

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Polimorfismo e Expressão do Gene da UCP2 no Fígado de Cabras em
Lactação**

Leonardo Ferreira

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO GENE DA UCP2 NO FÍGADO DE
CABRAS EM LACTAÇÃO**

LEONARDO FERREIRA

*Sob a orientação da professora
Maria Amélia Menck Soares*

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em produção de ruminantes.

Seropédica, RJ
Novembro de 2013

636.390821

F383p

T

Ferreira, Leonardo, 1988-

Polimorfismo e expressão do gene da UCP2 no fígado de cabras em lactação / Leonardo Ferreira. - 2013.

55 f.: il.

Orientador: Maria Amélia Menck Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 48-55.

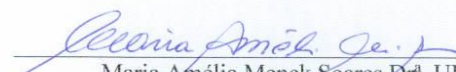
1. Cabra - Genética - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Fígado - Metabolismo - Teses. 4. Metabolismo energético - Teses. 5. Proteínas - Metabolismo - Teses. I. Soares, Maria Amélia Menck, 1963- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

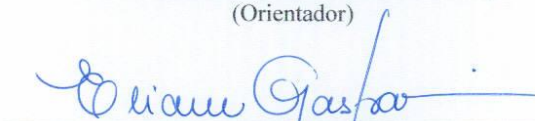
LEONARDO FERREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

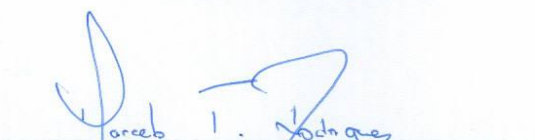
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/11/2013



Maria Amélia Menck Soares Dr^a. UFRRJ
(Orientador)



Eliane Gasparino Dr^a. UEM - DZO



Marcelo Teixeira Rodrigues Dr. UFV - DZ

*Aos meus pais e a minha família por todo apoio.
À minha orientadora pelos ensinamentos passados.
Aos meus amigos pela paciência e apoio durante essa jornada.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de utilização das suas dependências, salas de aula e laboratórios e pelo ensino gratuito, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal e pelo incentivo a buscar mais conhecimentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelo financiamento deste projeto, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste projeto.

À orientadora, Professora Dra. Maria Amélia Menck Soares, pelos conhecimentos a mim passados, e por me auxiliar na realização deste projeto, de grande importância em minha vida. Obrigado pela amizade, paciência, compreensão e por sua brilhante orientação.

Agradeço também à Universidade Federal de Viçosa e ao Professor Marcelo Teixeira Rodrigues e à Doutoranda Magna, essenciais à realização deste Projeto.

À Professora Eliane Gasparino da Universidade Estadual de Maringá, pela ajuda com as análises de expressão gênica.

Aos meus pais, Márcia e Vinícius, que me deram todo o apoio me auxiliando nos momentos difíceis aconselhando e me ajudando a manter a calma nas situações mais difíceis, também pela compreensão.

À minha Irmã Ligia por todo o apoio e pelos conselhos imprescindíveis que me ajudaram a seguir em frente.

Às amigos que colaboraram para o desenvolvimento deste projeto, Adriana, Odair, Ramon, Ana.

Aos meus amigos de hoje e sempre que fizeram parte da minha vida, que me motivaram a continuar em busca desta conquista, a todos os que fizeram parte de minha vida, direta ou indiretamente, por me fazerem continuar e não desistir mesmo com todas as dificuldades. Agradeço pelas risadas, por todos os momentos juntos e principalmente pela amizade verdadeira.

Aos meus colegas e a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

E por fim agradeço a deus por ter me dado esta oportunidade, e me dar forças nessa caminhada, em quem também busquei conforto em horas difíceis.

BIOGRAFIA

LEONARDO FERREIRA, filho de Vinicius Ferreira e Maria Marciene Balbino Ferreira, nasceu em Foz do Iguaçu – PR, em 25 de Janeiro de 1988. No ano de 2007, iniciou no Curso de Graduação Bacharelado em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, concluindo em dezembro de 2010. Em agosto de 2011, iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração Produção de Ruminantes, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro especificamente em Melhoramento Genético Animal.

RESUMO

FERREIRA, L.. **Polimorfismo e expressão do gene da UCP2 no fígado de cabras em lactação.** 2013. 41p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

As proteínas desacopladoras de membrana desacoplam a respiração celular da produção de ATP tendo papel importante no metabolismo energético do organismo. Polimorfismos em de genes codificantes para UCPs têm sido associados a características como cobertura de gordura e ganho de peso em bovinos de corte, e à obesidade em humanos. A grande mobilização de ácidos graxos no início da lactação pode influenciar na expressão da UCP2 mostrando que esta tem papel nos processos fisiológicos desta fase. Com o presente trabalho buscamos verificar se a expressão do gene *UCP2* no fígado de cabras leiteiras varia durante o período inicial da lactação e sequenciar uma parte do gene da UCP2 em caprinos verificando a existência de polimorfismo nesta região. Para isso foram utilizadas 40 cabras (*Capra hircus*), todas fêmeas lactantes, das raças Saanen e Alpina das quais primeiramente foram coletados 10 mL de sangue. Posteriormente, para as análises de expressão gênica, 10 desses animais foram abatidos em diferentes estágios da fase inicial de lactação (dia do parto, 7, 21, 35 dias pós-parto) e uma amostra de tecido hepático foi coletada e armazenada em *RNA-holder*. O sangue total foi utilizado para extração de DNA e posterior amplificação de 4 fragmentos do gene UCP2 através da reação em cadeia da polimerase, os fragmentos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (300V a 24hrs) para avaliar pequenas diferenças de tamanho entre as amostras. Posteriormente os fragmentos foram avaliados por PCR-RFLP quanto a diferenças no padrão de corte da enzima *HaeIII*. Três diferentes amostras de cada fragmento da região inicial do gene foram selecionadas ao acaso para o sequenciamento de bases. A partir das amostras de tecido hepático foi realizada a extração de RNA, o qual foi utilizado nas reações de PCR em tempo real com o composto fluorescente *Syber Green*. Para analisar se os genótipos encontrados tem influência sobre produção de gordura e porcentagem de gordura no leite, foram realizadas análises de variância e estimação de contrastes. Para avaliar se a expressão variou, nos diferentes dias pós-parto foi realizada uma análise de regressão. Na região promotora foi encontrado um polimorfismo de tamanho de fragmento que origina dois alelos, o alelo A de tamanho maior e o B, de tamanho menor, estes foram avaliados quanto a sua influência sobre a porcentagem de gordura no leite e a produção de gordura, porém nenhum dos alelos influenciou estas características. As análises de PCR-RFLP mostraram uma diferença no padrão de corte da enzima entre as amostras no éxon 2 gene dando origem a dois alelos, C e N. Estes também foram avaliados quanto à influência sobre a porcentagem de gordura no leite e produção de gordura, porém nenhuma relação foi encontrada. Após o sequenciamento as sequências foram comparadas entre si e um polimorfismo de nucleotídeo único foi encontrado no íntron 1 porém nenhuma enzima de restrição que reconhece este polimorfismo foi encontrada, impossibilitando a genotipagem de um número maior de animais por PCR-RFLP. As reações de PCR em tempo real revelaram que expressão da UCP2 no fígado foi maior no dia do parto e diminuiu gradativamente com o avançar da lactação até os 35 dias pós-parto.

Palavras-chave: Alpina. Metabolismo energético. Saanem.

ABSTRACT

FERREIRA, L.. **Polymorphism and expression of the UCP2 gene in the liver of lactating goats**. 2013. 41p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The uncoupling proteins of mitochondrial inner membrane uncouples the cellular respiration from ATP production thus it has an important role in the energy metabolism of the organism. Polymorphisms in genes coding for UCPs have been associated with characteristics such as fat thickness and weight gain in beef cattle, and to obesity in humans. The massive mobilization of fatty acids in early lactation can influence the expression of UCP2 showing that this protein has a role in physiological processes of this phase. Thus, the purposes of this study was to verify if the expression of UCP2 gene varies during early lactation in dairy goats liver, sequence a initial part of the goat UCP2 gene and verify the existence of polymorphism in the studied region of this gene. For this we used 40 goats (*Capra hircus*), all lactating animals of Saanen and Alpina breed, from which 10 mL of periferic blood were collected. Thereafter, for the analysis of gene expression, 10 of these animals were slaughtered at different stages of the early lactation (day of birth, 7 , 21, 35 days post-partum) and a sample of liver tissue was collected and stored in *RNA-holder*. Whole blood was used for DNA extraction and subsequent amplification of four fragments of UCP2 gene by polymerase chain reaction. Amplified fragments were then subjected to electrophoresis on 12% polyacrylamide gel (300v for 24hrs) to evaluate small size differences between samples. Subsequently the fragments were analyzed by PCR-RFLP for differences in the digestion pattern of the enzyme *HaeIII*. Three different samples of each fragment of the initial region of the gene were randomly selected for sequencing. From the samples of liver tissue an RNA extraction was performed, and the RNA was used for the real time PCR reactions using *Syber Green* fluorescent compound. To assess if the genotypes found had any influence on fat production and milk fat percentage, variance and estimation of contrasts analysis were performed. To evaluate whether the expression varied at different postpartum days, a regression analysis was made. In the promoter region fragment a fragment size polymorphism that originates two alleles was found: the allele A, larger, and the allele B, smaller. Then the influence of these two alleles on the percentage of fat and fat production in milk were accessed, but neither allele showed influence over these characteristics. The PCR-RFLP analysis showed a difference in enzyme digestion pattern among samples in the exon 2, originating two alleles, C and N. These were also evaluated for their influence on the percentage of fat in milk and fat production, but no relationship was found. After sequencing, the sequences were compared to each other, and a single nucleotide polymorphism was found in intron 1 but no restriction enzyme that recognizes this polymorphism was found, making impossible the genotyping of a larger number of animals by PCR-RFLP technique. The reactions of real-time PCR revealed that expression of UCP2 in the liver was higher at birth and gradually decreased with advancing lactation up to 35 days postpartum.

Key words: Alpina. Energetic metabolism. Saanem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> para PCR convencional.....	15
Tabela 2. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> utilizados na análise de PCR em tempo real correspondentes aos seus respectivos genes.	17
Tabela 3. Associação dos efeitos dos genótipos do fragmento UCP2-PR (AA, AB, BB) com a estimativa dos valores genéticos para as características porcentagem de gordura e produção de gordura no leite de caprinos.....	20
Tabela 4. Associação dos efeitos dos genótipos do fragmento UCP2-2 (CC, NC, NN) com a estimativa dos valores genéticos para as características porcentagem de gordura e produção de gordura no leite de caprinos.....	24
Tabela 5. Comparação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene <i>UCP2</i> de caprino com o gene em bovino (<i>Gene ID: 281562</i>) através do programa <i>BLAST</i> (ALTSCHUL et al., 1997).....	24
Tabela 6. Expressão do gene <i>UCP2</i> no decorrer do período de lactação até os 35 dias pós-parto em caprinos.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fragmentos amplificados.	19
Figura 2. Alelos A e B do fragmento UCP2-PR.....	20
Figura 3. Desenho esquemático do padrão de corte da enzima <i>HaeIII</i> para os alelos N e C do fragmento UCP2-2.....	22
Figura 4. Alelos N e C do fragmento UCP2-2.	23
Figura 5. Alinhamento das sequências dos fragmentos UCP2-1 e UCP2-2 caprino e bovino (<i>Gene ID</i> : 281562), através do programa <i>BLAST</i> (ALTSCHUL et al., 1997).....	26
Figura 6. Alinhamento das sequências do fragmento UCP2-3 caprino e bovino (<i>Gene ID</i> : 281562), através do programa <i>BLAST</i> (ALTSCHUL et al., 1997).....	27
Figura 7. SNP localizado no éxon 1 no gene <i>UCP2</i> caprino.	28
Figura 8. Curva de dissociação do produto de PCR em tempo real.	29
Figura 9. Teste de eficiência para a PCR em tempo real.	30
Figura 10. Expressão do Gene <i>UCP2</i> durante o período inicial da lactação.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ACTB</i>	Gene que codifica a β -actina.
AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados.
ANT-1	Translocador do nucleotídeo adenina I
ATP	Adenosina trifosfato.
AGRP	Proteína Relacionada à Agouti.
ASP	Proteína Estimuladora da Ascilação.
cDNA	DNA complementar
CHOP-10	Proteína Homóloga a C/EBP.
Ct	Ciclo Limiar.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
<i>GAPDH</i>	Gene que codifica a proteína Gliceraldeido-3-Fosfato Desidrogenase.
GH	Hormônio do Crescimento.
GHR	Receptor do Homônio do Crescimento.
HSL	Lipase Sensível a Hormônio.
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I.
KATP	Canais de Potássio Sensível à ATP.
LPS	Lipopolissacarídeo de Bactérias.
NPY	Neuropeptídeo Y.
PAI-I	Inibidor do ativador do plasminogênio I.
PCR	Reação em Cadeia da DNA Polimerase.
PCR-RFLP	PCR associada com a avaliação de polimorfismo nos fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição.
POMC	Proópiomelanocortina.
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio.
SIDG	Secreção de Insulina Dependente de Glicose.
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único.
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α .
UCP2	Proteína Desacopladora de Membrana 2.
UCP2-1	Fragmento de DNA que contém o éxon 1 do gene <i>UCP2</i> e parte dos íntrons 1 e 2 .

UCP2-2	Fragmento de DNA que contém o éxon 2 do gene <i>UCP2</i> e parte dos íntrons 2 e 3.
UCP2-3	Fragmento de DNA que contém o éxon 3 do gene <i>UCP2</i> e parte dos íntrons 3 e 4.
UCP2-1 + UCP2-2	União dos fragmentos de DNA UCP2-1 e UCP2-2.
WAT	Tecido Adiposo Branco.
α -MSH	Hormônio alfa Estimulador de Melanócito.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABELAS	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Metabolismo no periparto em ruminantes	3
2.1.1 Lipídios	3
2.1.2 Carboidratos	5
2.1.3 Proteínas	6
2.2 Proteínas Desacopladoras de Membrana (UCPs)	6
2.3 Proteína Desacopladora de Membrana 2 (UCP2)	7
2.3.1 Regulação da termogênese e metabolismo basal	7
2.3.2 Controle das espécies reativas de oxigênio	8
2.3.3 UCP2 e o controle da insulinemia.....	9
2.3.4 UCP2 e o metabolismo de ácidos graxos	10
2.3.5 UCP2 e lipídose hepática.....	11
2.4 Polimorfismos	12
2.5 PCR em tempo real	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Delineamento experimental	14
3.2 Amostra de animais e coleta de material biológico	14
3.3 Extração de DNA	14
3.4 Desenho de <i>primers</i>	15
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese.....	15
3.6 PCR-RFLP	16
3.7 Sequenciamento	16
3.8 Extração de RNA	16
3.9 PCR quantitativo (PCR em tempo real)	16
3.10 Estimativa do valor genético dos animais	17
3.11 Análise estatística.....	17
3.11.1 Associação do genótipo com o valor genético.....	17
3.11.2 Expressão UCP2.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Obtenção dos fragmentos por PCR convencional	19
4.2 PCR-RFLP	21
4.3 Sequenciamento	24
4.4 Análise de expressão	28
5 CONCLUSÕES	33

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

As Mitocôndrias, organelas onde a respiração celular acontece, são separadas em dois compartimentos limitados por duas membranas. A membrana externa contém diversas proteínas transportadoras chamadas porinas, sendo permeável a moléculas de até 5000 Da, enquanto que a membrana interna é controlada para manter o gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento do processo de fosforilação oxidativa. As proteínas da cadeia respiratória transportam prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranas, criando um gradiente eletroquímico de prótons. Ao retornar para a matriz mitocondrial, através da enzima ATP sintetase, a força eletromotriz desse gradiente de prótons é transformada em ATP (ALBERTS et al. 2004). Porém embora a respiração celular seja geralmente acoplada com a geração de ATP essa relação não é perfeita, e esse gradiente eletroquímico pode ser perdido devido ao escape de prótons, para a matriz, através de algumas proteínas transportadoras da membrana interna (ROLFE & BRAND 1996).

Proteínas mitocondriais conhecidas como Proteínas Desacopladoras de Membrana ou UCP (do inglês: *uncoupling protein*), são transportadores de membrana bastante peculiares, transportam prótons para a matriz mitocondrial interna produzindo calor ao invés de ATP, dessa forma o gradiente eletroquímico da membrana diminui, e a respiração celular acoplada à produção de ATP fica prejudicada, uma vez que parte da energia eletroquímica é dissipada na forma de calor (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000).

Após a descoberta da UCP1, outras 4 UCPs foram descobertas em mamíferos: UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5, todas nomeadas pela ordem de descoberta (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000). Quanto a UCP2, SHEETS et al. (2011) mostraram que esta proteína age como modulador da resposta metabólica do organismo ao jejum, e que ela pode influenciar nos processo de esteatose hepática em camundongos, além disso, diversos trabalhos relatam que as UCPs têm papel importante na termogênese (BRAND & ESTEVES, 2005), taxa de metabolismo basal (NEEDERGARD & CANON, 2003), controle de espécies reativas de oxigênio (ARSENIJEVIC et al., 2000), regulação do metabolismo de ácidos graxos (SHEETS et al., 2011) e secreção de insulina (ZHANG et al., 2001), sendo que, existe uma relação direta entre a expressão das UCPs e níveis elevados de ácidos graxos no sangue (THOMPSON & KIM, 2004).

