bromopol para 50mL de leite e refrigeradas à 4°C e enviadas para o Laboratório de Análise e Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Para as medições do conteúdo de gordura, proteína, lactose, nitrogênio ureico, extrato seco desengordurado, sólidos totais e contagem de células somáticas foram utilizados a metodologia eletrônica Bentley®.

### **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental aplicado neste experimento foi o inteiramente casualizado. Foram utilizadas 12 vacas divididas em dois grupos genéticos, sendo um composto por vacas da raça Holandês e outro de vacas F1 Holandês-Gir. Os dados referentes à BHBA foram transformados usando log2 visando obter distribuição normal dos resíduos (Chen *et al.*, 2015) (BHBAlog2).

Como as medidas repetidas estão correlacionadas pela contribuição de cada vaca, considerou-se estruturas de covariâncias residuais, auto regressiva de primeira ordem

AR(1) para BHBAlog2 e simétrica composta heterogênea CSH para glicose e AGNE. Para as enzimas G6PC e PPARA foi considerada ARH(1), para MUT AR(1) e para GLUT2 CSH. Todos os metabólitos e genes foram analisados por todas estas estruturas de variância, no entanto, foi escolhido o menor valor entre os critérios de ajuste fornecidos pelo programa. O critério de informação de Akaike, (1974) (AIC) foi o escolhido entre o Hurvich and Tsai, (1989) (AICC); Schwarz, (1978) (BIC) e os valores de verossimilhança restrita ( $-2\ln(L)$ ).

As variáveis relacionadas aos metabólitos glicose, BHBA e NEFA e às enzimas G6PC, PPARA, MUT e GLUT2 foram analisadas utilizando-se modelos lineares mistos (PROC MIXED, SAS, versão 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando como efeitos fixos grupo genético (G), período (PER) e efeitos aleatórios de animal (Costa *et al.*, 2007).

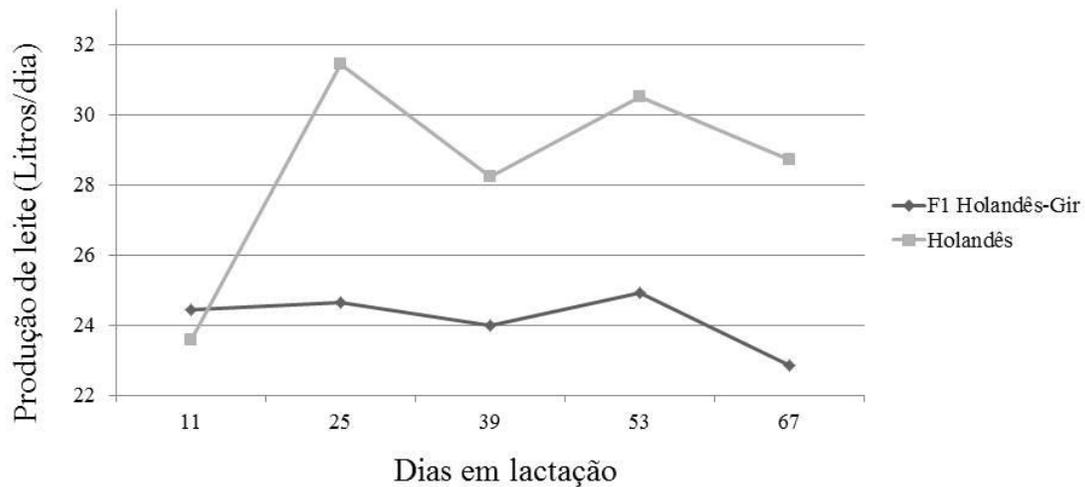
Análises preliminares demonstraram que a interação entre grupo genético e período não foi significativa ( $P>0,05$ ).

Comparações entre as médias estimadas para cada período foram feitas, quando necessárias, utilizando o teste de Tukey-Kramer e consideradas significantes quando P ajustado  $\leq 0,05$ .

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **1.6.1. Produção e composição do leite**

A média da produção de leite até 67 dias de lactação das vacas da raça Holandês foi 28,48 litros, enquanto das vacas F1 Holandês-Gir foi 24,14 litros. A produção de leite das vacas da raça Holandês aumentou 33% do 11° ao 25° dias e o da vaca F1 se manteve estável entre os dias 11° e 53° de lactação. Dos 53° até os 67° dias de lactação, houve redução de 2% na produção de leite das vacas da raça Holandês enquanto que a redução na produção das vacas F1 foi de 8,4% (Figura 3).



**Figura 3:** Médias da produção de leite de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir em função dos dias de lactação.

Carvalho, (2009) observou que a produção de leite de vacas F1 Holandês-Zebu foi semelhante durante os primeiros 100 dias de lactação, independente da dieta fornecida durante o período pré parto (suplementadas ou não). Vacas mestiças F1 de cruzamento entre raças europeias e raças zebuínas, tiveram o início da lactação até o pico em 14 dias. Glória *et al.*, (2010) mencionaram que períodos maiores do início da lactação ao pico são desejáveis, pois possibilitam maior tempo para desafiar nutricionalmente o animal, de modo que ele possa expressar seu potencial genético.

O leite de vacas da raça Holandês normalmente contém 3,2% de proteína, 3,4% de gordura e 4,6% de lactose, enquanto que em vacas F1 as porcentagens observadas por Fonseca e Santos, (2000) foram os de 3,52, 4,00 e 4,80%, respectivamente. Neste estudo foi observado que a porcentagem de gordura (27%, 4,57 vs 3,58) e de proteína (12,4%, 3,35 vs 3,01) foram maiores para as vacas F1 Holandês-Gir do que no leite das vacas da raça Holandês, respectivamente. Já a porcentagem de lactose foi semelhante entre os grupos genéticos (4,48 vs 4,35) (Tabela 3).

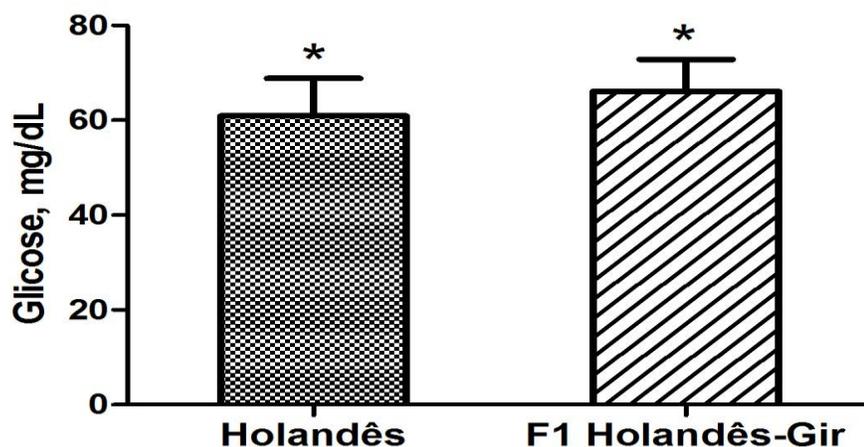
Neste projeto a composição do leite das vacas F1 Holandês-Gir foi semelhante ao encontrado por Peixoto, (2011), porém a produção de leite encontrada pelo autor foi inferior ao encontrada neste estudo. A glicose produzida pode ser encaminhada/transportada para diversos locais no organismo, pode ser utilizada pelo próprio tecido hepático, devido à alta taxa de renovação protéica, a qual requer alta demanda energética (Kozloski, 2002; Lehninger, 2014), pode ter sido direcionada aos tecidos, com o objetivo de aumentar a síntese protéica e assim recuperar do balanço energético negativo ou pode ser direcionada ao tecido mamário, como fonte de energia ou para síntese dos componentes do leite: proteína, gordura, lactose (Akers, 2006).

**Tabela 3:** Composição de leite de vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir aos 11°, 25°, 39°, 53° e 67° dias em lactação

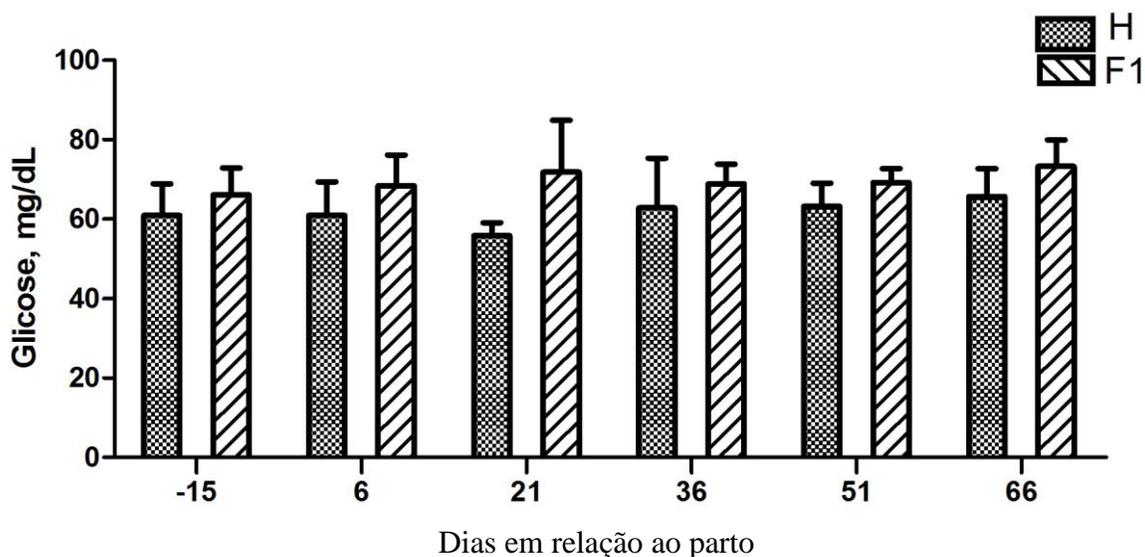
Dias em lactação	Composição de leite (%)		
	Holandês		
	Gordura	Proteína	Lactose
11	3,37	3,31	4,08
25	3,29	2,96	4,41
39	3,59	2,84	4,37
53	3,11	2,86	4,49
67	4,54	3,08	4,41
Médias	3,58	3,01	4,35
	F1 Holandês-Gir		
	Gordura	Proteína	Lactose
11	4,61	3,62	4,38
25	4,48	3,24	4,45
39	4,60	3,25	4,53
53	4,97	3,26	4,54
67	4,20	3,39	4,50
Médias	4,57	3,35	4,48

### 1.6.2. Perfil metabólico

As concentrações de glicose diferiram ( $p < 0,05$ ) entre as vacas da raça Holandês e F1 Holandês-Gir 60,86 vs 66,10 mg/dL, respectivamente, (Figura 4), porém, não observamos diferença dentro do grupo genético ao longo do período analisado (Figura 5).



**Figura 4:** Concentrações médias de glicose no plasma de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir.

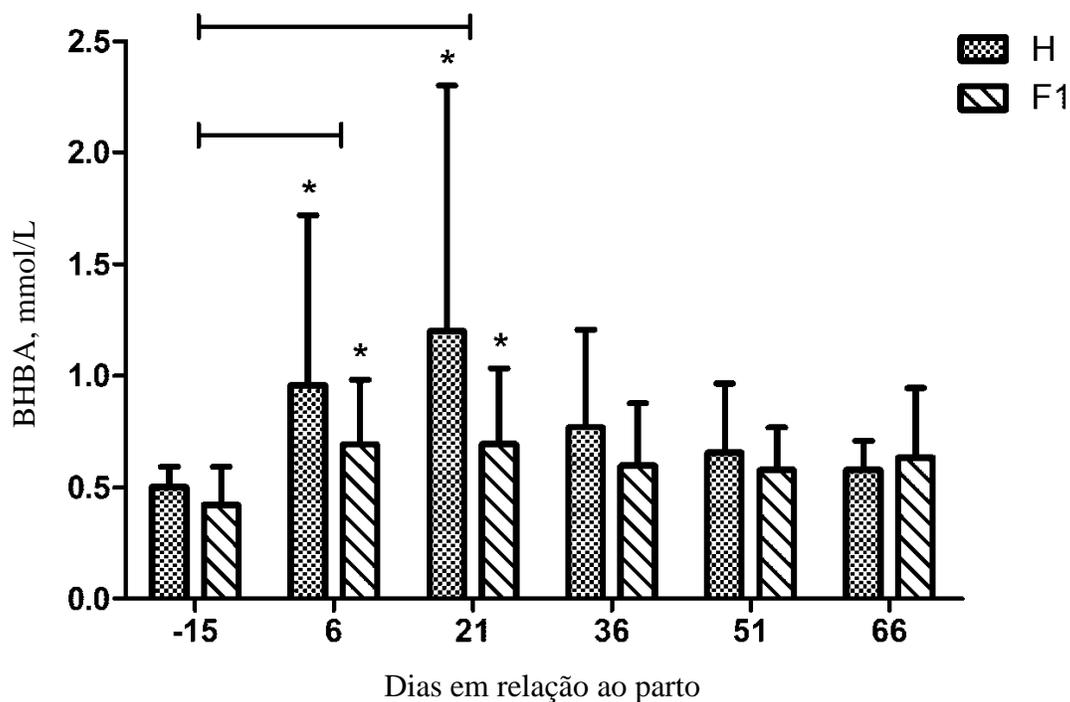


**Figura 5:** Concentrações médias de glicose no plasma de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir aos - 15,+ 6, + 21, + 36, + 51, + 66 dias em relação ao parto.

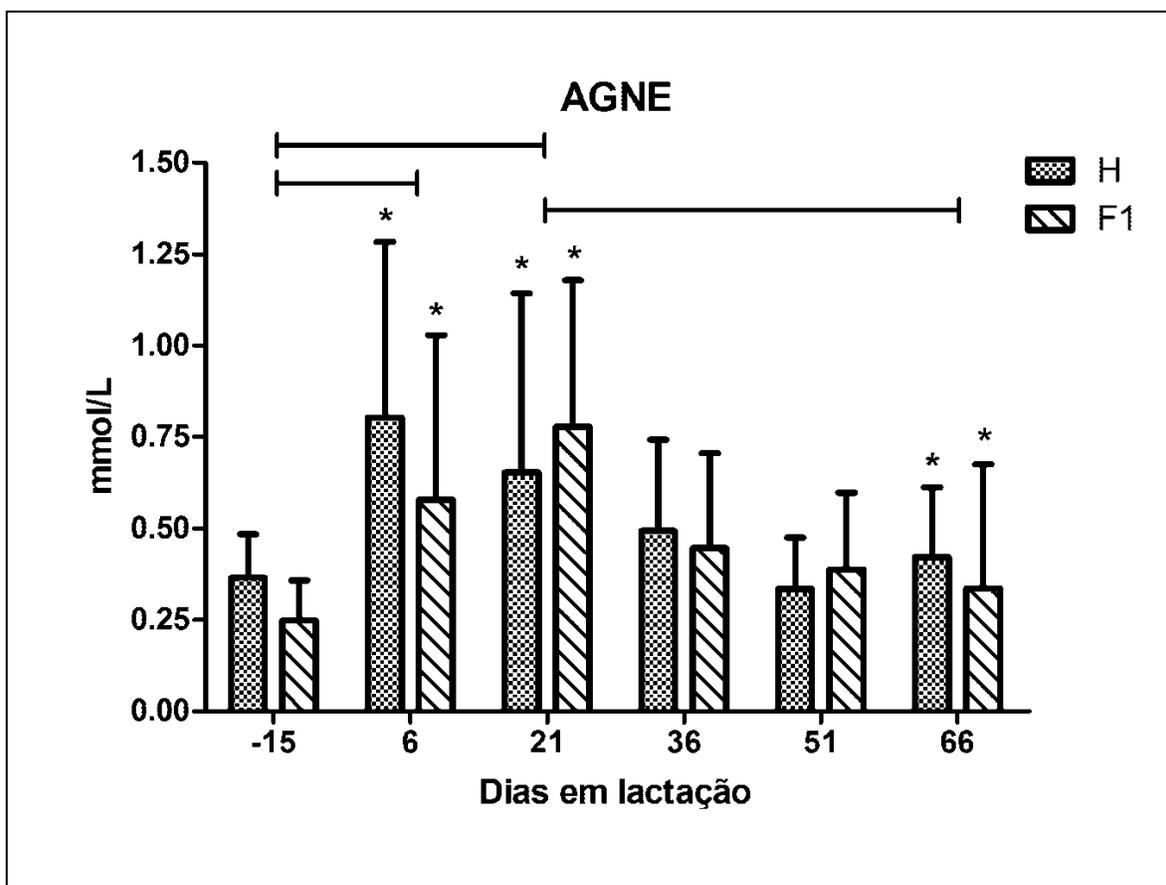
Carvalho, (2009) avaliando o perfil metabólico de vacas F1 Holandês-Zebu submetidas a dois manejos no pré-parto (recebiam ou não suplementação) em duas diferentes épocas de partições (estação chuvosa e estação seca) observou que as concentrações de glicose e de AGNE aumentaram do pré para o pós-parto. Segundo Radostits *et al.*, (2000), o estresse do parto provocou a remoção na reserva de glicogênio hepático acarretando em um aumento

nas concentrações sanguíneas de glicose. Segundo Bauman e Currie, (1980), ao parto o aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, ocorre quando há liberação de cortisol (estresse pelo parto) estimulando a gliconeogênese. Radostits *et al.*, (2000) também observaram aumento na concentração de glicose do pré para o pós parto durante a primeira semana e redução a partir da segunda semana, não diferindo até a oitava semana da lactação.

