



# **ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA DE ENZIMAS REGULADORAS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO EM OVINOS SUJEITOS A RESTRIÇÃO ALIMENTAR**

**Renata Alves Paiva de Brito**

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em  
**Engenharia Zootécnica – Produção Animal**

Orientador: Doutor Luís Granger Alfaro Cardoso

Co-Orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

**Júri:**

Presidente: Doutor Rui Manuel Vasconcelos Horta Caldeira, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Luís Granger Alfaro Cardoso, Investigador Principal do Instituto de Investigação Científica Tropical;

Doutora Maria Leonor Mota Morais Cecílio, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

## Resumo

Estudou-se o efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo intermediário. Foram utilizados borregos de duas raças distintas (Merino Australiano e Dorper). Os animais estiveram sujeitos, durante 42 dias, a dois tratamentos nutricionais: restrição alimentar (80% das necessidades diárias de manutenção) e controlo (alimentação *ad libitum*). Definiram-se 4 grupos experimentais (Merino Australiano Controlo, Merino Australiano Restrição, Dorper Controlo e Dorper Restrição). No final do ensaio, os animais foram abatidos e recolheram-se amostras de tecido hepático, que foram utilizadas para quantificar a expressão dos genes que codificam para a síntese de enzimas relevantes do metabolismo intermediário (Hexocinase, Fosfofructocinase, Piruvato-Cinase, Piruvato-Carboxilase, Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase, Frutose-1,6-Difosfatase, Glucose-6-Fosfatase, Glicogénio-Fosforilase, Glicogénio-Sintase, Acetil-CoA-Carboxilase, Sintase de Ácidos Gordos, Lipase Hepática, Glutamato Desidrogenase e Carbamoil-Fosfato Sintase), através da técnica de PCR em Tempo Real.

Os resultados obtidos demonstraram uma superioridade da raça Dorper na manutenção da homeostase da glucose. A restrição alimentar conduziu a uma diminuição significativa da expressão génica da síntese de enzimas envolvidas em fenómenos glicolíticos nos animais Dorper. A expressão de enzimas neoglucogénicas não evidenciou alterações nos animais experimentais e as enzimas lipogénicas manifestaram igual decréscimo de expressão nas duas raças experimentais. A raça Dorper evidenciou ainda um menor recurso ao catabolismo dos aminoácidos e uma maior síntese de ureia. Estes resultados são consistentes com as reduções dos pesos vivos encontradas (15,3% para o Merino Australiano e 7,5% para o Dorper), que traduzem um melhor desempenho nutricional dos animais da raça Dorper.

**Palavras-chave:** borregos, restrição alimentar, metabolismo intermediário, expressão génica, PCR em Tempo Real.

## **Abstract**

The effect of food restriction on expression of genes encoding the regulatory enzymes of intermediary metabolism was studied. We used two distinct breeds of lambs (Australian Merino and Dorper) which were submitted to two nutritional treatments: food restriction (80% of daily requirements for maintenance) and control (*ad libitum* feeding) during 42 days. The animals were divided into four experimental groups (Australian Merino Control, Australian Merino Restriction, Dorper Control and Dorper Restriction). After the trial, the animals were slaughtered and samples were collected from liver tissue, which were used to quantify the expression of genes encoding the synthesis of relevant intermediary metabolism enzymes (Hexokinase, Fosfofructokinase, Pyruvate kinase, Pyruvate carboxylase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Fructose 1,6-bisphosphatase, Glucose-6-phosphatase, Glycogen phosphorylase, Glycogen synthase, Acetyl CoenzymeA carboxylase, Fatty acid synthase, Hepatic lipase, Glutamate dehydrogenase e Carbamoyl phosphate synthase), through Real Time PCR.

The results showed a superiority of Dorper sheep in maintaining glucose homeostasis. Food restriction led to a significant decrease of gene expression of glycolytic enzymes in Dorper animals. The expression of gluconeogenic enzymes showed no changes in experimental animals and the lipogenic enzymes showed an equal decrease of expression in two experimental breeds. The Dorper breed also showed a reduced use of aminoacids and an increase in the synthesis of urea. These results are consistent with the reductions found in body weight (15,3% for the Australian Merino and 7,5% for Dorper), which reflect a better nutritional performance of the Dorper breed.

**Key words:** lambs, food restriction, intermediary metabolism, gene expression, Real-Time PCR.

## Extended Abstract

This work concerns the study of the effect of food restriction on expression of genes encoding the synthesis of regulatory enzymes of intermediary metabolism in sheep subjected to seasonal weight loss. Our study covers glucose, lipid and protein metabolic pathways within the intermediary metabolism, considering the *ad libitum* and food restriction effect on regulatory enzymes.

We used two distinct breeds of lambs from Australia: the Australian Merino, a wool production breed, although improved carcass quality gives this breed a dual purpose (meat and wool), and Dorper, a synthetic breed selected for high meat productivity.

We defined four experimental groups (Australian Merino Control - MC, Australian Merino Restriction - MR, Dorper Control - DC and Dorper Restriction - DR), each one consisting of five animal samples. The animals were subjected for 42 days to two nutritional treatments: food restriction (80% of the daily maintenance and calculated individually based on weight at the beginning of the test) and control (*ad libitum* feeding) in order to investigate the response and adaptability of these two breeds to nutritional stress. After the trial, the animals were slaughtered and samples were collected from liver tissue, which were used in developing this experimental work. Then we proceeded to Real-Time PCR technique to quantify the expression of genes encoding the synthesis of most relevant enzymes of carbohydrate, lipid and protein metabolism.

In the end of the trial, with the same level of food restriction, animals of the Australian Merino and Dorper breed suffered reductions in their body weight, respectively 15,3% and 7,5% compared to the start of the trial. Dorper animals presented a better performed nutrition, converting more efficiently the supplements in weight gains.

In carbohydrate metabolism, food restriction showed significant decreases in the level of glycolytic enzymes gene expression. Dorper restricted animals revealed a significant decrease over controls in the transcription of Fosfofructokinase (49%) and of Pyruvate kinase (56%). The significant decrease of enzymes concerned with the glycolytic pathway in Dorper animals observed in this experimental work showed a better effort of these animals in maintaining glucose homeostasis.

It was not demonstrated in this experimental work the increase in the level of gene expression of gluconeogenic enzymes associated with the condition of food restriction. The Phosphoenolpyruvate carboxykinase expression only revealed the effect of breed, and the restricted animals of both breeds revealed a significant transcription increase over controls of Glucose-6-phosphatase (18% and 27% in the Australian Merino and Dorper sheep, respectively).

In lipid metabolism, Fatty acid synthase transcription showed a strong influence of dietary restriction on gene expression in both breeds. The level of transcription of Fatty acid synthase mRNA presented a decrease (78%) in the Australian Merino restricted animals, and also in the Dorper restricted group (89%) when compared to the respective control groups.

Finally, regarding protein metabolism, Carbamoyl phosphate synthase expression only revealed the effect of breed, demonstrating an increase in urea's metabolism in the Dorper breed. Glutamate dehydrogenase showed a transcription decrease over control in Dorper restricted animals (46%), which indicate a diminution of amino acid catabolism in these animals.

All these results are consistent with the reductions in body weight found in our work, and reflect a better nutritional performance of the Dorper breed.

## **Agradecimentos**

Ao Doutor Luís Alfaro Cardoso, meu orientador, por todo o apoio prestado para a elaboração deste trabalho, pelo acompanhamento cuidado e, em especial, pelo seu sentido crítico na minuciosa revisão desta dissertação.

Ao Professor Doutor Miguel Pedro Mourato, por ter aceite a co-orientação deste trabalho e pela ajuda preciosa na revisão desta tese.

À Doutora Sofia van Harten, por todos os ensinamentos que me foram inculcados durante os meses de estágio, por todo o apoio prestado nos momentos mais difíceis, pela disponibilidade na resolução dos mais variados problemas de ordem prática com que me vi confrontada e pela excelente ajuda na revisão da tese. O meu sincero agradecimento pela paciência e por toda a amizade.

Ao Doutor André Almeida e à equipa australiana do Department of Agriculture and Food Western Australia (Perth, WA, Australia), Tim Scanlon, Johan Greeff, Tanya Kilminster, John Milton e Chris Oldham, ao pessoal técnico do Merredin Research Station e do Tammin Abattoir, pela realização do trabalho “in vivo” envolvendo aos animais experimentais.

A todos os docentes do Instituto Superior de Agronomia (ISA) que contribuíram para minha formação, em particular os do Departamento de Produção Animal.

Ao Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT), pelo financiamento disponibilizado, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), e às pessoas que o constituem, por me terem acolhido com carinho e amizade durante os meses de estágio e que contribuíram para a execução prática deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e restante família por todo o amor e paciência e a todos os meus amigos pela preciosa amizade e ajuda demonstrada ao longo destes anos.

Ao meu namorado, pelas toneladas de paciência, amor e amizade, pelo apoio prestado nos momentos mais difíceis e por ser quem é!

A todos, o meu Obrigada!

## Índice Geral

<b>I. Prólogo e Objectivos .....</b>	<b>Pág. 1</b>
<b>II. Introdução.....</b>	<b>Pág. 3</b>
1. Ovinicultura nos Trópicos .....	Pág. 3
2. Ovinicultura na Austrália.....	Pág. 4
3. A Raça Merino Australiano .....	Pág. 6
4. A Raça Dorper.....	Pág. 8
5. A restrição alimentar.....	Pág. 10
6. O metabolismo intermediário e as enzimas reguladoras.....	Pág. 11
7. O metabolismo intermediário dos ruminantes.....	Pág. 12
8. Metabolismo Glucídico .....	Pág. 12
9. Metabolismo Lipídico .....	Pág. 19
10. Metabolismo Proteico.....	Pág. 23
11. Metabolismo no estado alimentado .....	Pág. 26
12. Metabolismo na restrição alimentar .....	Pág. 27
<b>III. Material e Métodos .....</b>	<b>Pág. 29</b>
1. Ensaio e Recolha de Amostras.....	Pág. 29
2. Técnica de PCR .....	Pág. 31
3. Extracção de RNA.....	Pág. 32
4. Técnica de RT-PCR .....	Pág. 33
5. PCR em Tempo Real .....	Pág. 33
6. Primers Degenerados.....	Pág. 37
7. Primers PCR em Tempo Real .....	Pág. 42
8. Condições PCR em Tempo Real.....	Pág. 44
9. PCR Miner.....	Pág. 45
10. Tratamento estatístico.....	Pág. 47

<b>IV. Resultados.....</b>	<b>Pág. 48</b>
1. Crescimento e evolução dos pesos vivos .....	Pág. 48
2. Resultados PCR em Tempo Real – Expressões gênicas relativas ao nível do mRNA transcrito.....	Pág. 49
3. Novas sequências nucleotídicas.....	Pág. 55
<b>V. Discussão de Resultados .....</b>	<b>Pág. 56</b>
1. Pesos Vivos.....	Pág. 56
2. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Glucídico .....	Pág. 56
3. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Lipídico.....	Pág. 61
4. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Proteico.....	Pág. 62
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>Pág. 66</b>
<b>VII. Bibliografia .....</b>	<b>Pág. 69</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Ovino da Raça Merino Australiano .....	Pág. 6
<b>Figura 2</b> - Ovino da Raça Dorper .....	Pág. 8
<b>Figura 3</b> - Enzimas reguladoras do Metabolismo dos Glúcidos (adaptado de: Nordlie <i>et al.</i> , 1999, Dhahbi <i>et al.</i> , 1999 e 2001; Maughan, 2005; Campbell, 2008) .....	Pág. 19
<b>Figura 4</b> – Enzimas reguladoras do Metabolismo dos Lípidos (adaptado de: Kersten, 2001) .....	Pág. 22
<b>Figura 5</b> – Enzimas reguladoras do Metabolismo Proteico (adaptado de Dhahbi <i>et al.</i> , 1999 e 2001).....	Pág. 25
<b>Figura 6</b> - Curva de Amplificação da reacção de PCR em Tempo Real (Kubista <i>et al.</i> , 2006) .....	Pág. 35
<b>Figura 7</b> - Curva de Amplificação (A) e Curva de Dissociação ou de <i>Melting</i> (B) da reacção de PCR em Tempo Real (Robert <i>et al.</i> , 2002).....	Pág. 36
<b>Figura 8</b> - Parte do alinhamento nucleotídico dos genes da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP) para diferentes espécies animais .....	Pág. 38
<b>Figura 9</b> – Produtos de PCR analisados por electroforese em gel de agarose .....	Pág. 41
<b>Figura 10</b> – Produtos de PCR analisados por electroforese em gel de agarose .....	Pág. 46
<b>Figura 11</b> – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo glucídico para ambas as raças.....	Pág. 61
<b>Figura 12</b> – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo lipídico para ambas as raças. ....	Pág. 62
<b>Figura 13</b> – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo proteico para ambas as raças .....	Pág. 65

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Composição química da dieta experimental .....	Pág. 30
<b>Tabela 2</b> – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP) .....	Pág. 39
<b>Tabela 3</b> – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Piruvato-Carboxilase (PC) .....	Pág. 39
<b>Tabela 4</b> – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Glicogénio-Sintase (GS) .....	Pág. 40
<b>Tabela 5</b> – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Carbamoil-Fosfato Sintase (CPS) .....	Pág. 40
<b>Tabela 6</b> – Sequências de <i>primers</i> PCR em Tempo Real .....	Pág. 43
<b>Tabela 7</b> - Sequências de <i>primers</i> PCR em Tempo Real do <i>Housekeeping gene</i> Proteína Ribossomal L19 (RPL 19) .....	Pág. 44
<b>Tabela 8</b> – Crescimento e evolução dos pesos vivos dos grupos experimentais (média $\pm$ erro padrão da média) .....	Pág. 48
<b>Tabela 9</b> – Quantificação relativa da transcrição do mRNA por PCR em Tempo Real (média $\pm$ erro padrão da média) .....	Pág. 54

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> – Crescimento e evolução dos pesos vivos dos grupos experimentais .....	Pág. 48
<b>Gráfico 2</b> - Expressões génicas relativas da Fosfofructocinase (PFK).....	Pág.49
<b>Gráfico 3</b> – Expressões génicas relativas da Piruvato-Cinase (PK).....	Pág.50
<b>Gráfico 4</b> – Expressões génicas relativas da Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase (PEPCK) .....	Pág.50
<b>Gráfico 5</b> – Expressões génicas relativas da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP).....	Pág.51
<b>Gráfico 6</b> – Expressões génicas relativas da Glucose-6-Fosfatase (G6P).....	Pág.51
<b>Gráfico 7</b> – Expressões génicas relativas da Glicogénio-Sintase (GS).....	Pág.52
<b>Gráfico 8</b> – Expressões génicas relativas da Sintase de Ácidos Gordos (FAS).....	Pág.52
<b>Gráfico 9</b> – Expressões génicas relativas da Glutamato Desidrogenase (GDH).....	Pág.53
<b>Gráfico 10</b> – Expressões génicas relativas da Carbamoil-Fosfato Sintase (CPS).....	Pág.53
<b>Gráfico 11</b> – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras para os animais Merino Australiano e Dorper.... .....	Pág.55

## Lista de Abreviaturas

A – Adenina

aa – Aminoácidos

ABS – *Australian Bureau of Statistics*

ACOAC – Acetil-CoA-Carboxilase

ADF – Fibra Detergente Ácida

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

bp – pares de bases

C - Citosina

cDNA – DNA complementar

CIISA – *Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal*

CPS – Carbamoil-Fosfato Sintase

CT - limiar de detecção

DC – Dorper Controlo (Grupo experimental)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DR – Dorper Restrição (Grupo experimental)

EM – Energia Metabolizável

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FAS – Sintase de Ácidos Gordos

FBP – Frutose-1,6-Difosfatase

FCT – *Fundação para a Ciência e a Tecnologia*

G – Guanina

G6P – Glucose-6-Fosfatase

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDH – Glutamato Desidrogenase

GP – Glicogénio-Fosforilase

GS – Glicogénio-Sintase

HK – Hexocinase

HL – Lipase Hepática

IICT – *Instituto de Investigação Científica Tropical*

ISA – *Instituto Superior de Agronomia*

ITQB – *Instituto de Tecnologia Química e Biológica*

MC – Merino Australiano Controlo (Grupo experimental)

MR – Merino Australiano Restrição (Grupo experimental)

mRNA – RNA mensageiro

MS - Matéria Seca

MSD – Matéria Seca Digestível

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

p – Nível de significância

PB – Proteína Bruta

PC – Piruvato-Carboxilase

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase

PEPCK – Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase

PFK – Fosfofructocinase

PK – Piruvato-Cinase

PV – Peso Vivo

RNA – Ácido ribonucleico

RPL 19 – Proteína Ribossomal L19

RT-PCR – Transcriptase reversa seguida de uma Reacção em Cadeia pela Polimerase

T – Timina

T<sub>m</sub> – Temperatura de *Melting*

β-actina – Beta-Actina

β2M – Beta-2 microglobulina

18S RNA – RNA ribossomal 18S

## I. Prólogo e Objectivos

Os ovinos são uma das espécies mais amplamente distribuídas em todo o mundo. Possuem uma elevada capacidade de adaptação que lhes permite sobreviver numa grande variedade de ambientes, desde zonas áridas, quentes e semi-desertas ao frio das regiões montanhosas. Uma grande percentagem da população de ovinos do mundo está localizada em regiões e sub-regiões tropicais, tendo como principal objectivo a produção de carne e, em menor grau, a produção de pele, leite e lã (Combellas, 1980).