Crescimento, fertilidade e produção de leite, são todos dependentes de um funcionamento eficiente do sistema mitocondrial, refletindo a importância da homeostase metabólica (SHEETS et al., 2011), a qual, fica prejudicada durante o periparto em animais de produção leiteira, pois estes animais apresentam diminuição na capacidade de ingestão de alimentos, juntamente com a maior necessidade de nutrientes, o que os coloca em um Balanço Energético Negativo (BEN), uma fase comum do início da lactação, caracterizada por uma grande mobilização de gordura corpórea (BAUMAN & CURRIE, 1980). Dessa forma, o início da lactação é um período de grande mobilização de gordura, e ainda existem dúvidas quanto ao número exato de genes que participam da mobilização dos triglicerídeos e ácidos graxos nesta fase em ruminantes.

A carga metabólica do fígado aumenta bastante neste período, devido à grande demanda por nutrientes em decorrência do início da lactação (DRAKLEY et al., 2001). Neste período ocorre uma maior utilização de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) pelas mitocôndrias o que aumenta a produção de ROS na organela (FEILLET-COUDRAY et al., 2009). A UCP2 atua na regulação dos processos mitocondriais que levam ao aumento na produção dessas moléculas que podem afetar tanto a atividade da mitocôndria como do órgão todo (BRAND & ESTEVES, 2005).

Em alguns trabalhos foi demonstrado que polimorfismos em genes codificantes para UCPs estão associados à diversas características de produção em animais domésticos, como espessura de gordura (SHERMAN et al., 2008, FERRAZ et al., 2009) gordura intramuscular (CHEN et al., 2011) e peso de carcaça (FERRAZ et al., 2009). Porém, estudos de associação entre polimorfismos no gene UCP2 e produção de gordura no leite são escassos, e é possível que mutações neste gene tenham influência sobre tais características.

Além disso, a grande mobilização de ácidos graxos no início da lactação pode influenciar na expressão da UCP2 ou vice-versa, mostrando que esta tem papel nos processos fisiológicos desta fase. No levantamento bibliográfico realizado não foi encontrado nenhum trabalho avaliando como a expressão do gene *UCP2* se comporta no período inicial da lactação. No fígado sua expressão pode refletir a carga metabólica do órgão, bem como influenciar na distribuição de nutrientes realizada por ele no organismo.

Com o presente trabalho objetivou-se sequenciar a região 5' inicial do gene *UCP2* caprino, analisar a mesma em busca de polimorfismos e avaliar se os polimorfismos encontrados possuem associação com as características de produção de gordura e porcentagem de gordura do leite. Também buscou-se verificar o comportamento da expressão deste gene no período entre o dia do parto e os 35 dias pós-parto de cabras em lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo no periparto em ruminantes

A prenhez impõe um custo energético substancial para o organismo do animal. No final da gestação a demanda por nutrientes é até 75% maior do que a de um animal não gestante de mesmo peso, e durante os dois últimos meses de gestação a demanda do feto por nutrientes como glicose e aminoácidos é equivalente a de um animal produzindo 6 Kg de leite por dia. Para atender esse aumento na demanda energética ocorrem adaptações metabólicas no metabolismo materno. Essas mudanças são de extrema importância e são desencadeadas por sinais homeorréticos provenientes do feto (BAUMAN & CURRIE, 1980).

No período que sucede o parto, pós-parto, o qual coincide com o início da lactação, ocorrem alterações na partição de nutrientes para atender a demanda da glândula mamária, e as adaptações que ocorreram no organismo da mãe no final da gestação se tornam ainda mais pronunciadas com o início da lactação (BAUMAN & CURRIE, 1980).

Em vacas leiteiras, poucos dias após o parto, a demanda da glândula mamária por glicose, aminoácidos e ácidos graxos é de aproximadamente 2.7, 2.0 e 4.5 vezes, respectivamente, à existente do final da gestação (BELL, 1995). Em caprinos a captação de glicose pela glândula mamária após o parto é nove vezes maior do que a captação que ocorre de 7 a 9 dias antes do parto e cinco vezes maior do que a captação referente à 2 dias antes do parto (DAVIS et al., 1979). Além disso, durante as primeiras semanas de lactação, o consumo de matéria seca pelo animal aumenta apenas de forma moderada enquanto a lactação atinge o seu pico, e a ingestão de nutrientes, por si só, não é capaz de suprir a demanda, o que coloca o animal em BEN (BAUMAN & CURRIE, 1980).

Durante este período de BEN a deficiência energética decorrente da produção de leite é suprida pela grande mobilização de nutrientes provenientes das reservas corporais, e caso os mecanismos homeorréticos referentes a esse período não se sucedam corretamente o animal pode apresentar diversos problemas metabólicos como febre do leite, cetose e síndrome do fígado gorduroso, comprometendo assim a produção e impedindo o animal de atingir seu potencial máximo (DRAKLEY, 1999).

Dentre as adaptações metabólicas desencadeadas pelos sinais homeorréticos neste período, as mais evidentes são a supressão da lipogênese, e o aumento da lipólise, no tecido adiposo; o aumento na mobilização de aminoácidos do tecido muscular esquelético e o aumento da gliconeogênese hepática (BELL, 1995).

2.1.1 Lipídios

Durante a fase média da prenhez, o anabolismo predomina no tecido adiposo, porém, durante o período final da gestação o crescimento fetal é elevado e o tecido entra em catabolismo, o qual é intensificado após o parto devido ao início da produção de leite (MCNAMARA & HILLERS, 1986). Dessa forma as vacas geralmente mobilizam suas reservas de gordura no início da lactação e as recuperam na prenhez seguinte. Os lipídios provenientes das reservas corpóreas têm uma contribuição substancial para suprir o custo energético da produção de leite na fase inicial da lactação (FRIGGENS et al., 2004), o que leva a um aumento na concentração sanguínea de ácidos graxos não esterificados (AGNEs). Este aumento pode ser alcançado de diversas formas como: supressão da lipogênese e da reesterificação e um aumento da lipólise. Dessa forma a liberação líquida de AGNEs proveniente do tecido adiposo representa o balanço entre a síntese de triglicerídeos e a lipólise (MCNAMARA, 1989).

A lipogênese e a esterificação de ácidos graxos, que já são baixas no final da gestação, são ainda mais suprimidas após o parto em ovelhas (SMITH & WALSH, 1984) e em vacas (MCNAMARA & HILLERS, 1986). Além disso, a reesterificação intracelular de ácidos graxos hidrolisados também é mínima durante início da lactação em bovinos (METZ, 1977) e caprinos (DUNSHEA, 1990). Nesta fase ocorre uma diminuição drástica na insulinemia e alterações nas proteínas responsáveis pela resposta celular à insulina causam uma diminuição na lipogênese deixando esta em níveis bastante baixos. Análises de transcriptoma (LOOR, 2010) mostraram uma clara redução na maioria dos elementos e enzimas que controlam a lipogênese. Além disso, o tecido adiposo aumenta sua sensibilidade a estímulos lipolíticos como: baixas concentrações de insulina, altas concentrações de catecolaminas e glicocorticóides. Ainda, mecanismos adicionais de regulação podem atuar na estimulação à expressão e/ou atividade de proteínas como lipase sensível a hormônio (HSL, do inglês: *Hormone Sensitive Lipase*) e receptores β -adrenérgicos (SUMNER & MCNAMARA, 2007).

A lipólise está sob o controle do sistema nervoso simpático e alguns dos fatores que afetam o tecido adiposo, são os fatores β -adrenérgicos, que atuam estimulando a lipólise. Alguns receptores para tais fatores como β_1 , β_2 , β_3 e outras proteínas como a HSL e a Perplina, têm sua expressão aumentada no tecido adiposo juntamente com a atividade catalítica do mesmo durante o período de lactação. Equações de regressão estimam que essa alteração na expressão de tais proteínas podem representar cerca de 25% na variação do uso da gordura corpórea (SUMNER & MCNAMARA, 2007).

De acordo com MCNAMARA (1986), durante o período entre 30 dias pré-parto e 39 dias pós-parto, ocorre um aumento na capacidade de ligação dos fatores β -adrenérgicos aos adipócitos, aumentando a resposta desse tecido ao estímulo e causando uma maior mobilização de ácidos graxos. Ainda, segundo a revisão realizada por SUMNER & MCNAMARA (2007), esse aumento da resposta aos estímulos adrenérgicos durante a lactação varia de acordo como a qualidade genética do animal para a produção de leite.

No tecido adiposo o hormônio do crescimento (GH, do inglês: *growth hormone*) é um dos principais hormônios responsáveis pelo aumento da lipólise e conseqüentemente aumento na concentração sanguínea de AGNEs e sua concentração sanguínea é elevada durante o periparto. Uma dos possíveis fatores que levam a esse aumento é uma diminuição na expressão do seu receptor (GHR, do inglês: *growth hormone receptor*), no fígado. A diminuição na expressão do GHR no fígado ocorre provavelmente devido a uma diminuição na ingestão de alimentos ou de eventos hormonais que ocorrem em decorrência do parto. Sem o estímulo do GH as células do fígado não produzem fator de crescimento semelhante à insulina Tipo 1 (IGF-1, do inglês: *insulin like growth factor-1*) que é responsável pelo *feedback* negativo do GH, aumentando assim a sua concentração sanguínea, o que provoca maior mobilização de ácidos graxos. Após o parto, conforme a lactação avança, o consumo de alimento se normaliza, o animal volta ao balanço energético positivo e a expressão de GHR aumenta, retornando a níveis normais, diminuindo assim a lipólise (LUCY & KOBAYASHI, 2001).

Em vacas, os níveis de estradiol aumentam progressivamente durante o final da gestação alcançando o pico 1 ou 2 semanas antes do parto. Isso pode ocasionar um aumento na mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, independentemente de alterações no consumo de alimentos (BELL, 1995). Existem evidências de que o tratamento crônico de ovelhas ovariectomizadas com estradiol-17 β em doses semelhantes à de ovelhas grávidas, aumenta os níveis de AGNEs e de Glicerol a concentrações semelhantes às do final da gestação. Além disso, o tratamento dessas ovelhas com estradiol causou uma grande inibição da capacidade *in vitro* de lipogênese e esterificação de ácidos graxos (GREEN et al., 1992).

A prolactina também pode ter um papel no metabolismo de lipídios, uma vez que em ratos ela é um importante fator que mantém a atividade anabólica do tecido adiposo diminuída, porém os autores relatam que para que isso ocorra é necessário o estímulo de amamentação, e que talvez essa influência seja indireta (FLINTCH et al., 1981). Ainda, também em ratos, esse hormônio pode aumentar a resistência à insulina nos tecidos periféricos e ter uma ação contrária a esta nas glândulas mamárias (BELL, 1995).

Durante o final da gestação e o período inicial da lactação o tecido adiposo do animal apresenta um quadro de resistência à insulina, onde a mobilização de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo é facilitada por uma diminuição na habilidade da insulina de promover a lipogênese e de provocar efeito oposto à lipólise, essa resistência também ocorre em outros tecidos do animal, principalmente em tecidos periféricos, o que não ocorre na glândula mamária, dessa forma, estes deixam de utilizar a glicose como fonte principal de energia poupando a mesma para a produção de leite (BELL, 1995).

2.1.2 Carboidratos

Antes do parto a glicose proveniente dos alimentos excede a demanda do animal, o que permite maior síntese de glicogênio no fígado e tecido muscular esquelético, também ocorre um aumento do uso de glicose para a síntese de NADPH₂ e glicerol, dando suporte à lipogênese, dessa forma, o animal ganha massa corporal e glicogênio hepático (DRACKLEY et al., 2001).

Após o parto, com o início da lactação, ocorre aumento abrupto na demanda por glicose, em decorrência da grande produção de lactose pela glândula mamária e os animais têm uma diminuição na utilização de glicose pelos tecidos periféricos (BENNINK et al., 1972).

Como o consumo de alimento pelo animal não é capaz, por si só de suprir a demanda por nutrientes, o animal passa a utilizar suas reservas corporais. Segundo cálculos de alguns pesquisadores a demanda estimada de glicose de uma vaca no final da gestação é de 1000 a 1100 g/d de glicose e aumenta para aproximadamente 2500 g/d aos 21 dias após o parto. A maior parte desse aumento na demanda deve ser compensada pela gliconeogênese hepática. Dessa forma, a taxa metabólica do fígado aumenta bastante com o início da lactação (OVERTON et al., 1998 *Apud* DRACKLEY et al., 2001).

Considerando que 100% do propionato e aminoácidos absorvidos estivessem disponíveis para a gliconeogênese, isso representaria apenas 65% da demanda, o glicerol proveniente do tecido adiposo representaria apenas mais 15 ou 20%, caso utilizado completamente para a gliconeogênese, e o lactato teria uma pequena contribuição. Dessa forma, é improvável que o fornecimento de glicose proveniente do metabolismo hepático de propionato, lactato, glicerol e aminoácidos provenientes da dieta, seja suficiente para atender a demanda da glândula mamária por glicose, sem contar a necessidade de outros tecidos, assim, o animal utiliza suas reservas proteicas para suprir esse *déficit* (BELL, 1995). Outros dados sugerem que propionato é a principal substância utilizada para a gliconeogênese com uma contribuição máxima de 73%, os aminoácidos contribuem com até 30% e o lactato com até 15%, sendo que o glicerol tem uma pequena participação (SEAL & REYNOLDS 1993).

Aparentemente a gliconeogênese a partir do propionato é aumentada durante o período de lactação, esse aumento tem relação direta com a absorção de propionato, uma vez que, aumentando a sua disponibilidade a gliconeogênese a partir desta substância é também aumentada. De forma similar aos carboidratos, a gliconeogênese a partir de aminoácidos tem relação direta com a sua disponibilidade, e os tecidos periféricos como o muscular esquelético e as vísceras têm uma contribuição substancial no fornecimento destes durante os primeiros

21 dias de lactação. O glicerol é bastante utilizado como fonte de glicose no início da lactação, porém sua utilização depende da taxa de mobilização do tecido adiposo. Aparentemente o lactato tem uma contribuição maior para a gliconeogênese no final da gestação, pois este é bastante liberado pelo útero neste período (DRACKLEY et al., 2001).

2.1.3 Proteínas

É interessante notar que mesmo que a oxidação de glicose esteja diminuída nos tecidos não-mamários periféricos, ainda persiste um *déficit* estimado de cerca de 500 g/d de glicose que pode ser compensado pela mobilização de aminoácidos armazenados na musculatura esquelética do animal, essa reserva é chamada de reserva lábil de proteínas, e pode chegar aproximadamente 25% de toda a proteína corpórea do animal (BAUMAN & CURRIE, 1980). Ela tem maior importância até cerca de duas semanas pós-parto e após esse período passa a ter menor contribuição (BAUMAN & ELLIOT 1983).

É provável que essa utilização de aminoácidos no tecido muscular esquelético seja alcançada, não pelo aumento na degradação proteica, mas sim pela inibição da síntese (BOISCAIR et al., 1993). Essa mobilização parece ser acompanhada por um aumento na síntese de proteínas hepáticas iniciada durante o final da gestação e aumentada ainda mais no pós-parto. Além disso, o fígado passa a utilizar os aminoácidos de forma mais eficiente (BELL, 1995).

2.2 Proteínas Desacopladoras de Membrana (UCPs)

Presente nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom de mamíferos a UCP1 (RICQUIER et al., 1982) foi a primeira proteína desta família a ser descoberta (FLEURY et al., 1997). Posteriormente, diversas proteínas homólogas a ela foram descritas em outros organismos como: mamíferos, aves, plantas e até de animais pecilotérmicos (LEDESMA et al., 2002). Em mamíferos cinco UCPs são conhecidas: UCP1, presente no tecido adiposo marrom; UCP2 expressa em diversos tecidos do organismo; a UCP3, aparentemente expressa somente no músculo estriado esquelético e músculo cardíaco, e ainda, a UCP4 e BMCO1 (*Brain Mitochondrial Carrier protein 1*) ou UCP5, expressas predominantemente no sistema nervoso central. Dentre estas, as UCPs 1, 2 e 3 são as que têm sido mais estudadas, pois já foi mostrando que elas estão envolvidas com importantes respostas metabólicas do organismo (ROBBINS & ZHAO, 2011).

As UCPs são proteínas integrais de membrana com aproximadamente 300 aminoácidos caracterizadas por seis alfa-hélices transmembranárias, com a extremidade carboxil voltada para o espaço intermembranário. Elas são divididas em três sub-unidades, cada uma compreendendo um dímero de aproximadamente 100 aminoácidos, com duas regiões hidrofóbicas em cada repetição, as quais correspondem as alfa-hélices transmembranárias. Estas, por sua vez, são ligadas por uma longa volta hidrofóbica voltada para o lado interno da membrana (MIROUX et al., 1993).

A estrutura do código genético para a UCP1 foi analisada por vários grupos de pesquisa e mostrou-se bastante conservada quando são feitas comparações entre várias espécies. O gene é composto por seis éxons onde cada um deles compõe um domínio transmembranário. O genes para UCPs 2 e 3 apresentam basicamente a mesma estrutura encontrada no gene da UCP1, porém eles diferem pela não tradução de dois éxons (UCP2) ou um éxon (UCP3), do lado 5'. Ainda foi notado que os genes para UCPs 2 e 3 estão bastante próximos um do outro, estando o gene da UCP2, em camundongos, cerca de 7 Kb de distância do da UCP3 no sentido 3' (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000).

