

## EFEITO DO BUTAFOSFAN ASSOCIADO A CIANOCOBALAMINA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO ENERGÉTICO EM VACAS NO PÓS-PARTO

BRUNA EMANUELE DA SILVA VELASQUEZ<sup>1</sup>; CAMILA PIZZONI<sup>2</sup>; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN<sup>2</sup>; ÂNTONIO BARBOSA<sup>2</sup>; ELIZA ROSSI KOMNINO<sup>2</sup>; MARCIO NUNES CORRÊA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [velasquezbruna95@gmail.com](mailto:velasquezbruna95@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nupeec@gmail.com](mailto:nupeec@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marcio.nunescorreia@gmail.com](mailto:marcio.nunescorreia@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O balanço energético negativo (BEN) ocorre em vacas leiteiras no chamado período de transição, este compreende os 21 dias pré-parto até 21 dias pós-parto, onde o aporte energético proveniente da dieta não é o suficiente para atender as altas demandas de energia no início da lactação (Gordon et al., 2013). Neste momento a via glicogênica não consegue atender as necessidades de glicose do organismo (Gordon et al., 2013), ativando então uma via catabólica que utiliza as reservas lipídicas, aumentando as concentrações ácidos graxos não esterificados (AGNE), e corpos cetônicos (Adewuyiet al., 2005), que afetam as respostas imunes, predispondo os animais a doenças (Chapinal et. al. 2011).

O uso de uma associação de butafosfan com cianocobalamina vem sendo estudado como uma alternativa para reduzir estas alterações, mostrando resultados positivos (Pereira et al., 2013). A cianocobalamina aumentando a atividade da metilmalonil-CoA mutase, auxiliando assim o ciclo glicogênico, suprimindo, as rotas cetogênicas ( Kennedy et al., 1990 ), já butafosfan, fornece fosforo participa de diversas rotas da gliconeogênese e ainda é fundamental na formação do ATP (Berget al., 2006).

A utilização do composto nesse período já se mostrou eficaz no aumento da produção de leite e na diminuição do BEN, reduzindo as concentrações de AGNE e beta-hidroxibutirato (BHB) (Pereira et al., 2013) e aumentando a concentração de glicose (Fürl, 2010). Então supõem-se que estes efeitos possam ocorrer por conta de uma maior com a expressão de genes relacionados com o metabolismo energético (Jaenisch e Bird, 2003).

A Glicose-6-Fosfatase (G6PC), é uma enzima que atua sobre a glicose-6-fosfato, gerando a glicose e o receptor de insulina (INSR) subs 1 do receptor de insulina (IRS1), são precursores do receptor que quando ativado pela insulina faz a captação da glicose do meio extracelular pro meio intracelular (Jacometo, 2016).

Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar se utilização do composto butafosfan e cianocobalamina é capaz de alterar a expressão gênica do G6PC, INSR e IRS1 envolvidos no metabolismo energético, em vacas pós-parto.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira comercial no sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande (32° 16 'S, 52 ° 32'), com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o código 0102025-2017.

Foi utilizado um lote de vacas da raça Holandês ( $n = 40$ ) de alta produção ( $\geq 30$  L/dia na lactação anterior) com o mesmo manejo pré-parto, alojadas em sistema *compost barn*, recebendo a mesma ração totalmente misturada, água *ad libitum* e ordenhadas duas vezes ao dia. Logo após o parto, foram selecionadas 18 vacas múltiparas, divididas aleatoriamente em dois grupos, o grupo B+C ( $n = 9$ ) recebeu uma dose de Butafosfan associado a cianocobalamina (25 mL/animal, Catosal B12®, Bayer, Alemanha) nos dias 0, 3 e 7 dias relativos ao parto, e o grupo Controle ( $n=9$ ) recebeu uma dose de solução salina (25 mL/animal) nos dias 0, 3 e 7 relativos ao parto. As vacas apresentavam escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5, Edmonson et al., 1989) (B+C =  $2,92 \pm 0,07$ ; CON =  $2,64 \pm 0,17$ ) e peso (B+C=  $690,1 \pm 18,83$ ; CON =  $747,1 \pm 34,19$  Kg) semelhantes, e escore de locomoção  $\leq 1$  (Sprecher et al., 1997).