Segundo estimativas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), um quinto da população mundial de ovinos está localizada nos trópicos (Kebreab *et al.*, 2005).

Nesta região, que inclui a maior parte dos países em vias de desenvolvimento, uma parte da população animal habita ambientes agressivos, com flutuações climáticas extremas que afectam negativamente a produção animal e provocam perda sazonal de peso nos animais (Iñiguez, 2004).

A produção animal é cada vez mais importante no crescimento da agricultura nas economias destes países, e os recursos genéticos animais são essenciais para o seu desenvolvimento económico. Neste âmbito, a aplicação da biotecnologia na área animal conduzirá a mudanças significativas no retorno económico da pecuária (Madan, 2005).

A biologia molecular tem sido uma das áreas que mais resultados acumulou nos últimos anos. Vários genomas já têm as suas sequências determinadas, com grande quantidade de informação publicamente disponível. Apesar disso, a aplicação desse conhecimento na produção animal ainda é incipiente nos países em desenvolvimento.

Vários estudos têm sido desenvolvidos em animais no sentido de caracterizar os efeitos da restrição calórica na expressão génica da síntese de enzimas envolvidas no metabolismo energético (Kim e Freake, 1996; Dhahbi *et al.*, 1999; Wetter *et al.*, 1999; Hagopian *et al.*, 2003a e 2003b; van Harten e Cardoso, 2010). Estes trabalhos evidenciaram alterações enzimáticas durante períodos de subnutrição, sugerindo que estas alterações estarão aumentadas em animais adaptados a condições alimentares restritivas.

Neste contexto, a identificação dos genes que intervêm na regulação do metabolismo intermediário é um desafio necessário, considerando as importantes perdas das regiões tropicais e subtropicais, devido aos longos períodos de carência alimentar a que animais estão sujeitos, face à ocorrência das secas sazonais.

Assim, o objectivo deste trabalho experimental foi o de estudar o efeito da restrição alimentar na expressão dos genes que codificam algumas das enzimas reguladoras do metabolismo intermediário, partindo do pressuposto que essas enzimas estariam relacionadas com as respostas fisiológicas à restrição alimentar. Este trabalho está incluído no projecto “Estudos da caracterização génica e fisiológica da adaptação de ovinos à restrição alimentar” subsidiado pela *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (FCT).

## **II. Introdução**

### **1. Ovinicultura nos Trópicos**

As regiões tropicais estão compreendidas entre o Trópico de Câncer e de Capricórnio (23,5 N e 23,5 S) e englobam também regiões subjacentes (subtropicais). Caracterizam-se pela existência de duas estações distintas no ano: a época das chuvas e a época seca.

A produção animal em todas as regiões tropicais pode ser afectada pelo clima de duas formas. Inicialmente há que considerar a influência directa do clima sobre os próprios animais, e por outro lado, os efeitos indirectos no seu meio ambiente. O stress climático, provocado pelas condições ambientais que se fazem sentir nestas regiões, reduz significativamente o apetite dos animais, diminuindo assim a quantidade de alimento ingerido. As performances produtivas dos animais estão assim reduzidas, traduzidas em menores ritmos de crescimento (Williamson e Payne, 1980).

A produção de carne nos trópicos baseia-se na utilização de gramíneas forrageiras e de pastagens como principal recurso alimentar para os animais. Assim sendo, a utilização destas fontes é limitada, sofrendo flutuações climáticas sazonais. As condições de seca extrema diminuem o valor nutritivo da pastagem disponível, ficando os animais sujeitos a períodos de alguma restrição alimentar. A sua produtividade é, geralmente, baixa e consequência deste stress alimentar (Moron-Fuenmayor e Clavero, 1999; Iñiguez, 2004).

De modo geral é reconhecido que os ovinos requerem uma dieta de melhor qualidade, especialmente em proteína e energia, que os grandes ruminantes, e que as forrageiras tropicais, especialmente as gramíneas, têm valores nutritivos mais baixos que as espécies de clima temperado. Assim, os alimentos disponíveis para a produção animal nos países tropicais são geralmente deficientes na maioria dos nutrientes e apresentam baixa digestibilidade (Kebreab *et al.*, 2005; Osuji *et al.*, 2005).

Uma alimentação inadequada e a má qualidade dos recursos, especialmente durante a estação seca, é o mais sério obstáculo para a produção de ovinos nas regiões tropicais e subtropicais. Nestas regiões, os animais estão subnutridos devido a flutuações no



fornecimento dos nutrientes ou a uma ingestão insuficiente de alimentos (Osuji *et al.*, 2005). A produção animal está assim seriamente afectada pela subnutrição.

A subnutrição pode ser definida como a ausência, insuficiência ou desequilíbrio de nutrientes que irá conduzir a um desvio fisiológico e a uma alteração dos processos metabólicos, resultando num mau desempenho do animal. A subnutrição ocorre quando a dieta é deficiente num ou mais constituintes alimentares ou quando é insuficiente em termos quantitativos (Osuji *et al.*, 2005).

Nas regiões tropicais os animais estão sujeitos a oscilações extremas no fornecimento de nutrientes e na disponibilidade de alimento como resultado da forte sazonalidade que se sente nestes países (Osuji *et al.*, 2005).

A adaptação a condições tropicais pode ser definida como a capacidade do animal sobreviver, crescer e reproduzir-se na presença de factores de stress extremos, característicos dos ambientes tropicais, como a existência de parasitas, doenças, climas quentes e secos, condições nutricionais pobres, entre muitos outros (Prayaga *et al.*, 2006).

As características tropicais das diferentes raças de ovinos variam ligeiramente de acordo com o ambiente a partir do qual tiveram origem, assim como o tipo de produção para o qual foram seleccionadas (Combella, 1980). Assim, a adaptação dos ovinos nos trópicos levou não apenas à perda da lã, mas, também, a algumas alterações em parâmetros fisiológicos.

## **2. Ovinicultura na Austrália**

Por muitos anos, a Austrália foi o maior país produtor de ovinos do mundo. No entanto, desde o final dos anos 80, altura em que os preços da lã começaram a diminuir, a produção de lã tem vindo a sofrer quebras severas e os produtores de ovinos da Austrália têm vindo a reduzir os seus efectivos animais.

Para combater esta redução passou-se a incentivar a produção de carne, utilizando raças produtoras de carne provenientes da África do Sul como alternativa. As raças Dorper e Damara constituem bons exemplos de raças exóticas introduzidas na Austrália e cujo interesse tem vindo a crescer (Crocker e Watt, 2001; Almeida, 2008).

A ovinicultura australiana sofreu e continua a sofrer uma reestruturação significativa, com uma reponderação do valor da indústria de carne em relação ao valor obtido a partir de lã. Além disso, tem havido um declínio constante do tamanho da população de ovinos nos últimos 20 anos (Curtis, 2009).

Em 1989/90 a Austrália contava com cerca de 180 milhões de ovinos e em 2000/01 este número foi reduzido para aproximadamente 115 milhões (Western Australian Sheep Statistics – ABS - *Australian Bureau of Statistics, Department of Agriculture and Food*). Estes dados demonstram a diminuição que o efectivo ovino tem vindo a sofrer nestes últimos anos.

Actualmente a ovinicultura na Austrália representa cerca de 30% do valor total da produção animal e suporta duas grandes indústrias: a indústria da lã, que prevalece, sendo o Merino Australiano a raça predominante, e a indústria da carne, cujo interesse tem vindo a aumentar nos últimos anos. A indústria de carne ovina tem sofrido um excelente crescimento no valor da produção e no valor das exportações nos últimos anos. Dados de 2004/05 indicam que a contribuição da indústria da carne de ovino aumentou 47% relativamente aos valores de 2000/01 (Western Australian Sheep Statistics – ABS, *Department of Agriculture and Food*).

De acordo com dados da ABS relativos ao ano 2007/2008, a Austrália conta com aproximadamente 85,71 milhões de ovinos, produzindo aproximadamente 435,400 toneladas de carne e 258,500 toneladas de lã.

A Austrália apresenta um clima variado que oscila entre o temperado e o tropical. A maior parte do seu território, em especial o interior e a zona ocidental, apresenta características desérticas, com precipitações muito escassas e temperaturas elevadas, com grandes amplitudes diurnas e anuais. As explorações comerciais de ovinos da Austrália enfrentam durante o ano flutuações extremas na quantidade e qualidade dos alimentos disponíveis para os animais, o que resulta em variações sazonais no peso vivo dos animais (Kilminster, 2007).

A raça Dorper da África do Sul, desenvolvida para sobreviver em ambientes adversos e sob má nutrição, tem vindo a ser introduzida na Austrália pois parece apresentar menores variações sazonais no seu peso vivo quando comparada com a raça Merino Australiano (Brand, 2000; Cloete *et al.*, 2000).

O interesse nesta raça tem vindo a aumentar e poderá constituir uma alternativa à produção de animais da raça Merino Australiano.

Por esta razão, no desenvolvimento deste trabalho experimental foi colocada a hipótese de que os animais da raça Dorper teriam um melhor desempenho nutricional que os animais da raça Merino quando alimentados para ganhar ou perder peso.

### 3. A Raça Merino Australiano

A raça Merina, conhecida pela sua lã fina, teve origem em Espanha e manteve durante séculos o monopólio da produção de lã. No entanto, no fim do século XVIII os Merinos espalharam-se por outros países e Espanha perdeu a sua reputação de produtora de ovinos de lã fina para a Austrália (Belonje e Vosloo, 1972; Gillespie e Flanders, 2009).



**Figura 1** - Ovino da Raça Merino Australiano

O Merino Australiano (Figura 1) apresenta uma constituição forte, com bom desenvolvimento corporal. Possui um elevado grau de adaptabilidade a regiões pobres e climas desfavoráveis.

#### **Origem da raça**

A primeira importação de ovinos a chegar à Austrália data de 1788, no entanto estes animais acabaram por não sobreviver. Posteriormente, em 1797, foram introduzidos com sucesso Merinos, provenientes da Alemanha, com o objectivo de produzir lã (Fraser e Stamp, 1989; Hinton, 2006). Estes animais são considerados como a origem de uma indústria que, hoje, torna a Austrália o maior produtor e exportador de vestuário de lã de alta qualidade, e um grande exportador de borrego para mercados mundiais.

A Austrália importou Merinos de todas as variedades existentes: Electoral, Negrettis, Rambouillets, Vermonts, etc. O Merino Australiano foi constituído pela mistura dessas variedades, com as seguintes proporções aproximadas: 25% de Merino Espanhol, 40% de Vermont Americano, 30% de Electoral e Negretti Alemães, 5% de Rambouillet Francês (Corradello, 1988)

A raça Merino Australiano foi desenvolvida através de selecção e cruzamentos, dando especial atenção ao impacto do ambiente nos próprios animais e no seu velo. O

Merino Australiano resulta assim de uma selecção projectada para produzir lã de alta qualidade sob condições ambientais adversas (D'Arcy, 1990).

Actualmente a raça Merino Australiano constitui a principal raça de ovinos da Austrália, representando cerca de 75% do efectivo ovino australiano (*Year Book Australia 2003 - Australian Bureau of Statistics*).

### **Características produtivas**

Durante séculos, os ovinos da raça Merino Australiano foram apreciados pela sua produção de lã de excelente qualidade aliada à sua rusticidade. Mais recentemente, com a queda no valor comercial da lã, a estratégia de melhoramento para a produção de carne passou a ser favorecida (Diez-Tascón *et al.*, 2000; Hinton, 2006; Almeida, 2008). A principal produção desta raça é obviamente a lã, sendo a carne considerada um subproduto (Degois, 1985; D'Arcy, 1990; Almeida, 2008). A raça possui assim aptidão para a produção de lã, embora a selecção para melhorar a qualidade da carcaça, possa tornar este Merino, uma raça de dupla aptidão.

É um ovino de grande produção, bom rendimento económico e bem adaptado às condições naturais e ao sistema de exploração extensivo.

Como toda raça produtora de lã, o Merino Australiano resiste bem a condições adversas, com pouca disponibilidade de alimentos de qualidade. O seu denso velo funciona como verdadeiro isolante térmico.

Na indústria da carne, cujo interesse tem vindo a aumentar, os animais Merinos são utilizados em cruzamentos com carneiros de diversas raças britânicas (Border Leicester, Dorset, Romney Marsh, etc.), com o objectivo de produzir borregos precoces, corpulentos e de crescimento rápido (Hinton, 2006). Dados de 2000/01, indicam que cerca de 12% do efectivo ovino australiano é constituído por animais resultantes destes cruzamentos, sendo a produção de carne o principal objectivo (*Year Book Australia 2003 - Australian Bureau of Statistics*).

Neste trabalho utilizaram-se ovinos Peppin Merino. O Peppin Merino foi desenvolvido em 1860, com o objectivo de se produzir um ovino forte e robusto, com elevada capacidade de adaptação a condições adversas. Pelas suas características específicas o Peppin acabou por ocupar as zonas mais áridas da Austrália e actualmente representa um dos

principais ovinos produzidos por toda a Austrália. São animais muito valorizados pela sua capacidade de adaptação a regiões secas. O Peppin Merino é predominante nos rebanhos de ovinos da Austrália do Sul e Austrália Ocidental (Hinton, 2006). Produzem cerca de 10 kg de lã por ano, de qualidade média, com 20-23 µm e aproximadamente 80-90 mm de comprimento.

#### **4. A Raça Dorper**

A raça Dorper é uma raça ovina de crescimento rápido, utilizada para produção de carne.

A necessidade de produzir ovinos com crescimentos rápidos e ao mesmo tempo com elevada qualidade da carcaça levou ao aparecimento desta nova raça (Milne, 2000).



**Figura 2** - Ovino da Raça Dorper

O Dorper (Figura 2) é um animal bem conformado, tolerante a parasitas, doenças e climas secos e que apresenta performances zootécnicas elevadas.

#### **Origem da raça**

A raça Dorper foi desenvolvida na África do Sul, na década de 40, a partir de cruzamentos progressivos entre as raças Dorset Horn e Black Head Persian, com o objectivo de produzir carne de qualidade em condições tropicais (Cloete *et al.*, 2000; Almeida, 2008).

Devido ao desempenho excepcional do Black Head Persian, especialmente sob duras condições ambientais, esta raça foi seleccionada como raça mãe. Para raça paterna seleccionou-se o Dorset Horn, pelas suas extraordinárias performances reprodutivas ao longo do ano (Milne, 2000). Trata-se assim de uma raça de síntese resultante do cruzamento Dorset×Persian (de Waal e Combrinck, 2000; Milne, 2000, Knights, 2010). O seu nome resulta da junção das primeiras sílabas dos seus progenitores.

Actualmente é a segunda raça mais popular na África do Sul e constitui um dos exemplos de maior sucesso dos programas de melhoramento genético animal neste país.

A raça está bem adaptada a uma grande variedade de condições climáticas e pastagens. Originalmente, a raça foi desenvolvida para as zonas mais áridas da África do Sul, mas actualmente a raça Dorper encontra-se distribuída por toda a África Central e África do Sul bem como noutros continentes, como a América do Norte e Austrália (Cloete *et al.*, 2000; Milne, 2000). Embora desenvolvido para regiões extensivas responde bem a condições intensivas de produção. Cloete *et al.*, (2000) demonstraram isso mesmo no seu trabalho de revisão, concluindo que a raça Dorper é uma das raças de ovinos mais adaptada e capaz de manter níveis de produção bastante aceitáveis numa vasta variedade de condições e ambientes.

### ***Características produtivas***

As características de robustez, adaptabilidade e as elevadas taxas de crescimento desta raça depressa levaram a uma enorme popularidade. As suas exigências nutricionais são baixas quando comparados com outros animais produtores de carne (Knights, 2010).

O Dorper é uma animal grande, bem conformado. Pode apresentar a cabeça preta (Dorper) ou branca (White Dorper) e o corpo é branco (Almeida, 2008, Knights, 2010).

Relativamente a hábitos alimentares o Dorper é capaz de utilizar uma grande variedade de espécies vegetais quando comparado com outras raças de ovinos como o Merino, o que demonstra a menor selectividade desta raça em condições extensivas. Quando existem limitações em termos nutricionais, a raça Dorper é capaz de seleccionar pastagens de menor qualidade que o Merino, apresentando assim uma maior capacidade de ingestão e adaptação a diferentes forragens (Brand, 2000).