2.3 Proteína Desacopladora de Membrana 2 (UCP2)

Após a descoberta da UCP2 (FLEURY et al., 1997), percebeu-se, que diferente da UCP1, ela era amplamente distribuída entre os tipos celulares, com propriedades que sugerem que ela tenha participação em de doenças como obesidade e diabetes. Apesar de ser uma proteína mitocondrial, o gene que a codifica está localizado no cromossomo 11 em humanos, dentro de uma região ligada à hiperinsulinemia e a obesidade (FLEURY et al., 1997). O nível de expressão deste gene varia dependendo do tipo de tecido e do estado fisiológico do organismo, dessa forma, acredita-se que esta tenha mais de uma única função *in vivo* (ARSENIJEVIC et al., 2000).

A estrutura da UCP2 de camundongos assemelha-se à do carreador ADP/ATP bovino, a *adenine nucleotide translocator* (ANT-1) (PEBAY-PEYROULA et al., 2003), e embora estas proteínas tenham pouca semelhança na sequência de aminoácidos, as duas formam estruturas semelhantes a canais, onde três repetições adotam dobras similares. Cada repetição consiste em uma hélice transmembranária, uma volta, uma hélice anfipática e outra hélice transmembranária, contendo torções em prolínas, as quais também são conservadas em proteínas carreadoras de membrana. A maior diferença entre a UCP2 e ANT1 está na terceira parte da proteína onde ao invés da hélice anfipática se projetar em direção à hélice transmembranária ímpar, fechando o canal, esta é deslocada para o espaço intermembranário da mitocôndria, e como consequência o canal da proteína fica mais aberto (BERARDI et al., 2011).

2.3.1 Regulação da termogênese e metabolismo basal

Dado o papel da UCP1 na produção de calor, quando a UCP2 foi descoberta acreditava-se que sua função também seria de regular a termogênese e a massa corporal (FLEURY et al., 1997), talvez por catalisar um vazamento de prótons em diversos tecidos e complementar assim aquele da UCP1, porém surgiram diversas evidências contra essa teoria (BRAND & ESTEVES, 2005). Estudos com camundongos *knockout* mostraram que os três genótipos, UCP2^{-/-}, UCP2^{-/+} e UCP2^{+/+} quando expostos ao frio, 5°C por 24h, têm uma diminuição similar na temperatura corpórea (ARSENIJEVIC et al., 2000). ZHANG et al. (2001) também em estudos com camundongos *knockout* notaram que os animais UCP2^{-/-} apresentam peso e termogênese normais e não são obesos, sugerindo que essa proteína não tem influência sobre o peso corporal ou regulação da temperatura.

Outras evidências sugerem que a UCP2 pode ter alguma função na termogênese adaptativa como evidenciado nos estudos de MURDOCH et al. (2005), no qual foi observado que novilhas expostas ao frio tiveram a expressão da UCP2 aumentada em tecidos periféricos, como adiposo subcutâneo e músculo esquelético, concluindo que, embora um aumento na expressão da UCP2 possa diminuir a eficiência energética nesse animais, a habilidade de aumentar a capacidade termogênica também é de extrema importância para manter a homeostasia.

Aparentemente a UCP2 também tem um papel na termogênese em resposta à infecção uma vez que, em camundongos, sua expressão é aumentada em tecidos, como tecido adiposo, músculo e fígado, quando é realizada uma aplicação intravenosa de fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês: *Tumor Necrosis Factor α*) ou lipopolissacarídeo de bactérias (LPS) (FRAGGIONI et al., 1998). Em ratos a aplicação de TNF- α também aumenta a expressão desse gene no músculo esquelético (BUSQUETS et al., 1998).

O fato de os camundongos *knockout* UCP2^{-/-} não apresentarem maior sensibilidade ao frio (ARSENIJEVIC et al., 2000), nem obesidade, (ZHANG et al., 2001) em comparação ao genótipo selvagem, é um forte argumento contra a proposição de que a UCP2 tem função central na termogênese, porém a termogênese produzida por ela pode ser importante em determinadas condições (BRAND & ESTEVES, 2005).

Devido à sua capacidade de desacoplar a respiração celular da síntese de ATP, a UCP2 pode ter uma influência importante no metabolismo energético (WALDER et al., 1998) ou no balanço energético (BOUCHARD et al., 1997). Estudos de associação entre marcadores moleculares próximos ao gene codificante para a UCP2 em humanos mostra uma associação entre polimorfismos e a taxa de metabolismo basal (BOUCHARD et al., 1997) e também, polimorfismos no próprio gene *UCP2* estão ligados à taxa de metabolismo basal e metabolismo durante o sono (WALDER et al., 1998). Isso pode ser relacionado com o fato de que o vazamento de prótons pela membrana mitocondrial interna esteja associado com a taxa de metabolismo basal em diversos tecidos (ROUSSET et al., 2004).

2.3.2 Controle das espécies reativas de oxigênio

As mitocôndrias são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *reactive oxygen species*) nas células (BRAND & ESTEVES, 2005). As ROS são geralmente citotóxicas e causam dano oxidativo em diversas macromoléculas celulares, elas são reconhecidas como importantes fatores que contribuem para diversas condições patológicas como câncer, arteriosclerose, diabetes, neurodegeneração.

Na cadeia respiratória a passagem de elétron do Ubiquinol (Ubiquinona reduzida, Qh₂) para o complexo III e a passagem de elétrons do complexo I para o Ubiquinol envolvem o radical semiquinona (Q[•]) como intermediário, o que pode, com uma pequena probabilidade, passar elétrons para O₂ produzindo O₂^{•-}, radical bastante reativo que pode levar a formação de um radical ainda mais reativo OH[•]. Na mitocôndria ativa, de 0,1 a 4% do oxigênio consumido pela respiração pode formar ROS, quantidade suficiente para causar efeitos letais na célula. Fatores que retardam o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória aumentam a formação desses superóxidos, provavelmente por aumentar a meia vida do O₂^{•-} gerado no ciclo da Ubiquinona (LENINGHER et al., 2008).

Dessa forma a produção de ROS pelas mitocôndrias é muito sensível à força protomotora gerada pelo gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna. A UCP2, através de um leve aumento no vazamento de prótons através dessa membrana, diminui essa força protomotora, minimizando assim a formação de ROS sem cessar a produção de ATP ao mesmo tempo em que aumenta a respiração celular (BRAND & ESTEVES, 2005).

Os radicais livres produzidos pela respiração celular quando difundidos pela membrana mitocondrial interna atacam os fosfolípidios da membrana produzindo hidroperóxidos lipídicos, essas moléculas vão ativar as UCPs e aumentar o vazamento de prótons pela membrana mitocondrial interna. Esse aumento no vazamento de prótons diminui o potencial eletroquímico da membrana e aumenta o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória diminuindo a concentração de carreadores eletrônicos reduzidos (NADH, NADPH, CoQH₂, FADH₂), responsáveis pela produção de superóxidos. Dessa forma, esse vazamento de prótons provocado pela UCP2 protege a célula do stress oxidativo (DIANO & HORVATH, 2011).

Embora o superóxidos sejam geralmente considerados como subprodutos tóxicos da respiração, evidências recentes sugerem que a produção destas moléculas pode ter papel

fundamental na sinalização e regulação de diversos processos celulares (THANICKAL & FANBURG, 2000).

Os superóxidos são importantes estimulantes da expressão e atividade das UCP2, e a sensibilidade da UCP2 às ROS foi demonstrada em diversos tecidos, como tecido adiposo (CHEVIOLETE et al., 2007), sistema nervoso (ANDREWS et al., 2008) e pâncreas (PI & COLLINS, 2010). E através desse controle sobre a concentração de ROS que pesquisadores sugerem para esta proteína um papel regulador no metabolismo tanto de glicose (ZHANG et al., 2001) como de lipídios (CHEVIOLETE et al., 2007).

2.3.3 UCP2 e o controle da insulinemia

A UCP2 funciona como um inibidor da secreção de insulina dependente de glicose (SIDG) nas Células β -pancreáticas, uma vez que estas “monitoram” a glicemia através do seu metabolismo, apresentando níveis elevados de ATP intracelular na presença de glicose, e menor relação ATP/ADP na sua ausência. Assim na presença de grandes quantidades de ATP no citoplasma celular ocorre a SIDG mantendo a glicose sanguínea em níveis normais (NEWGARD & MACGARRY, 1995).

Em condições glicêmicas “normais” a glicose é preferencialmente metabolizada para geração de ATP, e o excesso de carboidratos é convertido em triglicerídeos os quais são estocados no tecido adiposo. Porém, sob condições de jejum a glicose disponível não é suficiente e os lipídios tornam-se a fonte principal de energia (LENINGHER et al., 2007). Como os ácidos graxos estimulam tanto a expressão como a atividade da UCP2 nas células β -pancreáticas, níveis elevados de ácidos graxos podem estimular a expressão e ativar a UCP2 durante períodos de BEN, contribuindo para a supressão na secreção de insulina, a qual é um forte inibidor da HSL, fundamental na lipólise, pois é esta enzima que hidrolisa os triglicerídeos à ácidos graxos (SHEETS et al., 2008). Ainda, em outro trabalho, os autores (ROUSSET et al., 2007), verificaram que a meia vida da UCP é de cerca de 30 min, apontando-a como um potencial regulador de respostas biológicas rápidas.

Embora o sistema nervoso utilize principalmente glicose como fonte de energia, é fundamental que populações específicas de neurônios consigam sentir todos os tipos de nutrientes presentes no organismo, permitindo uma adaptação dos tecidos periféricos à flutuação de nutrientes. Em mamíferos, quando os níveis de carboidratos aumentam na circulação devido à ingestão de alimentos, circuitos neuronais específicos promovem a cessação da fome (saciedade), captação e utilização de glicose. Em contraste quando os níveis de glicose diminuem devido à falta de alimentação, outro conjunto de neurônios hipotalâmicos é ativado para promover fome e mobilização de lipídios. O principal responsável por esse processo é o sistema da melanocortina do núcleo arqueado no hipotálamo (GAO & HORVATH). Esse sistema é constituído de neurônios próopiomelanocortina (POMC), que produzem hormônio alfa estimulador de melanócito (α -MSH, do inglês: *α -Melanocyte Stimulating Hormone*), anorexígeno (promove saciedade), e neurônios que produzem a proteína relacionada à agouti (AGRP, do inglês: *agouti-related protein*) e neuropeptídeo Y (NPY), orexígenos (promovem fome). E é através da ação da UCP2 no sistema da melanocortina que ela pode influenciar o metabolismo do organismo (DIANO & HORVATH, 2011).

Quando os níveis de leptina e glicose aumentam após as refeições os neurônios POMC aumentam a sua atividade afetando a homeostase da glicose no fígado e a ação da insulina no metabolismo (KONNER et al., 2007). A ativação dos neurônios POMC pela glicose durante elevado níveis de leptina pode se dar por múltiplos mecanismos intracelulares: Abertura de canais de cátions não específicos induzida pela leptina e também pode ser auxiliado pela

fosforilação STAT3 promovida pela Janus Kinase (GAO & HORVATH 2007), a utilização de glicose pelos neurônios POMC também pode levar à despolarização da célula através de canais de potássio sensíveis à ATP (KATP, do inglês: *ATP-sensitive potassium channel*) (FIOMRAMONTI et al., 2007). E é o seu envolvimento com os KATP que promove uma explicação plausível de como a UCP2 pode influenciar a na ativação dos neurônios POMC. Com o aumento da atividade da UCP2 a produção de ATP diminui e assim a sua disponibilidade também, o que diminui a ativação do KATP afetando a despolarização celular e consequentemente a liberação de α -MSH (PARTON et al., 2007).

Além disso, os neurônios POMC disparam em uma taxa elevada em condições hiperglicêmicas e sua atividade parece estar ligada a quantidade de ROS gerada pela oxidação da glicose. Durante o balanço energético positivo esses neurônios estão ativos e a quantidade de ROS esta elevada, porém durante o balanço energético negativo, os níveis de ROS estão reduzidos e tais neurônios são silenciados (ANDREWS et al., 2008). O aumento nos níveis de ROS gerado pelo metabolismo de glicose nos POMC é provavelmente um importante regulador da atividade dessas células que promove a saciedade. Dessa forma aparentemente a UCP2 através do controle das ROS pode diminuir a sensibilidade desses neurônios à glicose debilitando o metabolismo de glicose do organismo (DIANO & HORVATH, 2011).

Quando neurônios NPY/AGRP são ativados em períodos de balanço energético negativo (pouca glicose) os níveis de ROS não são aumentados devido a atividade da UCP2. Na ausência da UCP2 essas produzem quantidades elevadas de ROS e tem sua atividade debilitada (ANDREWS et al., 2008).

2.3.4 UCP2 e o metabolismo de ácidos graxos

Existem relatos de alterações na expressão da UCP2 em decorrência de situações conhecidas por alterar o nível de ácidos graxos no organismo ou a intensidade da oxidação de ácidos graxos, como jejum, dieta rica em lipídios, infusão de lipídios e exercícios (ROUSSET et al., 2004). Isso é consoante com o fato de que o transporte de prótons pelas UCPs requer a presença de ácidos graxos (BERARDI et al., 2011).

O tecido adiposo branco (WAT, do inglês: *white adipose tissue*) tem papel fundamental na fisiologia dos mamíferos. A visão clássica é de que esse tecido é responsável pela reserva de “combustível” podendo ser utilizado em períodos de balanço energético negativo através da liberação de ácidos graxos que serão oxidados em outros tecidos (TRAYHURN & BEATTIE, 2001). Um novo papel para este tecido, na regulação do balanço energético e outros processos fisiológicos, foi descoberto através da identificação da leptina (ZHANG et al., 1994), um hormônio secretado, principalmente, a partir de adipócitos, com ações no SNC e em órgãos periféricos. A leptina não é, contudo, a única proteína secretada pelo WAT. De fato, há uma crescente lista de proteínas e fatores que são liberados dos adipócitos brancos, o que também atribui a ele um papel endócrino. Assim fica claro que o WAT desempenha um papel de grande importância na regulação metabólica e homeostase fisiológica, muito além do simples paradigma de armazenamento de gordura (TRAYHURN & BEATTIE, 2001). Alguns exemplos destas substâncias são, além da leptina, a proteína estimuladora de acilação (ASP), TNF- α , Inibidor do ativador do plasminogênio I (PAI-1), interleucina-6, e a adiponectina. Tais moléculas são chamadas adipocitocinas, moléculas biologicamente ativas provenientes do tecido adiposo (DIÉZ & IGLESIAS, 2003).

A adiponectina é uma proteína de aproximadamente 30K-Da com características de uma molécula sinalizadora descoberta em adipocitos do WAT (HU et al., 1995). Essa molécula aumenta a fosforilação e a atividade da proteína kinase ativada por monofosfato de

adenina (AMPK) e através desse processo aumenta a captação de glicose e a produção de lactato em miócitos da linhagem C2C12 *in vitro* e no músculo esquelético *in vivo*. Outros efeitos do aumento da fosforilação da AMPK também incluem uma redução na expressão das moléculas responsáveis pela gliconeogênese no fígado reduzindo assim os níveis de glicose. A adiponectina também aumenta a fosforilação da acetil coenzima a carboxilase e a oxidação de ácidos graxos em miócitos da linhagem C2C12 e em hepatócitos. Dessa forma, através da ativação da AMPK a adiponectina regula diretamente o metabolismo de glicose e a sensibilidade à insulina (YAMAUCHI 2002).

Um número crescente de evidências apontam as ROS como moléculas de comunicação entre a mitocôndria e os processos reguladores da expressão gênica celular. Essa sinalização geralmente ocorre através de moléculas que derivam da interação entre as ROS e lipídios da membrana celular, as quais podem atuar modulando a atividade de algumas kinases, fosfatases e de alguns genes (LEONARDUZZI et al., 2004). Assim, mudanças na atividade mitocondrial e nos níveis de UCP2 no tecido adiposo têm consequências que podem ir além dos processos intracelulares, influenciando o metabolismo sistêmico através de alterações na liberação de adipocitocinas pelo tecido adiposo (CHEVIOLLETE et al., 2007).

A atividade mitocondrial e especificamente a atividade da UCP2, na produção de ROS, têm influência primordial na expressão do gene da adiponectina. Mudanças na atividade mitocondrial e na ação da UCP2 ocorrem através das mudanças no nível de ROS e envolvem mudanças nos níveis de Proteína Homóloga a C/EBP (CHOP-10), que atua como inibidor da transcrição do gene da adiponectina por interferir no sítio de ligação da C/EBP no promotor. Em momento de elevada produção de ROS os níveis de CHOP-10 também estão elevados, inibindo assim a expressão da adiponectina, porém quando as concentrações de ROS estão baixas, a quantidade de CHOP-10 diminui favorecendo a expressão da adiponectina (CHEVIOLLETE et al., 2007).

Dessa forma, a UCP2 regula a expressão do gene da adiponectina mediada pela atividade mitocondrial, especificamente pelos níveis de UCP2 mitocondriais. Essas observações dão suporte ao fato de que a atividade mitocondrial e a produção ROS são eventos importantes influenciando a sensibilidade à insulina e o metabolismo sistêmico através do controle da expressão e liberação da adiponectina (CHEVIOLLETE et al., 2007).