Foi observado do pré para o pós-parto, aumento significativo sobre as concentrações dos metabólitos BHBA e AGNE até 21 dias após o parto. Entretanto, observou-se uma tendência na redução das concentrações de BHBA até 66 dias em lactação e um declínio significativo das concentrações de AGNE ao comparar os valores observados entre os dias 6 com 51 e 66 dias em lactação (Figuras 6 e 7).



**Figura 6:** Concentrações médias de betahidroxibutirato (BHBA) no plasma de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir aos + 21, + 36, + 51, +66 dias em relação ao parto. \*Diferença significativa entre as médias ao longo do período de transição, Tucker-Kramer (P<0,05).



**Figura 7:** Concentrações médias de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir aos - 15,+ 6, + 21, + 36, + 51, + 66 dias em relação ao parto. \*Diferença significativa entre as médias ao longo do período de transição, Tucker-Kramer (P<0,05).

Os resultados encontrados por Van Dorland *et al.*, (2009) foram semelhantes aos aqui relatados, pois as concentrações de BHBA e AGNE foram inferiores no pré-parto e superiores após o parto. Durante o balanço energético negativo tanto as concentrações de BHBA quanto de AGNE aumentaram, devido à rápida mobilização das gorduras. Quando

AGNE chegam ao fígado podem seguir vários destinos (Bergman, 1971 e Duffield *et al.*, 2008), ou seja, quando não são oxidados completamente podem aumentar a síntese de corpos cetônicos, como o BHBA.

Zambrano e Marques Jr. (2009), ao analisarem os resultados aos 22 dias da data prevista do parto, do 17° a 78° dias pós parto e do 110° ao 153° dias, encontraram aumento não significativo nas concentrações plasmática de BHBA em vacas F1 Holandês-Gir. Os resultados foram semelhantes aos valores de referência encontrados por Parra *et al.*, (1999).

Neste projeto as concentrações de AGNE e BHBA aumentaram do pré para o pós-parto, conforme relatado por Weber *et al.*, (2013b) e Weber *et al.*, (2015). Neste experimento as concentrações médias de BHBA para vacas Holandês foi de 0,501 mmol/L e para as vacas F1 Holandês-Gir foi de 0,421 mmol/L. Para Gonzales *et al.*, (2000) valores de BHBA menores que 0,05 e maiores que 1,00 mmol/L são considerados valores de referência, ou seja, caso forem menores ou maiores podem indicar algum transtorno metabólico. Já as concentrações médias de AGNE foram de 0,365 mmol/L e 0,248 mmol/L para vacas Holandês e F1 Holandês-Gir, respectivamente (Figuras 6 e 7).

Altas concentrações de BHBA e AGNE podem reduzir as concentrações de mRNA do fator de transcrição PPARA no hepatócito, acumular gordura no tecido e prejudicar o metabolismo da glicose, tal como interferir no processo de fosforilação oxidativa (adenosina trifosfato) (Lehninger, 2014). Vacas com cetose, por exemplo, em relação às vacas sem o distúrbio metabólico, tiveram a síntese de ubiquinona que é um importante transportador de elétrons durante a fosforização oxidativa, reduzida (Loor *et al.*, 2005).

Segundo Pilks *et al.*, (1991) o fluxo de substratos presentes na corrente sanguínea pode tanto aumentar quanto inibir a expressão gênica de algumas enzimas no tecido hepático. A regulação da expressão gênica dessas enzimas do metabolismo pode ser influenciada tanto pela nutrição quanto pelo estado hormonal.

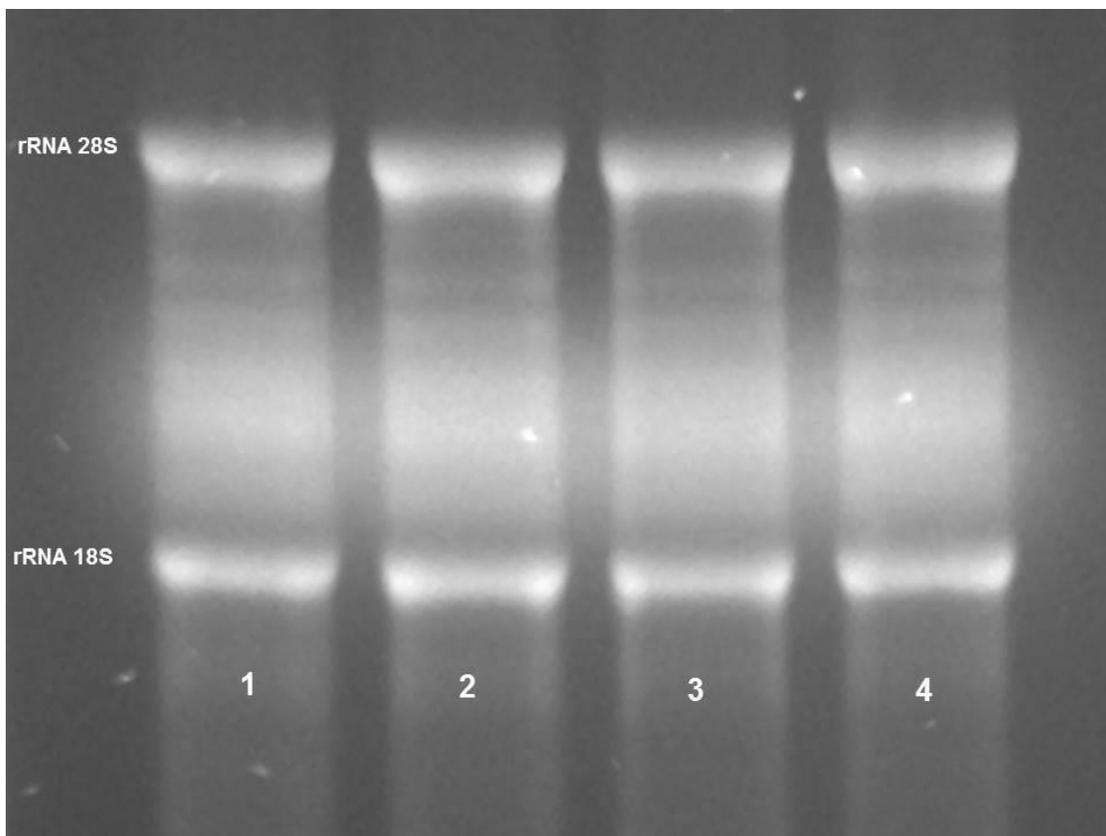
O Graber *et al.*, (2010), trabalhando com 232 vacas da raça Holandês recebendo a mesma dieta, observaram que as concentrações de BHBA e AGNE foram menores aos 21 dias da data prevista do parto e maiores aos 30 dias após parto, já a concentração de glicose foi maior antes do parto e menor após o parto. A expressão gênica do gene G6PC, tal como o gene das enzimas propionil-Coa-carboxilase alfa e beta (PCCA alfa e beta) foram maiores e as do gene PPARA foram menores aos 21 dias do parto e maior aos 30 dias após o parto ( $P > 0,05$ ). Os genes PCCA alfa e beta também participam das reações metabólicas que ocorrem na via do succinato, sendo responsáveis em formar o metabólito propionil-Coa (Kozloski, 2002). Em nosso projeto foi avaliado a expressão do gene MUT, pois é a etapa responsável em converter o metilmalonil-Coa em succinato.

Weber *et al.*, (2013b) não encontraram correlação entre os metabólitos AGNE e BHBA e os genes PPARA e G6PC durante o período de transição, porém encontraram correlação com outros genes, tais como PC e PEPCKc, os quais participam do metabolismo da gliconeogênese, mas não foram avaliados neste projeto

Fatores da dieta e/ou envolvendo interações metabólicas (metabolômica) podem ter efeitos diretos e/ou indiretos, influenciando a regulação e a expressão de genes específicos (efeitos da nutragenômica). Verificando quais metabólitos poderiam influenciar na região promotora do gene PC, Hazelton *et al.*, (2008) observaram que o gene PPARA pode influenciar a região promotora de regulação do gene PC. Também observaram que o ácido graxo esteárico (C18:0) influenciou a região promotora do gene PC denominada de P1 suprimindo-a, enquanto que a atividade das regiões denominada como P2 e P3 aumentaram quando foram testados outros perfis de ácidos graxos circulantes tais como: ácido oléico (C18:1) ou linoléico (C18:2). Esses resultados demonstraram a habilidade do C18:0 em controlar (aumentando ou suprimindo) a atividade de dois promotores simultaneamente, havendo interações entre os metabólitos e o promotor do gene PC. Elevadas concentrações do C18:0 tem sido notado no sangue de vaca ao redor do parto (Hazelton *et al.*, 2008). Na literatura consultada não foi encontrado nenhum artigo correlacionando os perfis de ácidos graxos e a expressão dos genes SLC2A2 (Glut2) e MUT em vacas leiteiras.

### **1.6.3. Análise da expressão gênica: qualidade e integridade do RNA purificado do tecido hepático de vacas das raças Holandês e F1 Holandês-Gir**

Foi verificado a qualidade e a integridade do RNA no espectrofotômetro NanoDrop. A absorvância máxima dos ácidos nucléicos é de 260 nanômetros (nm). Foram avaliadas também as absorvâncias nos comprimentos de onda de 230 nm, o que pode indicar se a amostra apresenta contaminações como: fenol ou guanidina isotiocianato, utilizados nas extrações e de 280 nm, o qual pode indicar contaminações com proteínas. Com estas informações, a razão 260/230 e 260/280 foram calculadas. Para o RNA ser considerado com alto grau de pureza, os valores devem estar entre 2,0 e 2,2 (Boletim técnico T042 – [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)), valores que foram obtidos para todas as amostras purificadas e que estão demonstradas na figura 7.



**Figura 8:** Foto das amostras de RNA total extraídas do fígado de vacas e analisadas por eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta. As bandas representativas dos RNAs ribossômicos indicadas no gel como rRNA 28S e 18S, mostram a boa qualidade do RNA purificado. As amostras nas canaletas 1, 2, 3 e 4 correspondem ao RNA total extraído das vacas da raça Holandês (440/1) e das F1 Holandês-Gir (2061/5, 2055/6 e 2055/1) e apresentam qualidades similares à de todas as amostras purificadas e que foram utilizadas no projeto.

Antes de iniciar a extração do RNA nas amostras colhidas, foram testados três protocolos de extração de RNA utilizando amostras de fígado de camundongos e de vacas, que foram armazenadas em RNAlater (Ambion®). O primeiro testado foi o método utilizando Trizol (Invitrogen®), o qual não foi adequado, pois a qualidade e a integridade do RNA total extraído do fígado de vacas não foram mantidas, porém o rendimento foi satisfatório (1.187 ng/ $\mu$ L) ao utilizar 70 mg de tecido. O segundo método utilizado (RNeasy Mini kit da empresa Qiagen®), a qualidade e o rendimento do RNA total extraído do fígado de

camundongo foi o desejado, bem como o rendimento (1.042 ng/ $\mu$ L). O terceiro método utilizado foi o kit Directzol, da empresa Zymo Research®, com o qual as amostras tiveram a melhor qualidade e rendimento, tanto utilizando fígado de camundongo (média de 1022,3 ng/ $\mu$ L) quanto o de vacas (média 678,70 ng/ $\mu$ L) utilizando 70 a 150 mg de tecido. Assim, diante dos resultados obtidos com o kit Directzol da empresa Zymo Research® e pela rapidez na extração do RNA total, este método foi o escolhido.

Nagashima *et al.*, (2013) testaram diferentes protocolos de extração de RNA e verificaram que utilizando o reagente trizol ou kit, a qualidade, o rendimento e a concentração do RNA total foram suficientes para prosseguir com o restante das análises. Nesta pesquisa, as concentrações médias das amostras foram de 730 ng/ $\mu$ L. Nos trabalhos de Dastgheib *et al.*, (2014) as amostras também foram armazenadas em RNAlater® e a qualidade do RNA total foram semelhantes a vista neste projeto.

Fígado, tecidos fibrosos ou adiposos são ricos em nucleases, o que torna a extração do RNA total desafiadora, pois o material pode ser degradado facilmente. Segundo Kirty, (1956), a maceração e homogeneização dos tecidos devem ser feitas em menos de 60 segundos.

#### **1.6.4. Remoção do DNA nuclear**

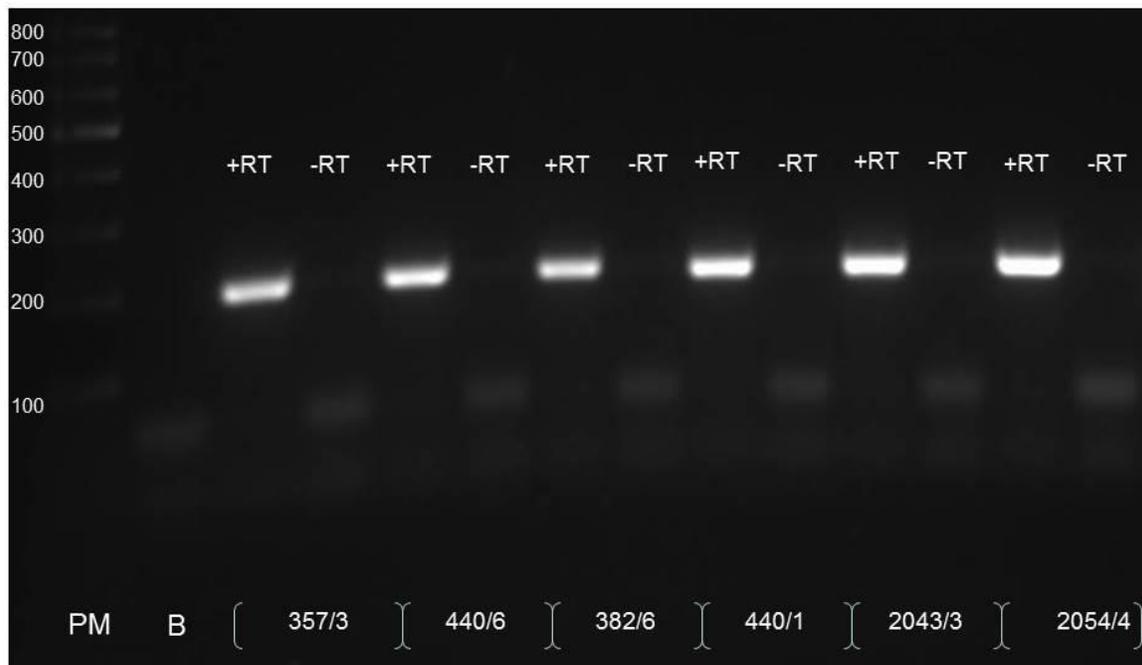
Com o objetivo de averiguar a presença do DNA genômico contaminando a amostra de cDNA recém sintetizada, foram feitas reações de polimerização em cadeia convencional (PCR convencional) em todas as amostras utilizadas neste projeto, sendo que 2 reações para cada amostra foram analisadas. Como em uma das reações não foi adicionada a enzima transcriptase reversa, isso permite verificar a presença de DNA contaminante, pois o aparecimento de uma banda como produto da reação nesse tubo só poderia ocorrer se houvesse contaminação de DNA genômico no cDNA sintetizado.