Resultados apresentados por Brand (2000) evidenciam ainda que existem diferenças no comportamento de pastagem destas duas raças. O Dorper, apesar da sua capacidade para percorrer longas distâncias em busca de alimentos só o faz em casos extremos. O tempo que estes animais passam a pastar também se revelou menor quando comparado com animais da raça Merino.

Mais recentemente, em 2007, Kilminster, comparou as performances de crescimento de animais das raças Dorper e Merino Australiano, entre outras. Neste trabalho parece ter ficado demonstrada uma superioridade da raça Dorper face à raça Merino, evidenciando

pesos vivos aos 40 dias de 18,6 kg e 15,7 kg para borregos machos Dorper e Merino respectivamente. Aos cinco meses, os borregos machos pesavam uma média de 38,5 kg para a raça Dorper e de 31 kg para a raça Merino, o que se traduz em ganhos médios diários 181 e 139 g/dia, respectivamente (Kilminster, 2007).

O Dorper constitui assim uma raça de importância mundial na produção ovina em climas secos. Na Austrália, a raça Dorper poderá ser encarada como uma alternativa à produção de Merinos Australianos, sobretudo se os preços da carne continuarem a subir e os preços da lã a descer. Actualmente, o Dorper é uma das raças mais utilizadas para a produção de carne na Austrália (Almeida, 2008).

## **5. A restrição alimentar**

Em regiões tropicais os animais estão sujeitos a perdas sazonais de peso, como já descrevemos anteriormente. As situações de carência alimentar sazonal nas regiões tropicais são a principal causa da subnutrição dos animais. A restrição alimentar constitui a principal condição experimental deste trabalho, uma vez que pretendemos relacionar o seu efeito com as respostas fisiológicas verificadas ao nível da expressão dos genes que codificam para a síntese de enzimas chave do metabolismo intermediário.

O efeito da restrição alimentar no metabolismo intermediário é há muito tempo alvo de diversos estudos de investigação.

Feuers *et al.*, já em 1988, estudavam os efeitos da restrição calórica nas várias enzimas hepáticas intervenientes no metabolismo energético, utilizando ratos como animal experimental.

Entretanto, vários estudos têm sido desenvolvidos de forma a investigar os efeitos da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo intermediário (Hotta *et al.*, 1991; Nur *et al.*, 1995; Kim e Freake, 1996; Tillman *et al.*, 1996; Dhahbi *et al.*, 1999; Wetter *et al.*, 1999; Hagopian *et al.*, 2003a e 2003b; Velez e Donkin, 2005; Ugochukwu e Figgers, 2006), e sugeriram que a condição de restrição alimentar pode diminuir a actividade das enzimas glicolíticas e aumentar a capacidade da neoglucogénese hepática, conduzindo também a uma eliminação dos produtos do catabolismo proteico.

Mais recentemente, van Harten e Cardoso (2010) estudaram os fenómenos enzimáticos do metabolismo intermediário utilizando como modelo experimental duas raças de coelhos sujeitas a diferentes condições nutricionais.

Pretendemos neste trabalho estudar as possíveis diferenças nos fenómenos do metabolismo intermediário nas duas raças de ovinos, Dorper e Merino Australiano, alimentadas *ad libitum* e sujeitas a restrição alimentar.

## **6. O metabolismo intermediário e as enzimas reguladoras**

A regulação do metabolismo é fundamental para que um organismo possa responder de modo rápido e eficiente a variações das condições ambientais, alimentares ou patológicas. A regulação metabólica é feita pela acção de enzimas reguladoras de processos metabólicos chave, para que se possa activar ou inibir reacções químicas específicas para cada situação, resultando em respostas biológicas adequadas.

As enzimas reguladoras possuem propriedades específicas que fazem com que lhes seja atribuído um papel regulador no metabolismo, uma vez que aumentam ou diminuem a sua actividade em resposta a certos sinais. Esta regulação é essencial pois permite regular a actividade inteira da via metabólica, possibilitando a célula ajustar-se às suas necessidades energéticas e biomoleculares. Uma enzima reguladora é inibida pelo seu próprio produto; sempre que a concentração do seu produto no interior celular sobe acima de seu nível normal, ela passa a inibir temporária e reversivelmente.

O presente trabalho abrange os percursos metabólicos dos glúcidos, lípidos e proteínas dentro do metabolismo intermediário. As várias enzimas reguladoras do metabolismo intermediário desempenham papéis fundamentais e serão descritas e analisadas ao longo deste trabalho.



## **7. O metabolismo intermediário dos ruminantes**

Antes de fazer uma descrição pormenorizada das diversas vias metabólicas há que fazer referência à nutrição dos ruminantes e às suas características digestivas específicas, que determinam padrões metabólicos próprios desta espécie.

A nutrição dos ruminantes pode ser considerada mais complexa que a nutrição dos monogástricos. O sistema digestivo das espécies ruminantes apresenta adaptações para o bom aproveitamento dos alimentos vegetais. Os ruminantes apresentam uma digestão altamente especializada, que lhes permite um maior acesso à energia proveniente dos alimentos fibrosos quando comparados com os demais herbívoros (Soest, 1994; Kozloski, 2002).

A principal característica destes animais é o consumo de fibras (celulose e hemicelulose), obtidas das gramíneas e leguminosas, e como não possuem sistema enzimático capaz de hidrolisar estes polissacáridos, necessitam de um conjunto de microrganismos que façam a digestão das fibras. O estômago dos ruminantes é constituído por quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. O rúmen é o maior dos quatro compartimentos e fornece o ambiente propício e fonte alimentar para o crescimento e reprodução dos microrganismos. A ausência de oxigénio no rúmen favorece o crescimento de algumas bactérias em particular, e algumas delas conseguem degradar a parede celular das plantas em açúcares simples (glucose). Os microrganismos fermentam a glucose para obter energia para crescer e durante o processo de fermentação produzem ácidos gordos voláteis. Estes ácidos orgânicos atravessam a parede ruminal e são a principal fonte de energia dos ruminantes (Andriquetto, 1981; Russell *et al.*, 1992; Hobson e Stewart, 1997; Kozloski, 2002).

O metabolismo intermediário das espécies ruminantes é assim desviado da utilização da glucose para os ácidos gordos voláteis.

## **8. Metabolismo Glucídico**

Os glúcidos são peças fundamentais no metabolismo energético. Nos ruminantes representam 70 a 80% da dieta do animal e são fundamentais para satisfazer as suas necessidades de energia, síntese de proteína microbiana, manutenção e saúde do animal, além das exigências para a produção (Andriquetto, 1981; Kozloski, 2002).

Podem ser classificados, quanto à sua utilização pelos animais, em fibrosos (celulose e hemicelulose) e não fibrosos (amido, açúcares e pectina). Os primeiros são caracterizados por uma digestão mais lenta, ao passo que os segundos caracterizam-se pela rápida degradação no rúmen.

A fermentação dos glúcidos no rúmen dá origem à produção de ácidos gordos voláteis, que representam a principal fonte de energia para os ruminantes, atendendo até 80% das exigências diárias de energia do animal (Kozloski, 2002; Paulino e Sartori, 2006). Os principais ácidos gordos voláteis produzidos pelos microrganismos do rúmen são o ácido acético, o ácido propiónico e o ácido butírico. Em dietas alimentares à base de forragem, a proporção de ácidos gordos voláteis é de aproximadamente 65-70% de ácido acético, 15-25% de ácido propiónico e 5-10% de ácido butírico (Andriquetto, 1981). A energia presente nos ácidos gordos é cerca de 75 a 80% da energia originalmente presente nos glúcidos fermentados (Kozloski, 2002).

Do ponto de vista bioquímico a glucose é utilizada como principal fonte de energia para os ruminantes num número reduzido de órgãos. Apesar da grande oferta de ácidos gordos voláteis para os tecidos, o sistema nervoso central requer glucose para satisfazer as suas exigências energéticas. Uma desvantagem do metabolismo microbiano dos ruminantes é que todos os glúcidos provenientes da dieta são transformados em ácidos gordos voláteis e muito pouca glucose chega ao intestino para ser absorvida. Como consequência, os ruminantes são dependentes da neoglucogénese para a manutenção dos níveis de glucose no sangue (Paulino e Sartori, 2006).

O ácido acético será o maior precursor para a lipogénese, o ácido propiónico o maior precursor para a neoglucogénese, sendo responsável pela produção de 50% de glucose no fígado, e o ácido butírico será utilizado para satisfazer as necessidades energéticas (Andriquetto, 1981).

O fígado é um órgão vital na regulação do metabolismo energético, desempenhando um papel fundamental na manutenção do equilíbrio entre a captação, síntese e armazenamento da glucose e a degradação da mesma. Isto exige a regulação de duas importantes vias metabólicas, a neoglucogénese e a glicogenólise, que produzem glucose no fígado. Além disso, as vias metabólicas opostas, de utilização da glucose, a glicólise e a glicogénese, também devem ser reguladas (Rosa *et al.*, 1992; Nordlie *et al.*, 1999; Campbell, 2008). Na Figura 3 estão representadas esquematicamente as enzimas reguladoras que foram abordadas dentro das diversas vias metabólicas do metabolismo dos glúcidos.

## **Glicólise**

A maior parte dos monossacáridos que entram na célula microbiana são fermentados pelas bactérias ruminais pela via glicolítica (Hobson e Stewart, 1997; Kozloski, 2002). A glicólise ou via de Embden-Meyerhof, é uma via metabólica na qual a uma molécula de glucose é convertida em duas moléculas de ácido pirúvico com síntese de ATP. No entanto, apenas uma pequena percentagem da energia total contida na glucose é conservada sob a forma de ATP durante a glicólise, visto que a glucose é apenas parcialmente oxidada. Esta reacção ocorre no citosol e o balanço global da glicólise é:



O ácido pirúvico é o principal intermediário metabólico no rúmen e é formado através do catabolismo de açúcares pelas bactérias ruminais. A partir do piruvato várias vias metabólicas podem ser utilizadas até á formação dos produtos finais de fermentação, que são principalmente os ácidos gordos voláteis, o dióxido de carbono e o metano (Hobson e Stewart, 1997). A quantidade e a proporção dos produtos finais da fermentação bacteriana ruminal pode ser amplamente variável e depende principalmente da composição da dieta que chega ao rúmen (Kozloski, 2002).

No metabolismo glucídico, são específicas da glicólise as seguintes enzimas reguladoras:

### Hexocinase (EC 2.7.1.1) - HK

Enzima que catalisa a primeira reacção da glicólise, a fosforilação da glucose a glucose-6-fosfato.



Nos tecidos animais é possível encontrar quatro isoenzimas da hexocinase, com propriedades distintas, designadas por hexocinases I, II, III e IV ou hexocinases A, B, C e D. No fígado estão presentes duas das quatro isoenzimas, a hexocinase I e hexocinase IV, também conhecida por glucoquinase. No entanto é a glucoquinase que representa a maior expressão da hexocinase neste órgão, desempenhando assim um importante papel regulador no metabolismo dos glúcidos no fígado (Vischer *et al.*, 1987; Nordlie *et al.*, 1999).

### Fosfofructocinase (EC 2.7.1.11) - PFK

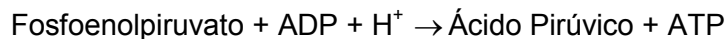
A fosfofructocinase é a enzima responsável pela reacção de fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato, que representa um dos passos mais importantes da glicólise. Por esta razão a fosfofructocinase é considerada a enzima chave da regulação da glicólise (Dunaway *et al.*, 1988; Maughan, 2005).



É formada por quatro subunidades e existem três isoformas da fosfofructocinase, específicas de cada tecido: a PFK tipo A, expressa no músculo, a PFK tipo B, específica do fígado, e a PFK tipo C, presente no cérebro, rins etc. (Dunaway *et al.*, 1988).

### Piruvato-Cinase (EC 2.7.1.40) - PK

Enzima que catalisa a última reacção da glicólise, que conduz à formação do ácido pirúvico.



A Piruvato-Cinase constitui também uma enzima chave no controlo da glicólise. Possui quatro isoenzimas: L (predominantemente expressa no fígado), R (restrita aos glóbulos vermelhos), M1 (expressa essencialmente no músculo); e M2 (que corresponde à única forma detectável nos tecidos fetais e que, durante o desenvolvimento, é gradualmente substituída pelos restantes tipos). Todas as isoformas da Piruvato-Cinase são citosólicas e constituídas por quatro subunidades (Yamada e Noguchi, 1999).

### **Neoglucogénese**

A neoglucogénese constitui a via metabólica inversa da glicólise, convertendo o ácido pirúvico em glucose. Ocorre no citosol, tal como a glicólise, excepto a primeira reacção que ocorre na mitocôndria. Esta via metabólica é essencial para a produção de glucose e ocorre predominantemente no fígado ou no rim em casos de subnutrição, quando as reservas de glicogénio se esgotam (Van Schaftingen e Gerin, 2002; Maughan, 2005;

Campbell, 2008). No caso dos ruminantes existem, nesta fase, algumas diferenças significativa. Os ácidos gordos voláteis constituem os principais produtos finais da digestão fermentativa dos glúcidos, e toda a glucose disponível para o animal ruminante é originária da neoglucogénese. Por outro lado, a mobilização das reservas de glicogénio hepático nos ruminantes é pouco significativa. Deste modo, os animais ruminantes vivem num estado contínuo de neoglucogénese (Kozloski, 2002). O ácido propiónico é o ácido gordo precursor para a síntese de glucose no fígado.

Esta via metabólica não segue em sentido inverso à via da glicólise pois as três reacções acima descritas não são reversíveis e portanto, a estes níveis a neoglucogénese utiliza reacções catalisadas por enzimas diferentes.

Com intervenção no sentido da neoglucogénese, identificam-se as seguintes enzimas reguladoras:

#### Piruvato-Carboxilase (EC 6.4.1.1) – PC

Trata-se de uma enzima mitocondrial, sendo que as restantes enzimas da neoglucogénese são citoplasmáticas. É constituída por quatro subunidades e catalisa a reacção de carboxilação do ácido pirúvico a ácido oxaloacético. A Piruvato-Carboxilase está dependente da presença de biotina (Jitrapakdee e Wallace, 1999). A biotina é um cofactor responsável pela transferência de dióxido de carbono. Na reacção catalisada pela Piruvato-Carboxilase, a biotina capta uma molécula de dióxido de carbono e transfere-a para uma molécula de piruvato, formando o ácido oxaloacético.

Verifica-se actividade mais elevada desta enzima no fígado e no rim (tecidos gluconeogénicos), no tecido adiposo e em menor grau no cérebro e coração (Jitrapakdee e Wallace, 1999).

#### Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase (EC 4.1.1.32) – PEPCK

A Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase catalisa a reacção de descarboxilação fosforilante do ácido oxaloacético a ácido fosfoenolpirúvico, em presença de guanosina-trifosfato (GTP).

Esta enzima apresenta duas isoformas: a mitocondrial, PEPCKm, e a citosólica, PEPCKc (Hanson e Reshef, 1997). O ácido oxaloacético gerado na mitocôndria pela Piruvato-Carboxilase pode ser convertido em ácido fosfoenolpirúvico através da isoforma

mitocondrial. Alternativamente, o ácido oxaloacético pode ser reduzido a ácido málico, por uma malato-desidrogenase, no interior da mitocôndria. Depois de transportado através da membrana mitocondrial, o ácido málico é reoxidado a ácido oxaloacético, no citosol, onde a isoenzima citosólica pode converter o ácido oxaloacético a ácido fosfoenolpirúvico (Campos, 2002). O gene da PEPCKc é expresso na maioria dos tecidos animais, excepto no fígado e no rim (Hanson e Reshef, 1997).

A soma das duas reacções acima descritas pode escrever-se resumindo:



#### Frutose-1,6-Difosfatase (EC 3.1.3.11) – FBP

Trata-se de uma enzima chave da neoglucogénese e catalisa a hidrólise irreversível da frutose-1,6-difosfato à frutose-6-fosfato. Existem pelo menos três isoformas distintas da frutose-1,6-difosfatase, expressas no cérebro, no músculo e no fígado. A isoenzima expressa no fígado é reconhecida como sendo uma das principais enzimas reguladoras da neoglucogénese, e é formada por quatro unidades idênticas (Yáñez *et al.*, 2003). O gene FBP1 é expresso predominantemente no fígado e rins, ao passo que o gene FBP2 é específico para o músculo (Tillmann *et al.*, 2002).

#### Glucose-6-Fosfatase (EC 3.1.3.9) – G6P

É reconhecido que a glucose-6-fosfatase é uma enzima multifuncional e que é formada por um sistema complexo de várias componentes. É predominantemente expressa no fígado e rins e desempenha o importante papel de fornecer glucose. A última etapa da neoglucogénese, a hidrólise da ligação éster da glucose-6-fosfato, é a principal função da glucose-6-fosfatase (Nordlie *et al.*, 1999; Dhahbi *et al.*, 2001; Van Schaftingen e Gerin, 2002).