2.3.5 UCP2 e lipídose hepática

Em um estudo com camundongos *knockout*, UCP2^{-/-}, SHEETS et al. (2008) observaram que após 24h de jejum os animais apresentaram menor quantidade lipídios acumulados no fígado em relação aos animais de genótipo selvagem, UCP2^{+/+}. Após 72h de jejum os animais UCP2^{-/-} apresentaram esteatose hepática mais severa do que os animais de genótipo selvagem. Segundo os autores isso ocorreu porque os hepatócitos de camundongos UCP2^{-/-} não foram capazes de realizar com eficiência as etapas de armazenamento e de catalisação de lipídios no fígado, uma vez que enzimas essenciais para a β -oxidação, cetogênese, exportação dos ácidos graxos para a corrente sanguínea e redistribuição destes para o organismo, tem sua expressão reduzida em camundongos UCP2^{-/-} (SHEETS et al., 2008).

Após 24hrs de jejum a insulinemia basal dos animais *knockout* foi igual à de animais com genótipo selvagem que não estavam em jejum. Isso é consoante com o fato de que a UCP2 altera a SIDG. Porém após 72hrs de jejum os níveis de insulina entre os animais dos dois genótipos eram iguais. A alteração na secreção da insulina entre os genótipos pode ter causado um efeito direto na resposta hepática à lipólise, causando as alterações observadas no

fígado dos animais. Os autores concluem que um aumento na expressão da UCP2 nas células β -pancreáticas diminuiu a liberação de insulina facilitando a lipólise (SHEETS et al., 2008).

2.4 Polimorfismos

Polimorfismos e deleções em genes codificantes para UCPs foram associados à diversas características de produção em animais domésticos: FERRAZ et al. (2009) em estudos com bovinos da raça Nelore encontraram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês: *single nucleotide polymorphism*) (C/G), no íntron 1 do gene para UCP1 e notaram que os animais que apresentam o alelo G em homozigose possuíam um peso de carcaça quente e espessura de gordura subcutânea maiores que os a animais com o alelo C em homozigose. SHERMAN et al. (2008) avaliando diversas raças de *Bos taurus* encontraram associação entre um SNP (G/A) no íntron 3 do gene para UCP3, com ganho de peso diário e conversão alimentar. No mesmo estudo os autores verificaram associações entre outro SNP (G/A) no éxon 4 do gene para UCP2, o qual mostrou que o alelo A tem efeito negativo na produção de carne magra e positivo sobre a espessura de gordura subcutânea.

CHEN et al., 2011 encontraram associação entre um SNP (T/C), no éxon 2 e notaram que o genótipo CC estava relacionado à maior quantidade de gordura intramuscular do que o TT em suínos da F2 de um cruzamento Pietran X Jinhua. Em vista do exposto, genes codificantes para as UCPs são potenciais genes candidatos a serem utilizados como marcadores moleculares de características de produção em animais domésticos.

2.5 PCR em tempo real

A quantificação dos níveis de expressão gênica pode fornecer pistas valiosas sobre a função do gene. Por exemplo, através de análises de expressão do gene é possível identificar o tipo de células ou tecidos em que o gene é expresso, revelar níveis de expressão de genes individuais em um estado biológico definido e mostrar alterações nos níveis de expressão dos genes em resposta a estímulos biológicos específicos. O PCR em tempo real tem diversas vantagens sobre outros métodos, incluindo a pequena quantidade de amostra necessária para a análise, a capacidade de reproduzir dados rápidos e precisos, e a possibilidade de analisar mais de um gene de cada vez (FRAGA et al., 2008).

A PCR em tempo real utiliza compostos fluorescentes para monitorar a produção de produtos de amplificação durante cada um dos ciclos da reação. Ela combina os passos de amplificação e análise em um único passo sem a necessidade de processamento após a PCR. Ao invés de observar a quantidade de DNA produzida após um número fixo de ciclos a reação de PCR em tempo real detecta em qual ciclo a intensidade da fluorescência do corante *reporter* aumenta acima do nível base, dessa forma ela determina o momento em que o produto de PCR é detectado. Este momento é chamado de ciclo limiar (Ct, do inglês: *threshold cycle*) (BUSTIN S., 2005).

Os dois métodos mais comumente usados para analisar os dados da reação de PCR em tempo real quantitativa são quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias através de uma curva padrão, a qual tem as concentrações conhecidas de produto alvo. A quantificação relativa relaciona os dados de grupos tratados com a de um outros grupos, como o grupo controle (não tratado) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

O primeiro passo para a realização da reação de PCR em tempo real é converter as moléculas de RNA que correspondem à parte codificante dos genes em cDNA. Isso é realizado através do processo de transcrição reversa, que converte o RNA em DNA. Esse

processo é catalisado por uma DNA Polimerase Dependente de RNA, chamada Transcriptase Reversa. Um *primer* é hibridizado na molécula de RNA permitindo assim a enzima sintetizar a fita complementar de DNA. A sequência do *Primer* de DNA pode ser desenhada para se anelar em uma região gênica particular ou em todo o RNA isolado. Um *Primer* específico é necessário para converter uma região gênica específica em cDNA porém um primer universal pode ser utilizado. Este último hibridiza na cauda poli A dessas moléculas e assim todo o RNA é convertido (FRAGA et al., 2008).

Para normalizar a reação utiliza-se um controle interno chamado Gene de Referência. Este gene não tem sua expressão alterada com o tratamento, dessa forma, ele é utilizado para normalizar a quantidade de RNA adicionado. Alguns genes desempenham bem esse papel como o da beta actina (*ACTB*, do inglês: *Actin-beta*) e o da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*GAPDH*), porém é necessária uma validação destes como desses como gene de referência, analisando se o tratamento não altera a sua expressão (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para a realização da técnica é necessário que a eficiência da reação entre os genes de referência e o gene alvo sejam semelhantes e que se tenha uma eficiência de reação constante, próxima a 100% na fase exponencial da reação (LIU & SAINT, 2002). Uma boa forma de testar a eficiência da reação é produzir uma curva padrão através de uma diluição seriada do material alvo e realizar a PCR em tempo real e após a reação preparar um gráfico do Ct versus o log da concentração dos ácidos nucleicos e fazer uma regressão linear. A eficiência da reação é calculada a partir do *Slope* da linha, para isso utiliza-se a seguinte equação “ $efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$ ”. Se a reação for 100% eficiente a quantidade de produto de PCR irá dobrar a cada ciclo e o *Slope* da curva será de -3.33 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Após realizadas as reações de PCR em tempo real para calcular a quantificação das mudanças relativas na expressão gênica utiliza-se o método do ΔCt , que determina o efeito do tratamento na expressão de um gene a partir de um gene de referência, este valor é dado pela seguinte fórmula: $\Delta Ct = (CT_{Alvo} - CT_{Gene\ de\ Referência})$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Para as análises de expressão gênica o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos representados pelos dias pós-parto. A unidade experimental foi o caprino em lactação.

3.2 Amostra de animais e coleta de material biológico

Foram utilizadas 40 cabras multíparas, de 2º ou 3º lactação, todas fêmeas lactantes das raças Saanem e Alpina, alojadas no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os animais foram criados em baias de metabolismo individuais com piso ripado, e dimensões de 1,5 x 2,0 m, providas de cochos para fornecimento das rações e água a vontade.

Todos os animais receberam uma única dieta experimental, formulada de acordo com os valores preconizados pelo NRC (2007). A ração foi fornecida duas vezes ao dia (7 e 16 h) sempre após a ordenha dos animais. Foi utilizada uma ração de mistura completa com silagem de milho e mistura concentrada. Os animais receberam a mesma dieta antes e depois do parto.

A quantidade de alimento ofertada foi ajustada semanalmente para atender as exigências nutricionais, levando em consideração a produção de leite e a massa corporal das cabras em lactação. O consumo da primeira semana foi calculado estimando a produção de leite das lactações anteriores e a massa corporal no momento do parto. Maiores detalhes relacionados à dieta dos animais podem ser encontrados em LIMA (2013).

Foram utilizados tubos *vacutainer* contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 8%, onde foram coletados 10 mL de sangue periférico da veia jugular dos animais. Após a coleta os tubos contendo sangue foram armazenados em isopor com gelo e posteriormente transferidos para freezer a -20°C.

Dez destes animais foram abatidos, seguindo procedimentos de abate humanitário, em diferentes dias pós-parto. Um animal foi abatido no dia do parto e, a partir da primeira semana de lactação, três animais foram abatidos a cada 14 dias pós-parto (7, 21, 35 dias pós-parto).

O abate foi realizado por meio de atordoamento através de concussão cerebral seguido de sangria através da secção das veias jugular e carótida. Imediatamente após o abate, amostras de fígado foram coletadas e devidamente acondicionadas em tubos de 1,5 mL contendo *RNA-holder* (Bioagency laboratórios, SP-Brasil) e colocadas em isopor com gelo. Logo após a coleta as amostras foram transferidas para geladeira a 4°C por 24 hrs e posteriormente armazenadas a -20°C até o período das análises laboratoriais.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 300 µL de sangue total utilizando o protocolo “*Salting Out*” descrito por MILLER et al. (1988) acrescentando-se uma limpeza com clorofórmio após precipitação proteica com NaCl. Posteriormente o DNA foi resuspendido em cerca de 50 µL de água ultrapura e quantificado em gel poliacrilamida a 5% com o auxílio de padrão Lambda DNA (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA). As amostras de DNA foram então diluídas a uma concentração de uso de aproximadamente 100 ng/µL.

3.4 Desenho de *primers*

A sequência de nucleotídeos do gene *UCP2* em caprino não está disponível no *GenBank* (BENSON et al., 2005), dessa forma, com a utilização do programa *Web Primer* (CHERRY et al., 2012), foram desenhados quatro pares de *primers* a partir da sequência do gene *UCP2* bovino (*Gene ID*: 281562). A localização dos fragmentos no gene, sequências e temperaturas de anelamento dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos *primers* para PCR convencional.

<i>Primer</i> - de 5' para 3'	Tamanho do amplicon	Temperatura de Anelamento	Localização
UCP2- PR (F)- CGGAGTAGCGGGAGGAGGG (R)- TTGGCGGTGACAGGCCAC	684Pb	62°C	Promotor (-) 523 – 146
UCP2-1 (F)- TATCGTCTGCGCTCCGTG (R)- GGGGGCATCAGGATGGTT	514 Pb	64°C	Éxon 1 1 – 514
UCP2- 2 (F)- GGAGCTTTGAGCTGCTTGATG (R)- CACAGGGCTGAGGCAGTAGAA	676 Pb	64°C	Éxon 2 409 – 1076
UCP2- 3 (F)- GGGGGGTGATGCTATCAGAGA (R)- TGCCATCCCTGTGCTCTAAAA	437 Pb	65°C	Éxon 3 3283 – 3717

Nos fragmentos estão inseridas importantes regiões de regulação da expressão de mRNA como a região promotora (UCP2-PR), transcritas porém não traduzidas (UTR, do inglês: *Untranslated Region*), éxons 1 (UCP2-1) e 2 (UCP2-2), e de início de transcrição, éxon 3 (UCP2-3).

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese

Para a amplificação dos fragmentos de interesse foi utilizado o *GoTaq Colorless Master Mix Kit* (*Promega, Madison, WI, USA*) e as reações foram conduzidas em termociclador (*Biotraza, LongGene®, Modelo MG96+*) consistindo de um passo inicial a 94°C por cinco minutos para que ocorresse a desnaturação do DNA genômico, seguido por 35 ciclos que se repetiam da seguinte maneira: 94°C por 30 segundos para a abertura da fita molde de DNA, 62°C a 65°C, dependendo do *primer* (Tabela 1), por 35 segundos, para que seja efetuada a ligação dos *primers* e 72°C por 50 segundos para a extensão do fragmento. A finalização da reação de PCR se deu por um passo a temperatura de 72°C durante 5 minutos.

Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% para confirmação da amplificação e 12% (24h a 300v) para analisar a existência de pequenas diferenças de tamanho entre os produtos de PCR referente às diferentes amostras.

3.6 PCR-RFLP

Para as reações de PCR associada com a avaliação de polimorfismo nos fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP, do inglês: PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a endonuclease *HaeIII* (*Promega, Madison, WI, USA*) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente o produto da digestão foi avaliado em gel de poliacrilamida 8% (170V por 8hrs).

3.7 Sequenciamento

Três fragmentos de PCR (UCP2-1, UCP2-2 e UCP2-3), obtidos de três amostras de DNA de diferentes animais selecionados aleatoriamente foram enviados para sequenciamento de acordo com a técnica de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977) na empresa (*Macrogen INC, Seul Korea*). Os eletroferogramas gerados foram editados com o uso do programa *DNA Baser*. As seqüências editadas foram comparadas entre si utilizando os programas *DNA Baser* e *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1997).

As variações observadas entre as seqüências geradas foram avaliadas quanto a possibilidade de utilização de enzimas de restrição para diferenciá-las. Esta análise foi realizada com o auxílio do programa *Restriction Mapper*, disponível em (www.restrictionmapper.org).

3.8 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de amostras de aproximadamente 100mg de tecido hepático de 10 animais que atingiram até a quinta semana de lactação, com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*), seguindo as recomendações do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido e armazenado em água ultrapura tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC) (*Promega, Madison, WI, USA*) a 0.1%. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio (*Promega, Madison, WI, USA*).

Para degradar contaminantes de DNA das amostras, cerca de 3 µg de RNA foram tratadas com três unidades da enzima DNase (*Promega, Madison, WI, USA*) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi então quantificado através do fluorômetro Qubit® 1.0 (Life Technologies). Após tratamento com a enzima RNase, a integridade do RNA foi avaliada através de gel de agarose a 0.5%, corado com Brometo de Etídio (*Promega, Madison, WI, USA*) e observado em luz UV em fotodocumentador L-PIX EX (*Loccus Biotecnologia*).

3.9 PCR quantitativo (PCR em tempo real)

A confecção do cDNA foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix* (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e RNase free foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)₂₀) e 1 µL de tampão de anelamento (*Annealing buffer*). As reações foram incubadas por 5 minutos a 65°C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50

minutos a 50°C para a síntese do cDNA. A reação foi então incubada por 5 minutos a 85°C e imediatamente colocada sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente *SYBR GREEN* (*SYBR® GREEN PCR Master Mix Applied Biosystems, USA*). As reações foram realizadas em aparelho Bio-Rad iQTM5, todas submetidas às mesmas condições de análise, em volume de 25µL e em duplicatas.

Na avaliação da expressão do gene *UCP2*, o gene *ACTB* foi utilizado como gene de referência. O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de quantificação relativa. Tanto os *primers* do gene alvo como os do controle endógeno foram desenhados com base na sequência de Bovino (*GeneID*: 281562) disponível no *GenBank* (BENSON et al., 2005) com o auxílio dos programas *Web Primer* (CHERRY et al., 2012) e *Primer-Blast* (YE et al., 2012). Suas sequências estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados na análise de PCR em tempo real correspondentes aos seus respectivos genes.

<i>Primers</i> - 5' para 3'	Fragmento	Temperatura de anelamento
<i>ACTB</i>		
(F)- ACCCAGATCATGTTTGAGACC	95Pb	60°C
(R)- TCCCCAGAGTCCATCACG		
<i>UCP2</i>		
(F)- GAAAACCAAAGGGACCAAGCC	152Pb	60°C
(R)- GCAACAAGACGAGACAGAGGA		

3.10 Estimativa do valor genético dos animais

O valor genético utilizado para 40 animais foi estimado por MELO (2012) a partir de dados de produção e composição do leite de 639 cabras pertencentes ao rebanho do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV/ MG).

3.11 Análise estatística

3.11.1 Associação do genótipo com o valor genético

Para verificar o contraste dos genótipos para os valores genéticos das características relacionadas com a produção de gordura no leite, foram realizadas análises de variância e estimação de contrastes, pelo procedimento GLM do SAS[®](2002), sendo considerado apenas os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características avaliadas de acordo com o seguinte modelo:

$$\text{Modelo: } Y_{ij} = \mu + G_j + e_{ij}$$

Em que Y_{ij} é o valor genético do animal i para cada característica avaliada (produção e porcentagem de gordura no leite); μ média geral; G_j é o efeito do genótipo j dos polimorfismos; e_{ij} é o efeito aleatório do resíduo.

Para análise de associação dos genótipos com o valor genético foram utilizadas as informações dos genótipos de 40 cabras para o fragmento UCP2-PR, sendo 19 AA, 13 AB e 8 BB; e 40 cabras para o fragmento UCP2-2, sendo 10 CC, 18 NC e 12 NN.

3.11.2 Expressão UCP2

Para analisar se a expressão de mRNA (Unidades Arbitrarias) variou com os dias pós-parto foi utilizada análise de regressão linear, seguindo o modelo:

$$\text{Modelo: } Y = \alpha + X \beta$$

Posteriormente foi realizado teste de médias (Teste de Tukey a 5% de probabilidade) para avaliar entre quais períodos ocorrem as maiores diferenças.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos fragmentos por PCR convencional

Com a utilização de *primers* heterólogos foi possível amplificar os quatro fragmentos (UCP2-PR, UCP2-1, UCP2-2, UCP2-3) a partir do DNA genômico de caprinos. Todos os fragmentos apresentam o tamanho equivalente ao esperado para a mesma região gênica de bovino disponível no *GenBank* (BENSON et al., 2005) (*Gene ID*: 281562), UCP2-PR e UCP2-2 com aproximadamente 600 pb, UCP2-1 com aproximadamente 500 pb e UCP2-3 com aproximadamente 400 pb (Figura 1).