Neste projeto foram testados alguns protocolos com o objetivo de remover o DNA contaminante nas amostras de RNA total extraídas. Durante a extração do RNA pelo kit

Directzol da empresa Zymo Research®, foi feito o tratamento para remover o DNA nuclear, no entanto, este tratamento não foi eficiente para removê-lo completamente. Este ocorrido é muito comum em amostras de tecidos ricos em DNA genômico. Diante disso, foram testados outros protocolos. Os protocolos utilizados foram: DNASE I (Invitrogen®) e TURBO DNA-free™ Kit TURBO™ DNase “Treatment and Removal Reagents” (Ambion®). Ambos foram descartados, pois o RNA total de todas as amostras testadas foram degradadas. A degradação pode ter sido causada pela presença de nucleases, pois algumas destas enzimas podem degradar tanto DNA quanto RNA. Estas enzimas são capazes de clivar as ligações fosfodiéster internas para produzir tanto as terminações 3'-hidroxila e 5' fosforila quanto 5' hidroxila e 3' fosforila (Murray *et al.*, 2013).

Diante destes resultados, as amostras foram novamente tratada com a DNase I presente no kit Directzol, a qual não removeu o DNA contaminante por completo. Diante desta situação, o kit NucleoSpin®RNA da empresa MACHEREY-NAGEL foi testado e utilizado em todas as amostras deste projeto, pois a qualidade e a integridade do RNA total extraído se manteve. Segundo o fabricante, o tratamento com a rDNase é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA contaminante nas amostras de RNA total e assim prepará-la para as reações de RT-PCR.

A figura 8 mostra a foto de fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose após a amplificação por PCR convencional do cDNA obtido a partir de RNA extraído de vacas da raça Holandês (357/3, 440/6, 382/6 e 440/1) e F1 Holandês-Gir (2043/3 e 2054/4).



PM = Marcador de peso molecular; B = Branco; RT = amostra com a enzima transcriptase reversa e -RT = amostra sem transcriptase reversa.

**Figura 9:** Foto de fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose e corados com Syber-Safe após a amplificação por PCR convencional do cDNA obtido a partir de RNA extraído de vacas da raça Holandês (357/3, 440/6, 382/6 e 440/1) e F1 Holandês-Gir (2043/3 e 2054/4) com o par de primers para GADPH. As PCRs foram feitas com cada amostra incubada anteriormente na presença (+RT) ou na ausência (-RT) da enzima transcriptase reversa (RT). A ausência de banda nas canaletas correspondentes as amostras sem RT indica que o RNA utilizado não estava contaminado com DNA nuclear. Figura que representa todas as amostras utilizadas neste projeto.

### 1.6.5. Amplificação por RT-PCR e a curva de dissociação dos genes

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica de laboratório baseada no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e que permite quantificar moléculas de DNA ou

cDNA (DNA complementar). A PCR foi originalmente desenvolvida por Kary Mullis e seus colaboradores na metade da década de 80, Saiki *et al.*, (1985). Com a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) é possível determinar de forma rápida e exata as mudanças de expressão gênica resultantes de fenômenos patológicos ou fisiológicos, por exemplo, o qual possibilita correlacionar as alterações metabólicas com os processos moleculares por meio da síntese de DNAs complementares aos diferentes mRNAs utilizando a enzima Transcriptase Reversa e em seguida amplificando esses cDNAs por PCR. Como os produtos da PCR são detectados em tempo real esse método permite selecionar a etapa de amplificação onde pode ser correlacionado o número de moléculas de cDNA iniciais e o número de moléculas do produto da amplificação (Mackay *et al.*, 2004).

Nos equipamentos de RT-PCR é possível observar a dinâmica das curvas de amplificação devido à presença dos fluorocromos que são ligados às duplas fitas do DNA que estão sendo geradas em cada ciclo de amplificação, o que pode ser analisado mediante um programa computacional. É possível estabelecer com exatidão quando o sinal de fluorescência de uma determinada amostra ultrapassa um nível mínimo basal, sendo denominado ponto de cruz da curva (Ct - threshold cycle). Este princípio estabelece a base de quantificação do PCR em tempo real. A detecção da fluorescência para um determinado mRNA é proporcional à quantidade de moléculas de cDNA correspondentes a esse mRNA presentes na amostra, assim quanto maior a quantidade de um mRNA mais precocemente será detectada a fluorescência (Velasco *et al.*, 2006).

Neste projeto foi feita a quantificação relativa, pois emprega-se uma amostra que recebe um valor de 100% e sobre este valor quantifica-se de forma relativa a amostra em estudo (Mackay *et al.*, 2004 e Velasco *et al.*, 2006). Um método de quantificação absoluta, o qual utiliza uma curva-padrão onde se leva em consideração o valor de Ct do gene de estudo também pode ser utilizado. Independentemente da quantificação utilizada, neste projeto e em outros estudos (Janovick-Guretzky *et al.*, 2007; Graber *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2013b) é preciso incluir sempre o gene de referência, o qual deve se expressar de forma constitutiva nas células.

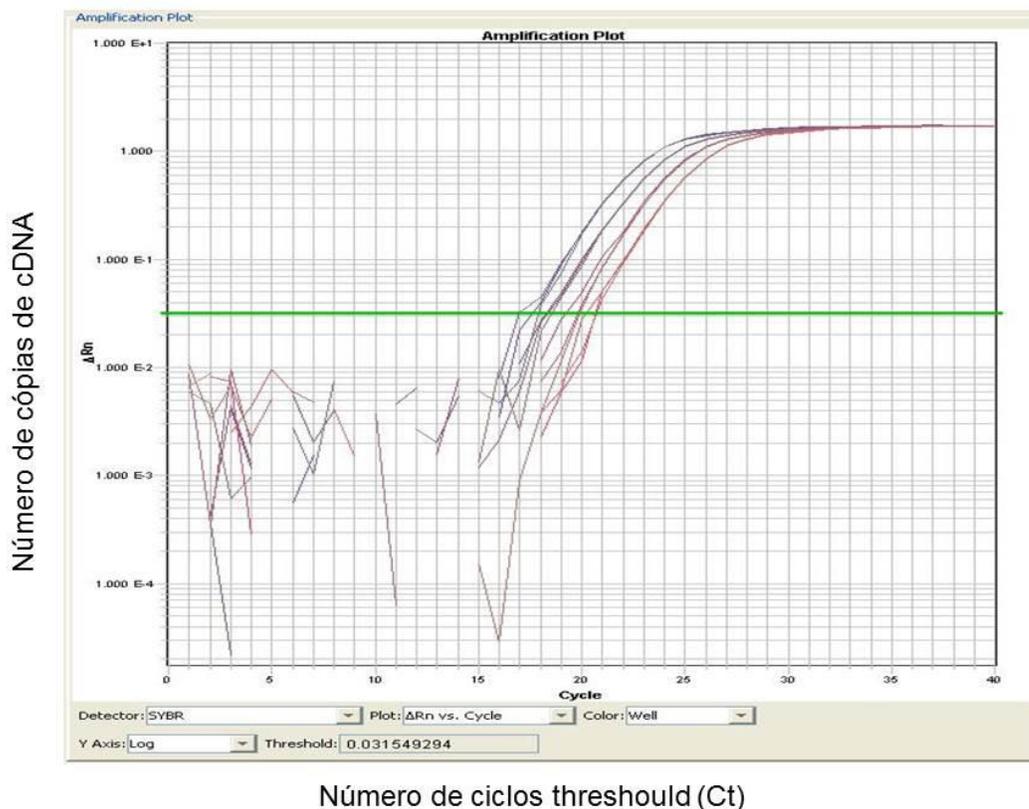
A construção de uma curva padrão baseada em diluição seriada do molde da PCR (cDNA) é de grande importância pois determina se a eficiência da amplificação está adequada com os *primers* selecionados (Raeymaekers *et al.*, 2000). Neste projeto foi avaliada a eficiência de cada par de *primer* utilizado para as reações de RT-PCR. Somente foram utilizados os *primers* com a eficiência e correlação acima de 95%. A figura 9 está representando as diluições feitas com todas amostras utilizadas neste projeto. Na tabela 4 encontram-se os resultados. Inicialmente para calcular a correlação, foram feitas 4 diluições com uma amostra de cDNA que foi testado com todos os *primers*. As médias e o desvio padrão dos valores dados pelo Ct foram obtidas para cada *primer*, e o cálculo da eficiência de amplificação feito por meio da equação abaixo: (Tabela 4).

Para calcular a eficiência foi utilizado a fórmula:

$$E = 10^{[-1/\text{inclinação}]-1} * 100$$

E= eficiência

Inclinação = valor a dado pela equação  $y = ax + b$ , feita pelo gráfico da correlação (Livak *et al.*, 2001).



**Figura 10:** Figura que representa a padronização da reação de RT-PCR em tempo real. Diluição em série das amostras de cDNA da vaca F1 Holandês-Gir (2055/5) obtida após a extração do RNA total do tecido hepático. O nível de fluorescência computado para cada amostra é suficiente para atingir um limiar (traço horizontal) de detecção igual para cada *primers*/amostra testado e a reação de amplificação é realizada de forma exponencial, portanto observa-se que a cada diluição do cDNA, o número de ciclos (Ct) aumenta uma vez. A emissão de luz será proporcional a quantidade de produto gerado em cada tubo da reação. Nesta figura foi utilizado o *primer* do gene G6PC, a qual está representando todas as diluições feitas com os diferentes *primers* dos genes-alvo testados neste projeto.

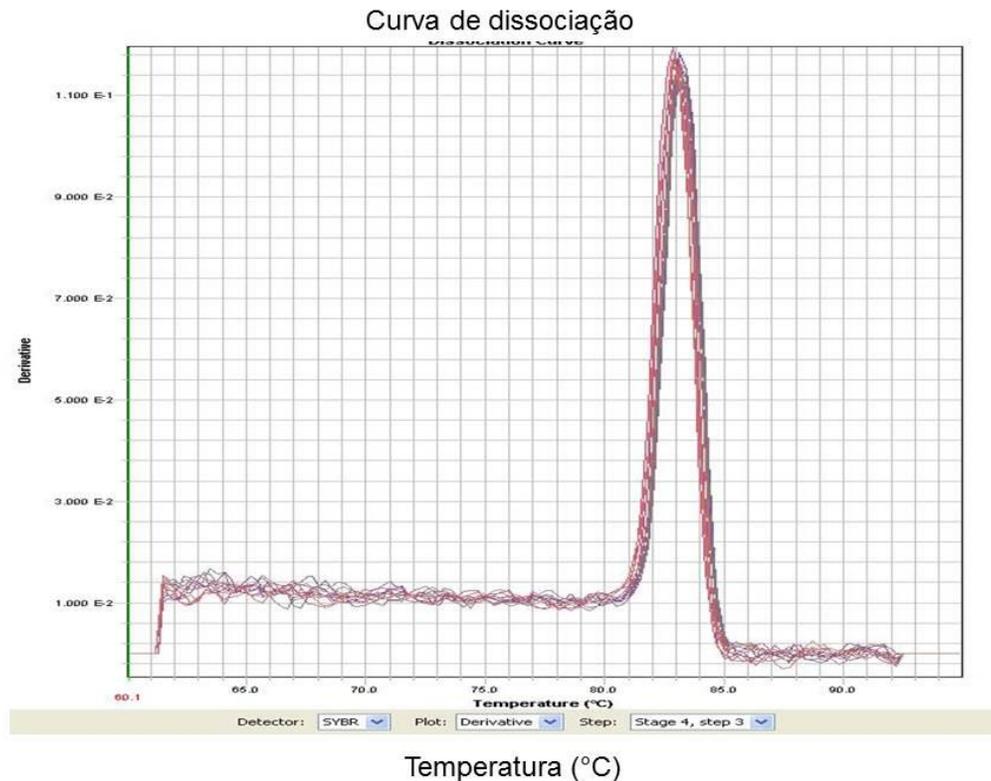
**Tabela 4:** Sequencia de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR, o número de acesso ao GenBank/EMBL, eficiência, correlação e o número de pares de bases dos produtos de PCR

<i>Gene</i>	<i>Sequencia 5'-3'</i>	<i>N° acesso ao GenBank/ EMBL</i>	<i>Eficiência (%)</i>	<i>Correlação (r<sup>2</sup>) (%)</i>	<i>Produto de PCR (pb)</i>
<b>*GAPDH</b>		U85042	99,96	97,35	197
<b>Forward</b>	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG				
<b>Reverse</b>	TCATGGATGACCTTGCCAG				
<b>*ACTB</b>		NM_173979.3	100	96,35	222
<b>Forward</b>	CAGGATGCAGAAAGAGATCACTGC				
<b>Reverse</b>	AGGGTGTAAACGCAGCTAACAG				
<b>*RPS9</b>		NM_001101152	98,15	97,39	140
<b>Forward</b>	AAGCTGATCGGCGAGTATG				
<b>Reverse</b>	GCATTACCTTCGAACAGACG				
<b>*G6PC</b>		NM_001076124	97,38	98,29	140
<b>Forward</b>	GCCAACCTACAGATTTTCGGTG				
<b>Reverse</b>	CAATGCCTGACAAGACTCCAG				
<b>MUT</b>		NM_173939.2	95,70	98,36	177
<b>Forward</b>	GGGATTCCCAAAGTGGCTGA				
<b>Reverse</b>	TCTTCGGGCAGCACATTCTT				
<b>*PPARA</b>		NM_001034036	99,96	99,20	363
<b>Forward</b>	AGGGCTGCAAGGGTTTCTTTAG				
<b>Reverse</b>	TGACGAAAGGCGGGTTGTTGTTG				
<b>SLC2A2</b>		NM_001103222.1	95,33	97,61	147
<b>Forward</b>	ACAAGCCTGGGAGATCCAAC				
<b>Reverse</b>	CCCAAGCAACCCTCCAAAGA				

EMBL = European Molecular Biology Laboratory

\*GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; RPS9 = Proteína ribossomal 9; G6PC = Glicose-6-fosfatase; PPARA = Receptor peroxissomo proliferador-ativador  $\alpha$ . Todas estas sequencias de primers foram utilizados pelos autores: Hammon, et al. (2003) e Graber, et al. (2010), respectivamente. ACTB = B-actina; MUT = Metilmalonil-coa mutase; SGC2A2 = Transportador de glicose. Estas sequencias de primers foram desenhadas pelo programa *PRIMERBLAST*.

Ao término das amplificações foi feita também a análise da curva de dissociação (Melting curve) que permite avaliar se a especificidade das reações era adequada. Este passo foi aplicado em todos os genes quantificados neste projeto. Como mostrado na Figura 10 a presença de um único pico nesse gráfico de “melting” indica que todas as moléculas amplificadas possuem a mesma temperatura de dissociação, o que indica que apresentam a mesma sequência nucleotídica. Se fosse observado o aparecimento de vários picos na curva, poderia considerar a hipótese de produtos inespecíficos na reação.



**Figura 11:** Figura que determina a curva de dissociação ou “melting” na reação de RT-PCR em tempo real da amostra de cDNA da vaca F1 Holandês-Gir (2055/5) obtida após a extração do RNA total do tecido hepático. Nesta figura foi utilizado o *primer* do gene G6PC, a qual esta representando todas as amostras testadas neste projeto.

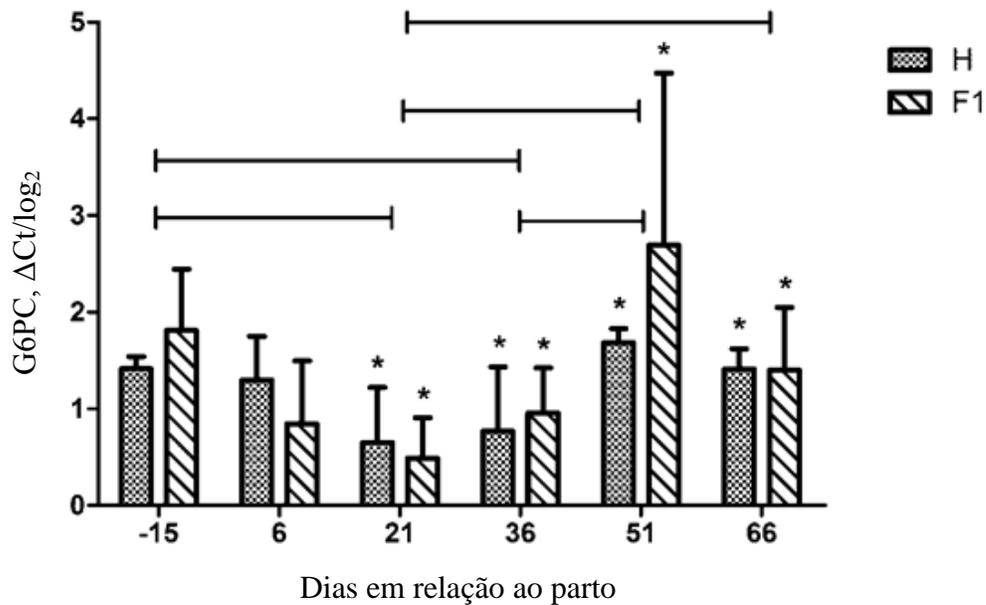
O RT-PCR começa a uma temperatura pré-ajustada (geralmente acima da  $T_m$  do *primer*, por exemplo, 65 °C) e mede a quantidade de fluorescência. Como a temperatura aumenta no decorrer das reações, a dupla fita de DNA desnatura, se tornando fita simples. Quando as sequências no DNA são ricas em regiões com guanina (G) e citosina (C), a dissociação irá acontecer quando a temperatura for alta, entretanto, se as regiões forem ricas em adenina (A) e timina (T) o pico na curva de “melting” acontecerá em temperaturas mais baixas.