A regulação dos processos da glicólise está intimamente conjugada com a regulação da neoglucogénese, pois ambos os processos têm lugar no mesmo compartimento celular, com várias reacções comuns.

## ***Glicogenólise e Glicogénese***

Ainda no metabolismo glucídico há considerar o metabolismo do glicogénio.

O glicogénio é, nos animais, uma forma de armazenamento de glucose facilmente mobilizável (Bollen *et al.*, 1998; Campbell, 2008). Como já foi referido, as reservas de glicogénio hepático para os animais ruminantes são praticamente insignificantes (menos de 3% do peso seco do fígado). Apesar disso, as vias metabólicas referentes ao metabolismo do glicogénio foram abordadas neste trabalho: a **glicogenólise**, que consiste na degradação do glicogénio, e a via metabólica oposta de síntese do glicogénio, a **glicogénese**. O mecanismo geral de síntese e degradação do glicogénio é idêntico em todos os tecidos (Bollen *et al.*, 1998).

As enzimas que catalisam directamente estas reacções são, respectivamente:

### Glicogénio-Fosforilase (EC 2.4.1.1) – GP

A primeira reacção da degradação do glicogénio requer a acção da glicogénio-fosforilase.

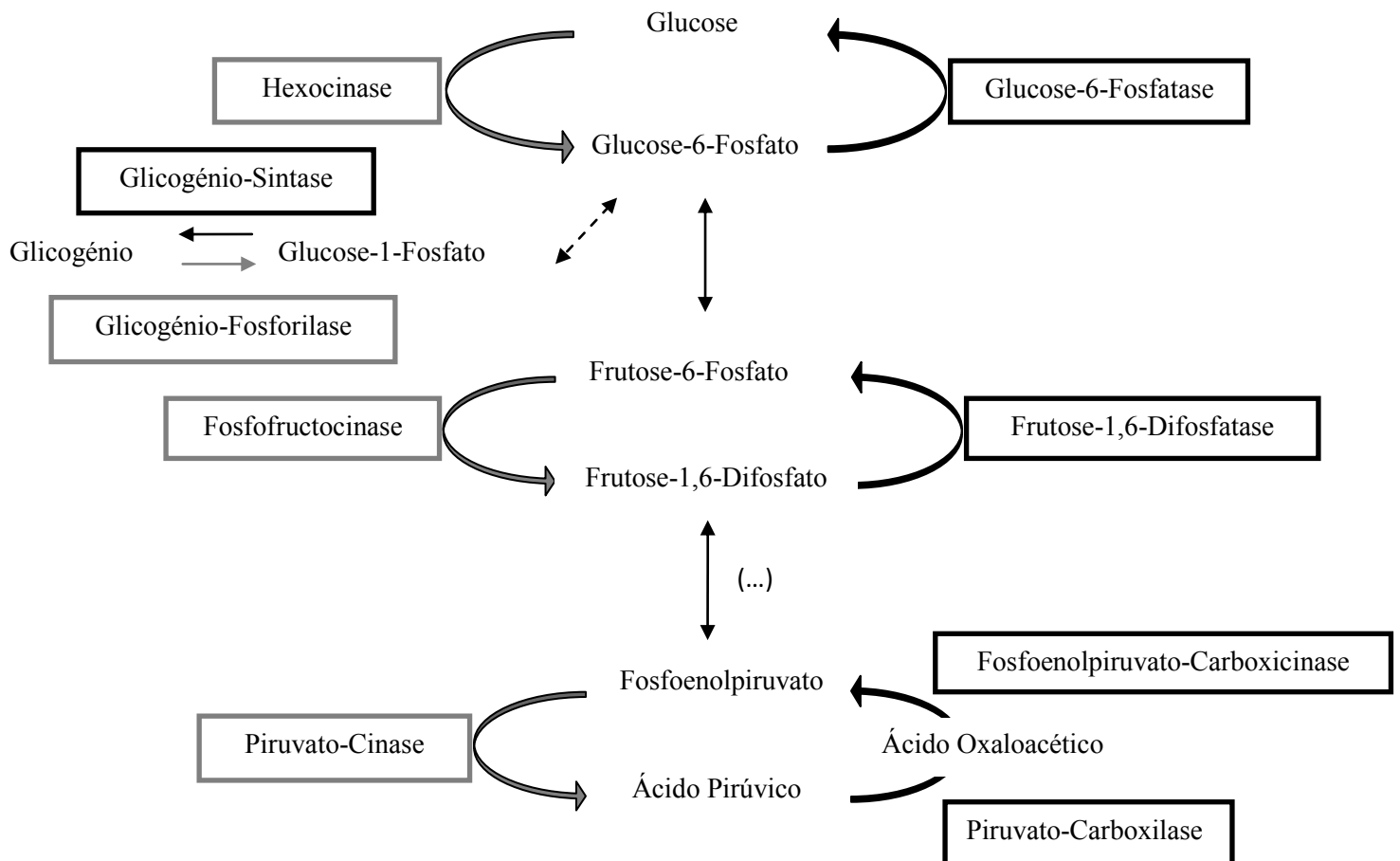
Nos mamíferos existem três principais isoenzimas da glicogénio-fosforilase, que são encontradas no músculo, no fígado e no cérebro, expressas por diferentes genes. Todas as isoenzimas são convertidas de uma forma inactiva (b) para uma forma activa (a) através da fosforilação da Ser<sup>14</sup> pela fosforilase-quinase (Bollen *et al.*, 1998; Campbell, 2008).

### Glicogénio-Sintase (EC 2.4.1.11) – GS

A glicogénio-sintase é a principal enzima limitante da formação do glicogénio, catalisando a reacção de síntese do glicogénio a partir da glucose-6-fosfato, proveniente da glicólise.

Foram identificadas duas isoenzimas da glicogénio-sintase, a glicogénio-sintase1, amplamente expressa no músculo e noutros tecidos e codificada pelo gene GYS1, e a glicogénio-sintase2, restrita ao tecido hepático e expressa pelo gene GYS2. O glicogénio hepático tem uma função fisiológica distinta do glicogénio muscular. O glicogénio hepático é convertido em glucose para manter o nível de glicemia em situações de jejum, ao passo que o glicogénio muscular funciona como reserva energética para a contracção muscular, fornecendo energia durante períodos intensos de actividade (Wang *et al.*, 1986).

Estas duas enzimas actuam simultaneamente e em sentidos opostos. Em consequência do aumento de concentração de glucose, ocorre a inactivação da glicogénio-fosforilase e activação da glicogénio-sintase. Deste modo fica perfeitamente articulada a regulação dos processos de degradação e síntese do glicogénio.



**Figura 3** - Enzimas reguladoras do Metabolismo dos Glúcidos (adaptado de: Nordlie *et al.*, 1999, Dhahbi *et al.*, 1999 e 2001; Maughan, 2005; Campbell, 2008)

## 9. Metabolismo Lipídico

Outra grande fonte energética no organismo são os lípidos. Os ácidos gordos são componentes essenciais de todas as membranas biológicas e representam uma importante reserva energética (Smith, 1994).



Os ácidos gordos necessários ao organismo podem ter origem na dieta alimentar, ou ter uma origem endógena, isto é, serem formados a partir dos glúcidos ou ainda a partir de alguns aminoácidos. Podem ser oxidados imediatamente após a absorção pelo intestino, ou serem armazenados como triglicéridos no tecido adiposo e utilizados mais tarde em situações de carência alimentar (Ducharme e Bickel, 2008).

Os ácidos gordos constituem assim um importante combustível metabólico, em particular para o tecido muscular. São utilizados por todos os tecidos (excepto o cérebro) em condições normais e são usados exclusivamente por alguns tecidos sob condições de restrição alimentar (McDonald, 1998).

As principais vias metabólicas do metabolismo dos lípidos abordadas neste estudo são a lipogénese, a lipólise e a cetogénese. Na Figura 4 evidenciam-se esquematicamente as enzimas reguladoras que foram abordadas dentro das diversas vias metabólicas do metabolismo dos lípidos.

### ***Lipogénese***

A lipogénese corresponde à formação de ácidos gordos a partir da glucose e é considerada uma via metabólica de extrema relevância quando existe uma ingestão elevada de glúcidos no contexto de uma dieta pobre em ácidos gordos. Assim se o valor calórico dos glúcidos da dieta exceder a despesa energética, os glúcidos em excesso são convertidos em ácidos gordos (Towle, 1995; Kersten, 2001; Maughan, 2005; Campbell, 2008). Na maioria dos sistemas metabólicos os ácidos gordos são derivados da glucose, e o ácido acético representa a maior fonte de carbono para a síntese de ácidos gordos em ruminantes. A lipogénese é um processo extra-mitocôndrial e o acetil-CoA é o substrato da lipogénese. Nos ruminantes, o ácido acético é absorvido directamente pelo epitélio ruminal ou intestinal e é transformado em acetil-CoA, na presença de acetil-CoA sintetase. Comparativamente com outros tecidos, a lipogénese é mais activa no fígado e no tecido adiposo (Campbell, 2008). Nos ruminantes, cerca de 90% da síntese de gordura ocorre no tecido adiposo e a síntese realizada no fígado contribui apenas com 5% (Pearce, 1983).

Os ácidos gordos formados combinam-se com o glicerol para formar triglicéridos.

As principais enzimas reguladoras envolvidas na síntese dos ácidos gordos são:

#### Acetil-CoA-Carboxilase (EC 6.4.1.2) – ACOAC

É uma ligase, que tem como cofactor a biotina e que catalisa o primeiro passo da síntese dos ácidos gordos, a reacção de carboxilação do acetil-CoA a malonil-CoA. Trata-se portanto de uma enzima determinante na formação de ácidos gordos, e a sua actividade está directamente relacionada com o estado nutricional em que o organismo se encontra (Majerus e Kilburn, 1969).

Para a acetil-CoA-carboxilase foram identificadas duas isoformas enzimáticas: a ACOAC- $\alpha$ , envolvida na síntese dos ácidos gordos, e a ACOAC- $\beta$ , responsável pela oxidação dos ácidos gordos na mitocôndria. A ACOAC- $\alpha$  é expressa na maioria dos tecidos, mas demonstra maior expressão génica nos tecidos lipogénicos do fígado, no tecido adiposo e na glândula mamária, durante a lactação. A ACOAC- $\beta$  é a isoforma expressa no coração e no músculo-esquelético (Majerus e Kilburn, 1969; Travers *et al.*, 2001).

#### Sintase de Ácidos Gordos (EC 2.3.1.85) – FAS

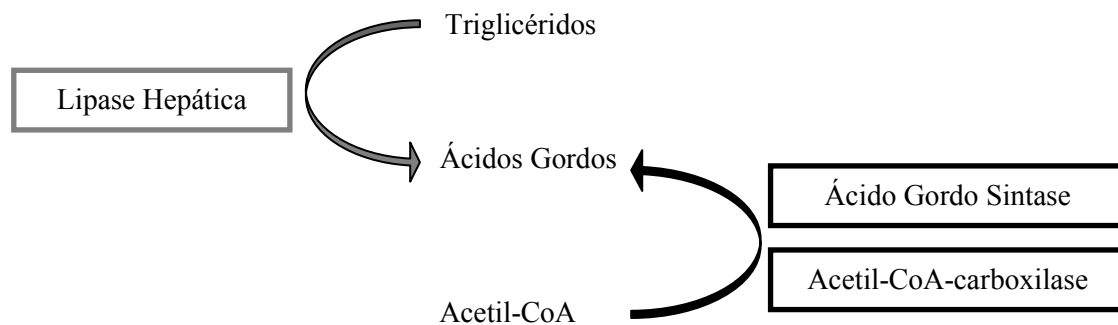
Complexo enzimático central envolvido na síntese dos ácidos gordos, que catalisa todas as etapas na conversão do malonil-CoA, produto da carboxilação do acetil-CoA, até à síntese do ácido palmítico (Joseph *et al.*, 2002). Este complexo enzimático contém 7 actividades catalíticas distintas que operam sequencialmente. Durante este processo ocorre a libertação de dióxido de carbono. O palmitato libertado constitui a base para a síntese de outros ácidos gordos de cadeias mais longas, por adição sequencial de unidades de 2 carbonos (Smith, 1994).

#### **Lipólise**

É o processo pelo qual ocorre a degradação das reservas energéticas lipídicas, sob forma de triglicéridos, para a produção de energia (Ducharme e Bickel, 2008). Existem duas importantes enzimas envolvidas neste processo de hidrólise, a lipase hepática e a lipase lipoproteica (Doolittle *et al.*, 1987). Neste trabalho experimental apenas se estudou a lipase hepática.

### Lipase Hepática (EC 3.1.1.3) - HL

É uma glicoproteína responsável pela hidrólise dos triglicéridos das lipoproteínas e dos fosfolípidos em mono e diglicéridos (Doolittle *et al.*, 1987; Sanan *et al.*, 1997), que são posteriormente convertidos em glicerol e ácidos gordos, e lançados na circulação sanguínea. O glicerol e os ácidos gordos formados são utilizados como substratos para a neoglucogénese e cetogénese, respectivamente, no fígado (Ducharme e Bickel, 2008).



**Figura 4** – Enzimas reguladoras do Metabolismo dos Lípidos (adaptado de: Kersten, 2001)

### **Cetogénese**

Se predominar a oxidação dos lípidos sobre o catabolismo glucídico, a concentração de ácido oxaloacético baixa, e o Acetil-CoA, não podendo entrar no ciclo de Krebs é convertido em ácido acetoacético, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico e acetona, designados por corpos cetónicos. Os corpos cetónicos são posteriormente utilizados no músculo. Observa-se a formação anormal de corpos cetónicos quando o regime alimentar é exageradamente rico em lípidos (Bergman, 1971; Campos, 2002).

A cetogénese nos mamíferos ocorre no fígado, com posterior libertação dos corpos cetónicos para a corrente sanguínea e excreção na urina. Nos ruminantes, o butirato, resultante da digestão fermentativa dos glúcidos, é convertido em ácido  $\beta$ -hidroxibutírico. Desta forma, na espécie ruminantes, os corpos cetónicos não são apenas produtos do metabolismo dos ácidos gordos, mas também produtos da digestão normal, e combustíveis metabólicos importantes que ocupam uma parte integral do esquema da homeostase de combustíveis energéticos (Cunningham, 2004).

## 10. Metabolismo Proteico

As proteínas têm um papel fundamental no organismo e representam um dos principais componentes dos alimentos.

Os ruminantes são caracterizados pela presença de uma população microbiana que degrada grande parte da proteína e outros compostos azotados do alimento e que também utiliza compostos azotados não proteicos, como a ureia, para a síntese das suas próprias proteínas. Assim as principais consequências da fermentação ruminal, relativas aos compostos azotados, são a síntese de proteína microbiana e a produção de amoníaco no interior do rúmen (Kozloski, 2002).

A maior parte (cerca de 60 a 90%) do azoto consumido pelos animais é convertido em amoníaco pela actividade bacteriana ruminal. O fígado capta praticamente todo o amoníaco que chega até ele, e converte a maior parte dele em ureia, que é depois excretada na urina e na saliva (Kozloski, 2002).

O fígado é o local principal de todo o metabolismo azotado (Newsholme *et al.*, 2003). No organismo animal, as proteínas estão constantemente a ser sintetizadas e degradadas. Ao processo contínuo de síntese e degradação das proteínas dá-se o nome de reciclagem proteica. O sistema digestivo e o fígado possuem uma alta taxa de renovação proteica (aproximadamente 50%/dia nos ruminantes adultos), sendo responsáveis por, cerca de, 40% da síntese diária total de proteína do organismo. Na degradação das proteínas, cerca de 75-80% dos aminoácidos libertados são usados para nova síntese proteica e os restantes 20-25% são degradados (Kozloski, 2002).

Os aminoácidos, constituintes das proteínas, podem ser usados como precursores de moléculas biológicas azotadas, pois têm na sua constituição um grupo amina (Campbell, 2008). O excesso de aminoácidos da dieta não é armazenado nem excretado, mas sim convertido em ácido pirúvico, ácido oxaloacético e ácido  $\alpha$ -cetoglutárico. Consequentemente, os aminoácidos podem ser considerados verdadeiros “compostos energéticos”, pois são precursores da glucose, dos ácidos gordos e dos corpos cetónicos. Esta etapa constitui um importante ponto de contacto entre metabolismos glucídico, lipídico e proteico.