Nos dias 0 e 10 relativo ao parto foi realizada a coleta de material hepático através de biópsia. Após desinfecção e bloqueio com anestésico local, foi realizada uma incisão de pele de 0,5 cm no 11º espaço intercostal, em torno de 20 cm abaixo da linha dorsal (Barros et al., 2007). Após a incisão era então introduzida a agulha de biópsia (18g  $\times$  25 cm Geotek Medikal, Turquia) e realizado o disparo no tecido hepático. Cada coleta foi realizada em duplicata. Imediatamente após a biópsia, as amostras foram acondicionadas em criotubos livres de DNases e RNases e congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise.

O RNA total do tecido hepático foi extraído utilizando Reagente TRIZOL (Sigma-Aldrich, EUA) associado a um kit comercial de purificação (RNeasy Cleanuo Qiagen®, Hilden, Alemanha). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1  $\mu$ g de RNA total utilizando kit comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de PCR em tempo real foi conduzida em duplicata, usando 4  $\mu$ L de cDNA (20 ng), 5  $\mu$ L de GoTaq (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, Madison, USA), 0,75  $\mu$ L de cada primer (5  $\mu$ M) e 4,5  $\mu$ L de água ultra pura. A PCR foi conduzida no sistema de PCR em tempo real Stratagene® Mx3005P™ (Agilent Technologies, EUA). Para cada ensaio foram corridos 40 ciclos (95 °C por 15 s e 60° C por 60 s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para detectar a amplificação de um único produto de PCR. Foram avaliados genes relacionados à síntese de glicose (*G6PC*) e insulina (*INSR*, *IRS1*) (Jacometo et al. (2016). A média geométrica da expressão dos genes *UXT* (Bionaz & Loor, 2007) e *RPS9* (Janovick-Guretzky et al. 2007) foi utilizada como controle endógeno.

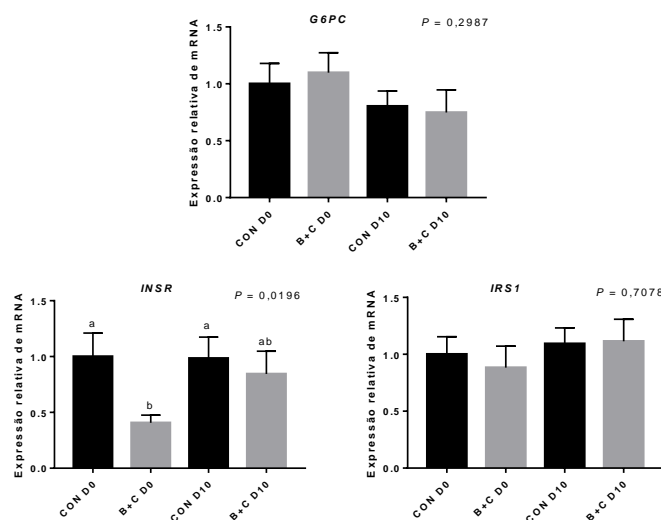
A expressão relativa foi calculada a partir da equação  $2^{A-B}/2^{C-D}$  (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do grupo controle, B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada, C, o valor médio de Ct dos genes *UXT* e *RPS9* na primeira amostra do controle e D, o valor médio de Ct dos genes *UXT* e *RPS9* na amostra analisada).

A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphad Prism 7. As variáveis contínuas foram analisadas utilizando o método de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para a comparação de médias. Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum efeito foi observado na rota relacionada à síntese de glicose, visto que a expressão relativa de *G6PC* não diferiu entre os grupos e períodos (Figura 1), resultado semelhante ao encontrado por Kreipe (2011) que também não

encontrou nenhum efeito de três aplicações da combinação na expressão do gene *G6PC*. Era esperado uma maior expressão deste gene, pelo efeito positivo da cianocobalamina na via da gliconeogênese (Kennedy et al., 1990), e por outros estudos mostrarem um aumento na produção de leite (Pereira et al., 2013), que poderia estar relacionada com uma melhor atividade gliconôgena, que por sua vez poderia estar sendo estimulada pelo *G6PC*, porém a gliconeogênese não depende apenas deste gene, inúmeros outros mecanismos estão envolvidos no processo que podem gerar uma maior disponibilidade de glicose e supressão das rotas cetogênicas.