Como neste projeto foi utilizado o reagente SYBER®Green e o mesmo não é específico para uma determinada sequência genética, a curva de “melting” se fez necessária, como

forma de comprovar a especificidade do gene em estudo. Caso não fosse específico, na curva haveria dois picos formados em duas diferentes temperaturas.

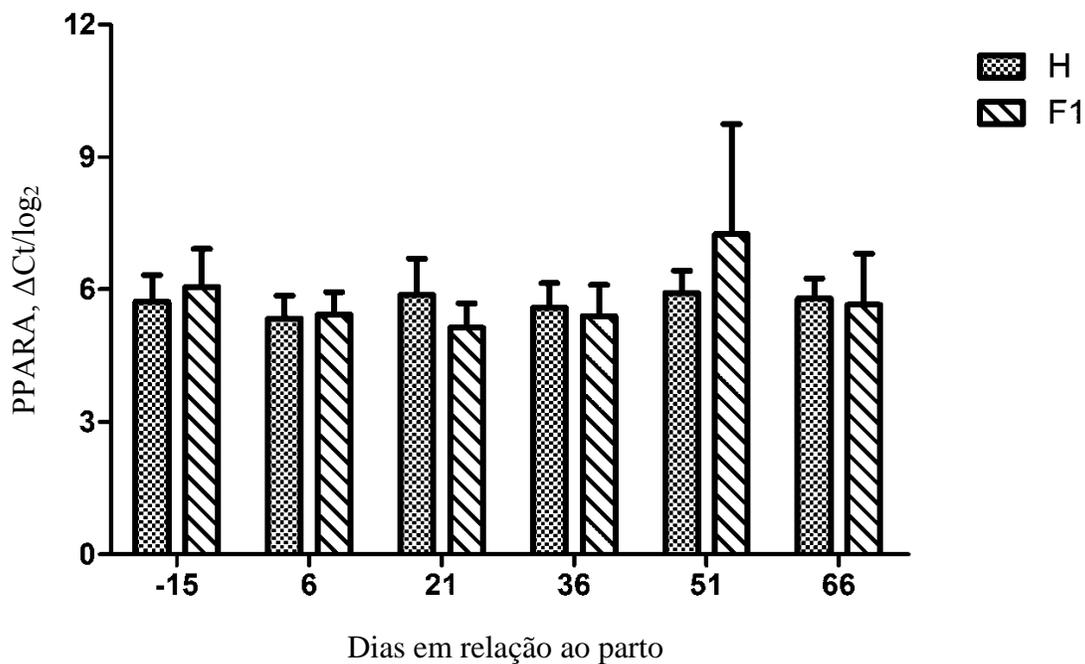
#### **1.6.6. Genes que foram expressos no tecido hepático**

Do pré para pós-parto houve tendência em reduzir a expressão do gene G6PC até 6 dias de lactação. Entretanto, ao comparar o período que antecede ao parto com 21 e 36 dias após o parto, a expressão do gene reduziu 39 e 55%, respectivamente e aumentou 380% dos 21 para 51 dias e 228% até 66 dias em lactação (Figura 12). Com relação ao grupo genético estudado, não ocorreu diferença significativa.



**Figura 12:** Concentração média relativa de mRNA (Delta CT/ $\log_2$ ) da enzima glicose-6-fosfatase (G6PC) aos - 15, + 6, + 21, + 36, + 51, + 66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir. \*Diferença significativa entre as médias ao longo do período de transição, Tucker-Kramer ( $P < 0,05$ ).

Para o gene do Receptor Peroxissomo Proliferador Ativador Alfa (PPARA), não foram observadas diferenças entre os períodos e grupos genéticos avaliados (Figura 13).



**Figura 13:** Concentração média relativa de mRNA (Delta CT/log<sub>2</sub>) do fator de transcrição, receptor peroxissomo proliferador ativador alfa (PPARA) aos - 15, + 6, + 21, + 36, + 51, + 66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir.

Ao trabalharem com vacas da raça Holandês, Weber, *et al.*, (2013b) observaram diferença na expressão do gene G6PC ao longo do período de transição, porém não encontraram diferença ao avaliarem o gene PPARA.

Segundo Graber *et al.*, (2010) o aumento nas concentrações de mRNA do gene G6PC do pré para o pós parto é um indicativo de ajuste do fígado para suportar demanda de glicose. Já Weber *et al.*, (2015) trabalhando com vacas da raça Holandês subdivididas em três grupos de acordo com o tamanho do período seco, ou seja, grupos com curto período seco (28 dias); convencional (56 dias) e com o período seco prolongado (90 dias), não observaram diferença significativa sobre os níveis de mRNA do gene G6PC após o parto.

Em ruminantes, a glicose disponível é dependente da gliconeogênese no fígado ou de nutrientes gliconeogênicos, tais como ácido propiônico, aminoácidos e lactato (Danfaer *et al.*, 1994).

As mudanças observadas para o gene G6PC neste estudo demonstraram que a redução nos níveis de mRNA do pré para o pós-parto ocorreu, possivelmente, devido à elevada concentração de BHBA. Como mencionado por Van Dorland *et al.*, (2009) concentrações de BHBA maior que 1,00 mmol/L pode regular negativamente a expressão de genes envolvidos com a gliconeogênese, como G6PC, PC, PEPCKc ou PEPCKm. De acordo com Loores *et al.*, (2007); Li *et al.*, (2012b); Scaff *et al.*, (2012) and Weber *et al.*, (2013b), elevadas concentrações de BHBA está altamente relacionada com o acúmulo de gordura hepática e com o aumento da expressão dos genes envolvidos na síntese dos ácidos graxos. Já elevadas concentrações de AGNE não prejudicou o metabolismo da glicose, segundo relatado por Hazelton *et al.*, (2008); White *et al.*, (2011) and Li *et al.*, (2012a).

Nos estudos de Greenfield *et al.*, (2000); Aschenbach *et al.*, (2010); Garber *et al.*, (2010); Weber *et al.*, (2013b), os níveis de mRNA aumentaram neste período, bem como, outros genes envolvidos na gliconeogênese hepática, devido ao ajuste que o fígado promove para suprir a demanda de glicose durante o período de transição, possivelmente, isto ocorre devido a grande flexibilidade metabólica e ao papel fundamental e central que o fígado tem sobre o processamento e distribuição de nutrientes, abastecendo os órgãos e tecidos via corrente sanguínea.

Kreipe *et al.*, (2011) concluíram que as concentrações de mRNA para os genes G6PC e PEPCKc e PEPCKm reduziram à medida que aumentou a concentração sanguínea de glicose, sendo que para o gene G6PC e PEPCKc esta redução foi significativa. O aumento na concentração de glicose na corrente sanguínea pode provocar um efeito inibitório, o qual pode regular a atividade enzimática (Lehninger, 2014).

O hormônio insulina é liberado pelo pâncreas, tendo efeito central sobre a regulação metabólica no fígado, influenciando as enzimas tanto pelo processo de fosforilação quanto

para o processo de desfosforilação, inibindo ou estimulando a expressão gênica (Lehninger, 2014), por exemplo, em genes envolvidos na gliconeogênese, cetogênese e estimulando os efeitos na lipogênese no fígado de vacas leiteiras (Hairly *et al.*, 2006). Weber *et al.*, (2013b) confirmaram o efeito inibitório da insulina sobre os genes G6PC e PEPCKc. Neste projeto não foi mensurado a concentração de insulina no sangue das vacas.

Rukkewamesk, (1999) mencionou que a expressão da enzima PEPCK foi menor para as vacas que consumiram alta concentração de energia do pré para o pós-parto, e nenhuma diferença significativa na expressão da enzima G6PC e na frutose-1,6-bifosfatase. O alto consumo de energia durante o período seco fez com que o fígado se adaptasse menos a gliconeogênese antes do parto. Assim, após o parto ocorreu menor atividade da enzima PEPCK nas vacas experimentais, indicando uma inadequada produção de glicose. Esta particular situação promove mobilização dos ácidos graxos vindos do tecido adiposo e em consequência, o fígado é continuamente confrontado com alta concentração de AGNE.

Seung-Soon *et al.*, (2011) observaram que o fator de transcrição PPARA influenciou a atividade promotora do gene G6PC, regulando-a positivamente. A concentração de mRNA para o gene PPARA, quando em camundongos em processo de jejum, aumentaram, e ao serem realimentados as concentrações reduziram. O mecanismo pelo qual este gene influencia ou regula o gene G6PC ainda não é muito bem entendido. O PPARA é um fator de transcrição que contribui para o aumento da liberação da glicose pelo fígado (Seung-Soon *et al.*, 2011). Neste projeto, não foram avaliados as correlações entre os genes PPARA e G6PC.

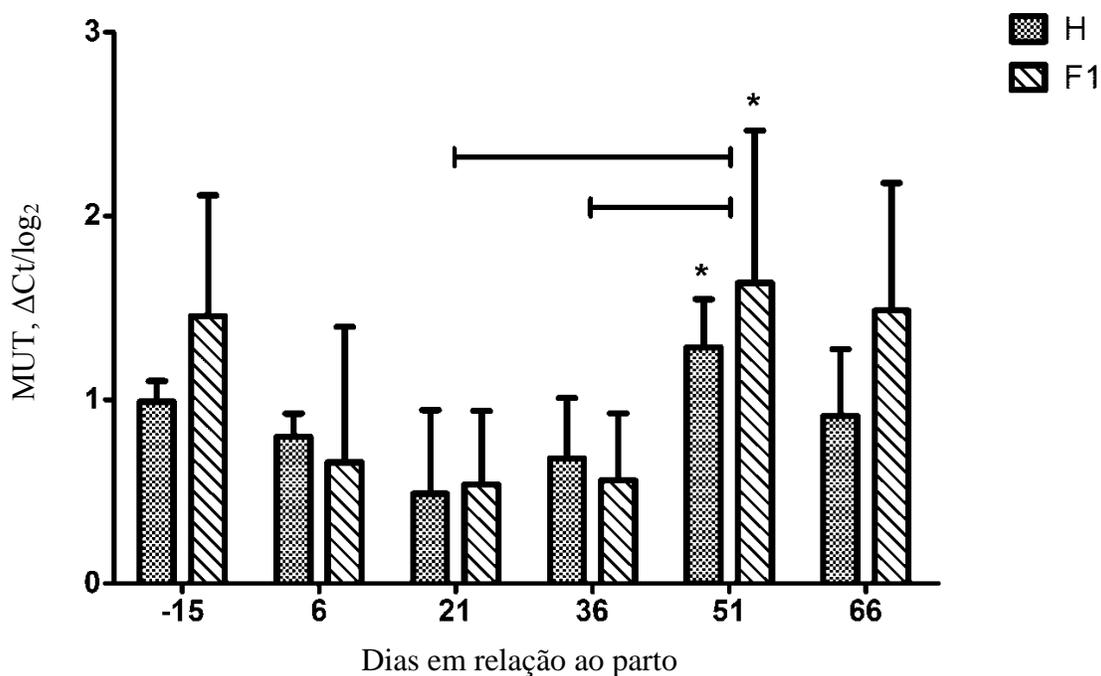
Segundo Kanunfre, (2002), a função do PPARA é ligante e dependente. Ou seja, quando ativados por ligantes, modulam a expressão de alguns genes pela ligação de elementos responsivos ao PPARA. Este elemento é o PPRE (Peroxisomo Proliferador de Elemento Responsivo), os quais são sequências repetidas direta de hexonucleotídeos separados por uma base (DR1) e localizadas na região regulatória do promotor dos genes, que estão sob seu controle transcricional.

Van Dorland *et al.*, (2009) observaram, ao coletarem amostras de tecido hepático 10 semanas antes da data prevista do parto, um dia, 4 e 14 semanas após o parto, que não houve diferença significativa para o gene PPARA entre os grupos que consumiram ou não semente de girassol. No entanto, a expressão do gene PPARA aumentou do primeiro dia até 4 semanas e reduziu após este período até 14 semanas. Janovick, (2004) e Weber *et al.*, (2013b) também demonstraram aumento nos níveis de mRNA para o gene PPARA no fígado das vacas ao redor do parto. Estes resultados diferem dos apresentados neste projeto, onde não foram observadas diferenças entre os níveis de mRNA do gene PPARA (Figura 13).

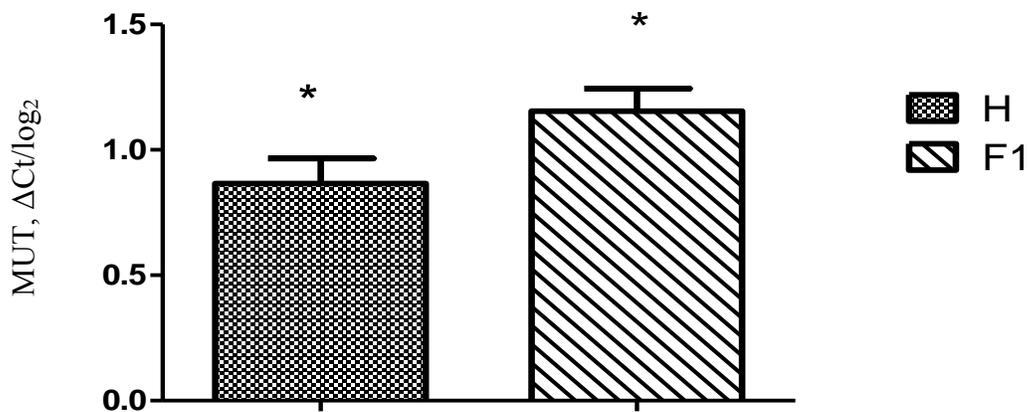
Os autores também comentaram que o gene PPARA é um fator de transcrição predominante envolvido na regulação do metabolismo dos ácidos graxos e de carboidratos durante o período de transição, pois observaram aumento significativo em alguns genes envolvidos em ambos os metabolismos, tais como a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT1) e 2 (CPT2) e o fosfenolcarboxiquinase citosólico (PEPCKc) e o mitocondrial (PEPCKm). Os primeiros genes estão envolvidos na oxidação dos ácidos graxos e os segundos no metabolismo da gliconeogênese, os quais estão envolvidos no segundo ponto de controle para formação da glicose (Lehninger, 2014). Estes genes não foram analisados neste projeto.

Com relação à expressão do gene da metilmalonil-Coa mutase (MUT), observou-se aumento significativo de 35% ao comparar os períodos de 21 com 51 dias e de 42,5% de 36 para 51 dias em lactação. Esses resultados estão de acordo com os dados fisiológicos que são observados durante a recuperação dos animais 36 dias após o parto. Nesse período é esperado aumento da capacidade de conversão de derivados de ácidos graxos de cadeia curta (propionato) em succinil-Coa, o qual pode ser metabolizado pela via da gliconeogênese. Como a análise desse gene não havia sido ainda descrita na literatura para vacas em período de transição, acredita-se que esse resultado representa uma contribuição importante para o estudo do metabolismo hepático nos animais avaliados neste projeto (Figura 14).

Para o mesmo gene também foi observada diferença entre os grupos genéticos (Figura 15). Estes resultados podem ter refletido positivamente sobre o balanço energético do animal e poderia ser explicado pela principal fonte de variação no rendimento entre vacas que é a partição de nutrientes, ou seja, quando ocorre mudança na prioridade dos tecidos/sistema, no qual é possível que os nutrientes metabolizáveis e/ou reservas teciduais sejam direcionadas para a glândula mamária ou outros tecidos, como fonte de energia ou reserva. Os mecanismos responsáveis por esta partição incluem tanto adaptações homeostáticas quanto homeorréticas, que ao longo prazo, envolve provavelmente cada tecido e sistema fisiológico do organismo (Baumgard *et al.*, 2012).