Existem aminoácidos que têm de ser necessariamente adquiridos pela ingestão de alimentos, pois não podem ser produzidos pelo corpo humano (aa essenciais), e outros cujo organismo é capaz de sintetizar a partir dos próprios produtos do catabolismo proteico (aa não-essenciais). Os animais ruminantes e não-ruminantes devem receber quantidades suficientes de aminoácidos essenciais para atender as suas necessidades de manutenção e de produção, porém, no caso dos ruminantes, a situação é mais complexa, pois os

alimentos sofrem transformações durante a fermentação ruminal, o que dificulta o conhecimento dos aminoácidos disponíveis para absorção (Alves, 2004). No caso dos animais ruminantes, os alimentos consumidos são inicialmente expostos à fermentação ruminal antes da digestão gástrica e intestinal. Os glúcidos e a proteína da dieta são degradados pelos microrganismos do rúmen e os produtos finais desse processo fermentativo (ácidos gordos voláteis e proteína microbiana) são utilizados pelo animal como fonte de energia e aminoácidos. Deste modo, em espécies ruminantes, a necessidade de aminoácidos a serem absorvidos no intestino é suprimida pela síntese de proteína microbiana no rúmen, pela proteína não-degradada no rúmen mas digerida no intestino e pela proteína endógena (Rossi Jr. *et al.*, 2007).

Assim no catabolismo proteico interessa-nos estudar as seguintes enzimas reguladoras (Figura 5):

#### Glutamato Desidrogenase (EC 1.4.1.3) – GDH

A glutamato desidrogenase desempenha um papel fundamental no metabolismo azotado (McGivan *et al.*, 1973; Parrilla e Goodman, 1975).

Para que os aminoácidos possam ser utilizados como fonte de energia, eles devem primeiramente sofrer uma remoção dos grupos amina. A transaminação consiste na transferência do grupo amina de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido e é catalisada por enzimas denominadas de aminotransferases. O primeiro passo no catabolismo dos aminoácidos é a transferência do seu grupo amina para o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, um intermediário do ciclo de Krebs. Os produtos dessa reacção são o ácido  $\alpha$ -cetoglutâmico, que pode entrar nas vias centrais do metabolismo energético, e o ácido glutâmico (Wright, 1995).

A desaminação oxidativa é o passo seguinte do catabolismo dos aminoácidos e é catalisada pela glutamato desidrogenase. No decurso do seu catabolismo os aminoácidos perdem os seus átomos de azoto que, não sendo utilizados pelo organismo para sintetizar novos aminoácidos ou outros produtos azotados, são, na sua maioria incorporados na ureia e excretados na urina (McGivan *et al.*, 1973). O amoníaco forma-se em todos os tecidos como resultado da remoção do grupo amina dos aminoácidos degradados, mas como é um composto extremamente tóxico para a maioria dos mamíferos terrestres é convertido em ureia, um composto não – tóxico, e portanto tolerável pelo organismo (Campbell, 2008). Assim, no fígado e no rim, a glutamato desidrogenase catalisa a reacção de desaminação oxidativa do ácido glutâmico, promovendo a libertação do amoníaco, utilizado

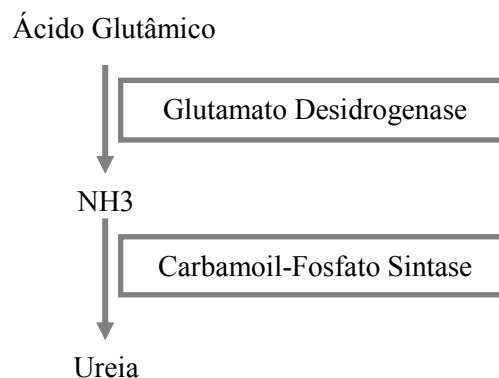
posteriormente na síntese da ureia (Wright, 1995). A glutamato desidrogenase está localizada na matriz mitocondrial (McGivan *et al.*, 1973).

#### Carbamoil-Fosfato Sintase (EC 6.3.4.16) - CPS

A carbamoil-fosfato sintase está envolvida no Ciclo da Ureia, que permite a síntese do composto orgânico ureia a partir de dois compostos inorgânicos, dióxido de carbono e iões amónio, resultantes da degradação dos aminoácidos (Van Beers *et al.*, 1998).

As duas primeiras reacções do ciclo da ureia ocorrem nas mitocôndrias e as restantes três no citosol. A primeira reacção inicia-se com a formação do Carbamoil Fosfato e é catalisada pela carbamoil fosfato sintase I (CPSI). É uma reacção irreversível, constituindo assim, um ponto importante de regulação de todo o ciclo (Thoden *et al.*, 1997).

Existem duas enzimas homólogas da carbamoil fosfato sintase I, a carbamoil fosfato sintase II e a carbamoil fosfato sintase III. Nos mamíferos apenas são expressas as isoenzimas I e II. A primeira é uma enzima exclusivamente intra-mitocôndrial, enquanto a segunda é encontrada no citosol (Van Beers *et al.*, 1998; Newsholme *et al.*, 2003).



**Figura 5** – Enzimas reguladoras do Metabolismo Proteico (adaptado de Dhahbi *et al.*, 1999 e 2001)

As isoformas enzimáticas expressas no fígado foram as isoformas consideradas ao longo deste trabalho experimental.

## 11. Metabolismo no estado alimentado

No estado alimentado existe uma entrada significativa na circulação de substratos após a ingestão de um alimento. Neste estado os nutrientes absorvidos podem ter três destinos: ser imediatamente utilizados como energia; entrar na síntese de componentes básicos necessários para o crescimento e manutenção de células e tecidos ou ser armazenados como glicogénio e gordura, garantindo energia para o período pós-absortivo (Paulino e Sartori, 2006). Nos ruminantes, esta condição é relativamente mais variável e mais demorada, quando comparada com os monogástricos, pois o alimento ingerido é previamente fermentado a taxas variáveis nos pré-estômagos e o fluxo de digesta torna-se relativamente mais constante. Esta fase pode, no caso dos ruminantes, durar até cerca de 8 horas após a ingestão do alimento, ao passo que nos monogástricos manter-se-ia apenas durante as primeiras 4 horas (Kozloski, 2002).

A glucose representa um combustível vital para o organismo e o fígado tem como função fornecer energia aos tecidos musculares, ao cérebro e a outros órgãos periféricos, desempenhando um papel central na regulação de todo o metabolismo intermediário. Quando a glucose não é ingerida na dieta cabe ao fígado gera-la a partir de outras fontes (Nordlie *et al.*, 1999; Gottschlich, 2000).

Logo que o organismo é alimentado, há um aumento do teor de glucose. A grande disponibilidade de glucose no sangue, proveniente de absorção intestinal, presente neste estado faz com que ela seja utilizada imediatamente como fonte de energia na maioria dos tecidos, pela glicólise (Paulino e Sartori, 2006). No entanto, no caso dos ruminantes, a glucose raramente é absorvida em quantidades significativas, sendo os ácidos gordos voláteis os principais nutrientes absorvidos. Deste modo a neoglucogénese hepática é um processo constante nos ruminantes e, inclusive, mais intensa no estado alimentado que no jejum (Kozloski, 2002). Após a ingestão de alimentos as substâncias nutritivas são absorvidas a partir do intestino: os glúcidos e lípidos são oxidados nos tecidos periféricos, a fim de permitir as reacções de síntese e manter as funções celulares. O excedente em relação às necessidades energéticas imediatas é armazenado. No músculo a glucose é convertida em glicogénio e a sua afluência ao tecido adiposo permite a síntese de lípidos de reserva. No estado alimentado, para além da síntese de ácidos gordos e de triglicéridos, a síntese proteica também está estimulada, principalmente no tecido muscular (Kozloski, 2002; Paulino e Sartori, 2006).

O metabolismo no estado alimentado é assim caracterizado por uma fase de armazenamento de combustíveis, ao mesmo tempo que há grande utilização imediata da glucose como fonte de energia (Paulino e Sartori, 2006).

## **12. Metabolismo na restrição alimentar**

Os ruminantes, como as demais espécies animais, mantêm-se num estado de equilíbrio dinâmico com o meio ambiente. Apesar de os animais não apresentarem uma ingestão contínua de alimento, os tecidos necessitam continuamente de energia. Há assim uma necessidade vital por um suprimento constante de nutrientes fornecedores de combustíveis para manter as funções metabólicas basais do organismo (Paulino e Sartori, 2006). A viabilidade do organismo depende, por um lado, da manutenção da sua homeostase e, por outro, da oferta contínua de energia e substratos para os processos oxidativos e sintéticos. A obtenção de substratos do meio ambiente ocorre de forma intermitente, durante a ingestão de alimentos.

No período após a ingestão de alimentos, devido ao fluxo abundante de nutrientes, há predomínio dos processos anabólicos sobre os catabólicos (Gottschlich, 2000). Este período é denominado de absorptivo, e os nutrientes provenientes da digestão enzimática vão sendo absorvidos no intestino delgado, durante determinado período de tempo após a refeição (Paulino e Sartori, 2006).

Porém na ausência de alimentos o catabolismo prevalece sobre o anabolismo (Gottschlich, 2000). O período pós-absorptivo corresponde à altura em que o animal fica sem se alimentar e os nutrientes deixam ser absorvidos. Este período pode ser de maior ou menor duração, dependendo do tipo de animal e manejo (Paulino e Sartori, 2006).

Deste modo, os animais desenvolveram a capacidade de adaptar o seu metabolismo, pelo menos, até certos limites, no sentido de resolver o problema do excesso ou da escassez de substratos, que ocorrem durante a ingestão de um alimento ou durante o jejum, respectivamente. Em períodos prolongados de jejum, o organismo adapta-se para a conservação de energia e nutrientes, e as vias metabólicas tendem a adaptar-se às circunstâncias, o que permite a sobrevivência por períodos mais longos (Kozloski, 2002). Para que os tecidos tenham garantido o fornecimento de energia, parte dos nutrientes absorvidos no intestino delgado devem ser acumulados em reservas durante o período absorptivo. O destino destes nutrientes absorvidos deve ser bem controlado para que as reservas acumuladas durante o período absorptivo sejam usadas apropriadamente durante o período pós-absorptivo (Paulino e Sartori, 2006). Os ruminantes, especificamente, também têm o seu metabolismo caracterizado por estas situações. No entanto, como o alimento é previamente fermentado nos pré-estômagos, o metabolismo destes animais possui algumas particularidades importantes (Kozloski, 2002).



Na situação metabólica de restrição alimentar, os animais passam a mobilizar e a utilizar fontes energéticas alternativas aos ácidos gordos voláteis para suprimir as necessidades energéticas (Kozloski, 2002). Este período é caracterizado por alterações a curto prazo que mobilizam nutrientes armazenados para manter a disponibilidade de substratos energéticos para tecidos metabolicamente activos. O objectivo destas alterações é manter concentrações plasmáticas de glucose numa faixa aceitável, para que o cérebro tenha quantidades adequadas de substrato (Paulino e Sartori, 2006).

Decorridas algumas horas após a ingestão de alimentos ocorre uma redução do teor de glucose. O fígado é a primeira fonte de glucose, sendo capaz de mobilizar rapidamente o glicogénio nele armazenado e promover a glicogenólise a fim de fornecer glucose ao sangue e, portanto, aos outros órgãos. Em situações de carência alimentar prolongadas o glicogénio armazenado no fígado esgota-se e a neoglucogénese passa a ser a única fonte de glucose do organismo a partir desse momento (Bollen *et al.*, 1998). A neoglucogénese torna-se assim uma via metabólica fundamental quando as reservas de glicogénio no fígado se esgotam. A glucose obtida vai servir sobretudo o cérebro e os tecidos que dependem essencialmente da sua energia, e tanto o fígado como o músculo passam a utilizar os ácidos gordos, em vez da glucose, como alimento energético. No caso dos ruminantes existem, nesta fase, algumas diferenças significativas pois a mobilização das reservas de glicogénio hepático nos ruminantes é pouco significativa. Deste modo, a neoglucogénese continua a ser a principal responsável pela manutenção da glicémia em situações de restrição alimentar, tal como no estado alimentado (Kozloski, 2002). No tecido adiposo a lipólise é estimulada, aumentando a concentração de ácidos gordos livres no sangue. Os lípidos de reserva são mobilizados e constituem o principal substrato para oxidação nos tecidos periféricos, seja na forma de ácidos gordos, ou após serem convertidos no fígado em corpos cetónicos e utilizados como substrato para a neoglucogénese (Paulino e Sartori, 2006). A formação de corpos cetónicos no fígado é extremamente importante, pois são eles que vão servir de alimento ao cérebro e diminuir as necessidades de glucose. Isso significa que o organismo apenas precisa de sintetizar quantidades mínimas de glucose a partir dos valiosos aminoácidos do músculo, os quais constituem, nesta situação, o único recurso de emergência para a síntese da glucose (Gottschlich, 2000). A síntese proteica está assim diminuída; as proteínas musculares são quebradas e os aminoácidos são libertados para a corrente sanguínea (Kozloski, 2002; Paulino e Sartori, 2006).

### III. Material e Métodos

#### 1. Ensaio e Recolha de Amostras

O ensaio envolvendo os animais e a consequente recolha de amostras foi realizado na Austrália Ocidental, em Merredin, no período de Setembro a Novembro de 2007, no âmbito de um trabalho conjunto entre as equipas portuguesas (IICT/ITQB) e a equipa australiana (*Department of Agriculture and Food of the Government of Western Australia*).

O objectivo deste trabalho experimental foi estudar o comportamento das duas raças de ovinos (Merino e Dorper), com diferentes capacidades de adaptação à restrição alimentar (sazonal), submetidos a condições nutricionais de perda de peso.

Foram usados borregos machos de cada uma das raças, com idades compreendidas entre os quatro e os seis meses de idade, num total de 24 animais por raça, que foram alimentados de forma a ganhar ou perder 100g/d, durante 42 dias.

Assim, para cada raça, os animais foram divididos em dois tratamentos nutricionais:

- **Controlo** (ganho de 100g/d) – Sujeitos a alimentação *ad libitum*.
- **Restrição** (perda de 100g/d) – Sujeitos a uma restrição alimentar (80% das necessidades diárias de manutenção, calculadas individualmente, e com base no peso vivo no início do ensaio). Estima-se que esta restrição corresponderá à limitação alimentar que os animais estarão sujeitos durante a época seca.

O software GrazFeed (Freer *et al.*, 1997) foi utilizado para calcular a quantidade de alimento a fornecer aos animais. A introdução do alimento e da restrição foi feita de forma gradual.

Os animais foram alimentados exclusivamente com granulado Mako 101, cuja composição se apresenta na tabela seguinte (Tabela 1).

**Tabela 1** – Composição química da dieta experimental

Parâmetro	Mako 101
Matéria Seca (MS, %)	91,2
Proteína Bruta (PB, %)	11,5
Fibra Detergente Ácida (ADF, %)	29,1
Matéria Seca Digestível (MSD, %)	65,9
Energia Metabolizável (EM, MJ/kg)	9,3
Fósforo (P, g/kg)	2,0
Potássio (K, g/kg)	7,2
Enxofre (S, g/kg)	2,1
Sódio (Na, g/kg)	0,9
Cálcio (Ca, g/kg)	7,4
Magnésio (Mg, g/kg)	1,6
Cobre (Cu, mg/kg)	7
Zinco (Zn, mg/kg)	45
Manganês (Mn, mg/kg)	75
Ferro (Fe, mg/kg)	306
Boro (B, mg/kg)	8

Os animais foram instalados num parque desprovido de vegetação (previamente aspergido com herbicida) e recolhidos diariamente (7h30min) para um parque com compartimentos individuais (60 X 150 X 100 cm) para fornecimento da alimentação. No parque os animais tinham acesso a água *ad libitum*. Durante este período, os animais estiveram sujeitos a temperaturas médias de 15 a 20°C.

O ensaio teve a duração de 42 dias, ao fim dos quais se registaram as alterações de peso vivo dos animais.

No final do ensaio os animais foram então eutanasiados num matadouro comercial. Na linha de abate retiraram-se amostras de tecido hepático dos 48 animais, que foram imediatamente congeladas em azoto líquido. As amostras foram mantidas a -80°C para posterior análise.

O ensaio “*in vivo*” foi desenhado de acordo com as boas práticas de utilização de vertebrados em experimentação, tanto da Australian Commonwealth como da União Europeia, sendo que localmente foi monitorizado por pessoal veterinário especializado.

As amostras de fígado recolhidas no final do ensaio foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Para o delineamento experimental foram definidos quatro grupos experimentais, de 12 animais cada (n=12), diferenciados por raças e condições alimentares distintas:

**Merino Australiano Controlo (MC)** – Animais da raça Merino Australiano alimentados *ad libitum*;

**Merino Australiano Restrição (MR)** – Animais da raça Merino Australiano subalimentados;

**Dorper Controlo (DC)** – Animais da raça Dorper alimentados *ad libitum*;

**Dorper Restrição (DR)** – Animais da raça Dorper subalimentados.

Para cada um dos grupos experimentais foi utilizado um total de cinco amostras animais (n=5). Estas 5 amostras foram escolhidas aleatoriamente dos 12 animais de cada grupo.