Conforme revisado por MADDIX & COCKETT (2007) a alta similaridade entre os genomas de bovinos e caprinos, os quais compartilham de 96 a 97% de similaridade entre as regiões codificantes do genoma, permite a utilização de alguns microssatélites e microarranjos de DNA de bovinos para estudos em caprinos. Estes autores também sugerem que o cDNA de bovinos pode ser uma ferramenta viável a ser utilizada em estudos com caprinos.

Essa similaridade entre os genomas permitiu a utilização da sequência de bovino para amplificação de fragmentos de DNA por PCR em caprinos, mesmo para regiões não codificantes, como as regiões promotora e de íntrons utilizadas neste estudo.

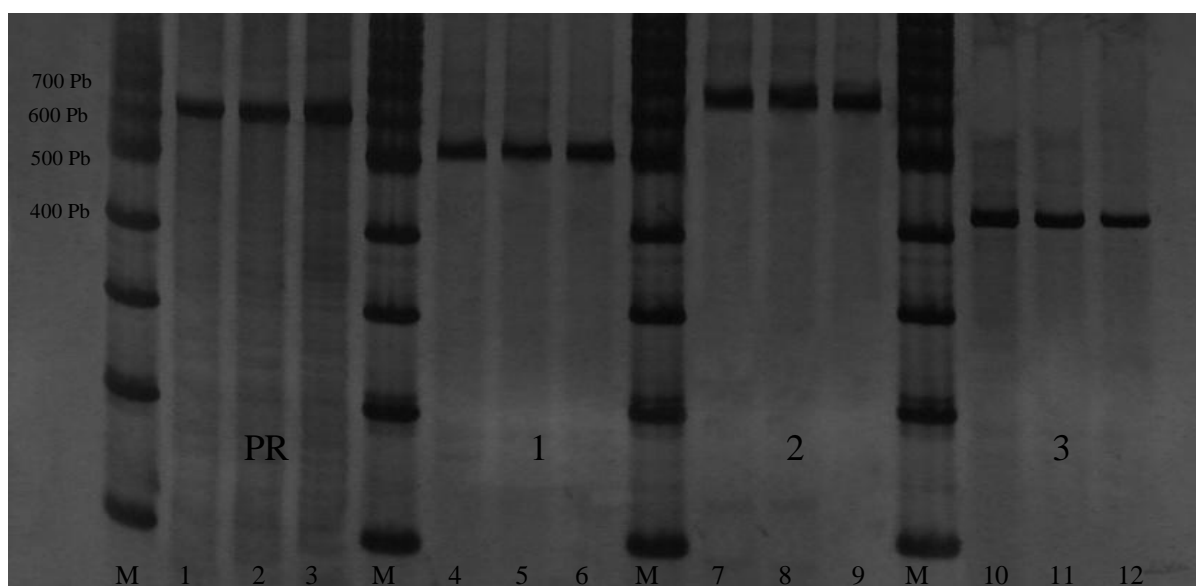


Figura 1. Fragmentos amplificados. Gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata. Pares de base (pb) Marcador de peso molecular (100 pb, Ludwig Biotec LTDA) (M).² Canaletas de 1 a 3= fragmentos de aproximadamente 600 pb amplificados pelo par de primers UCP2-PR. Canaletas de 4 a 6 = fragmentos de aproximadamente 500 pb amplificados pelo par de primers UCP2-1. Canaletas de 7 a 9 = fragmentos de aproximadamente 600 pb amplificados pelo par de primers UCP2-2. Canaletas de 10 a 12= fragmento de aproximadamente 400 pb amplificados pelo par de primers UCP2-3.³ 0.32, respectivamente. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg esta população se apresentou em equilíbrio sugerindo que não há nenhuma força de seleção atuando sobre este polimorfismo. Este fragmento de PCR abrange grande parte da região promotora do gene UCP2. De acordo com ALBERTS et al. (2004), esta região, em alguns casos, pode apresentar sítios de ligação para proteínas reguladoras que também se ligam no complexo de transcrição, contribuindo para a regulação da expressão gênica.

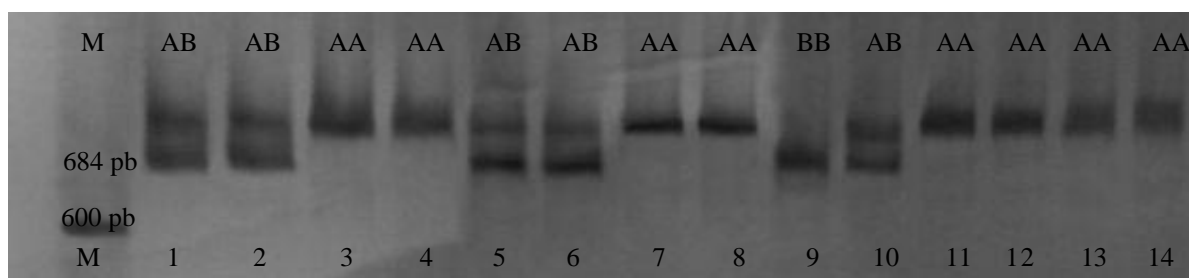


Figura 2. Alelos A e B do fragmento UCP2-PR. Gel de poliacrilamida a 12% corado com nitrato de prata. Pares de base (pb) Marcador de peso molecular (100 Pb, Ludwig Biotec LTDA) (M). Banda alta correspondente ao alelo A; banda baixa correspondente ao alelo B. Canaletas 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 14 = animais homocigotos (AA). Canaleta 9 = animal homocigoto (BB). Canaletas 1, 2, 5, 6, 10 = animais heterocigotos (AB).

Como já foi observado em outros estudos, polimorfismos no gene *UCP2* podem influenciar o fenótipo do animal em bovinos (FERRAZ et al. 2009; SHERMAN et al. 2008). Em vacas leiteiras, por exemplo, um SNP na região promotora apresentou influência sobre a idade ao primeiro parto e sobre o peso destes animais (CLEMPSON et al., 2011), porém não houve análise de associação deste polimorfismo com características relacionadas diretamente com a produção e qualidade do leite. Já em humanos uma transição G/A na região promotora está associada com um aumento no risco do indivíduo desenvolver obesidade (ESTERBAUER et al., 2001).

Com os 40 animais genotipados foi realizada uma análise de associação entre os genótipos para o fragmento UCP2-PR (AA, AB, BB) e a estimativa dos valores genéticos para as características: Produção de Gordura (Kg) e Porcentagem de Gordura no leite. Porém, os testes não mostraram nenhuma associação entre os genótipos e as estimativas de valor genético para as características analisadas, sendo a maior diferença encontrada para a o valor genético do animal para a produção de gordura entre os genótipos AA e AB (Tabela 3).

Tabela 3. Associação dos efeitos dos genótipos do fragmento UCP2-PR (AA, AB, BB) com a estimativa dos valores genéticos para as características porcentagem de gordura e produção de gordura no leite de caprinos.

Característica	AA-BB ⁽¹⁾	(p-value)	AA-AB ⁽¹⁾	(p-value)	AB-BB ⁽¹⁾	(p-value)
Produção de Gord.(Kg)	-0,25	0,64	-0,45	0,30	0,20	0,72
Porcentagem de Gord (%)	1,38 ⁻⁰⁴	0,77	1,22 ⁻⁰⁴	0,75	0,16 ⁻⁰⁴	0,97

⁽¹⁾Valores expressos como medias dos valores genéticos.

Tendo em vista a localização do polimorfismo encontrado e o papel da UCP2 no metabolismo, regulando a quantidade de ROS (DIANO & HORVATH, 2011), moléculas citotóxicas que afetam no funcionamento e desgaste de órgãos e do organismo (HARMAN, 1956), é possível que os genótipos encontrados apresentem associação com outras características economicamente importantes, como teor de proteína, produção de leite e a duração da lactação. Uma vez que, ambas as características são afetadas pela quantidade de células secretoras da glândula mamária, as quais apresentam uma alta taxa de apoptose após o pico de lactação (CAPUCO, 2001). Assim é possível que esta taxa de apoptose sofra

influência da concentração de ROS, logo os genótipos encontrados para a UCP2 podem afetar tais características regulando a concentração de tais moléculas.

4.2 PCR-RFLP

Para os fragmentos UCP2-PR, UCP2-1 e UCP2-3, houve corte pela enzima *HaeIII*, porém, nenhuma diferença no padrão de corte foi encontrada entre as amostras. Já para o fragmento UCP2-2, as amostras apresentaram padrões de corte diferentes, evidenciando um polimorfismo que origina dois alelos C (“corte”) e N (“não corte”).

De acordo com a digestão virtual da sequência do alvo pelo programa *Webcutter 2.0* a enzima *HaeIII* corta o fragmento UCP2-2 em 6 sítios de restrição resultando em sete fragmentos diferentes (figura 3A). A diferença encontrada consiste em um sétimo sítio de corte da enzima (figura 3B) no fragmento de 169 pb gerando desta forma outros dois fragmentos menores, um de aproximadamente 120 pb e outro com aproximadamente 49 pb.

O éxon 2 ocupa grande parte da região central da banda de 169 pb que é cortada pela enzima (Figura 3B). Observando o tamanho das bandas resultantes do corte, um fragmento de aproximadamente 49 pb e outro de aproximadamente 120 pb, é possível deduzir que este polimorfismo ocorre dentro do éxon 2. Análises de sequenciamento irão detalhar com maior exatidão a posição deste polimorfismo.

Na figura 4 pode ser observado o padrão de corte da enzima no gel. As bandas menores que 50 pb não aparecem, dessa forma, nos animais homozigotos NN aparecem três bandas (318, 169 e 61 pb). No caso de um homozigotos CC, a banda de 169 pares de base “desaparece” (é cortada), originando duas outras bandas, uma de aproximadamente 120 pb e outra de aproximadamente 49 pb, são visualizadas assim 4 bandas no gel (318, 120, 61 e 49 pb). Os animais NC apresentam tanto os fragmento resultantes do corte como a banda de 169 pb íntegra, e no gel aparecem cinco bandas (318, 169, 120, 61, 49 pb).

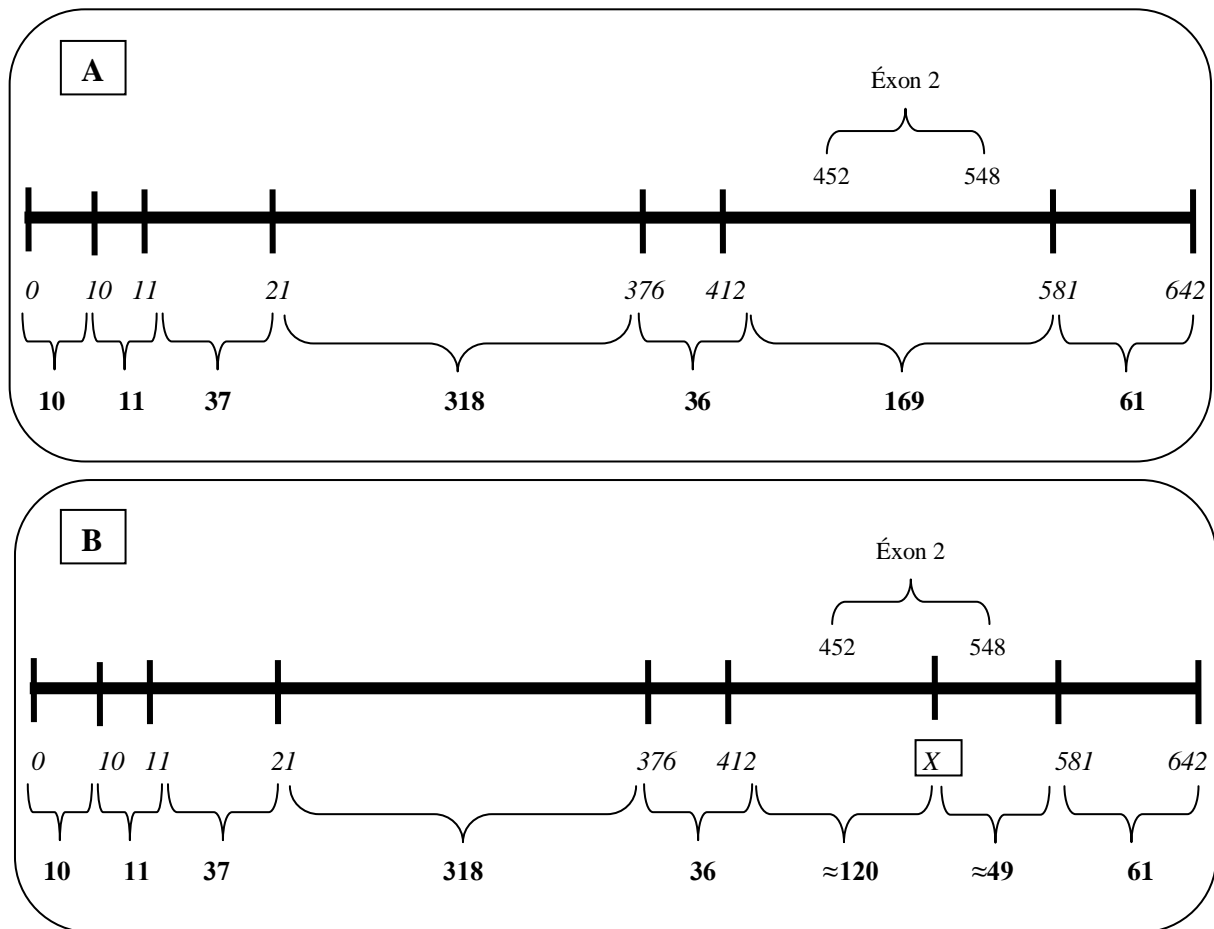


Figura 3. Desenho esquemático do padrão de corte da enzima *HaeIII* para os alelos N e C do fragmento UCP2-2. Em **negrito** esta o tamanho dos fragmentos, e em **itálico** a posição destes fragmentos na sequência do fragmento UCP2-2. Em **(A)** o padrão para os animais homocigotos para o “não corte” da enzima (**NN**) mostrando os seis cortes. Em **(B)** o padrão para os homocigotos para o “corte” da enzima (**CC**), o fragmento que era de 169 pb é novamente cortado dando origem a dois fragmentos de aproximadamente 120 e 49 pb. A letra X mostra a sétima região de corte da enzima.

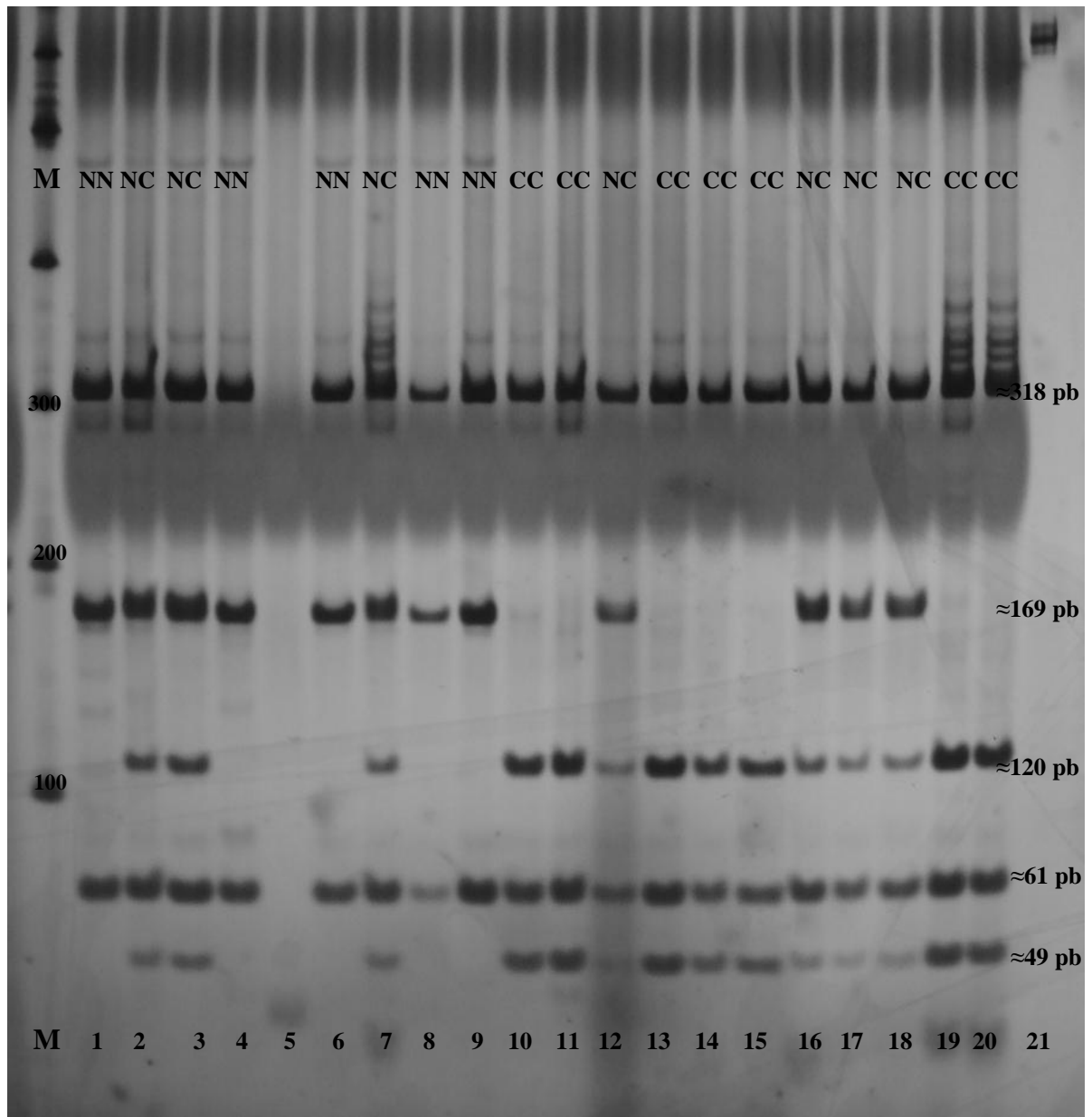


Figura 4. Alelos N e C do fragmento UCP2-2. Gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata. pares de base (**pb**), Marcador de peso molecular (**M**) (100 pb, Ludwig Biotec LTDA). Digestão do fragmento UCP2-2 com a enzima *HaeIII*. Canaletas 10, 11, 13, 14, 15, 19 e 20 = animais homozigotos (**CC**). Canaletas 1, 4, 6, 8, 9 = homozigotos (**NN**). Canaletas 2, 3, 7, 12, 16, 17, 18= animais heterozigotos (**NC**). Canaleta 21 = fragmento não submetido à digestão com a enzima *HaeIII*.