**Figura 14:** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/ $\log_2$ ) do gene da enzima metilmalonil Coa mutase (MUT) aos - 15, + 6, + 21, + 36, + 51, +66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir. \*Diferença significativa entre as médias ao longo do período de transição, Tucker-Kramer ( $P < 0,05$ ).



**Figura 15:** Concentrações médias relativas de mRNA (Delta CT/ $\log_2$ ) do gene da enzima metilmalonil Coa mutase (MUT) entre as vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir. \*Diferença entre as médias das vacas Holandês e F1 Holandês-Gir, Tucker-Kramer ( $P < 0,05$ ).

O gene da enzima metilmalonil-Coa mutase é fundamental nas reações metabólicas e para o metabolismo de energia no hepatócito de ruminantes, pois é a enzima responsável em converter o propionato em succinato, que é um intermediário do TCA. A partir deste forma-se o malato mitocondrial, que é capaz de sair da mitocôndria, ser transformado em oxaloacetato citosólico, e servir como intermediário da via que leva à síntese de glicose.

No hepatócito a via metabólica do ácido propiônico é essencial para vacas leiteiras. Quando o ácido propiônico é absorvido pelas paredes ruminais entra na via porta-hepática e chega ao fígado. Nos hepatócitos é carboxilado até formar o metabólito metilmalonil-Coa (Kozloski, 2002 e Lehninger, 2014).

Outra possível explicação para o aumento nos níveis de mRNA do gene MUT para as vacas F1 Holandês-Gir em relação as vacas da raça Holandês é devido às etapas envolvendo a regulação gênica. Segundo Day e Tuite, (1998) a expressão de um gene pode ser controlada

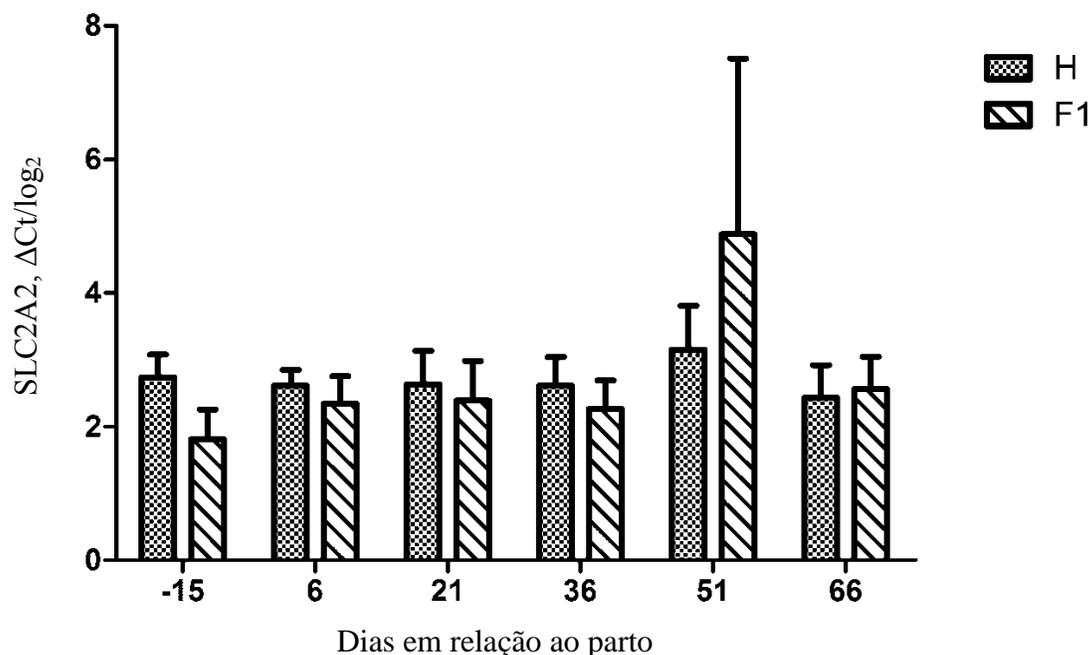
em vários níveis, incluindo os processos pós transcricional, bem como na tradução e pós tradução.

Preynat *et al.*, (2010) analisaram 60 vacas da raça Holandês de alta produção, as quais receberam três tipos de tratamentos: um controle e outros dois grupos com menor teor de metionina (1,83% da proteína metabolizável) e outro com maior teor (2,2% da proteína metabolizável). As vacas que receberam metionina na dieta foram subdivididas em grupos que receberam ácido fólico (160mg) como suplemento alimentar e no outro grupo este foi combinado com vitamina B12. O grupo de vacas que recebeu maior teor de metionina teve maior expressão do gene MUT no tecido hepático e somente o grupo que recebeu menor teor de metionina mais vitamina B12 teve aumento significativo em 25% sobre a expressão do gene MUT.

A glândula mamária não é capaz de sintetizar glicose (Scott *et al.*, 1976). Com isso, o tecido mamário é dependente do suprimento de glicose sanguínea. Vacas em lactação, necessitam em média 72g de glicose para produzir 1 kg de leite (Kronfield, 1982). Uma vaca produzindo em média 40 kg de leite por dia requer remoção de 3 kg de glicose do sangue/dia pela glândula mamária, podendo essa ser capaz de remover do sangue 60-85% da glicose (Sunehag *et al.*, 2002 e 2003).

Vários transportadores de glicose, denominados Glut1 a Glut12 já foram identificados, sendo os mais estudados, a Glut1 até a Glut5. Neste trabalho foi avaliada a expressão gênica do transportador de glicose 2 (SLCSA2 - Glut2), o qual é muito expresso no fígado e capaz de liberar ou remover a glicose do tecido para a corrente sanguínea (Milles *et al.*, 1999 e Breves e Wolfram, 2006).

Neste projeto, não foi encontrado diferença significativa na expressão do gene da Glut2, entre os grupos genéticos ao longo do período de transição. Hammon *et al.*, (2009) também não encontraram diferença na expressão do gene da Glut 2 em vacas da raça Holandês durante o período de transição.



**Figura 16.** Concentrações médias relativa de mRNA (Delta CT/ $\log_2$ ) para o gene SLC2A2 (transportador de glicose-Glut2) aos - 15, + 6, + 21, + 36, + 51, + 66 dias em relação ao parto de vacas da raça Holandês (H) e F1 Holandês-Gir.

Os estudos conduzidos pelos autores Zhao *et al.*, (1996) mostraram resultados semelhantes ao deste projeto, pois não encontraram diferenças significativas ao quantificar a expressão do gene da Glut2 no fígado de vacas da raça Holandês que receberam (29mg/dia) ou não do hormônio do crescimento (GH). Os autores concluíram que o GH não influenciou a quantidade de transcritos para o gene da Glut2 no fígado. Já Zhao *et al.*, (2004) ao avaliarem a expressão gênica do transportador de glucose-1 (Glut1) no tecido mamário de vacas leiteiras de mostras coletadas aos 40, 20 e 7 dias do pré-parto e aos 7 dias do pré-parto e aos 7 dias após o parto, demonstraram que os níveis de mRNA para a Glut1 aumentaram significativamente ao aproximar-se do parto e após o parto. A Glut1 é o principal transportador de glicose expresso no tecido mamário.

Avaliando a expressão gênica do gene da Glut2, e do receptor de insulina (IR) nas células hepáticas, Eisenberg *et al.*, (2004), trabalhando com 35 camundongos que foram alimentados e outros que passaram por um período de jejum, encontraram aumento significativo dos genes avaliados no grupo de camundongos que foram alimentados e observaram correlação de 81% entre os genes avaliados.

Trabalhando com células epiteliais mamárias de vacas da raça Holandês Zhao *et al.*, (2014) encontraram que a proteína quinase C (PKC) regula a expressão gênica do transportador de glicose 1 e 8, tal como a remoção da glicose para dentro do tecido. A proteína quinase C é um importante sinalizador molecular, capaz de modular uma grande variação de processos celulares, tais como secreções, expressão gênica, proliferação, diferenciação e contração muscular (Bell e Bauman, 1997).

O fígado tem grande flexibilidade metabólica e alta taxa de renovação celular (5 a 10 vezes maior do que ocorre em outros tecidos) (Lehninger, 2014). Durante o período de transição, a taxa de renovação celular é intensa. Seria, portanto, interessante avaliar, futuramente, os níveis de mRNA de PKC no fígado dos grupos genéticos aqui estudados.

Ao estudar os efeitos da infusão constante de insulina em camundongos, em uma concentração de 10 mmol/h, Postic *et al.*, (1993) concluíram que ao aumentar a concentração de insulina, os níveis de mRNA do gene da Glut2 reduziu, após 3h, em 70% e houve uma inibição de 93% após 6h de infusão nas células hepáticas de camundongos vivos. Ao avaliarem as células do hepatócito recebendo a mesma infusão de insulina, porém *in vitro*, os autores encontraram que a redução na expressão gênica da Glut2 foi significativa somente após 12h. Devido às diferenças das respostas nos hepatócitos *in vivo* e *in vitro*, os autores sugeriram que possivelmente existe regulação do gene da Glut2 no fígado ocasionado pela insulina.

Também foi avaliado o efeito da concentração de glicose sobre a expressão do gene da Glut2, onde demonstraram que a medida que a concentração de glicose aumentou (0-20

mmol), os níveis de mRNA da Glut2 aumentou significativamente, com ou sem a presença da insulina.

Ao trabalhar com células hepáticas de pessoas obesas e diabéticas (com síndrome metabólica) Okamoto *et al.*, (2002) observaram em culturas *in vitro* que a medida que aumentou a concentração de ácido oleico, a expressão do gene da Glut2 aumentou, demonstrando que o perfil desse ácido graxo regula a expressão do gene da Glut2 no tecido hepático.

## 7. CONCLUSÕES

Neste estudo foi observado que os grupos genéticos estudados são fisiologicamente e metabolicamente semelhantes, pois não foram encontradas diferenças nos níveis de mRNA para os genes G6PC, PPARA e SLC2A2, como também nas concentrações dos metabólitos BHBA e AGNE.

As concentrações de BHBA e AGNE aumentaram do pré para o pós-parto, possivelmente devido ao balanço energético negativo que ocorre neste período.

Foi observada redução da expressão do gene G6PC ao comparar o pré com o pós-parto, possivelmente devido à elevada concentração de BHBA que ocorreu neste período, o que poderia indicar que este metabólito regulou negativamente a expressão do gene.

A expressão do gene MUT diferiu entre os dois grupos genéticos estudados, sendo os níveis de mRNA maiores em vacas F1 do que nas vacas Holandês. Também, foi observada diferença significativa entre os grupos nas concentrações plasmáticas de glicose, demonstrando que esta rota metabólica foi mais favorável em vacas F1. Apesar de não terem sido avaliados parâmetros, como ganho de peso dos animais e escore da condição corporal, pode-se especular que o aumento na expressão do gene MUT pode estar relacionado com a partição de nutrientes, o qual pode refletir no desempenho animal.

## **8. PERSPECTIVAS**

Os resultados observados neste projeto irão permitir maior entendimento em relação ao metabolismo e a fisiologia das vacas F1 Holandês-Gir, pois este grupo genético é importante para a produção de leite no país e devemos visar melhorar a produção e a composição do leite. Diante disto, mais pesquisas envolvendo a nutrigenômica são necessárias.

Diante dos resultados deste projeto, seria interessante quantificar os níveis de mRNA das enzimas piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolcarboxiquinase citosólica (PEPCKc), envolvidas no metabolismo da glicose, bem como mensurar a concentração de insulina.

Diante da importância do gene MUT para o metabolismo da glicose em ruminantes, seria interessante sequenciar a região promotora do gene da enzima metilmalonil-coa mutase (MUT), em ambos os grupos genéticos.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADMED, S; LIU, C. C; NAWSHAD, A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta 3. *Dev. Biology*.v.15.n.2.p.193-207, 2007.

AKERS, R. M. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.89.1222-1234, 2006.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular Biology of the cell*.5ª edição.411-499p, 2008.

ALVARENGA, E.A; MOREIRA, G. H. F. A; FACURY FILHO, E. J; LEME, F. O. P; COELHO, S. G; MOLINA, L, R; LIMA, J. A. M; CARVALHO, A. U. Avaliação do perfil

metabólico de vacas da raça holandesa durante o período de transição. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. N.3.v.35.p.281-290, 2015.

BASU-MODAK, S. Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-Coa synthetase 2 in aggregated rat brain cell cultures. *Journal of Biology Chemistry*.v.274.p.35881-35888, 1999.

BARROS, C. S. L; CASTILHOS, L. M. L; RISSI, D. R; KOMMERS, G. D; RECH, R. R. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senesio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.v.27.n.1.53-60p, 2008.

BAUMAN, D. E; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation; A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*.v.63.1514-1529p., 1980.

BECKMAN, L. P; HANNIVOORT, R.A; GERJEN, G; HOT, G. S.The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases.*Journal of Hepatology*.v.56.p.1952-1964, 2012.

BELL, A. W; BAUMAN, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation.*Mammary Gland biology Neoplasia*.v.2.p.265-278, 1997.

BERGMAN, E. N. SYMPOSIUM: Ketosis in Dairy Cows x Hyperketonemia-Ketogenesis and Ketone Body Metabolism. *Journal of Dairy Science*.v.54.n.6.p.936-948, 1971.

BERGMAN E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species.*Physiological Reviews*.v.70.n.2.p.567-590, 1990.

BERTONI, G. E; TREVISI, X; HAN, M; BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows.*Journal of Dairy Science*.v.91.p.3300-3310, 2008.

BITENCOURT, G. A; CHIARI, L; BORGES DO VALE, C; LAURA, V. A; MORO, J. R. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. Embrapa Gado de Corte. Boletim de pesquisa e desenvolvimento.ISSN 1983-9715, 2011.

BODE, G; YOUNG, J. W; BEITZ, D. C. Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. Journal of Dairy Science.v.87.3105-3124p., 2004.

BRAGA, M. M; CASTILHOS, L. M. L; SANTOS, M. N. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. Revista Ciências Rurais.v.15.7988p, 1985.

BROCKMAN, R. P. Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminants- A review. Journal Canadian Veterinary.v.19.55-62p, 1978.

BUCHER, N. L. R; SWAFFIELD, M. N. Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon (growth regulation/portal blood hepatotrophic factors/evisceration/pancreatectomy).Proceedings of the National Academy Science.v.72.n.3.p. 1157-1160, 1975.

BUTLER, S. T; MARR, A. L ; PELTON, S. H ; RADCLIFF, R. P ; LUCY, M. C ; BUTLER, W. R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-1 and GH receptor A1. Journal Endocrinol.v.176.p.205-217, 2003.

CARRIQUIRY, M; WEBER, W. J; FAHRENKRUG, S. C; CROOKER, B. A. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. Journal of Dairy Science.v.92.p.4889-4900, 2009.

CARVALHO, B. C. Parâmetros reprodutivos, metabólitos e produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu submetidas a dois manejos pré-parto. Tese: Doutorado em Zootecnia. Belo Horizonte: EV-UFMG p.1-193, 2009.

CHEN, J; ROSS, J. J; VAN DORLAND, H. A; REMMELINK, G. J; BRUCKMAIER, R. M; KEMP, B; VAN KNEGSEL, A. T. M. Effects of dry period length and dietary energy source on metabolic status and hepatic gene expression of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*.v.98.n.2.p.1033-1045, 2015.

CHURCH, D. C. THE RUMINANT ANIMAL. Digestive physiology and nutrition. 2<sup>o</sup>ed., 1993.

COSTA, P. B; QUAIROZ, A. C; RODRIGUES, M. T; MAGALHAES, A. L. R; COSTA, M. G; TORAL, F. L. B; CARVALHO, T. A; MONTEIRO, L; ZORZI, K; DUARTE, M. S. Desempenho de novilhas leiteiras sob manejo para crescimento compensatório recebendo suplementação com ionóforo. *Revista Brasileira de Zootecnia*.v.36.n.2.p.461-470, 2007.

CURTIS, C. R; HOLLIS, N. E; CHARLES, J. S; SMITH, R. D; KROFELD, D. S. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders and mastitis in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*.v.68.p.2347-2360, 1985.

DANN, H. M; LITHERLAND, N. B; UNDERWOOD, J. K; BIONAZ, M; D'ANGELO, A; McFADDEN, J. W; DRACKLEY, J. K. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of Dairy Science*.v.89.p.3563-3577, 2006.

DANFAER, A. Nutrient metabolism and utilization in the liver. *Livestock Production Science*.v.34.p.115-127, 1994.