## 2. Técnica de PCR

Vários métodos têm sido descritos para a análise quantitativa de sequências de ácidos nucleicos. Recentemente, a técnica de PCR (Reacção em Cadeia pela Polimerase) provou ser uma ferramenta poderosa na detecção e quantificação de ácidos nucleicos e tem permitido a análise a partir de quantidades mínimas de DNA (Heid *et al.*, 1996; Bustin *et al.*, 2005).

O PCR é baseado na capacidade da enzima *Taq polimerase*, não ser inactivada por temperaturas elevadas que promovem normalmente a desnaturação do DNA. Os reagentes desta reacção incluem o DNA que se quer amplificar, a *Taq polimerase*, nucleótidos contendo os 4 tipos de bases azotadas (A-adenina, T-timina, C-citosina e G-guanina), e dois oligonucleótidos iniciadores (“*primers*”).

A técnica de PCR baseia-se na alternância de ciclos térmicos. A cada ciclo térmico, a quantidade de cópias do fragmento de DNA a ser amplificado aumenta. O produto final

desta reacção é composto por uma grande quantidade de DNA amplificado, juntamente com o DNA original presente no início da reacção. Após a reacção, podemos submeter o produto final do PCR a uma separação por electroforese em um gel de agarose. Ao corarmos este gel com um composto que se liga ao DNA como o brometo de etídeo, teremos uma banda, visível à luz ultra-violeta, na região correspondente ao peso molecular do fragmento de DNA que foi amplificado.

Além da utilização do DNA como substrato, a reacção de PCR pode também partir do mRNA que será posteriormente convertido em cDNA (DNA complementar) através de utilização da enzima transcriptase reversa. A técnica de RT-PCR (Transcriptase reversa seguida de uma Reacção em Cadeia pela Polimerase) combina assim a síntese de cDNA com a amplificação *in vitro* por PCR, possibilitando a clonagem de genes a partir dos respectivos mRNA e análise da expressão génica.

Neste trabalho experimental o RNA foi utilizado como substrato da reacção de PCR. As cinco amostras animais que constituem cada grupo experimental foram sujeitas aos procedimentos experimentais que de seguida são descritos (Laboratório CIISA - FMV).

### **3. Extracção de RNA**

Para a extracção do RNA total utilizaram-se aproximadamente 30 mg de tecido hepático que foram processadas utilizando um *kit* comercial (RNeasy Mini Kit – Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA obtido foi observado em gel de agarose a 1,5% em TAE, na presença de brometo de etídeo, durante 20 min, a uma intensidade de corrente de 90V. Após a extracção as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

Após os procedimentos de extracção determinou-se, para cada amostra de RNA obtida, a concentração e o grau de pureza do RNA por espectrofotometria (Beckman DU68) a 260 nm e 280 nm. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi indicativa do grau de pureza do DNA obtido. A relação entre estas duas leituras fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Soluções puras de DNA e RNA possuem valores de  $A_{260nm}/A_{280nm}$  entre 1,8 e 2 respectivamente.

#### 4. Técnica de RT-PCR

Para a síntese de cDNA as amostras de RNA foram submetidas a uma reacção de PCR (RT-PCR) utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega).

Foi feita uma solução com 1000 ng do RNA total com Oligo-dT *primers* (500 ng/μL) e Random *primers* (500 ng/μL), no volume final de 15 μL. Esta solução foi incubada durante 5 min a 70°C e de seguida adicionamos os restantes componentes (M-MLV 5X Reaction Buffer, dNTP's 10 mM, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor e M-MLV RT), num volume final de 25 μL. A solução foi então incubada a 37°C durante 60 min, 15 min a 42°C e finalmente a 94°C durante 5 min. Este processo foi repetido 4 vezes, de forma a obtermos no final um volume de 100 μL de cada uma das amostras.

As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

O cDNA, por ter sido sintetizado a partir do mRNA, é composto apenas pelas regiões exónicas do gene original do qual se transcreveu o mRNA. O cDNA pode então ser submetido à reacção de PCR à semelhança do DNA genómico.

#### 5. PCR em Tempo Real

Apesar de constituir uma ferramenta poderosa, a reacção normal de PCR é extremamente sensível e a utilização desta metodologia exige muitos cuidados para se evitar que um pequeno número de cópias de DNA contaminante possa causar resultados falso-positivos. Como esta análise é geralmente feita em géis de agarose, os resultados são baseados no tamanho dos produtos obtidos e portanto revelam-se pouco precisos.

Actualmente, com o desenvolvimento das novas técnicas em Biologia Molecular, já é possível acompanhar o processo de amplificação do material genético que ocorre em cada um dos ciclos de uma reacção normal de PCR. O PCR em tempo real é uma técnica recente da biologia molecular e tem sido utilizado para diversos fins, particularmente para a quantificação de ácidos nucleicos e genotipagem (Heid *et al.*, 1996).

Desde a sua invenção em 1996, o número de publicações que recorrem à técnica de PCR em tempo real aumentou quase exponencialmente (Wilhelm e Pingoud, 2003).

A particularidade do PCR em tempo real é que todo o processo de amplificação é monitorizado em tempo real por meio de técnicas de fluorescência. Requer assim uma molécula fluorescente, que se liga ao produto formado, monitorizando assim a reacção de

síntese de DNA (Kubista *et al.*, 2006). É uma técnica de análise rápida, fácil de executar e que evita as contaminações, apresentando também uma maior precisão dos resultados (Wilhelm e Pingoud, 2003).

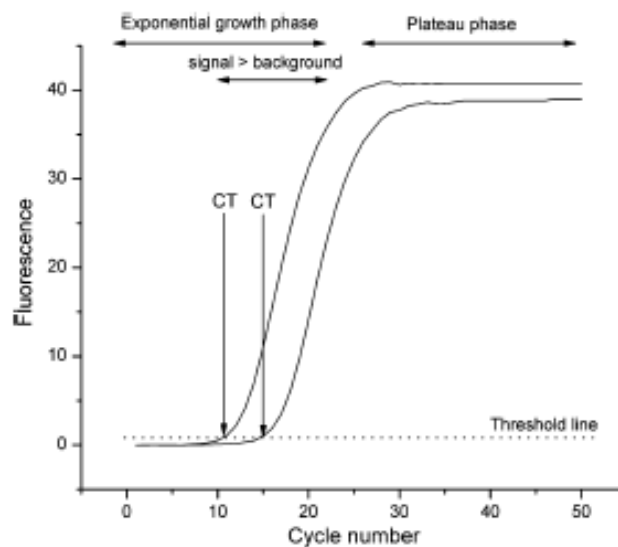
Trata-se de uma técnica que oferece várias vantagens relativamente a outros métodos utilizados, como a reacção normal de PCR. Em primeiro lugar, o PCR em tempo real é realizado em sistema de tubos fechados e não necessita de manipulação da amostra pós-PCR, portanto o potencial de contaminação é reduzido, pois os produtos amplificados podem ser analisados sem abertura dos tubos de reacção. Em segundo lugar, o presente método suporta a utilização de uma normalização. Para isto é utilizado um *housekeeping gene*, que funciona como controlo interno de toda a reacção de PCR. Permite também que diversos genes sejam analisados simultaneamente, o que torna a análise muito mais fácil de desenvolver. Para ensaios com uma grande quantidade de amostras a analisar o PCR em tempo real constitui uma ferramenta muito útil. Por último, como não há tempo de processamento pós – PCR é possível obter resultados muito mais rapidamente. A técnica de PCR em tempo real é altamente reprodutível, específica e sensível, permitindo obter resultados mais precisos (Heid *et al.*, 1996).

Ao executar esta técnica é necessário ter em atenção alguns aspectos importantes. A existência de complementaridade entre diferentes regiões da amostra pode causar problemas, pois podem dobrar e formar *hairpins*, que vão interferir com a extensão. O mesmo pode suceder com os *primers*, formando outros produtos de PCR denominados dímeros. Evitar a formação de *hairpins* e dímeros é muito importante para a análise quantitativa em tempo real. Com esta metodologia as sequências a amplificar são tipicamente mais pequenas, e com capacidade limitada para “dobrar” (Kubista *et al.*, 2006).

O SYBR Green é o corante mais frequentemente utilizado e o mais popular para monitorizar a reacção de PCR em tempo real (Wilhelm e Pingoud, 2003). Esta molécula gera um sinal de fluorescência que reflecte a quantidade de produto formado. A desvantagem do PCR em tempo real utilizando o SYBR Green como corante interligante é que este se liga a qualquer produto de dupla cadeia, incluindo dímeros de *primers* e produtos de amplificação não específicos, e origina fluorescência (Giglio *et al.*, 2003).

Para uma análise quantitativa as curvas de amplificação são analisadas (Figura 9). Durante os primeiros ciclos o sinal é tão fraco que não se consegue distinguir do “*background*”. Os ciclos iniciais de amplificação, caracterizados por reduzidos incrementos nos sinais de fluorescência, definem o limiar de detecção. À medida que a quantidade de

produto se vai acumulando, o sinal começa a desenvolver-se e vai aumentando exponencialmente numa fase inicial. Posteriormente, o sinal atinge um limite e satura. Assim cada curva obtida consiste em três fases distintas: uma fase inicial, em que nenhum produto acumulado pode ser medido, uma fase exponencial e por último uma fase de saturação. A metodologia permite monitorizar, em tempo real, o momento da reacção em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado atinge o limiar de detecção. O número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção é denominado por CT. O ponto CT indica assim o momento a partir do qual a reacção é optimizada (fase exponencial) e o produto amplificado pode ser quantificado. O sinal aumenta exponencialmente, sendo que a determinada temperatura a cadeia dupla de DNA separa-se e o corante sai, diminuindo abruptamente o sinal de fluorescência. Esta temperatura corresponde ao “*melting*” ( $T_m$ ) e pode ser facilmente determinada como o ponto máximo da 1ª derivada da curva de dissociação ou curva de *melting* (Heid *et al.*, 1996; Wilhelm e Pingoud, 2003; Kubista *et al.*, 2006), conforme evidenciado na Figura 6.



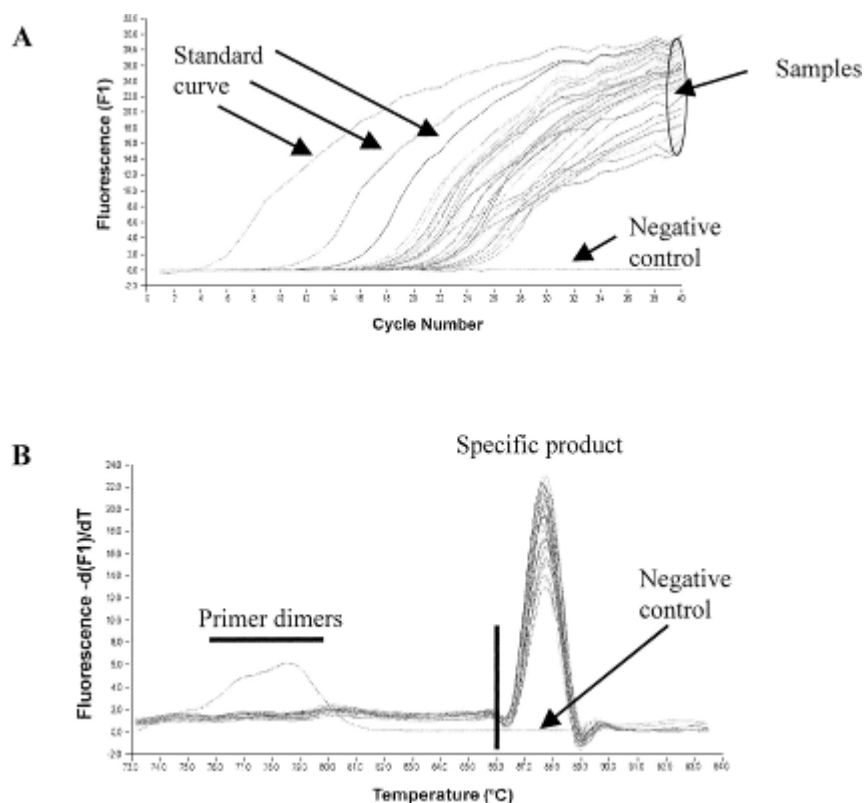
**Figura 6** - Curva de Amplificação da reacção de PCR em Tempo Real (Kubista *et al.*, 2006)

**Legenda:**

- “background”: fluorescência do meio (ruído libertado pela reacção)
- *Threshold line*: limiar de detecção, utilizado para a determinação do CT
- CT: ciclo onde a reacção cruza o limiar de detecção



Para compensar a ligação não específica do corante SyberGreen, o equipamento de PCR tem a capacidade de correr uma curva de dissociação após o PCR (Figura 7). Quando se atinge a temperatura de *melting* da sequência alvo observa-se uma quebra abrupta da fluorescência; caso se observem diminuições adicionais da fluorescência pode significar que ocorreu contaminação, ou que os parâmetros do PCR podem não ter sido suficientemente específicos. A temperatura de *melting* de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina (GC), comprimento e características da sequência, o que permite então distinguir diferentes produtos de PCR. As curvas de dissociação permitem assim diferenciar produtos de amplificação específicos e inespecíficos (Giglio *et al.*, 2003).



**Figura 7** - Curva de Amplificação (A) e Curva de Dissociação ou de *Melting* (B) da reacção de PCR em Tempo Real (Robert *et al.*, 2002)

**Legenda:**

A especificidade da reacção é confirmada através da Curva de Dissociação (B), que indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* específicos para as sequências alvo que estão a ser pesquisadas. A análise do perfil desta curva permite distinguir os produtos específicos e dos dímeros de *primer*, formados no controlo negativo.

(A) Curva de Amplificação – Dados brutos

(B) Curva de Dissociação ou de *Melting*

Para a quantificação exacta, a eficiência da amplificação da reacção deve ser conhecida.

A estratégia de quantificação é o principal aspecto na determinação da expressão de um gene. Geralmente existem duas estratégias que podem ser adoptadas: a quantificação absoluta ou a quantificação relativa (Livak e Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004).

A quantificação relativa baseia-se no nível de expressão de determinado gene relativamente a um gene de referência ou de controlo (*housekeeping gene*), e é mais fácil de executar pois, ao contrário da quantificação absoluta, não é necessário recorrer a uma curva de calibração. Teoricamente a quantificação relativa é considerada mais adequada para estudar as alterações fisiológicas na expressão dos genes (Pfaffl, 2004), pelo que foi a estratégia de quantificação escolhida no desenvolvimento deste trabalho experimental.

Os *housekeeping genes* correspondem a genes que são expressos a um nível constante nos diversos tecidos de um organismo, em todas as fases do desenvolvimento e cuja expressão não é afectada pelas condições experimentais (Bustin, 2000).

Os genes Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Beta-Actina ( $\beta$ -actina) e o RNA ribossomal 18S (18S RNA) são citados na literatura como possíveis controlos internos em estudos de expressão génica (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000).

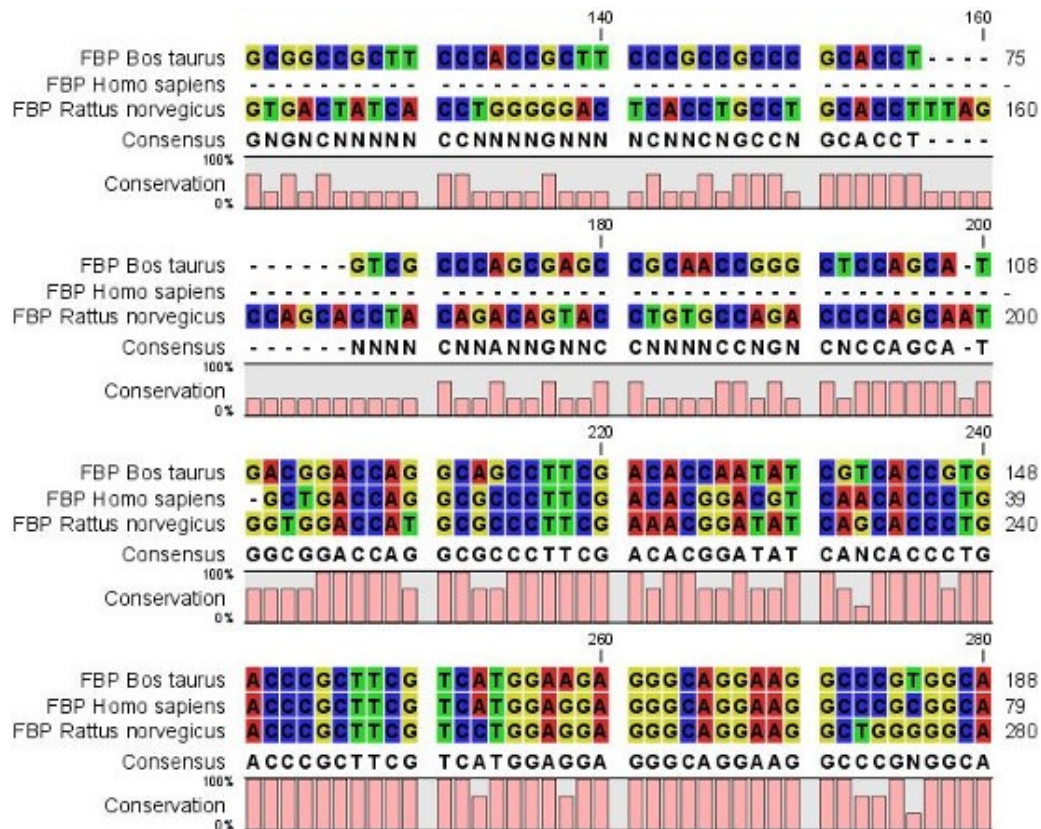
No entanto, vários estudos já demonstraram que os *housekeeping genes* acima mencionados podem variar muito com as condições experimentais do ensaio (Schmittgen, 2000). Torna-se assim necessário pesquisar genes de referência adequados para cada situação e validar que os mesmos não são afectados pelas condições experimentais. A escolha de um *housekeeping gene* apropriado é essencial para a obtenção de resultados fiáveis (Pfaffl, 2004; Janovick-Guretzky *et al.*, 2007).