**Figura 1.** Expressão relativa de genes relacionados à síntese de glicose (*G6PC*) e insulina (*INSR* e *IRS1*) de vacas de alta produção que receberam (B+C) ou não (CON) Butafosfan associado à Cianocobalamina no pós-parto recente.

A expressão dos genes *INSR* e *IRS1* indicam que o animal tem maiores condições de apresentar receptores de insulina, que estes por sua vez estão relacionados com a capacidade do organismo em captar glicose para o espaço intracelular (De Koster, 2015), as vacas do grupo B+C apresentaram menor expressão do gene *INSR* no dia 0 (Figura 1), sugerindo que estes animais apresentavam menor atividade dos receptores de insulina na membrana dos hepatócitos indicando uma maior resistência à insulina no início do experimento (Liu et al., 2010). Porém no dia 10 (Figura 1) a expressão deste gene foi semelhante entre os grupos, sugerindo que o tratamento não afetou sua expressão. Da mesma forma a expressão do gene *IRS1* não foi afetada pelo tratamento no período avaliado (Figura 1).

#### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com cianocobalamina associada ao butafosfan em vacas leiteiras no pós-parto, não afetou a expressão do gene relacionado a síntese de glicose (*G6PC*), e nem dos genes relacionados com a presença de receptores de insulina (*INRS* e *IRS1*).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWUYI, A.A, GRUYS, E., VAN EERDENBURG F.J. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. **Veterinary Quarterly** 27, 117–126, 2005.

BERG JM, TYMOCZKO JL AND STRYER L. Glycolysis and gluconeogenesis. In **Biochemistry, 6th edition** (ed. JM Berg, JL Tymoczko and L Stryer), pp. 433–474. W. H. Freeman and Co., New York, NY, pp. 433-474, 2006.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.E.; DUFFIELD, T.F.; CAPEL, M.; GODDEN,S.; OVERTON, M.; SANTOS, J.E.P.; LEBLANC, S.J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of Dairy Science** 94, 489-4903, 2011.

DE KOSTER, J. HOSTENS, M. VAN EETVELDE, M. HERMANS, K. MOERMAN, S. BOGAERT, H. DEPREESTER, E. VAN DEN BROECK, W. OPSOMER, G. Insulin response of the glucose and fatty acid metabolism in dry dairy cows across a range of body condition scores. **Journal of Dairy Science**, 98, pp. 4580 – 4592. 2015.

EDMONSON, A. J. LEAN, I. J. WEAVER, L. D. FARVER, T. WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. January. 72:68-78. 1989.

FÜRLI, M., DENIZ, A. WESTPHAL, B. ILLING, C. CONSTABLE, P.D. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 93, pp. 4155 – 4164. 2010.

GORDON, J. L., LEBLANC, S. J., & DUFFIELD, T. F. Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 29(2), 433–445, 2013.

JACOMETO, C.B. ZHOU, Z. LUCHINI, D. TREVISI, E. CORREA, M.N. LOOR, J.J. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**., 99, pp. 6753-6763, 2016.

JAENISCH R. BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.** 33: 245-254. 2003.

KENNEDY, D.G. CANNAVAN, A. MOLLOY, A. O'HARTE, F. TAYLOR, S.M. . KENNEDY, S. BLANCHFLOWER, W.J. Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt-vitamin 12 deficient sheep. **Br. J. Nutr.**, 64, pp. 721-732, 1990.

KREIPE, L.; DENIZ, A.; BRUCKMAIER, R.M.; VAN DORLAND, H.A. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. **Journal of Dairy Science**.,v.94, p.4904-4914, 2011.

PEREIRA, R., SILVEIRA, P., MONTAGNER, P., SCHNEIDER, A., SCHMITT, E., RABASSA, V., PFEIFER, L., DEL PINO, F., PULGA., M., CORRÊA, M.. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal**, 7(7), 1143-1147. 2013.

SPRECHER, D. J. HOSTETLER, D. E. KANEENE, J. B. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology**, 15;47(6):1179-87. 1997.