DASTGHEIB, S; IRAJIE, C; ASSAEI, R; KOOHPEIMA, F; MOKARRAM, P. Optimization of RNA Extraction from Rat Pancreatic Tissue. *Iran Medicine science*.n.3.v.39.p.282-288, 2014.

DAY, D. A; TUIITE, M. F. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *Journal of Endocrinology*.v.157.p.361-377, 1998.

DAWSON, K. A. Nutrigenomics: Feeding the genes for improved fertility. *Animal Reproduction Science*.v.96.p.312-322, 2006.

DENECHAURD, P. D; DENTIN, R; GIRARD, J. POSTIC, C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance.v.582.p.68-73, 2008.

DENTIN, R. BENHAMED, F; HAINAULT, I; FAUVEAU, V; FOUFELLE, F; DYCK, J. R. B; GIRARD, J; POSTIC, C. Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice.v.55.p.2159-2170, 2006.

DOEPEL, L; LOBLEY, G. E; BERNIER, J. F; DUBREUIL, P; LAPIERRE, H. Differences in splanchnic between late gestation and early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.92.n.7.p.3233-3243, 2009.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *Journal of Dairy Science*.v.82.2259-2273p., 1999.

DRACKLEY, J. K; OVERTON, T. R; DOUGLAS, G. N. Adaptation of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*.v.84., 2001.

DRACKLEY, J. K; DONKIN, S. S; REYNOLDS, C. K. Major advances in fundamental dairy cattle nutrition.*Journal of Dairy Science*.v.89.n.4.p.1324-1336, 2006.

DUFFIELD, T; BAGG, R; KELTON, D; DICK, P; WILSON, J. A field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.V.86.n.4161-4166, 2003.

DUFFIELD, T. F; RABIEE, A. R; LEAN, I. J.A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle.Part 2. production effects. *Journal of Dairy Science*. V.91.p.1347-1360, 2008.

EISENBERG, M. L; MAKER, A. V; SLEZAK, L. A; NATHAN, J. D; KUMUDESH, C. S; BHANU, P. J; GEIBEL, J. P; ANDERSEN, K. A. Insulin Receptor (IR) and Glucose Transporter 2 (GLUT2) Proteins Form a Complex on the Rat Hepatocyte Membrane. *Cell Physiology Biochemistry*.v.15.p.51-58, 2004.

FENG, J; SHEN, W. H. Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants.Articles reviews.Institut de Biologie Moléculaire des Plantes.v.5.Article.83, 2014.

FLADEBY, C. R; SKAR, R; SERCK-HANSEN, G. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells.*Biochemistry*.201-208p, 2003.

FONSECA, L. F. L; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos.175p, 2000.

GARRICK, D. J; BAUMGARD, L. H; NEIBERGS, H. L. Invited review: Genomic analysis of data form physiological studies. *Journal of Dairy Science*.v.95.n.2.p.499-507, 2012.

GILLARD, G. O; FARR, A. G. Features of medullary thymic epithelium implicate postnatal development in maintaining epithelial hererogeneity and tissue restrictd antigen expression. *Journal of Immunology*.v.176.p.5815-5824, 2006.

GLORIA, J. R. Fatores genéticos e ambientais que influenciam as características das curvas de lactação de quatro grupos genéticos de mestiças Holandês-Zebu. Tese: Doutorado em Zootecnia. Belo Horizonte: EV-UFMG.p.1-73, 2010.

GONZALES, F. H. D. Uso do perfil metabólico no diagnóstico de doenças metabólicas-nutricionais. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da UFRGS. p. 89-106, 2000.

GRABER, M; KOHLER, S; KAUFMANN, T; DOHERR, M. G; BRUCKMAIER, R. M e VAN DORLAND, H. A. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. Journal of Dairy Science.v.93.n.11.5200-5215p., 2010.

GRAVET, H.O. Breeding of dairy cattle. In: Dairy Cattle Production, Elsevier Science, New York, Gravet, p.35-76, 1987.

GREENBAUM, A. L; GUMAA, K.A; McLEAN, P. The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status. Archives of Biochemistry and biophysics.v.143.p.617-663, 1971.

GREENFIELD, R. B; CECAVA, M. J; DONKIN, S. S. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. Journal of Dairy Science.v.84.p.1228-1236, 2000.

GRUFFAT, D; DURAND, D; CHILLIARD, Y; WILLIAMS, P e BAUCHART, D. Hepatic gene expression of Apolipoprotein B100 during early lactation in underfed, high producing dairy cows. Journal of Dairy Science.v.80.n.4.p.657-666, 1997.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science.v.76.3882-3896p., 1993.

GROSS, J; VAN DORLAND, H. A; SCHWARZ, F. J; BRUCKMAIER, R. M. Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotrophic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.94.p.3484-3494, 2011.

HAAS, J. T; MIAO, J; CHANDA, D; WANG, Y; ZHAO, E; HAAS, M. E; HIRSCHEY, M; VAITHEESVARAN, B; FARESE, R. V; KURLAND, I. J; GRAHAM, M; CROOKE, R; FAUFELLE, F; BIDDINGER, S. B. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metabolism*.v.6.n.15.p.873-884, 2012.

HAMMON, G; SAUTER, S. N; REIST, M; ZBINDEN, Y; PHILIPONA, C; MOREL, C; BLUM, J. W. Dexamethasone and colostrums feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. *Journal of Animal Science*.v.81.p.3095–3106, 2003.

HAMMON, G; STURNER, F; SCHNEIDER, A. TUCHSCHERER, H. BLUM, T; ENGELLARD, A; GENZEL, R; STAUFENBIEL, W; KANIZ, W. Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *Journal of Dairy Science*.v.92.n.4.p.1554-1556, 2009.

HAZELTON, S. R; SPURLOCK, D. M; BIDWELL, C. A; DONKIN, S. S. Cloning the genomic sequence and identification of promoter regions of bovine pyruvate carboxylase. *Journal of Dairy Science*.v.91.n.1.91-99p, 2008.

HAYIRLY, A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle.v.30.749-774, 2006.

JANOVICK-GURETZKY, N. A; DANN, H. M; CARLSON, D. B; MURPHY, M. R; LOOR, J. J; DRACKEY, J. K. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by

physiological state, feed intake and dietary treatment. *Journal of Dairy Science*.v.90.n.5.2246-2252p., 2007.

KADONGA, J. T. Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell press*.v.92.p.307-313, 1998.

KADONGA, J. T. Regulation of RNA Polymerase II Review Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors. *Cell*.v.116.p.247-257,2004.

KIRTY, K. S. A New Method for the Isolation of Ribonucleic Acids from Mammalian Tissues.*British Empire Cancer Campaign Research Fellow*.v.64.p.406-408, 1956.

KREIPE, L; VERNAY, M. C. M. B; OPPLIGER, A; WELLNITZ, O; BRUCKMAIER, R. M; VAN DORLAND, H. A. Induced hypoglycemia for 48 hours indicates differential glucose and insulin effects on liver metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.94.n.11.5435-5448p., 2011.

KRONFELD, D. S. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency and spontaneous ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.65.2204-2212,p., 1982.

KNOWLTON, K. F; DAWSON, T. E; GLENN, B. P; HUNTINGTON, G. B; ERDMAN, R. A. Glucose metabolism and milk yield of cows infused abomasally or ruminally with starch. *Journal of Dairy Science*.v.81.n.12.p.3248-3258, 1998.

KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. Ed.UFSM.p.140, 2002.

LAGO, E. P; COSTA, A. P. D; PIRES, A. V; SUSIN, I; FARIAS, V. P; LAGO, L. A. Parâmetros metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto.*Revista Brasileira de Ciencia Veterinária*.v.11.n.2.p.98-103, 2004.

LARSON, L. B; SMITH, V. R. Biosynthesis and Secretion of milk/diseases. Lactation: A Comprehensive Treatise. United Kingdom Edition published by ACADEMIC PRESS, INC. (LONDON) LTD. Vol.2, 1974.

LEHNINGER, A. L. Princípios da regulação metabólica. In: Princípio de bioquímica. 5.ed. São Paulo: Savier. p.569, 2014

LI, P; LI, X. B; FU, S. X; WU, C. C; WANG, X. X; YU, G. J; LONG, M; WANG, Z; LIU, G. W. Alterations of fatty acid  $\beta$ -oxidation capability in the liver of ketotic cows. Journal of Dairy Science.v.95.n.4.1759-1766p., 2012.

LIVAK, K. J; SCHMITTGEN, T. D; Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method.Methods.v.25. p.402– 408, 2001.

LOOR, J. J; DANN, H. M; EVERTS, R. E; OLIVEIRA, R; GREEN, C.A; JANOVIK-GURETZKY, N.A; RODRIGUEZ-ZAS, S. L; LEWIN, H.A; DRACKLEY, J. K. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function.Physiological genomics.v.23.p.217-226, 2005.

LOOR, J. J; EVERTS, R. R; BIONAZ, M; DANN, H. M; MORIN, D. E; OLIVEIRA, R; RODRIGUEZ-ZAS, S. L; DRACKEY, J. K; LEWIN, H. A. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in the liver of periparturient dairy cows. Journal of dairy Science.v.32.105-116p., 2007.

MACKAY, M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology Infects.v.10.p.190–212, 2004.

MAUGH, K. Modification of the Standard TrizolBased Technique Improves the Integrity of RNA Isolated from RNase Rich Placental Tissue.Clinical Chemistry.v.52.n. 1, 2006

MORENO, N. N. GIONO, L. E. CAMBINDO BOTTO, A. E. MUNOS, M. J; KOMBLIHTT, A. R. Chromatin, DNA structure and alternative splicing. Pubmed, 2015.

MURRAY, R. K; BENDER, D. A; BOTHEN, K. M; KENNELLY, P. J; RODWELL, V. W; WEI, P. A. Bioquímica ilustrada de Harper. 29º edição.p.453-553, 2013.

NAGASHIMA, A. I; HENNING, L. M. M; POLIZEL, A. M; MOREIRA, R. M. P; HENNING, F. A. Comparação de Protocolos para Extração de RNA de Tegumentos de Sementes de SojaBiochemistry and Biotechnology Reports.n.3.v.2.p. 178-181, 2013.

NRC, 2001.Nutrient requirements of dairy cattle.7<sup>th</sup>. Academy Science, Washington, DC.  
OKAMOTO, Y; TANAKA, S; HAGA, H. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. Hepatology Research.n.2.v.23. p.138-144, 2002.

PARRA, O A. OJEDA, J; GABALDON, L; ESCOBAR, N; MARTINEZ, BENEZRA, M. Blood metabolites and their relationship whit production variables in dual-purpose cows in Venezuela. Prev. Veterinary Medicine. V.38.P.133-145, 1999.

PEDERSEN, A. G; BALDI, P; CHAUVIN, Y. BRUNAK, S.The biology of eukaryotic promoter prediction – a review. Computers and Chemistry.v.23.p 191-207, 1999.

PEIXOTO, R. T. Peril metabólico e hormonal de vacas F1 Holandês-Zebu durante o pré e pós parto e sua relação om a reprodução.Doutorado em Zootecnia. Belo Horizonte: EV-UFMG.p.1-57, 2011.

PILKIS, S. J; CLAUS. T. H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes.v.11.465-515p, 1991.

POSTIC, C; BURCELIN, R; RENCUREL, F; PEGORIER, J. P; LOIZEAU, M; GIRARD, G; LETURQUE, A. Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2

expression in the liver: studies *in vivo* and *in vitro*. Journal of Biochemistry.p.119-124, 1993.

PREYNAT, A; LAPIERRE, H; THIVIERGE, M. C ; PALIN, M. F ; CARDINAULT, N ; MATTE, J. J ; DESROCHERS, A ; GIRARD, C. L. Effects of supplementary folic acid and vitamin B12 on hepatic metabolism of dairy cows according to methionine supply.v.93.n.5.p.2130-2143, 2010.

RADOSTITS, O. M; GAY, C. C; BLOOD, D. C; HINCHCLIFF, K. W. Um tratado de Doenças dos Bovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. Clínica Veterinária.9ª ed.p.541-629, 2000.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. Review. Molecular Biotechnology.v.15.p.115-122, 2000.

REYNOLDS, C; HUNTINGTON, G. B; TYRRELL, H. F; REYNOLDS, P. J. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science.v.71.p.1803-1912, 1988a.

REYNOLDS, C. HUNTINGTON, G. B; TYRRELL, H. F. REYNOLDS, P. J. Net metabolism of volatile fatty acids D-β-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science.v.71.p.2395-2405, 1988b.

REYNOLDS, C. K. AIKMAN, P. C. LUPOLI, B. HUMPHRIES, D. J. BEEVER, D E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. Journal of Dairy Science.v.86.n.4.p.1201-1217, 2003.

RIGOUT, S; HURTAUD, C; LEMOSQUET, S; BACH, A; RUIQUIM, H. Lactational effects of propionate acid and duodenal glucose in cows.v.88.n.1.p.243-253, 2003.

RHOADS, M. L; MEYER, J. P; LAMBERSON, W. R; KEISLER, D. H; LUCY, M. C. Uterine and hepatic gene expression in relation to days postpartum, estrus and pregnancy in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.91.n.1.140-150p., 2008.

ROSE, N. R; KLOSE, R. J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Review. Biochimica et Biophysica Acta*.p1362–1372, 2014.

RUIZ, R; JIDEONWO, V; AHN, M; SURENDRAN, S; TAGLIABRACI, V. S; HOU, Y; GAMBLA, A; KERNER, J; DOMINQUEZ, J. M. I; PUCHOWICZ, M. A; ROACH, A. D; HOPPEL, C; ROACH, P; MORRAI, N. Sterol regulatory element-binding protein -1 (SREBP-1) is required to regulate glycogen synthesis and gluconeogenic gene expression in mouse liver. *Biology Chemistry*.v.289.n.9.p.5510-5517, 2014.

RUKKWAMSUK, T. T; KRUIP, T.A; MEIJER, G. A; WENSING, T. Hepatic fatty acid composition in periparturient dairy cows with fatty liver induced by intake of a high energy diet in the dry period. *Journal of Dairy Science*.v.82.p.280-287, 1999.

SAIKI, R. K; SCHAFT, S; FALOONA, F; MULLIS, K. B; HORN, G. T; ERLICH, H. A; AMHHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*.v.20.n.230.p.1350-1354, 1985.

SAKATANI, Y; ICHIHASHI, N; KAZUTA, Y; YOMO, T. A transcription and translation-coupled DNA replication system using rolling circle replication. *Scientific Reports*.n.5, 2015.

SCHAFF, C; BORNER, S; HACKE, S; KAUTZSCH, U; ALBRECHT, D; HAMMON, H. M; RONTGEN, M; KUHLA, B. Increased anaplerosis, TCA cycling and oxidative phosphorylation in the liver of dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. *Journal of Proteome Research*.v.11.p.5503-5514, 2012.

SCHMITT, E; BALLOU, M. A; CORREA, M. N; DePETERS, E. J; DRACKLEY, J. K; LOOR, J. J. Dietary lipid during the transition period to manipulate subcutaneous adipose tissue and target gene expression. *Journal of Dairy Science*.v.94.n.12.p.5413-5425, 2011.

SEUNG-SOON, I; MI-YOUNG, K; KWON, S.K; KIM, T. H; BAE, J. S; KIM, H; KIM, K. S; OH, G, T; AHN, Y. H. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Is Responsible for the Up-regulation of Hepatic Glucose-6-phosphatase Gene Expression in Fasting and db/db Mice.*The Journal of Biological Chemistry*.v. 286.n. 2.p.1157–1164, 2011.

SERFLING, E. JASIN, M. SCHAFFNER, W. Enhancers and eukaryotic gene transcription.*Science Direct*.v.1.p.224-230, 1985.

SHE, P; LINDBERG, G. L; HIPPEN, A. R; BEITZ, D. C; YOUNG, J. W. Regulation of messenger ribonucleic acid expression for gluconeogenic enzymes during glucagon infusions into lactating cows. *Journal of Dairy Science*.v.82.n.6.1153-1163., 1999.

SMALE, S. T; KODANGA, J. T.The RNA polymerase II core promoter.*Annual Reviews of Biochemistry*.v.72.p.449-479, 2003.

SUNEHAG, A. L; LOUSE, K; BIER, J. L; TIGAS, S; HAYMOND, M. W. Hexoneogenesis in the human breast during lactation. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*.v.87.297-301p., 2002.

SUNEHAG, A. L; TIGAS, S; HAYMOND, M. W. Contribution of plasma galactose and glucose to milk lactose synthesis during galactose ingestion.*Journal Clinical Endocrinology Metabolism*.v.88.225-229p., 2003.