## 6. Primers Degenerados

Utilizaram-se *primers* degenerados para os seguintes genes: HK, FBP, PC, GS, HL e CPS.

A pesquisa das sequências génicas foi feita no GenBank do NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nestes seis casos não estavam disponíveis as sequências nucleotídicas destes genes para a espécie ovina (*Ovis aries*) e foi necessário desenhar *primers* degenerados.

Inicialmente identificamos as regiões conservadas de cada gene em diferentes espécies animais (conforme exemplificado na Figura 8), utilizando o programa CLC Sequence Viewer 5.1.2 (<http://www.clcbio.com/>).



**Figura 8** - Parte do alinhamento nucleotídico dos genes da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP) para diferentes espécies animais

**Legenda:**

Bases azotadas: G-Guanina; C-Citosina; A-Adenina e T-Timina;

O alinhamento dos genes da FBP para as diversas espécies animais permitiu identificar as regiões conservadas.

A rosa está representada a percentagem de homologia das diferentes bases azotadas para as diversas espécies animais consideradas.

Todos os *primers* degenerados foram desenhados considerando as regiões conservadas resultantes do alinhamento dos nucleótidos de cada um dos genes para as diferentes espécies animais (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*), conforme demonstrado nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

No desenho dos *primers* teve-se ainda em atenção as três últimas bases, de forma a evitar-se a amplificação de produtos inespecíficos. Para tal, a extremidade 3' não deve conter mais de duas citosinas (C) ou guaninas (G).

**Tabela 2** – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP)

	Número de Acesso GenBank	Sequência nucleotídica DNA (5'-3')
<b>Bos taurus</b>	BC102974	AAGAGGGCAGGAAGG
<b>Rattus norvegicus</b>	BC078894	AGGAGGGCAGGAAGG
<b>Homo sapiens</b>	AF073475	AGGAGGGCAGGAAGG
<b>Primer FBP (Foward)</b>		<b>ARGAGGGCAGGAAGG</b>
<b>Bos taurus</b>	BC102974	CACAAGGCAGTCGATG
<b>Rattus norvegicus</b>	BC078894	CGCGAGGCAGTCGATG
<b>Homo sapiens</b>	AF073475	CACAAGGCAATCGATG
<b>Primer FBP (Reverse)</b>		<b>CRCRAGGCARTCGATG</b>
<b>Tamanho do produto esperado (pares de bases)</b>	336	

Nucleótidos degenerados: R=A/G

**Tabela 3** – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Piruvato-Carboxilase (PC)

	Número de Acesso GenBank	Sequência nucleotídica DNA (5'-3')
<b>Bos taurus</b>	AY185595	CACCGTGGAGTTCCTG
<b>Sus scrofa</b>	AY225510	CACCGTGGAGTTCCTG
<b>Rattus norvegicus</b>	BC085680	CACTGTGGAGTTCCTG
<b>Homo sapiens</b>	BC011617	CACCGTGGAGTTCCTG
<b>Mus musculus</b>	AK128927	CACTGTGGAGTTCCTG
<b>Primer PC (Foward)</b>		<b>CACBGTGGAGTTCCTG</b>
<b>Bos taurus</b>	AY185595	ATCTTGGTGGCGTCCG
<b>Sus scrofa</b>	AY225510	ATCTTGGTGGCGGCCG
<b>Rattus norvegicus</b>	BC085680	ATCTTGGTGGCAGCTG
<b>Homo sapiens</b>	BC011617	ATCTTGGTGGCGGCCG
<b>Mus musculus</b>	AK128927	ATCTTGGTGGCAGCTG
<b>Primer PC (Reverse)</b>		<b>ATCTTGGTGGCRKCYG</b>
<b>Tamanho do produto esperado (pares de bases)</b>	406	

Nucleótidos degenerados: R=A/G; K=G/T; Y=C/T; B=C/G/T

**Tabela 4** – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Glicogénio-Sintase (GS)

	Número de Acesso GenBank	Sequência nucleotídica DNA (5'-3')
<b>Rattus norvegicus</b>	AF346902	CAGCTGTGGGACACTG
<b>Mus musculus</b>	NM_145572	CAGCTGTGGGACACTG
<b>Homo sapiens</b>	NM_021957	CAGCTGTGGGATGTTG
<b>Primer GS (Foward)</b>		<b>CAGCTGTGGGAYRYTG</b>
<b>Rattus norvegicus</b>	AF346902	AGTAGGGGGCTGGTGG
<b>Mus musculus</b>	NM_145572	AATAGAGGGCTGGTGG
<b>Homo sapiens</b>	NM_021957	AGTAAGGGACTGGTGG
<b>Primer GS (Reverse)</b>		<b>ARTARRGGRCTGGTGG</b>
<b>Tamanho do produto esperado (pares de bases)</b>	306	

Nucleótidos degenerados: R=A/G

**Tabela 5** – Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas do gene da Carbamoil-Fosfato Sintase (CPS)

	Número de Acesso GenBank	Sequência nucleotídica DNA (5'-3')
<b>Rattus norvegicus</b>	RATCPSI01	AGTGGTGAAGACACTG
<b>Homo sapiens</b>	AB180933	AGTGGTGAAGACACTG
<b>Mus musculus</b>	NM_001080809	AGTGGTGAAGACCCTG
<b>Primer CPS (Foward)</b>		<b>AGTGGTGARGACMCTG</b>
<b>Rattus norvegicus</b>	RATCPSI01	AGTTCATCACGTGCCG
<b>Homo sapiens</b>	AB180933	AGTTCATCCAGAGCAG
<b>Mus musculus</b>	NM_001080809	AGTTCGTCTCGGGCAG
<b>Primer CPS (Reverse)</b>		<b>AGTTCRTCHMGDGCMTG</b>
<b>Tamanho do produto esperado (pares de bases)</b>	319	

Nucleótidos degenerados: R=A/G; H=A/T/C; M=A/C ; D=A/G/T

Para amplificar estes genes procedeu-se a uma reacção de PCR utilizando o *kit* comercial FidelityTaq DNA polymerase, com as seguintes concentrações: 10×PCR Buffer, 5 U/μL de Fidelity Taq polimerase e 10 mM de dNTP Mixture. Utilizaram-se ainda os

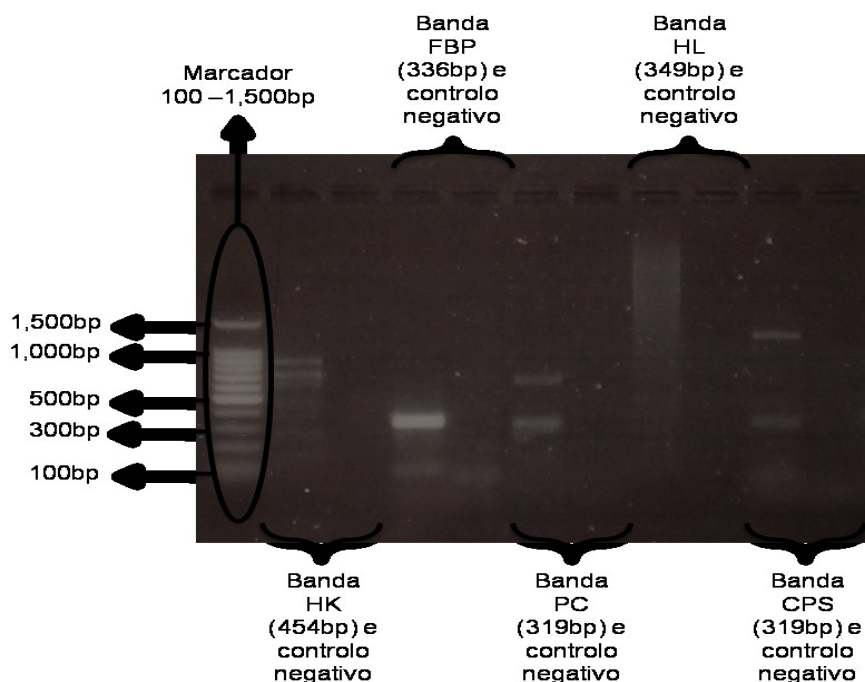
respectivos pares de *primers* degenerados, na concentração final de 10  $\mu\text{M}$ , e 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, no volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

Sempre que necessário, por ausência de amplificação ou amplificação de bandas inespecíficas de diferente peso molecular, as reacções foram optimizadas pela adição de 0,25 mM de  $\text{MgCl}_2$  ou por variação da temperatura no passo de *annealing*.

O GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) foi o aparelho utilizado.

As condições de amplificação incluíram um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 2 min, 35 ciclos a 94°C/30 seg, 50°C/30 seg para o gene da FBP e 55°C/30 seg para os genes PC, GS e CPS e 68°C/1 min, seguido de um passo final de extensão a 68°C durante 5 min.

De forma a avaliar a sua integridade, os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE, na presença de brometo de etídeo. Após observação no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech) os produtos de PCR amplificado foram visualizados e o seu peso molecular foi determinado por comparação com os fragmentos do marcador (BenchTop 100bp DNA Ladder – Promega) – Figura 9. Os fragmentos com tamanho esperado correspondentemente a cada gene foram cortadas e purificadas com o kit comercial NZYGelpure (Nyztech).



**Figura 9** – Produtos de PCR analisados por electroforese em gel de agarose

Após purificação as amostras obtidas foram sequenciadas pela STABVIDA (<http://www.stabvida.com/frontpage/por/index.php>).

O programa FinchTv 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) foi utilizado para a visualização dos cromatogramas das sequências nucleotídicas obtidas.

As sequências obtidas foram posteriormente alinhadas com o programa ClustalW2 - Multiple Sequences Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e submetidas a um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), uma avaliação online disponível no NCBI, para confirmação da identidade das mesmas

Não se conseguiram obter as sequências correctas para os genes HK e HL, e desta forma, não foi possível estudar a expressão génica destas enzimas.

## 7. Primers PCR em Tempo Real

Para desenhar os *primers* Real-Time dos genes PFK, PK, G6P, PEPCK, GP, ACOAC, FAS, GDH e RLP 19 acedemos à base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e pesquisamos as sequências nucleotídicas para estes genes nos ovinos que, nestes casos, se encontravam disponíveis. Com base nestas sequências e utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems) desenhamos os respectivos pares de *primers* tendo o cuidado, mais uma vez, de evitar a formação de *hairpins*, *self* e *cross dimers* (Tabela 6). O software Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) foi também utilizado como alternativa ao Primer Express.

**Tabela 6** – Sequências de *primers* PCR em Tempo Real

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pares de bases)	Número de Acesso GenBank
<b>PFK</b>	F - TGCACGATGGCTTTGAAGG R - CTCTTTGTCCCCAGCATGGA	106	AF483002
<b>PK</b>	F - CCGCTATTGGTGCTGTGGA R - CGAGACAGAAGCTGGGCTG	94	DQ174126
<b>PC</b>	F - GCACACTGTCACCGAGGAGA R - CGTTGATGCGGATGTTCTCC	116	**
<b>PEPCK</b>	F - AAGCGTTCAACGTCCGATTT R - CTGAACGGGATGACATACATGGT	64	EF062862
<b>FBP</b>	F - CGGGAGATCAAGTGAAGAAGCT R - CAGGTTGACTATGATGGCATGT	126	**
<b>G6P</b>	F - CCATCAAGTTGTTGCTGGAGTCT R - TCTGGATGTGGCGGAAAGTC	65	EF062861
<b>GP</b>	F - CGCCTGCCAGACCACTA R - TGAAGTCTGACGATCCATCTT	64	AY827551
<b>GS</b>	F - CGAGATGATCGGACAATTATGAAA R - GGTGCTGAGGATGGGATCG	114	**
<b>ACOAC</b>	F - AGGCGCAATGATGAGAGGAT R - AAAGAACTAGCCCTCAAGATTGACA	62	AJ564445
<b>FAZ</b>	F - GGCCCAGCATGGTTCGAT R - AGAGGGTGGTTGTTGGAAAGG	60	AF479289
<b>GDH</b>	F - TGCGCACAGCCATGAAGTAT R - CGTAGGCCGGCCGTTCTC	54	EU366475
<b>CPS</b>	F - GGCACCCGACTCCTTTCTG R - AGAGGATGGATGGCCAAAGG	96	**

F- *Primer Forward*; R- *Primer Reverse*;

\*\* Obtenção da sequência gênica neste trabalho experimental;

PFK- Fosfofructocinase; PK- Piruvato-Cinase; PC- Piruvato-Carboxilase; PEPCK- Fosfoenolpiruvato-Carboxicinas; FBP- Frutose-1,6-Difosfatase; G6P- Glucose-6-Fosfatase; GP- Glicogênio-Fosforilase; GS- Glicogênio-Sintase; ACOAC- Acetil-CoA-Carboxilase; FAS- Sintase de Ácidos Gordos; GDH- Glutamato Desidrogenase; CPS- Carbamoil-Fosfato Sintase

Os *primers* acima descritos foram desenhados entre dois exões diferentes.

Utilizou-se o kit Power SybrGreen PCR Master Mix da Applied Biosystems.

Outra etapa muito importante nesta fase foi a seleção de um gene de controle. Foi feita uma pesquisa de forma a encontrar um gene de referência entre vários genes candidatos citados na literatura (Thellin *et al.*, 1999; Schmittgen, 2000; Rhoads *et al.*, 2003; Zhang e Li, 2004; Garcia-Crespo *et al.*, 2005; Budhia *et al.*, 2006; Janovick-Guretzky *et al.*, 2007). As condições da nossa experiência, como a restrição alimentar e o tecido hepático, foram decisivas para a escolha do *housekeeping gene*.



O gene RPL 19 (Proteína Ribossomal L19) foi utilizado como *housekeeping gene*, permitindo a normalização das transcrições alvo. Este gene foi escolhido depois de testar outros genes (Beta-actina, Beta-2 microglobulina e 18S RNA ribossomal) e verificar que a expressão do gene que codifica o RPL 19 foi a única que não foi afectada pelas condições experimentais. No desenho dos *primers* Real-Time do *housekeeping gene*, foi utilizada a metodologia acima descrita (Tabela 7).

**Tabela 7** - Sequências de *primers* PCR em Tempo Real do *Housekeeping gene* Proteína Ribossomal L19 (RPL 19)

Gene	Sequência de <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pares de bases)	Número de Acesso GenBank
<b>RPL 19</b>	F - CCGGAAGGGCAGGCATA R - CGGGCATTTCGAGCATTG	62	AY158223

F- *Primer Forward*; R- *Primer Reverse*;  
RPL 19- Proteína Ribossomal L19

## 8. Condições PCR em Tempo Real

A quantificação relativa da expressão de cada gene foi determinada.

As reacções de PCR em tempo real para cada gene em estudo foram realizadas para um volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µL cDNA e 100 nM de cada um dos *primers* Real Time.

As amostras foram aplicadas em duplicado nos 96 poços da placa óptica de reacção (Applied Biosystems). Para cada amostra foi realizado um controlo negativo; o volume de cDNA foi substituído por água ultra pura. Nesta mesma placa foram ainda colocadas as amostras com o *housekeeping gene*, por forma a normalizar todo o processo. O aparelho utilizado foi o ABI Prism 7300 SDS (Applied Biosystems).

A reacção de PCR em tempo real iniciou-se com uma desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. No final das reacções a temperatura do aparelho foi elevada gradualmente, até que todas as cadeias duplas de material amplificado se dissociassem, para a verificação de possível contaminação dos cDNA's, em estudo, com DNA genómico ou com dímeros dos *primers*.

As concentrações dos *primers* foram previamente optimizadas, por forma determinar concentrações ideais, sendo seleccionadas as concentrações mínimas possíveis em que ocorria amplificação sem formação de dímeros ou de produtos inespecíficos.