Após genotipados os 40 animais os alelos C e N apresentaram frequências de 0.48 e 0.52 respectivamente. O genótipo NC teve frequência igual a 0.45, o genótipo NN de 0.30 e o CC de 0.25. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a população também se apresentou em equilíbrio para este polimorfismo sugerindo que não há força de seleção atuando sobre esta mutação.

O éxon 2 é uma região de UTR (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000), e esta tem um papel importante na regulação da transcrição gênica podendo ter efeito sobre o fenótipo do animal (ALBERTS et al., 2004), além disso, SHERMAN et al. (2008), analisando um SNP T/G no éxon 2 do gene UCP2 de bovinos de corte encontraram associação deste com algumas características de produção, como conversão alimentar e produção de carne magra, porém, não avaliaram a associação deste com nenhuma das características relativas à qualidade do leite. Dessa forma, foi avaliado se os alelos descobertos estavam associados com o valor genético para produção de gordura (Kg) e porcentagem de gordura no leite. O resultado dos testes não revelaram nenhuma influência do genótipo sobre o valor genético para estas características (Tabela 4), sendo o menor *P-valor* encontrado de 0,15, referente ao contraste entre os genótipos CC e NC para o valor genético da característica produção de gordura. Futuras análises podem indicar se este polimorfismo tem influência sobre outras características de qualidade do leite como produção de leite e produção de porcentagem de proteína no leite.

Tabela 4. Associação dos efeitos dos genótipos do fragmento UCP2-2 (CC, NC, NN) com a estimativa dos valores genéticos para as características porcentagem de gordura e produção de gordura no leite de caprinos.

Característica	CC-NN ⁽¹⁾	(<i>p-value</i>)	CC-NC ⁽¹⁾	(<i>p-value</i>)	NC-NN ⁽¹⁾	(<i>p-value</i>)
Produção de Gord.(Kg)	0,1317	0.79	0,6614	0.15	-0,5297	0.22
Porcentagem de Gord.	-1,98E-04	0.65	2,66E-04	0.51	-4,64E-04	0.22

⁽¹⁾Valores expressos como medias dos valores genéticos.

4.3 Sequenciamento

Como a sequência do gene *UCP2* para caprinos não estava disponível no *GenBank* (BENSON et al., 2005), os fragmentos amplificados por PCR provenientes de três amostras diferentes foram sequenciados e a sequência de nucleotídeos dos fragmentos UCP2-1, UCP2-2 e UCP2-3 foram obtidas para posterior depósito no *GenBank* (BENSON et al., 2005). Estas foram editadas e comparadas com a sequência de bovino, e assim a identidade das mesmas como o fragmento de interesse foi confirmada.

Em comparação com o gene em bovinos todos os fragmentos sequenciados tiveram mais de 90% de identidade, mostrando que esse gene é bastante similar nessas espécies. A região correspondente e a identidade dos fragmentos do gene da *UCP2* de caprinos, em comparação com a sequência *UCP2* de bovinos pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene *UCP2* de caprino com o gene em bovino (*Gene ID*: 281562) através do programa *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1997).

Primer	Identidade com Bovino	Alinhamento (Bovino/Caprino) (3' – 5') (pb)
UCP2-1 + UCP2-2	94%	1/59 – 1062/1112
UCP2-3	96%	3282/1 – 3717/436

Uma vez que os éxons um e dois estão próximos um do outro, os *primers* UCP2-1 e UCP2-2 foram desenhados de maneira sobreposta, assim, após o sequenciamento, foi possível realizar a união das duas sequências em uma só (UCP2-1 + UCP2-2), a qual foi então comparada com sequência de bovino (*Gene ID*: 281562). A partir dessa comparação, a sequência de caprino apresentou além de substituições, uma pequena quantidade de deleções e inserções (Figura 5).

Por estar mais distante dos fragmentos UCP2-1 e UCP2-2, o par de *primers* do UCP2-3 não foi desenhado de forma sobreposta com os destes dois fragmentos, assim, após o sequenciamento, não foi possível a junção desta sequência com a sequência UCP2-1+UCP2-2, dessa forma, esta foi analisada separadamente. Em relação à sequência de bovino (*Gene ID*: 281562) o fragmento UCP2-3 não apresentou deleções, apenas uma pequena quantidade de substituições (Figura 6).

Em resposta à comparação caprino/bovino, a sequência do fragmento UCP2-1+UCP2-2 apresentou uma maior variação do que a do fragmento do que a do fragmento UCP2-3. Isto pode ser explicado pelo fato de que os dois primeiros éxons representam uma região de UTR (RICQUIER & BOUILLAUD 2000). Regiões de UTR são transcritas, porém não são traduzidas. Elas não codificam a sequência de aminoácidos da proteína em si, tendo papel maior na regulação destas, assim são menos conservadas do que regiões codificantes do gene (ALBERTS et al., 2004). Aparentemente por este motivo que a sequência do fragmento UCP2-3 pode ser mais semelhante entre caprinos e bovinos.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1628 bits (881)	0.0	1009/1068 (94%)	20/1068 (1%)	Plus/Plus
Bovin 1	<u>TATCGTCTGCGCTCCGTGGACGCGCCCTCCGTCCGCCGACCGACAGAAGTGCCTATACCC</u>			60
Capri 59	TATTGTTTGGCGCTCCGTGGACGCGCCCTCCACTGCCGACCGACAGAAGTGCCTGTACCC			118
Bovin 61	GCCTGTTCTCCTTGCAGCCGGTGAGCCAGGCCCGGCCGCCCCAGCCCGGCACCTCA			120
Capri 119	<u>GCTTGTCTCCTTGCAGCCGGTGAGCCCGGCCGCCCCAGCCCGGCACCTCA</u>			178
Bovin 121	ACACCTGCCCTCCTCCCGCTACTCCGGCCGAGGGGACCCACGCGCCGCCTTAATTTCCC			180
Capri 179	ACACCTGCCCTCCTCCCGCTACTCCGGCCGAGGGGACCCACGCGCCACTTAATTTCCC			238
Bovin 181	TCCTCGCTCCACCGTATTTTGTATTTTACCGTTTGTCTtttttttttttttaatctc			240
Capri 239	TCCTCACCTCCAGCCTATTTTGTATTTTACCGTTTGTCT---TTTTTTTTTAACTC			294
Bovin 241	tcttcttcaactcttttgcgttttgcctttgtcttcttactctcGCGCTCAAAGGCTG			300
Capri 295	TCTTCCTTCACTCTTTTCTGTTTTGCCTTTGTCTTTACCTGTGCGCTCAAAGGCTG			354
Bovin 301	TAATATAAGCCCTCCTCTGCCAGGGTGGGGGCTTCAGCGATGATCAGAAGGACCTC			360
Capri 355	TAATATAAGCCCTCCTCTGCCAGGGTGGGGGCTTCAGCGATGATC-----ACCTC			408
Bovin 361	TCCCATTCCAGCGGCTACAGGCCCTCCTAGGGCTCTTCTGCTGGCAGGAGCTTTGAGC			420
Capri 409	TCCCATTCCAGCGGCTACAGGCCCTCCTAGGGCTCTTCTGCTGGGAGGAGCTTTGAAC			468
Bovin 421	TGCTTGATGCGGCCCTCCGCTGGGCCATTC AACCTCTCTAACCTCCTCAAGCCCTGCTC			480
Capri 469	TGCTTGATGCGGCCCTCCACTGGGCCATTC AACCTCTCTAACCTC---AGCCCTGCTC			524
Bovin 481	TGGGCCCTAGTCTCTGAACCATCTGATG---ccccccACCTCACTTCCAGCACCCCC			536
Capri 525	TGGGCCCTAGTCTCTGAACCATCTGATGCCCCCCCCCACCTCACTTCCAGCACCCCC			584
Bovin 537	ACTCACCAGAGTC-GCTGTGTTGTGGGATGCTTCCCAGAGTACTGAATTACACTAAAGC			595
Capri 585	ACTCACCAGAGTCTGCTGTGTTGTGGGATGCTTCCCAGAGTACTGAATTACACTAAAGC			644
Bovin 596	AGAAATCTGAAAGAGCAATGTGTGATACTAAGAGATCAGACCGGGGAAAGAGGACTTCTG			655
Capri 645	AGAAATCTGAAAGAGCAGCGTGTGATACTAAGAGGTCAGACCTGGGAGAGAGGACTTCTG			704
Bovin 656	GGCTCATCCCTTCCCTCCCATGTGTCTGTCCCTCCTTCACTGTGTGGACTTAA-TAGCC			714
Capri 705	GGTTCACCCCTCCTCCGCTGTGTCTGTCCCTCCTTCACTGTGTGGACTTAAATAGCC			764
Bovin 715	CCCAGCTGCCTGTGGGAAATGGACCCTGTTCCCTACCTCACATCCCCAGGCAAGGACT			774
Capri 765	CCCAGCTGCCTGTGGGAAATGGACCCTGTTCCCTACCTCACATCCCCAGGCAAGGACT			824
Bovin 775	GAATACGCTAATGTGCCTTGGGCCTTTCCCTTTTGTGTTGGTGTAGTCTTTAAGGCC			834
Capri 825	GAATACGCTAATGTGCCTTGGGCCTTTCCCTTTTGTGTTGGTGTAGTCTTTAAGGCC			884
Bovin 835	CATTCCCCTTCTAAACTCTCCTTTGCTCTACAGG ACACATAGTATGACCATTAGAT			894
Capri 885	CATTCCCCTTCTAAACTCTCCTTTGCTCTACAGG ACACATAGTATGACCATTAGAT			944
Bovin 895	ATTTCGTCTACCAACCATTTTCCATGGAAAACCAAGGGACCAGGCCATGATAGCCACTG			954
Capri 945	ATTTCGTCTACCAACCATTTTCTATGGAAAACCAAGGGACCAAGCCATGATAGCCACTG			1004
Bovin 955	GCAGCTTTGAAGAACGGGACATCTTTAGAGAAGCTTGACCTTGAAGACCTCAGCGTGGGA			1014
Capri 1005	GCAGCTTTGAAGAACGGGACATCTTTAGAGAAGCTTGACCTTGAAGGCTCAGCGTGGGA			1064
Bovin 1015	CCTAACACAGCCGGTAAGAGTCCAGTCTAAAGGAGGAGTATTCTACT 1062			
Capri 1065	CCTAACAAAGCCGGTAAGAGTCCAGTCTAAAGGAGGAGTCTTCTACT 1112			

Figura 5. Alinhamento das sequências dos fragmentos UCP2-1 e UCP2-2 caprino e bovino (GENE ID: 281562), através do programa *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1997). **Bovino** (Bovin) e **Caprino** (Capri). A sequência de caprino é resultante da junção das sequências dos fragmentos UCP2-1 e UCP2-2 (UCP2-1+UCP2-2). **Éxon 1** (sublinhado) e **Éxon 2** (negrito).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
717 bits (388)	0.0	420/436 (96%)	0/436 (0%)	Plus/Plus
Bovin 3282	AGGGGGGTGATGCTATCAGAGAAGGTAGGGGTGGGATAGTAAGAGAAGTTCGGAGGTTTC	3341		
Capri 1	AGGGGGGTGATGCTATCAGAGAAGGTAGGGGCGGGATAGTAAGAGAAGTTCGAAGGTTT	60		
Bovin 3342	GGCTGCTGATGGACCTTATCTCTCCTTGGCTTAGTCTCCGGCAGAGTTCCTCTGTCTCGT	3401		
Capri 61	GGCTGCTGATGGACCTTATCTCTCCTTGGCTTAGTCTCCGGCAGAGTTCCTCTGTCTCGT	120		
Bovin 3402	CTTGTGCTGACAGAAGGTGCCCCCTTCTCCAGTTTTTGTTCATCTCCTGGGAGGTTGCA	3461		
Capri 121	CTTGTGCTGACAGAAGGTGCCCCCTTCTCCAGTTTTTGTTCATCTCCTGGGAGGTTGCA	180		
Bovin 3462	<u>GGAAATCGTCATTATGGTTGGGTTCAAGGCCACAGATGTGCCCCCTACAGCCACTGTGAAG</u>	3521		
Capri 181	<u>GGAAATCGTCATTATGGTTGGGTTCAAGGCCACAGATGTGCCCCCTACAGCCACTGTGAAG</u>	240		
Bovin 3522	<u>TTCTTGGGGCAGGCACAGCTGCCTGCATTGCGGACCTCATCACCTTTCCCTGGATACT</u>	3581		
Capri 241	<u>TTCTTGGGGCAGGCACAGCTGCCTGCATTGCTGACCTCATCACCTTTCCCTGGATACT</u>	300		
Bovin 3582	GCTAAAGTCCGGCTACAGGTGAGTGAATGAAGCCTGCATTTCTGAGCGTAGCTAGTCCAC	3641		
Capri 301	GCTAAAGTCCGGCTACAGGTGAGTGGATGAAGCCTGCATTTCTGAGGGTGGCTAGTCCGC	360		
Bovin 3642	TCCCTCCCCAGGACACAGACTCTTCAAGGGCCAGTGGGGTTTTGGGGACCATAAAATTTTA	3701		
Capri 361	TCCCTCCCCGAGACACAACTCCTCAAGGGCCAGTGGGGTTTTGGGGACTGTAAGTTTTA	420		
Bovin 3702	GAGCACAGGGATGGCA	3717		
Capri 421	GAGCACAGGGATGGCA	436		

Figura 6. Alinhamento das sequências do fragmento UCP2-3 caprino e bovino (GENE ID: 281562), através do programa *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1997). **Bovino** (Bovin) e **Caprino** (Capri). **Éxon 3** (sublinhado).

A comparação das sequências geradas pelas diferentes amostras possibilitou observar a existência de uma transversão (C/G), caracterizando um polimorfismo do tipo SNP dentro do primeiro íntron do gene na posição que corresponde ao nucleotídeo 283 da sequência de bovino (Figura 7). Por intermédio do programa *restriction mapper* a região polimórfica foi avaliada quanto à existência de enzimas de restrição (endonucleases de restrição) que pudessem reconhecer este polimorfismo, porém nenhuma enzima foi encontrada, impossibilitando a sua identificação pela técnica de PCR-RFLP. Estudos futuros podem avaliar este polimorfismo quanto à influência em características fenotípicas economicamente importantes nesta espécie.