THEORELL, T. Anabolism and catabolism—antagonistic partners in stress and strain.*Journal of work, environment and health (SJWEH)* .n.6.p.136– 143, 2008.

VAN DORLAND, H.A; RICHTER, S; MOREL, I; DOHERR, M. G; CASTRO, N; BRUCKMAIER, R. M. Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.92.n.5.1924-1940p., 2009.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University. 2 edition, 1994.

VELASCO, A; SANCHEZ, A; MERTINEZ, I; SANTA CLARA, F. J; PEREZ-MARTIN, R. I; SOTELO, C. G; Development of a real-time PCR method for the identification of atlantic mackerel. *Food Chemistry*.v.1.n.3.p.141, 2006.

VELEZ J. C E DONKIN, S. S. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.88.n.8.2938-2948., 2005.

ZAMPRANO, W. J; MARQUES, A. P. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras do pré-parto ao quinto mês da lactação. *Zootecnia Tropical*.v.27.n.4.p. 475-488, 2009.

ZHAO, F. Q; KENNELLY J. J; MOSELEY, W. M. Regulation of the Gene Expression of Glucose Transporter in Liver and Kidney of Lactating Cows by Bovine Growth Hormone and Bovine Growth Hormone-Releasing Factor. *Journal of Dairy Science*.v.79.p.1537-1542, 1996.

ZHAO, F. Q; OKINE, E. R; KENNELLY, J. J. Glucose transporter gene expression in bovine mammary gland. *Journal of Animal Science*.v.77.2517-1522p., 1999.

ZHAO, F. Q; MILLER, P. J ; WALL, E. H ; ZHENG, Y. C; DONG, B; NEVILLE, M. C; McFADDEN, T. B. Bovine glucose transporter GLUT8: Cloning, expression and development regulation in mammary gland. *Biochemistry. Biophysical. Acta* 1680.103-113p, 2004.

ZHAO, F. Q e KEATING, A. F. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*.v.90.E76-E86p., 2007.

ZHAO, K; LIU, H. Y; ZHOU, M. M; ZHAO, F. Q; LIU, J. X. Insulin stimulates glucose uptake via a phosphatidylinositide 3-kinase-linked signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*.v.97.n.6.p.3660-3665, 2014.

WALTER, A. W; BLACKBURN, G. Symposium introduction: Nutrition and gene regulation. *Journal of Nutrition*.v.134.p.2434S-2436S, 2004.

WEAKE, V. M; WORKMAN, J. L. Inducible gene expression: diversity mechanisms. *Nature Reviews Genetics*.v.11.n.6.p.426-437, 2010.

WEBER, C; HAMETNER, C; TUCHSCHERER, T; LOSAND, B; KANIZ, E; OTTEN, W; SAUERWEIN, H; BRUCKMAIER, R. M; BECKER, F; ANITZ, W. K; HAMMON, H. M. Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *Journal of Dairy Science*.v.96.n.9.p.5670-5681, 2013b.

WEBER, C; LOSAND, B; TUCHSCHERER, T; EHBOCK, F. R; BLUM, E; YANG, W; BRUCKMAIER, R. M; SANFTLEBEN, P; HAMMON, H. M. Effects of dry period length on milk production, body condition, metabolites, and hepatic glucose metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.v.98.n.3.p.1772-1785, 2015.

WEN, A. Y; SAKAMOTO, K. M; MILLER, L. S. The Role of the Transcription Factor CREB. *Journal of Immunology*.v.185.p.6413-6419, 2015.

WHITE, H. M; KOSER, S. L; DONKIN, S. S. Differential regulation of bovine pyruvate carboxylase promoters by fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist. *Journal of Dairy Science*.v.94.n.7.3428-3436p, 2011.

WONG, P. B. Y; WILEY, E. O; JOHNSON, W. E. RYDER, O. A; O'BRIEN, J. S; HAUSSLER, D; KOEPFLI, K. P; HOUCK, M. L; PERELMAN, P; MASTROMONACO,

G; BENTLEY, A. C; VENKATESH, B; ZHANG, Y, MURPHY, R. W. Tissue sampling methods and standards for vertebrate genomics. *Giga Science*.n.1.v.8.p.1-12, 2012.

# Apêndice: Resultado estatístico

## ESTRUTURA VARIANCIA ARH: GLICOSE

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	GLI
Covariance Structures	Variance Components, Heterogeneous Autoregressive
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	15	357 377 382 429 431 440 441 2030 2033 2043 2054 2055 2060 2061 2066

#### Dimensions

Covariance Parameters	8
Columns in X	21
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	89
Observations Used	88
Observations Not Used	1
Total Observations	89

#### Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	618.53562947	
1	3	592.10392158	0.01352364
2	1	588.29384619	0.00421906
3	1	587.12928665	0.00362875
4	1	587.12451596	0.00000619
5	1	587.11676829	0.00000292
6	1	587.06099294	0.00000227
7	1	586.93649393	0.00004192
8	3	586.57716200	0.00117376

## The Mixed Procedure

## Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
9	1	586.29439490	0.00002128
10	1	586.28956661	0.00000001
11	1	586.28956339	0.00000000

Convergence criteria met.

## Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	66.5346	60.0020	26.5737	23.1263	13.4323	7.6746
2	60.0020	155.91	69.0491	60.0913	34.9025	19.9418
3	26.5737	69.0491	88.1116	76.6807	44.5381	25.4471
4	23.1263	60.0913	76.6807	192.28	111.68	63.8086
5	13.4323	34.9025	44.5381	111.68	186.90	106.79
6	7.6746	19.9418	25.4471	63.8086	106.79	175.80

## Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	1.0000	0.5891	0.3471	0.2045	0.1205	0.07096
2	0.5891	1.0000	0.5891	0.3471	0.2045	0.1205
3	0.3471	0.5891	1.0000	0.5891	0.3471	0.2045
4	0.2045	0.3471	0.5891	1.0000	0.5891	0.3471
5	0.1205	0.2045	0.3471	0.5891	1.0000	0.5891
6	0.07096	0.1205	0.2045	0.3471	0.5891	1.0000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		0
Var(1)	VACA	66.5346
Var(2)	VACA	155.91
Var(3)	VACA	88.1116
Var(4)	VACA	192.28
Var(5)	VACA	186.90
Var(6)	VACA	175.80
ARH(1)	VACA	0.5891

The Mixed Procedure

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	586.3
AIC (smaller is better)	600.3
AICC (smaller is better)	601.9
BIC (smaller is better)	605.2

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	63	2.29	0.1353
PER	5	63	1.98	0.0932
GG*PER	5	63	1.42	0.2303

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	80.8740	2.2154	63	36.51	<.0001
PER		2	83.2550	3.2312	63	25.77	<.0001
PER		3	81.2774	2.4291	63	33.46	<.0001
PER		4	88.1671	3.5883	63	24.57	<.0001
PER		5	90.0101	3.5377	63	25.44	<.0001
PER		6	84.1632	3.4310	63	24.53	<.0001
GG	1		81.4550	3.0604	63	26.62	<.0001
GG	2		87.7939	2.8621	63	30.67	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	-2.3810	2.7041	63	-0.88	0.3819	Tukey-Kramer	0.9498
PER		1		3	-0.4034	2.6925	63	-0.15	0.8814	Tukey-Kramer	1.0000
PER		1		4	-7.2930	3.8323	63	-1.90	0.0616	Tukey-Kramer	0.4099
PER		1		5	-9.1361	3.9528	63	-2.31	0.0241	Tukey-Kramer	0.2050
PER		1		6	-3.2892	3.9563	63	-0.83	0.4089	Tukey-Kramer	0.9605
PER		2		3	1.9776	2.6633	63	0.74	0.4605	Tukey-Kramer	0.9757
PER		2		4	-4.9121	3.9074	63	-1.26	0.2134	Tukey-Kramer	0.8067
PER		2		5	-6.7551	4.2757	63	-1.58	0.1191	Tukey-Kramer	0.6146
PER		2		6	-0.9082	4.4206	63	-0.21	0.8379	Tukey-Kramer	0.9999
PER		3		4	-6.8896	2.9166	63	-2.36	0.0213	Tukey-Kramer	0.1855
PER		3		5	-8.7327	3.5286	63	-2.47	0.0160	Tukey-Kramer	0.1474
PER		3		6	-2.8858	3.7768	63	-0.76	0.4477	Tukey-Kramer	0.9725
PER		4		5	-1.8430	3.2302	63	-0.57	0.5703	Tukey-Kramer	0.9926

ESTRUTURA VARIANCIA AR: BHBA

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	BHBA
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	15	357 377 382 429 431 440 441 2030 2033 2043 2054 2055 2060 2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	21
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	89
Observations Used	88
Observations Not Used	1
Total Observations	89

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	120.60083882	
1	4	90.11093315	0.01821436
2	1	89.64729932	0.00003186
3	1	89.64650122	0.00000000

Convergence criteria met.

## The Mixed Procedure

## Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	0.1877	0.1034	0.05691	0.03134	0.01725	0.009501
2	0.1034	0.1877	0.1034	0.05691	0.03134	0.01725
3	0.05691	0.1034	0.1877	0.1034	0.05691	0.03134
4	0.03134	0.05691	0.1034	0.1877	0.1034	0.05691
5	0.01725	0.03134	0.05691	0.1034	0.1877	0.1034
6	0.009501	0.01725	0.03134	0.05691	0.1034	0.1877

## Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	1.0000	0.5506	0.3032	0.1669	0.09192	0.05062
2	0.5506	1.0000	0.5506	0.3032	0.1669	0.09192
3	0.3032	0.5506	1.0000	0.5506	0.3032	0.1669
4	0.1669	0.3032	0.5506	1.0000	0.5506	0.3032
5	0.09192	0.1669	0.3032	0.5506	1.0000	0.5506
6	0.05062	0.09192	0.1669	0.3032	0.5506	1.0000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		3.01E-18
AR(1)	VACA	0.5506
Residual		0.1877

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	89.6
AIC (smaller is better)	93.6
AICC (smaller is better)	93.8
BIC (smaller is better)	95.1

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	63	1.29	0.2605
PER	5	63	3.52	0.0072
GG*PER	5	63	1.05	0.3945

The Mixed Procedure

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	0.4551	0.1180	63	3.86	0.0003
PER		2	0.8209	0.1121	63	7.32	<.0001
PER		3	0.9471	0.1121	63	8.45	<.0001
PER		4	0.6835	0.1121	63	6.10	<.0001
PER		5	0.6167	0.1121	63	5.50	<.0001
PER		6	0.6061	0.1121	63	5.41	<.0001
GG	1		0.7718	0.1075	63	7.18	<.0001
GG	2		0.6047	0.1005	63	6.02	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	-0.3659	0.1125	63	-3.25	0.0018	Tukey-Kramer	0.0217
PER		1		3	-0.4920	0.1374	63	-3.58	0.0007	Tukey-Kramer	0.0084
PER		1		4	-0.2284	0.1493	63	-1.53	0.1311	Tukey-Kramer	0.6469
PER		1		5	-0.1616	0.1555	63	-1.04	0.3026	Tukey-Kramer	0.9028
PER		1		6	-0.1510	0.1588	63	-0.95	0.3453	Tukey-Kramer	0.9314
PER		2		3	-0.1262	0.1063	63	-1.19	0.2397	Tukey-Kramer	0.8414
PER		2		4	0.1374	0.1324	63	1.04	0.3030	Tukey-Kramer	0.9031
PER		2		5	0.2042	0.1447	63	1.41	0.1631	Tukey-Kramer	0.7202
PER		2		6	0.2148	0.1511	63	1.42	0.1600	Tukey-Kramer	0.7137
PER		3		4	0.2636	0.1063	63	2.48	0.0158	Tukey-Kramer	0.1457
PER		3		5	0.3304	0.1324	63	2.50	0.0152	Tukey-Kramer	0.1408
PER		3		6	0.3410	0.1447	63	2.36	0.0216	Tukey-Kramer	0.1877
PER		4		5	0.06678	0.1063	63	0.63	0.5321	Tukey-Kramer	0.9885
PER		4		6	0.07740	0.1324	63	0.58	0.5608	Tukey-Kramer	0.9917
PER		5		6	0.01062	0.1063	63	0.10	0.9207	Tukey-Kramer	1.0000
GG	1		2		0.1671	0.1472	63	1.14	0.2605	Tukey-Kramer	0.2605

ESTRUTURA VARIANCIA CSH: AGNE

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set WORK.GENES2  
 Dependent Variable NEFA  
 Covariance Structures Variance Components,  
 Heterogeneous Compound  
 Symmetry  
 Subject Effect VACA  
 Estimation Method REML  
 Residual Variance Method None  
 Fixed Effects SE Method Model-Based  
 Degrees of Freedom Method Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	15	357 377 382 429 431 440 441 2030 2033 2043 2054 2055 2060

2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	8
Columns in X	21
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	89
Observations Used	88
Observations Not Used	1
Total Observations	89

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	68.37470024	
1	2	41.88726026	351.03480915
2	1	36.78566790	501.27630178
3	1	33.22355144	537.18372410
4	1	31.26141019	312.80450587
5	1	28.61810297	0.08414025
6	2	22.98198861	0.11763516
7	3	21.27225022	.
8	1	20.07590815	0.00261118

## The Mixed Procedure

## Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
9	1	19.90144640	0.00011484
10	1	19.89433924	0.00000032
11	1	19.89432030	0.00000000

Convergence criteria met.

## Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	0.01301	0.02174	0.02075	0.01220	0.009756	0.01560
2	0.02174	0.1974	0.08081	0.04752	0.03800	0.06074
3	0.02075	0.08081	0.1797	0.04534	0.03626	0.05796
4	0.01220	0.04752	0.04534	0.06215	0.02132	0.03408
5	0.009756	0.03800	0.03626	0.02132	0.03975	0.02726
6	0.01560	0.06074	0.05796	0.03408	0.02726	0.1016

## Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6
1	1.0000	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290
2	0.4290	1.0000	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290
3	0.4290	0.4290	1.0000	0.4290	0.4290	0.4290
4	0.4290	0.4290	0.4290	1.0000	0.4290	0.4290
5	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290	1.0000	0.4290
6	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290	0.4290	1.0000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		3.29E-36
Var(1)	VACA	0.01301
Var(2)	VACA	0.1974
Var(3)	VACA	0.1797
Var(4)	VACA	0.06215
Var(5)	VACA	0.03975
Var(6)	VACA	0.1016
CSH	VACA	0.4290

## The Mixed Procedure

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	19.9
AIC (smaller is better)	33.9
AICC (smaller is better)	35.5
BIC (smaller is better)	38.9

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	63	0.18	0.6767
PER	5	63	5.15	0.0005
GG*PER	5	63	0.95	0.4550

## Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	0.3022	0.03100	63	9.75	<.0001
PER		2	0.6918	0.1150	63	6.02	<.0001
PER		3	0.7161	0.1097	63	6.53	<.0001
PER		4	0.4697	0.06451	63	7.28	<.0001
PER		5	0.3619	0.05159	63	7.02	<.0001
PER		6	0.3793	0.08246	63	4.60	<.0001
GG	1		0.5101	0.08101	63	6.30	<.0001
GG	2		0.4636	0.07577	63	6.12	<.0001

## Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	-0.3896	0.1061	63	-3.67	0.0005	Tukey-Kramer	0.0064
PER		1		3	-0.4140	0.1011	63	-4.10	0.0001	Tukey-Kramer	0.0016
PER		1		4	-0.1675	0.05906	63	-2.84	0.0061	Tukey-Kramer	0.0646
PER		1		5	-0.05978	0.04812	63	-1.24	0.2188	Tukey-Kramer	0.8144
PER		1		6	-0.07714	0.07532	63	-1.02	0.3096	Tukey-Kramer	0.9081
PER		2		3	-0.02433	0.1201	63	-0.20	0.8401	Tukey-Kramer	1.0000
PER		2		4	0.2221	0.1050	63	2.12	0.0383	Tukey-Kramer	0.2925
PER		2		5	0.3299	0.1039	63	3.18	0.0023	Tukey-Kramer	0.0268
PER		2		6	0.3125	0.1090	63	2.87	0.0056	Tukey-Kramer	0.0600
PER		3		4	0.2464	0.1006	63	2.45	0.0171	Tukey-Kramer	0.1555
PER		3		5	0.3542	0.09920	63	3.57	0.0007	Tukey-Kramer	0.0086
PER		3		6	0.3368	0.1052	63	3.20	0.0021	Tukey-Kramer	0.0250
PER		4		5	0.1078	0.06299	63	1.71	0.0920	Tukey-Kramer	0.5299
PER		4		6	0.09040	0.07998	63	1.13	0.2626	Tukey-Kramer	0.8669
PER		5		6	-0.01736	0.07623	63	-0.23	0.8206	Tukey-Kramer	0.9999
GG	1		2		0.04646	0.1109	63	0.42	0.6767	Tukey-Kramer	0.6767

ESTRUTURA VARIANCIA ARH: Gene G6PC

## The Mixed Procedure

## Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	G6PC
Covariance Structures	Variance Components,

	Heterogeneous
	Autoregressive
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	10	357 382 429 440 441 2043 2054 2055 2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	8
Columns in X	21
Columns in Z	10
Subjects	1
Max Obs Per Subject	59
Observations Used	47
Observations Not Used	12
Total Observations	59

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	87.61669013	
1	2	74.17461734	0.03838052
2	1	73.95773380	0.00331784
3	1	73.94055043	0.00006089
4	1	73.94025285	0.00000004
5	1	73.94025266	0.00000000

Convergence criteria met.