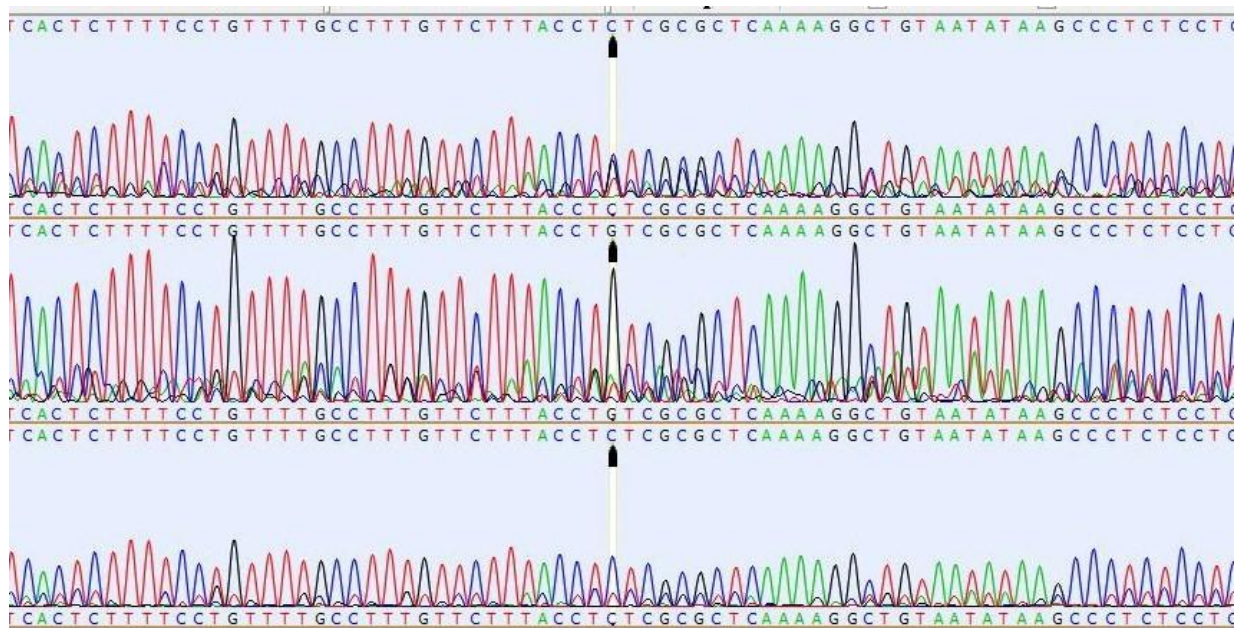


Figura 7. SNP localizado no éxon 1 no gene *UCP2* caprino. Eletroferograma mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al., 1977 do fragmento amplificado pelo par de *primers* correspondentes ao éxon 1. Cada base é representada por uma cor: A= Verde G= Preto C= Azul T=Vermelho. Cada gráfico corresponde uma amostra diferente. O SNP C-G encontrado sinalizado pela seta.

4.4 Análise de expressão

Como parâmetro de comparação para os resultados de expressão do gene da *UCP2*, o gene de referência, *ACTB*, mostrou expressão constante entre as amostras de tecido hepático e assim foi utilizado para normalizar a amplificação do gene-alvo.

O gráfico de curva de dissociação (*melting curve*) possibilita avaliar se as dissociações das duplas fitas de DNA ocorreram na mesma temperatura, ao se aumentar progressivamente a temperatura do bloco. Dessa forma é possível avaliar se a amplificação ocorreu de forma específica. Conforme pode ser observado na Figura 8, ocorreu apenas um pico, não apresentando amplificações inespecíficas ou formação de dímeros de *primer*.

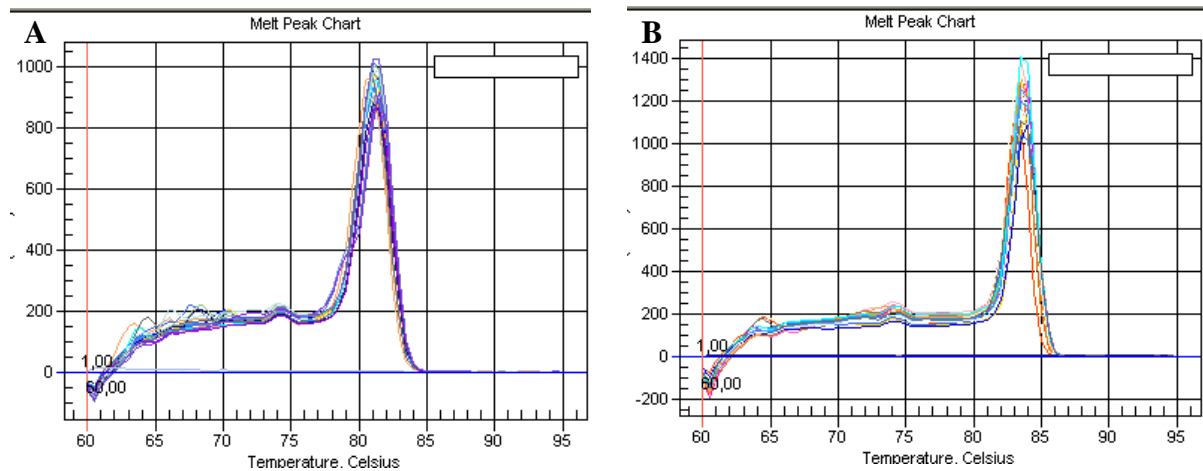


Figura 8. Curva de dissociação do produto de PCR em tempo real. *UCP2*(A) e *ACTB* (B).

Para alcançar o máximo de eficiência de amplificação da reação é necessário que a inclinação da reta da equação de regressão seja de -3,32 e o coeficiente de correlação seja de 1. Foi possível verificar através dos cálculos das equações de regressão, que houve boas condições de amplificação, com valor de inclinação para o gene *UCP2* de -3,38 e coeficiente de determinação de 0,99 (Figura 9).

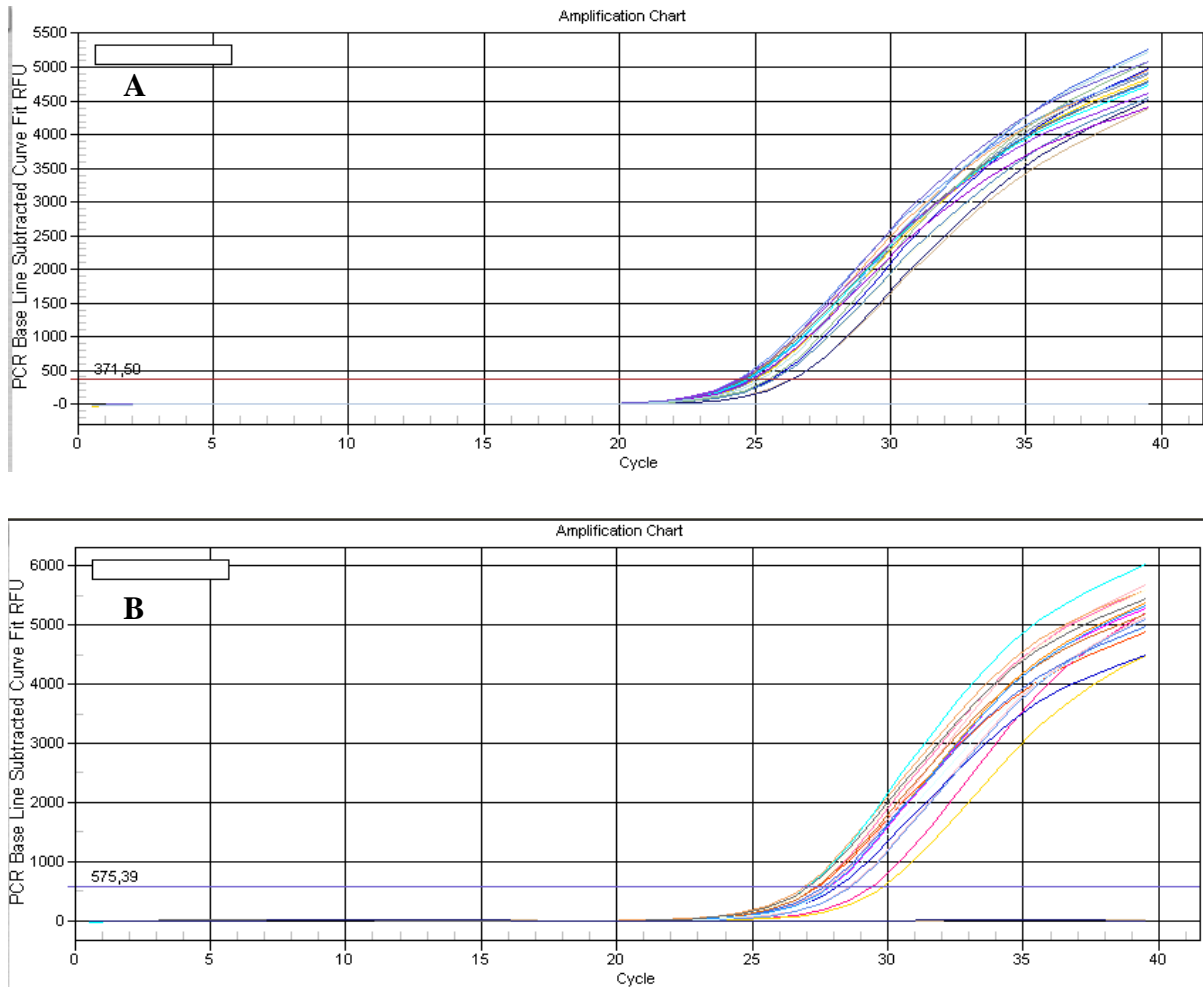


Figura 9. Teste de eficiência para a PCR em tempo real. *UCP2* (A) e *ACTB* (B).

Os dados de expressão do gene *UCP2* no fígado de fêmeas no dia do parto, e depois aos 7, 21 e 35 dias após o parto, apresentaram, conforme pode ser observado no gráfico da expressão gênica (Figura 10). Observa-se que a maior expressão ocorreu no dia do parto, diminuindo no decorrer da lactação de maneira significativa (Tabela 6). Conforme equação de regressão dada por $Y = 4,99 - 1,102X$ ($P < 0,05$) e R-quadrado (R^2) = 0,9122, houve efeito linear decrescente da expressão gênica em função dos dias pós-parto.

Apesar dos dados apontarem uma diminuição da expressão do gene *UCP2* no decorrer da lactação é interessante repetir a análise com um número maior de animais, uma vez que, para o tratamento dia do parto só foi possível analisar a expressão em um animal.

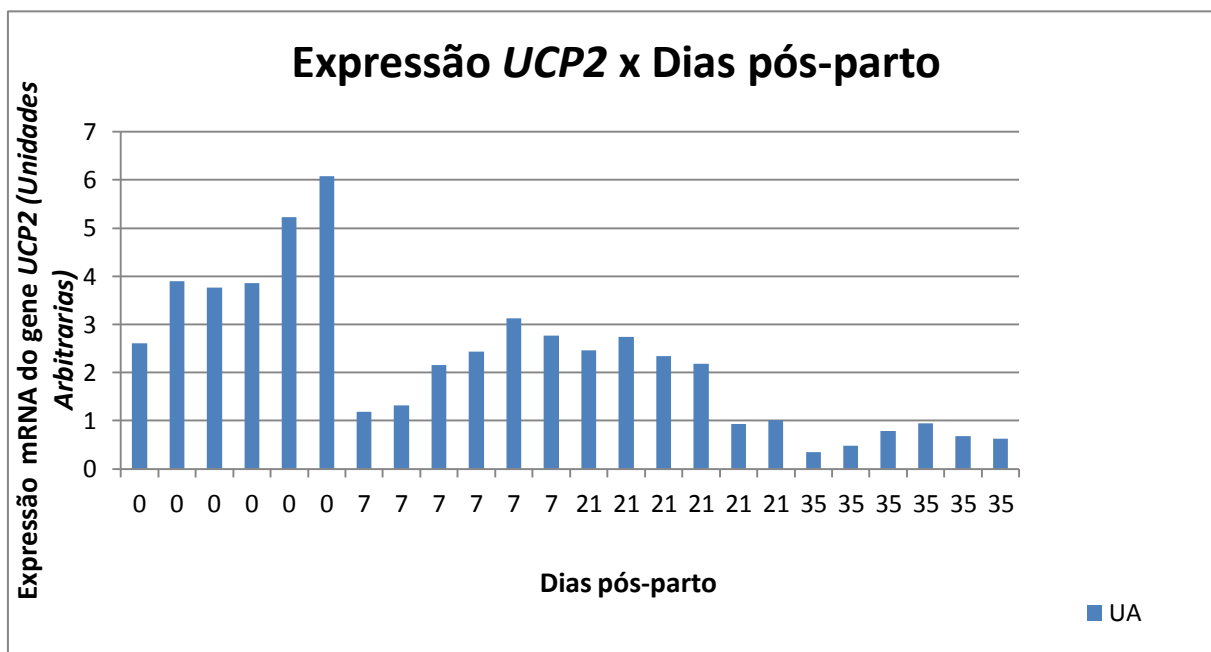


Figura 10. Expressão do Gene *UCP2* durante o período inicial da lactação. No gráfico pode se observada a expressão do gene *UCP2* em diferentes dias pós-parto e cabras em lactação. A expressão foi maior no dia do parto e posteriormente esta foi diminuindo gradativamente.

Tabela 6. Expressão do gene *UCP2* no decorrer do período de lactação até os 35 dias pós-parto em caprinos.

Data do abate (Dias pós-parto)	Médias e desvio padrão de expressão do gene <i>UCP2</i>
0	4,24 ± 1,23 ^a
7	2,16 ± 0,78 ^{ab}
21	1,94 ± 0,71 ^b
35	0,64 ± 0,21 ^b

Médias (± erro padrão) seguidas de letras diferentes indicam que houve diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Após o parto a demanda do animal por energia aumenta bastante e o consumo de alimento por si só já não é capaz de suprir a demanda do organismo por nutrientes, além disso, a ingestão de alimentos também diminui. Dessa forma o animal entra em BEN e começa a utilizar as suas reservas corporais (BAUMAN & CURRIE, 1980). A utilização de glicose pelas glândulas mamárias aumenta drasticamente devido ao início da produção de leite e a demanda de glicose pelo animal deve ser compensada pela gliconeogênese hepática (DRACKLEY et al., 2001). Juntamente com esse aumento na gliconeogênese a síntese de proteínas hepáticas também é aumentada (BELL, 1995).

Em comparação com o período que antecede o parto a taxa metabólica por grama de tecido hepático praticamente dobra, e em consequência disso, o fluxo sanguíneo deste órgão também, mostrando que a carga de trabalho aumenta rapidamente após o parto em decorrência do fato de que o consumo de alimento não acompanha a demanda energética para a produção de leite, assim o organismo do animal ativa os mecanismos compensatórios (DRACKLEY et al. 2001). Há relatos que em porcos um aumento no metabolismo hepático

esteja associado com uma maior produção de radicais livres (GUY et al., 1990). Essas substâncias nocivas às células estimulam a expressão e a atividade da UCP2 em outras células do organismo, como células β -pancreáticas (PI & COLLINS, 2010), neurônios (ANDREWS et al., 2008) e tecido adiposo (CHEVIOLLOTTE, 2007).

Dessa forma como o metabolismo do fígado é aumentado após o parto para suprir a demanda do animal por energia, a produção de ROS provavelmente é aumentada também, o que conseqüentemente leva a uma maior expressão do gene *UCP2* uma vez que a sua expressão aumenta juntamente com a produção de ROS. Conforme a lactação avança, o animal passa a consumir mais alimento e o seu déficit energético vai gradativamente diminuindo, assim a carga metabólica do fígado, que estava sobrecarregado diminui, e uma menor quantidade de radicais livres é produzida, o que leva a uma diminuição da expressão do gene *UCP2*.

No período médio da prenhez o tecido adiposo está em anabolismo e este é sintetizado, produzindo reservas para o animal (MCNAMARA & HILLERS, 1986). Em decorrência do parto uma série de mecanismos começa a atuar priorizando a produção de leite a custo das reservas corporais, com isso ocorre uma drástica diminuição nas concentrações sanguíneas de insulina e alguns mecanismos celulares atuam diminuindo a lipogênese (LOOR, 2010).

O tecido adiposo apresenta um quadro de resistência à insulina, dessa forma, a habilidade da insulina de promover a lipogênese é diminuída e a mobilização de ácidos graxos é facilitada. Essa resistência também ocorre em outros tecidos do animal, principalmente em tecidos periféricos, fazendo com que estes tecidos utilizem outras fontes de energia ao invés de glicose, como ácidos graxos (BELL, 1995). Somado a isso, a sensibilidade do tecido adiposo a estímulos lipolíticos também é aumentada (LOOR, 2010).

Em humanos, o quadro de resistência a insulina leva a uma lipólise contínua nos adipócitos liberando ácidos graxos na corrente sanguínea. Em ratos o aumento na concentração de AGNEs no fígado e no sangue, induzido pela alimentação, leva a uma disfunção mitocondrial seguida por uma produção aumentada de ROS e conseqüentemente do stress oxidativo no fígado (FEILLET-COUDRAY et al., 2009).

Ainda, a produção de ROS devido ao ambiente hiperlipidêmico contribui para a geração de um estado redox contínuo no fígado. Em ratos, apesar desse aumento nas concentrações de AGNEs levar a um aumento na expressão da *UCP2*, a capacidade de fosforilação oxidativa das mitocôndrias do fígado não é alterada (RAMIREZ et al., 2011).

Com isso é possível também que o aumento na expressão do gene *UCP2* neste experimento seja decorrente de uma maior concentração na AGNEs no fígado e na corrente sanguínea do animal. Conforme o animal sai do BEN, os níveis sanguíneos de ácidos graxos se normalizam e a demanda de nutrientes é suprida pela alimentação, a expressão da *UCP2* retorna a níveis normais.

5 CONCLUSÕES

Quanto aos polimorfismos encontrados no gene *UCP2*, estes não apresentam influência sobre o valor genético dos animais para as características de produção e porcentagem de gordura no leite.

A expressão de RNAm do gene *UCP2* no fígado é maior no dia do parto e diminuiu gradativamente com o avançar da lactação até os 35 dias pós-parto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B.; JOHNSON A.; WALTER P.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. **Molecular Biology of The Cell**. 4^a ed. Nova Iorque: Garland Sciences, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p.3389-3402, 1997.