## The Mixed Procedure

## Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	0.1373	0.06819	0.01594	0.005171	0.003969
2	0.06819	0.3704	0.08659	0.02809	0.02156
3	0.01594	0.08659	0.2213	0.07181	0.05512
4	0.005171	0.02809	0.07181	0.2547	0.1955
5	0.003969	0.02156	0.05512	0.1955	1.6412

## Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	0.3024	0.09145	0.02765	0.008362
2	0.3024	1.0000	0.3024	0.09145	0.02765
3	0.09145	0.3024	1.0000	0.3024	0.09145
4	0.02765	0.09145	0.3024	1.0000	0.3024
5	0.008362	0.02765	0.09145	0.3024	1.0000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		0.08437
Var(1)	VACA	0.1373
Var(2)	VACA	0.3704
Var(3)	VACA	0.2213
Var(4)	VACA	0.2547
Var(5)	VACA	1.6412
Var(6)	VACA	0.1255
ARH(1)	VACA	0.3024

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	73.9
AIC (smaller is better)	89.9
AICC (smaller is better)	95.5
BIC (smaller is better)	92.4

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	27	0.35	0.5582
PER	5	27	6.28	0.0006
GG*PER	5	27	1.26	0.3112

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	1.5643	0.1720	27	9.10	<.0001
PER		2	1.0923	0.2320	27	4.71	<.0001
PER		3	0.6190	0.1817	27	3.41	0.0021
PER		4	0.8680	0.1842	27	4.71	<.0001
PER		5	2.3237	0.5174	27	4.49	0.0001
PER		6	1.3979	0.1684	27	8.30	<.0001
GG	1		1.2203	0.2160	27	5.65	<.0001
GG	2		1.4014	0.2160	27	6.49	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	0.4720	0.2262	27	2.09	0.0465	Tukey-Kramer	0.3235
PER		1		3	0.9454	0.2072	27	4.56	<.0001	Tukey-Kramer	0.0013
PER		1		4	0.6963	0.2135	27	3.26	0.0030	Tukey-Kramer	0.0320
PER		1		5	-0.7593	0.5278	27	-1.44	0.1617	Tukey-Kramer	0.7040
PER		1		6	0.1665	0.2045	27	0.81	0.4227	Tukey-Kramer	0.9624
PER		2		3	0.4733	0.2307	27	2.05	0.0500	Tukey-Kramer	0.3411
PER		2		4	0.2243	0.2554	27	0.88	0.3876	Tukey-Kramer	0.9485
PER		2		5	-1.2314	0.5475	27	-2.25	0.0329	Tukey-Kramer	0.2494
PER		2		6	-0.3056	0.2561	27	-1.19	0.2433	Tukey-Kramer	0.8363
PER		3		4	-0.2490	0.1889	27	-1.32	0.1985	Tukey-Kramer	0.7726
PER		3		5	-1.7047	0.5225	27	-3.26	0.0030	Tukey-Kramer	0.0319
PER		3		6	-0.7789	0.2094	27	-3.72	0.0009	Tukey-Kramer	0.0107
PER		4		5	-1.4557	0.4957	27	-2.94	0.0067	Tukey-Kramer	0.0660
PER		4		6	-0.5299	0.2053	27	-2.58	0.0156	Tukey-Kramer	0.1367
PER		5		6	0.9258	0.5042	27	1.84	0.0774	Tukey-Kramer	0.4608
GG	1		2		-0.1811	0.3055	27	-0.59	0.5582	Tukey-Kramer	0.5582

ESTRUTURA VARIANCIA ARH: Gene PPARA

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	PPARA
Covariance Structures	Variance Components, Heterogeneous Autoregressive
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	10	357 382 429 440 441 2043 2054 2055 2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	8
Columns in X	21
Columns in Z	10
Subjects	1
Max Obs Per Subject	59
Observations Used	47
Observations Not Used	12
Total Observations	59

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	106.80833139	
1	3	95.73356295	0.14448212
2	3	92.56178195	.
3	1	91.83879812	.
4	1	90.75841670	0.01516301
5	1	90.52576764	0.00141528
6	1	90.50597998	0.00001725
7	1	90.50575217	0.00000000

The Mixed Procedure

Convergence criteria met.

Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	0.2173	0.1457	0.08888	0.03594	0.04908
2	0.1457	0.4157	0.2537	0.1026	0.1401
3	0.08888	0.2537	0.6592	0.2666	0.3640
4	0.03594	0.1026	0.2666	0.4590	0.6268
5	0.04908	0.1401	0.3640	0.6268	3.6448

Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	0.4846	0.2348	0.1138	0.05515
2	0.4846	1.0000	0.4846	0.2348	0.1138
3	0.2348	0.4846	1.0000	0.4846	0.2348
4	0.1138	0.2348	0.4846	1.0000	0.4846
5	0.05515	0.1138	0.2348	0.4846	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		0
Var(1)	VACA	0.2173
Var(2)	VACA	0.4157
Var(3)	VACA	0.6592
Var(4)	VACA	0.4590
Var(5)	VACA	3.6448
Var(6)	VACA	0.6951
ARH(1)	VACA	0.4846

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	90.5
AIC (smaller is better)	104.5
AICC (smaller is better)	108.7
BIC (smaller is better)	106.6

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	27	0.19	0.6670
PER	5	27	2.14	0.0914
GG*PER	5	27	1.57	0.2030

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	5.6480	0.1728	27	32.68	<.0001
PER		2	5.3729	0.2210	27	24.31	<.0001
PER		3	5.5883	0.2666	27	20.96	<.0001
PER		4	5.4440	0.2142	27	25.41	<.0001
PER		5	7.3450	0.7271	27	10.10	<.0001
PER		6	5.6877	0.3116	27	18.25	<.0001
GG	1		5.7609	0.2807	27	20.52	<.0001
GG	2		5.9344	0.2836	27	20.93	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	0.2751	0.2176	27	1.26	0.2169	Tukey-Kramer	0.8011
PER		1		3	0.05979	0.2890	27	0.21	0.8377	Tukey-Kramer	0.9999
PER		1		4	0.2040	0.2619	27	0.78	0.4427	Tukey-Kramer	0.9688
PER		1		5	-1.6970	0.7407	27	-2.29	0.0300	Tukey-Kramer	0.2323
PER		1		6	-0.03963	0.3534	27	-0.11	0.9115	Tukey-Kramer	1.0000
PER		2		3	-0.2153	0.2649	27	-0.81	0.4235	Tukey-Kramer	0.9627
PER		2		4	-0.07108	0.2725	27	-0.26	0.7962	Tukey-Kramer	0.9998
PER		2		5	-1.9721	0.7413	27	-2.66	0.0130	Tukey-Kramer	0.1170
PER		2		6	-0.3148	0.3742	27	-0.84	0.4076	Tukey-Kramer	0.9569
PER		3		4	0.1443	0.2523	27	0.57	0.5723	Tukey-Kramer	0.9921
PER		3		5	-1.7568	0.7259	27	-2.42	0.0225	Tukey-Kramer	0.1849
PER		3		6	-0.09943	0.3909	27	-0.25	0.8011	Tukey-Kramer	0.9998
PER		4		5	-1.9010	0.6702	27	-2.84	0.0085	Tukey-Kramer	0.0817
PER		4		6	-0.2437	0.3413	27	-0.71	0.4813	Tukey-Kramer	0.9786
PER		5		6	1.6573	0.6927	27	2.39	0.0240	Tukey-Kramer	0.1944
GG	1		2		-0.1736	0.3990	27	-0.44	0.6670	Tukey-Kramer	0.6670

ESTRUTURA VARIANCIA AR: Gene MUT

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	MUT
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	10	357 382 429 440 441 2043 2054 2055 2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	21
Columns in Z	10
Subjects	1
Max Obs Per Subject	59
Observations Used	47
Observations Not Used	12
Total Observations	59

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	64.61742507	
1	2	64.56342274	0.00000000

Convergence criteria met.

The Mixed Procedure

Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	0.2338	-0.01040	0.000462	-0.00002	9.146E-7
2	-0.01040	0.2338	-0.01040	0.000462	-0.00002
3	0.000462	-0.01040	0.2338	-0.01040	0.000462
4	-0.00002	0.000462	-0.01040	0.2338	-0.01040
5	9.146E-7	-0.00002	0.000462	-0.01040	0.2338

Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	-0.04447	0.001978	-0.00009	3.913E-6
2	-0.04447	1.0000	-0.04447	0.001978	-0.00009
3	0.001978	-0.04447	1.0000	-0.04447	0.001978
4	-0.00009	0.001978	-0.04447	1.0000	-0.04447
5	3.913E-6	-0.00009	0.001978	-0.04447	1.0000

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		0
AR(1)	VACA	-0.04447
Residual		0.2338

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	64.6
AIC (smaller is better)	68.6
AICC (smaller is better)	68.9
BIC (smaller is better)	69.2

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	27	4.28	0.0482
PER	5	27	4.67	0.0034
GG*PER	5	27	0.67	0.6484

The Mixed Procedure

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	1.2352	0.1846	27	6.69	<.0001
PER		2	1.0184	0.1709	27	5.96	<.0001
PER		3	0.5142	0.1621	27	3.17	0.0038
PER		4	0.6230	0.1529	27	4.07	0.0004
PER		5	1.4656	0.1973	27	7.43	<.0001
PER		6	1.2014	0.1846	27	6.51	<.0001
GG	1		0.8650	0.1025	27	8.44	<.0001
GG	2		1.1543	0.09512	27	12.14	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	0.2168	0.2560	27	0.85	0.4045	Tukey-Kramer	0.9557
PER		1		3	0.7210	0.2455	27	2.94	0.0067	Tukey-Kramer	0.0660
PER		1		4	0.6122	0.2397	27	2.55	0.0166	Tukey-Kramer	0.1440
PER		1		5	-0.2304	0.2702	27	-0.85	0.4012	Tukey-Kramer	0.9543
PER		1		6	0.03379	0.2611	27	0.13	0.8980	Tukey-Kramer	1.0000
PER		2		3	0.5041	0.2398	27	2.10	0.0450	Tukey-Kramer	0.3159
PER		2		4	0.3954	0.2291	27	1.73	0.0958	Tukey-Kramer	0.5276
PER		2		5	-0.4472	0.2610	27	-1.71	0.0981	Tukey-Kramer	0.5350
PER		2		6	-0.1830	0.2516	27	-0.73	0.4732	Tukey-Kramer	0.9767
PER		3		4	-0.1088	0.2275	27	-0.48	0.6363	Tukey-Kramer	0.9966
PER		3		5	-0.9514	0.2552	27	-3.73	0.0009	Tukey-Kramer	0.0105
PER		3		6	-0.6872	0.2457	27	-2.80	0.0094	Tukey-Kramer	0.0887
PER		4		5	-0.8426	0.2537	27	-3.32	0.0026	Tukey-Kramer	0.0278
PER		4		6	-0.5784	0.2395	27	-2.41	0.0228	Tukey-Kramer	0.1867
PER		5		6	0.2642	0.2736	27	0.97	0.3428	Tukey-Kramer	0.9248
GG	1		2		-0.2893	0.1398	27	-2.07	0.0482	Tukey-Kramer	0.0482

ESTRUTURA VARIANCIA CSH: Gene da Glut2

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.GENES2
Dependent Variable	GLUT2
Covariance Structures	Variance Components, Heterogeneous Compound Symmetry
Subject Effect	VACA
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	None
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
GG	2	1 2
PER	6	1 2 3 4 5 6
VACA	10	357 382 429 440 441 2043 2054 2055 2061 2066

Dimensions

Covariance Parameters	8
Columns in X	21
Columns in Z	10
Subjects	1
Max Obs Per Subject	59
Observations Used	47
Observations Not Used	12
Total Observations	59

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	98.20802459	
1	4	72.45194962	.
2	1	71.77854460	0.02447244
3	1	71.67621329	0.00119954
4	1	71.67164077	0.00000429
5	1	71.67162498	0.00000000

Convergence criteria met.

## The Mixed Procedure

## Estimated R Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	0.1837	0.01906	0.02684	0.01907	0.08610
2	0.01906	0.1717	0.02595	0.01844	0.08324
3	0.02684	0.02595	0.3406	0.02597	0.1172
4	0.01907	0.01844	0.02597	0.1720	0.08331
5	0.08610	0.08324	0.1172	0.08331	3.5044

## Estimated R Correlation Matrix for Subject 1

Row	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5
1	1.0000	0.1073	0.1073	0.1073	0.1073
2	0.1073	1.0000	0.1073	0.1073	0.1073
3	0.1073	0.1073	1.0000	0.1073	0.1073
4	0.1073	0.1073	0.1073	1.0000	0.1073
5	0.1073	0.1073	0.1073	0.1073	1.0000

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
VACA		0
Var(1)	VACA	0.1837
Var(2)	VACA	0.1717
Var(3)	VACA	0.3406
Var(4)	VACA	0.1720
Var(5)	VACA	3.5044
Var(6)	VACA	0.2212
CSH	VACA	0.1073

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	71.7
AIC (smaller is better)	85.7
AICC (smaller is better)	89.8
BIC (smaller is better)	87.8

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GG	1	27	0.04	0.8364
PER	5	27	1.41	0.2536
GG*PER	5	27	1.42	0.2479

Least Squares Means

Effect	GG	PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
PER		1	2.2503	0.1629	27	13.82	<.0001
PER		2	2.5159	0.1460	27	17.23	<.0001
PER		3	2.5245	0.1954	27	12.92	<.0001
PER		4	2.4420	0.1311	27	18.62	<.0001
PER		5	4.0997	0.7591	27	5.40	<.0001
PER		6	2.5162	0.1787	27	14.08	<.0001
GG	1		2.6927	0.2183	27	12.34	<.0001
GG	2		2.7568	0.2163	27	12.74	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	GG	PER	_GG	_PER	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t	Adjustment	Adj P
PER		1		2	-0.2655	0.2093	27	-1.27	0.2153	Tukey-Kramer	0.7987
PER		1		3	-0.2741	0.2443	27	-1.12	0.2716	Tukey-Kramer	0.8679
PER		1		4	-0.1917	0.1998	27	-0.96	0.3459	Tukey-Kramer	0.9267
PER		1		5	-1.8494	0.7638	27	-2.42	0.0225	Tukey-Kramer	0.1844
PER		1		6	-0.2658	0.2333	27	-1.14	0.2645	Tukey-Kramer	0.8605
PER		2		3	-0.00858	0.2333	27	-0.04	0.9709	Tukey-Kramer	1.0000
PER		2		4	0.07388	0.1866	27	0.40	0.6953	Tukey-Kramer	0.9986
PER		2		5	-1.5839	0.7635	27	-2.07	0.0477	Tukey-Kramer	0.3297
PER		2		6	-0.00027	0.2223	27	-0.00	0.9990	Tukey-Kramer	1.0000
PER		3		4	0.08247	0.2240	27	0.37	0.7157	Tukey-Kramer	0.9990
PER		3		5	-1.5753	0.7674	27	-2.05	0.0499	Tukey-Kramer	0.3407
PER		3		6	0.008311	0.2541	27	0.03	0.9741	Tukey-Kramer	1.0000
PER		4		5	-1.6577	0.7595	27	-2.18	0.0379	Tukey-Kramer	0.2781
PER		4		6	-0.07415	0.2120	27	-0.35	0.7292	Tukey-Kramer	0.9992
PER		5		6	1.5836	0.7684	27	2.06	0.0491	Tukey-Kramer	0.3366
GG	1		2		-0.06409	0.3073	27	-0.21	0.8364	Tukey-Kramer	0.8364