ANDREWS Z. B.; LIU Z. W.; WALLINGFORD N.; ERION D. M.; BOROK E.; FRIEDMAN J. M.; TSCHÖP M. H.; SHANABROUGH M.; CLINE G.; SHULMAN G. I.; COPPOLA A.; GAO X. B.; HORVATH T. L.; DIANO S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 846 –851, 2008.

ANDREWS Z. B.; ERION D. M.; BEILER R.; CHOI C. S.; SHULMAN G. I.; HORVATH T. L. Uncoupling protein-2 decreases the lipogenic actions of ghrelin. **Endocrinology**, v. 151, n.5, p. 2078-86, 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**. Section VII, 2004. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search.htm>.

ARSENIJEVIC D.; ONUMA H.; PECQUEUR C.; RAIMBAULT S.; MANNING B. S.; MIROUX B.; COUPLAN E.; ALVES-GUERRA M.; GOUBERN M.; SURWIT R.; BOUILLAUD F.; RICHARD D.; COLLINS S.; RICQUIER D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. **Nature**. v. 26, n. 4, p. 435-439, 2000.

BAILE C. A.; MAYER J.; MAHONEY A. W.; McLAUGHLIN C. Hypothalamic Hyperphagia in Goats and Some Observations of Its Effect on Glucose Utilization Rate. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 1, p. 101 – 109, 1969.

BAUMAN D. E. & CURRIE B. W. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

BAUMAN, D. E. & ELLIOT J. M. Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In: T. B. Mepham (Ed.) **Biochemistry of Lactation**. p 437. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 1983 *Apud* BELL A. W.. Regulation of Organic Nutrient Metabolism During Transition from Late Pregnancy to Early Lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73 n. 9, p. 2804-2819, 1995.

BELL A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73 n. 9, p. 2804-2819, 1995.

BENNINK M.R.; MELLENBERGER R. W.; FROBISH R. A.; BAUMAN D. E. Glucose Oxidation and Entry Rate as Affected by the Initiation of Lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 55, p. 712, 1972.

BENSON D. A.; KARSCH-MIZRACHI I.; et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. D34-D38, 2005.

BERARDI M J, SHIH W M, HARRISON S C, CHOU J J. Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. **Nature**, v. 476, n. 7358, p. 109-114, 2011.

BOSCLAIR, Y. R.; BELL A. W.; DUNSHEA F. R.; HARKINS M.; BAUMAN D. E. Evaluation of the arteriovenous difference technique to simultaneously estimate protein synthesis and degradation in the hindlimb of fed and chronically underfed steers. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 6, p. 1076, 1993.

BOUCHARD C., PÉRUSSE L., CHAGNON Y. C., WARDEN C., RICQUIER D. Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. **Human Molecular Genetic**, v. 6, n. 11 p. 1887-9, 1997.

BOUILLAUD F. Mitochondrial uncoupling proteins. **Heart Metabolism**, v. 48, p. 32–34, 2010.

BRAND M. D. & ESTEVES T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 2, p.85 – 93, 2005.

BUSQUETS S.; SANCHÍS D.; ALVAREZ B.; RICQUIER D.; LÓPEZ-SORIANO F. J.; ARGILÉS J. M. In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis?. **FEBS Letters**, v. 440 n. 3 p. 348-50, 1998.

BUSQUETS S.; ALMENDRO V.; BARREIRO E.; FIGUERAS M.; ARGILÉS J. M.; LÓPEZ-SORIANO F. J. Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. **FEBS Letters**, v. 579, n. 3, p. 717-722, 2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, n. 3, p. 597–601, 2005.

CAPUCO A. V.; WOOD D. L.; BALDWIN R.; MCLEOD K.; PAAPE M. J. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2177-87, 2001.

CHEN Z.; ZHAO X.; HAO Z.; GUO X.; JIANG X.; XU N. Association of porcine *UCP3* gene polymorphisms with fatness traits in a Pietrain×Jinhua F2 population. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 17, p. 3296-3300, 2011.

CHERRY J. M.; HONG E. L.; AMUNDSEN C.; BALAKRISHNAN R.; BINKLEY G.; CHAN E. T.; CHRISTIE K. R.; COSTANZO M. C.; DWIGHT S. S.; ENGEL S. R.; FISK D. G.; HIRSCHMAN J. E.; HITZ B. C.; KARRA K.; KRIEGER C. J.; MIYASATO S. R.; NASH R. S.; PARK J.; SKRZYPEK M. S.; SIMISON M.; WENG S.; WONG E. D. (2012) Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Research**. v. 40, n. D1, p. D700-D7005, 2012. (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>). Acesso em: 28/01/2013.

CHEVILLOTTE E.; GIRALT M.; MIROUX B.; RICQUIER D.; VILLARROYA F. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p.1042-50, 2007.

CLEMPSON A. M.; POLLOTTI G. E.; BRICKELL J. S.; BOURNE N. E.; MUNCE N.; D. WATHES D. C. Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. **Animal**, v. 5, n. 9, p. 1335–1343, 2011.

CRISCUOLO F, GONZALEZ-BARROSO M D M, BOUILLAUD F, RICQUIER D, MIROUX B, SORCI G. Mitochondrial Uncoupling Proteins: New Perspectives for Evolutionary Ecologists. **The American Naturalist**, v. 166, n. 6, p. 686-699, 2005.

DAVIS A. J., FLEET I. R., GOODE J. A, HAMON M. H., WALKER F. M. M., PEAKER M. Changes in Mammary Function at the Onset of Lactation in the Goat: Correlation with Hormonal Changes in Mammary Function at the Onset of Lactation. **The Journal of Physiology**, v. 288, p. 33-44, 1974.

DNA Baser Sequence Assembler v3.5.4 (2013), Heracle BioSoft SRL, www.Dnabaser.com

DUFFIELD T. F.; LESLIE K. E.; SANDALS D. Effect of prepartum administration of monensin in controlled-release capsule on milk production and milk components in early lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 2, p. 1254-1263, 1999.

DUNSHEA, F. R.; BELL A. W.; TRIGG T. E. 1990. Non-esterified fatty acid and glycerol kinetics and fatty acid re-esterification in goats during early lactation. **British Journal of Nutrition**, v. 64, n. 133, 1990.

DIANO S. & HORVATH T. L. Mitochondrial Uncoupling Protein 2 (UCP2) in Glucose and Lipid Metabolism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 52-58, 2011.

DIÉZ J. J. & IGLESIAS P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease **European Journal of Endocrinology**, v. 148, p. 293–300, 2003.

DRACKLEY J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2259–2273, 1999.

DRACKLEY J. K.; THOMAS R.; OVERTON T. R.; DOUGLAS G. N. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows During the Periparturient Period. **Journal of Dairy Science**, v. 84(Supplement), p. E100-E112, 2001.

ESTERBAUER H.; SCHNEITLER C.; OBERKOFER H.; EBENBICHLER C.; PAULWEBER B.; SANDHOFER F.; LADURNER G.; HELL E.; STROBERG A. D.; PATSCH J. R.; KREMPER F.; PATSCH W. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. **Nature Genetics**, v. 28, p. 178 – 183. 2001.

FERRAZ, B. S. J.; PINTO L. F. B.; MEIRELLES F. V.; ELER J. P.; DE REZENDE F. M.; OLIVEIRA E. C. M.; ALMEIDA H. B.; WOODWARD B.; NKRUMAH D. Association of

single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1360-1366, 2009.

FEILLET-COUDRAY C.; SUTRA T.; FOURET G.; RAMOS J.; WRUTNIAK-CABELLO C.; CABELLO G.; CRISTOL J. P.; COUDRAY C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 5, p. 624–632, 2009.

FIORAMONTI X.; CONTIÉ S.; SONG Z.; ROUTH V. H.; LORSIGNOL A.; PÉNICAUD L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks?. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1219-27, 2007.

FLEURY C.; NEVEROVA M.; COLLINS S.; RAINBAULT S.; CHAMPIGNY O.; MEYRUEIS L. C.; BOUILLAUD M. F.; SURWIT R. S.; RICQUIER D.; WARDEN C. H. Uncoupling Protein 2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, v. 15, n. 3, p. 269-272, 1997.

FLINT D. J.; CLEGG R. A.; VERNON R. G. Prolactin and the Regulation of Adipose-tissue Metabolism During Lactation in Rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 265-275, 1981.

FAGGIONI R.; SHIGENAGA J.; MOSER A.; FEINGOLD K. R.; GRUNFELD C. Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. **Biochem Biophysical Research Communication**, v. 244, n. 1, p. 75-8, 1998.

FRAGA D.; MEULIA, T.; FENSTER S. **Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, p. 10.3.1–10.3.34, 2008.

FRIGGENS N. C.; INGVARTSEN K. L.; EMMANS G. C. Prediction of Body Lipid Change in Pregnancy and Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 988–1000, 2004.

GAO Q. & HORVATH T. L. Neurobiology of feeding and energy expenditure. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, p. 367-98, 2007.

GARLID K. D.; JABŮREK M.; JEZEK P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. **FEBS Letters**, v. 438 n. 1-2, p.10-4, 1998.

GUY M. W. R. & FRANK J. K. Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver. **Development**, v. 108, n. 2, p. 331-336. 1990.

GREEN D. A.; BRINK D. R.; BAUER M. L.; WESTER T. J. Estradiol- 17 beta Effects on Lipid Metabolism of Adipose Tissue in Nutritionally Induced Lean and Obese Ovariectomized Ewes. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2120-2129, 1992.

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

INGVARTSEN K. L. & ANDERSEN J. B. Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1573–1597, 2000.

KÖNNER A. C.; JANOSCHEK R.; PLUM L.; JORDAN S. D.; ROTHER E.; MA X.; XU C.; ENRIORI P.; HAMPEL B.; BARSH G. S.; KAHN C. R.; COWLEY M. A.; ASHCROFT F. M.; BRÜNING J. C. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 6, p. 438-49, 2007.

LEDESMA M.; LACOBIA M. G.; RIAL E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biology**, v. 3, n. 12, p. 1-9, 2002.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

LEONARDUZZI P. G.; BIASI G. F.; CHIARPOTTO E. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1163–1182, 2004.

LIMA, M. C. **Mobilização de Lipídios em Cabras Leiteiras Durante o Periparto**. 2013. 54f Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2013.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v.25, n. 4 p. 402-408, 2001.

LIU W. & SAINT D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, n. 2, p. 347–353. 2002.

LOOR J. J. Genomics of metabolic adaptations in the peripartal cow. **Animal**, v. 4, n.7, p. 1110–1139, 2010.

LUCY M. C.; JIANG H.; KOBAYASHI Y. Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84(Supplement), p. E113-E119, 2001.

MADDOX J. F. & COCKETT N. E. An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. **Small Ruminant Research**, v. 70, n. 1, p. 4-20. 2007.

McNAMARA J. P.; HILLERS J. K. Regulation of Bovine Adipose Tissue Metabolism During Lactation. 1. Lipid Synthesis in Response to Increased Milk Production and Decreased Energy Intake. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 12, p. 3032-3041, 1986.

McNAMARA J. P. Regulation of Bovine Adipose Tissue Metabolism During Lactation. 5. Relationships of Lipid Synthesis and Lipolysis with Energy Intake and Utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 407 - 418, 1989.

MELO A. L. P. D. **Efeito de Polimorfismo nos Loci CSN1S1, GH, DGAT1 e PO1F1 Sobre os Valores Genéticos de Produção e Composição do Leite de Cabra**. 2012. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

METZ S. H. M. & BERGH S. G. C. D. Regulation of fat mobilization in adipose tissue of dairy cows in the period around parturition. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 25 p. 198., 1987.

MILLER S. A.; DYKES D. D.; POLESKY H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215. 1988.

MIROUX B.; FROSSARD V.; RAIMBAULT S.; RICQUIER D.; BOUILLAUD F. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 10, p. 3739-3745, 1993.

NEDERGAARD J. & CANNON B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 65-84, 2003.

NEWGARD C. B. & MCGARRY J. D. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 689–719, 1995.

OVERTON T. R. Substrate Utilization for Hepatic Gluconeogenesis in the Transition Dairy Cow. Pages 237 – 246 in **Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufacturers**, Cornell Univ., Ithaca, NY. *Apud* DRACKLEY J. K.; THOMAS R.; OVERTON T. R.; DOUGLAS G. N. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows During the Periparturient Period. **Journal of Dairy Science**, v. 84(Supplement), p. E100-E112, 2001.

PARTON L. E.; YE C. P.; COPPARI R.; ENRIORI P. J.; CHOI B.; ZHANG C. Y.; XU C.; VIANNA C. R.; BALTHASAR N.; LEE C. E.; ELMQUIST J. K.; COWLEY M. A.; LOWELL B. B. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 228-32, 2007.

PEBAY-PEYROULA E.; DAHOUT-GONZALEZ C. C.; RICHARD K. R.; TRÉZÉGUET V.; LAUQUIN G. J.; BRANDOLIN G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 39-44, 2003.

PI J. & COLLINS S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic β -cell function. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12 (Supplement 2), p. 141–148, 2010.

RestrictionMapper. Disponível em: <http://www.restrictionmapper.org> Acesso em: 25/05/2013.

RUIZ-RAMÍREZ A.; CHÁVEZ-SALGADO M.; PEÑEDA-FLORES J. A.; ZAPATA E.; MASSO F.; EL-HAFIDI M. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 6, p. E1198–E1207. 2011.

RHEE S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular Messenger. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 31, n. 2, p. 53-9, 1999.

RICQUIER, D.; CHI-SHUI LIN, C.; KLINGENBERG, M. Isolation of the GDP binding protein from brown adipose tissue mitochondria of several animals and amino acid composition study in rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 106, p. 582-589, 1982.

RICQUIER, D. & BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochemical Journal**, v. 345, p. 161-179, 2000.

ROBBINS D. & ZHAO Y. New Aspects of Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and Their Roles in Tumorigenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 8 p. 5285-5293, 2011.

ROLFE D. F. S. & BRAND M. D. The Physiological Significance of Mitochondrial Proton Leak in Animal Cells and Tissues. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 9-16, 1997.

ROUSSET S.; ALVES-GUERRA M.; MOZO J.; MIROUX B.; CASSARD-DOULCIER A.; BOUILLAUD F.; RICQUIER D. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins, **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. S130-S135, 2004.

ROUSSET S.; MOZO J.; DUJARDIN G.; EMRE Y.; MASSCHELEYN S.; RICQUIER D.; CASSARD DOULCIER A. M. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. **FEBS Letters**, v. 581, n. 3, p. 479-482, 2007.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

SEAL C. J. & REYNOLDS C. K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. **Nutrition Research Review**, v. 6, n. 1, p. 185-208, 1993.

SHEETS A. R.; FULOP P.; DERDA K. Z.; ANDREA K. A.; SABO E.; MARK N. M.; PARAGH G.; WANDS J. R.; BAFFY G. Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal & Liver Physiology**, v. 294, n. 4, p. G1017-G1024, 2008.

SHERMAN E. L.; NKRUMAH J. D.; MURDOCH B. M.; LI C.; WANG Z.; FU A.; MOORE S. S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 1-16, 2008.

SMITH, R. W.; A. WALSH. Effect of lactation on the metabolism of sheep adipose tissue. **Research in Veterinary Science**, v. 37, n. 3, p. 320, 1984.

SUMNER J. M.; MCNAMARA J. P. Expression of Lipolytic Genes in the Adipose Tissue of Pregnant and Lactating Holstein Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5237-5246, 2007.

THANNICKAL V. J.; FANBURG B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology – Lung & Cell Molecular Physiology**, v. 279, n. 6 p. L1005-L1028, 2000.

THOMPSON M. P. & KIM D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. **FEBS Letters**, v. 568, n. (1-3), p. 4-9, 2004.

TRAYHURN P. & BEATTIE .J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of Nutritional Society**, v. 60 n. 3, p. 329-39, 2001.

WALDER K.; NORMAN R. A.; HANSON R. L.; SCHRAUWEN P.; NEVEROVA M.; JENKINSON C. P.; EASLICK J.; WARDEN C. H.; PECQUEUR C.; RAIMBAULT S.; RICQUIER D.; SILVER M. H.; SHULDINER A. R.; SOLANES G.; LOWELL B. B.; CHUNG W. K.; LEIBEL R. L.; PRATLEY R.; RAVUSSIN E. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2–UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 9, p. 1431-5, 1998.

Webcutter 2.0. Disponível em: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Acesso em: 28/01/2013.

YAMAUCHI T.; KAMON J.; MINOKOSHI Y.; ITO Y.; WAKI H.; UCHIDA S.; YAMASHITA S.; NODA M, KITA S.; UEKI K.; ETO K.; AKANUMA Y.; FROGUEL P.; FOUFELLE F.; FERRE P.; CARLING D.; KIMURA S.; NAGAI R.; KAHN B. B.; KADOWAKI T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288-1295. 2002.

YE J.; COULOURIS G.; ZARETSKAYA I.; CUTCUTACHE I.; ROZEN S.; MADDEN T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**. v. 13, p. 134, 2012.

ZHANG C. C.; BAFFY G.; PERRET P.; KRAUSS S.; PERONI O.; GRUJIC D.; HAGEN T.; VIDAL-PUIG A. J.; BOSS O.; KIM Y.; ZHENG X. X.; WHEELER M. B.; SHULMAN G. I.; CHAN C. B.;LOWELL1 B. B. Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and Is a Major Link between Obesity, Cell Dysfunction, and Type 2 Diabetes. **Cell**, v. 105, n. 6 p. 745–755, 2001.