Para a quantificação do *housekeeping gene*, o RPL 19, utilizou-se uma diluição cDNA de 1/10.

No final da reacção analisaram-se as curvas de amplificação e de *melting*, validando-se a não formação de dímeros ou de produtos inespecíficos.

Não foi possível proceder à determinação da expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas GP, PC e ACOAC, pois ocorreu formação de dímeros e/ou produtos não específicos.

## 9. PCR Miner

O PCR Miner constitui uma ferramenta disponível online que fornece uma maneira simples de análise dos dados de PCR em tempo real a partir das leituras de fluorescência, sem a necessidade de curva padrão (Zhao e Fernald, 2005). Utiliza um algoritmo que identifica em primeiro lugar a fase exponencial da curva de amplificação por aplicação de ajuste à cinética da reacção, e posteriormente usa uma regressão não-linear e análise da média ponderada para calcular o valor final da eficiência (Arikawa e Yang, 2007). O algoritmo descrito usa assim a cinética das reacções individuais para estimar valores precisos de eficiência e da CT, sem a necessidade de preparar uma curva padrão. Este algoritmo utiliza estritamente critérios objectivos, automatiza todos os cálculos, e é independente da plataforma de PCR em tempo real (Zhao e Fernald, 2005). Trata-se assim de uma ferramenta ideal para estimar a eficiência da reacção de PCR em tempo real, fornecendo a melhor precisão na estimativa da eficiência independente do instrumento de PCR (Arikawa e Yang, 2007). Este método tem sido amplamente testado com milhares de amostras processadas em diferentes reacções de PCR em sistemas de tempo real e produz resultados altamente precisos de quantificação (Zhao e Fernald, 2005; Arikawa e Yang, 2007).

Para a quantificação do número de moléculas de cDNA nas amostras em estudo, o programa PCR Miner determinou, para cada poço, o número de ciclos em que a

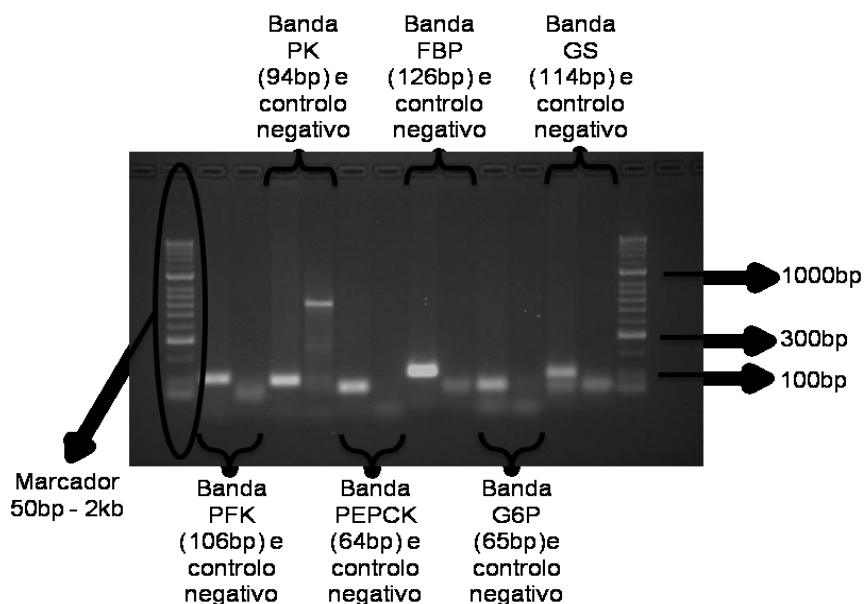
fluorescência cruzava a linha do limiar de detecção (Ct) durante a reacção (<http://www.miner.ewindup.info/version2/index.htm>).

O PCR Miner foi assim utilizado para calcular os ganhos de eficiência da reacção e os limiares de detecção a partir das leituras de fluorescência dos poços individuais durante a reacção.

Os valores foram corrigidos com um factor obtido para cada amostra, a partir da amplificação do cDNA do gene RPL19. Os resultados obtidos constituíram os factores utilizados para a normalização das quantidades de cDNA para todos os genes em estudo.

Por forma a validar todo o trabalho experimental, procedeu-se a um PCR convencional para confirmar se todos os produtos formados eram os esperados. Procedeu-se a uma reacção de PCR utilizando o *kit* comercial FidelityTaq DNA polymerase, utilizando os pares de *primers* real time na concentração final de 10 µM, 10×PCR Buffer, 5 U/µL de Fidelity Taq polimerase, 10 mM de dNTP Mixture e 3 µl de cDNA, no volume final de 25 µl.

As bandas correspondentes a cada gene foram cortadas e purificadas com o kit comercial NZYGelpure (Nyztech). Após observação no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech) os produtos de PCR amplificado foram visualizados e o seu peso molecular foi determinado por comparação com as bandas do marcador (HyperLadder II – Bionline) – Figura 10.



**Figura 10** – Produtos de PCR analisados por electroforese em gel de agarose

Após purificação as amostras obtidas foram sequenciadas pela STABVIDA.

## **10. Tratamento estatístico**

As diferenças estatísticas entre grupos foram analisadas por ANOVA dois factorial 2×2 (duas raças versus duas condições). O nível de significância foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ). Sempre que uma diferença significativa foi detectada, foi realizado um teste post-hoc de comparação (teste de Fisher - LSD). Nos casos em que apenas uma condição estava reunida, os resultados foram analisados separadamente (STATISTICA, StatSoft, Inc., 2004, version 7, Tulsa, OK, USA).

## IV. Resultados

### 1. Crescimento e evolução dos pesos vivos

Durante o período de ensaio foram registadas as evoluções dos pesos vivos de todos os animais.

**Tabela 8** – Crescimento e evolução dos pesos vivos dos grupos experimentais (média  $\pm$  erro padrão da média)

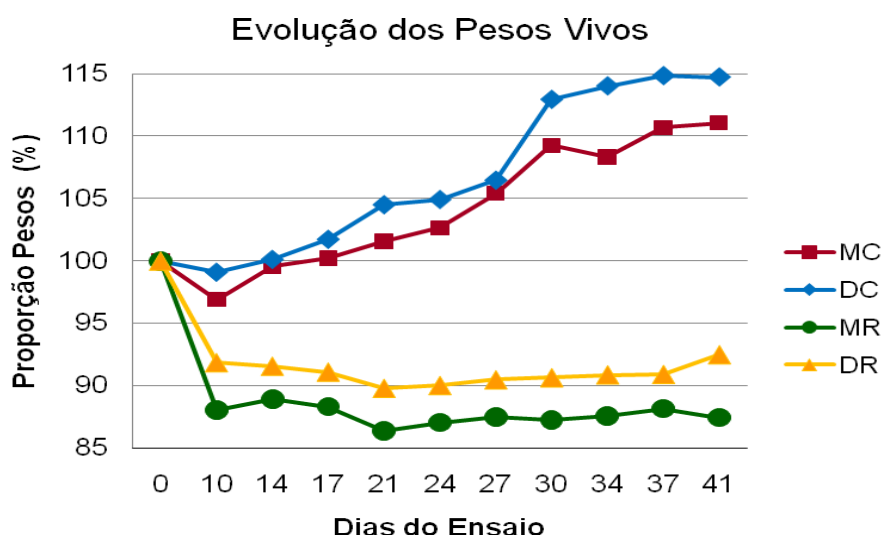
	MC	MR	DC	DR
<b>Peso vivo dia 0 (kg)</b>	34,17 <sup>b</sup> $\pm$ 1,28	34,72 <sup>b</sup> $\pm$ 1,13	39,54 <sup>a</sup> $\pm$ 2,29	38,25 <sup>a</sup> $\pm$ 2,13
<b>Peso vivo dia 41 (kg)</b>	37,77 <sup>b</sup> $\pm$ 1,31	29,33 <sup>c</sup> $\pm$ 0,86	45,00 <sup>a</sup> $\pm$ 2,17	35,28 <sup>b</sup> $\pm$ 1,80
<b>Crescimento (%)</b>	111,06 <sup>a</sup> $\pm$ 2,79	84,66 <sup>c</sup> $\pm$ 1,55	114,71 <sup>a</sup> $\pm$ 2,59	92,49 <sup>b</sup> $\pm$ 1,20

Letras minúsculas diferentes na mesma linha evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; DC- Dorper Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DR- Dorper Restrição

A Tabela 8 refere-se ao peso vivo inicial e final de todos os grupos experimentais, evidenciado o crescimento e a evolução de pesos vivos dos animais em estudo.

**Gráfico 1** – Crescimento e evolução dos pesos vivos dos grupos experimentais



**Legenda:**

MC- Merino Australiano Controlo; DC- Dorper Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DR- Dorper Restrição

Pela análise do Gráfico 1, verificou-se que todos os animais perderam peso nos primeiros 10 dias do ensaio, como resultado da adaptação ao regime alimentar e o dia 10 foi usado como ponto de partida para a análise da evolução dos pesos vivos.

As taxas médias de crescimento para cada uma das raças diferiram significativamente entre os diferentes grupos experimentais de controlo e de restrição.

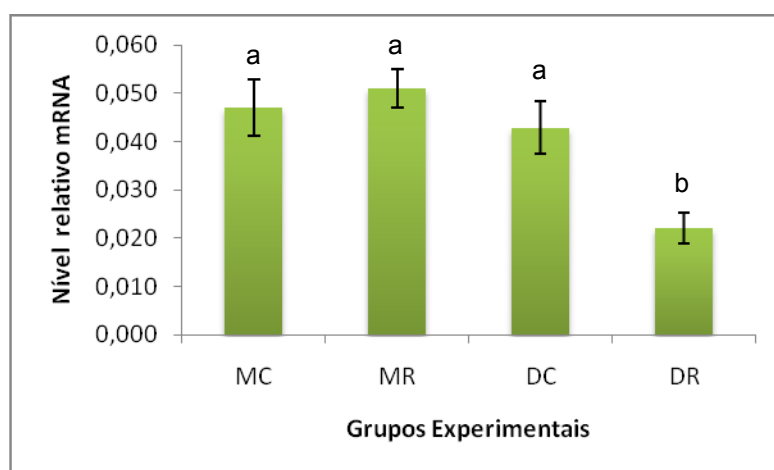
O grupo experimental de controlo ganhou peso mais rapidamente do que o previsto, enquanto o grupo de restrição perdeu peso mais lentamente do que o previsto.

Os animais Merino Australiano restringidos perderam 5,39 kg (uma diminuição de 15,3% relativamente ao início do ensaio experimental), e os animais Dorper restringidos perderam 2,97 kg (uma diminuição de 7,5% relativamente ao início do ensaio experimental).

## 2. Resultados PCR em Tempo Real – Expressões génicas relativas ao nível do mRNA transcrito

Os gráficos seguintes mostram as expressões génicas obtidas, ao nível do mRNA transcrito, por PCR em tempo real, para cada uma das enzimas reguladoras.

**Gráfico 2** - Expressões génicas relativas da Fosfofructocinase (PFK)

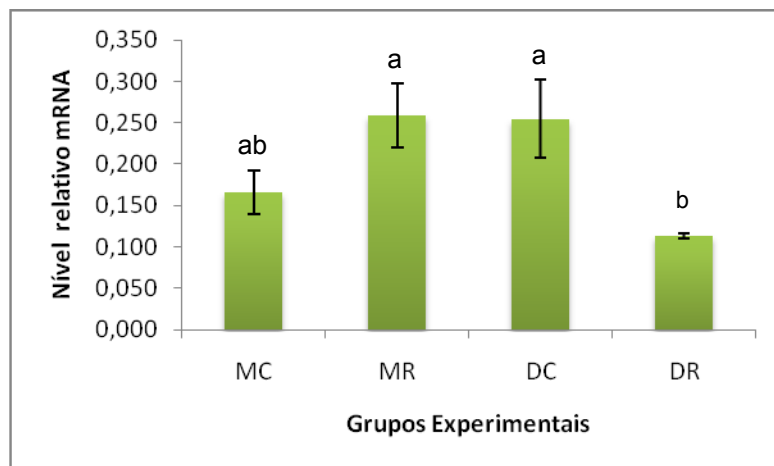


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Para a PFK foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de controlo e de restrição da raça Dorper. A restrição alimentar conduziu, neste caso, a um decréscimo da expressão dos genes que codificam a PFK nos animais Dorper - Gráfico 2.

**Gráfico 3** – Expressões génicas relativas da Piruvato-Cinase (PK)

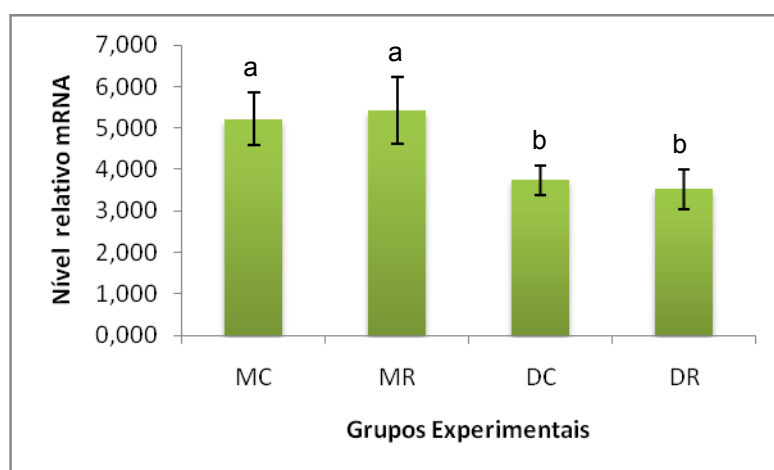


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Na PK foram igualmente detectadas diferenças significativas entre os grupos de controlo e de restrição nos animais Dorper. A condição de restrição alimentar está associada a uma diminuição da expressão dos genes que codificam a PK - Gráfico 3.

**Gráfico 4** – Expressões génicas relativas da Fosfoenolpiruvato-Carboxicinase (PEPCK)

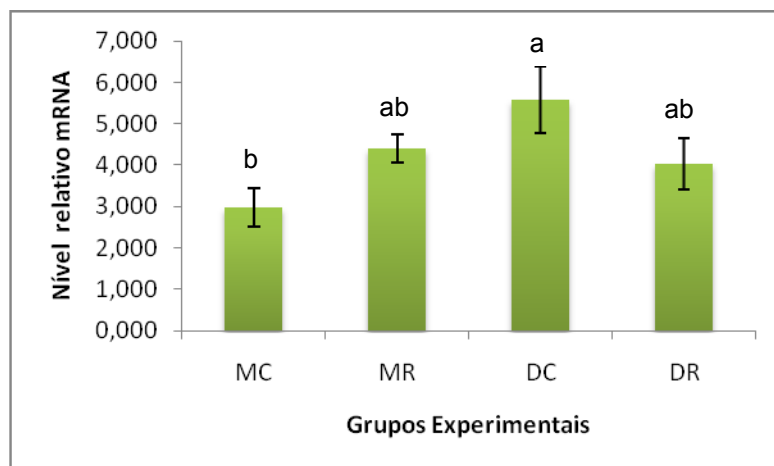


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

A PEPCK apenas revelou um efeito da raça. Os valores da expressão génica obtidos para os animais Merino Australiano foram significativamente superiores aos valores encontrados nos animais da raça Dorper – Gráfico 4.

**Gráfico 5** – Expressões génicas relativas da Frutose-1,6-Difosfatase (FBP)

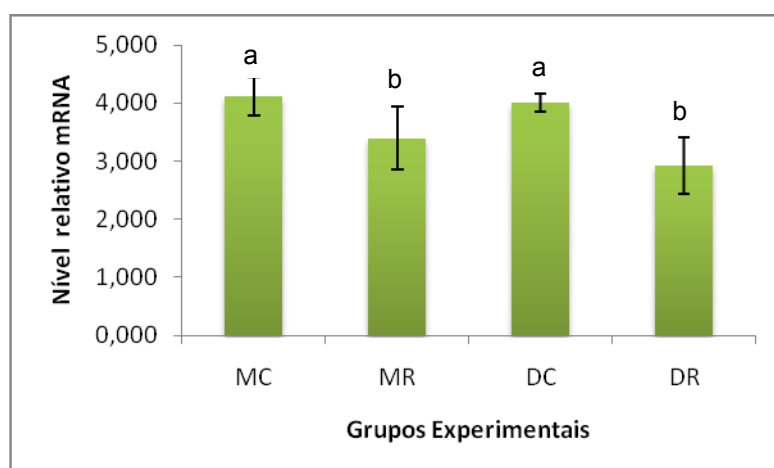


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Foram detectadas diferenças significativas na expressão dos genes que codificam a FBP entre os dois grupos de controlo. Os valores da expressão génica obtidos para os grupos de controlo revelaram-se significativamente maiores para os animais da raça Dorper – Gráfico 5.

**Gráfico 6** – Expressões génicas relativas da Glucose-6-Fosfatase (G6P)



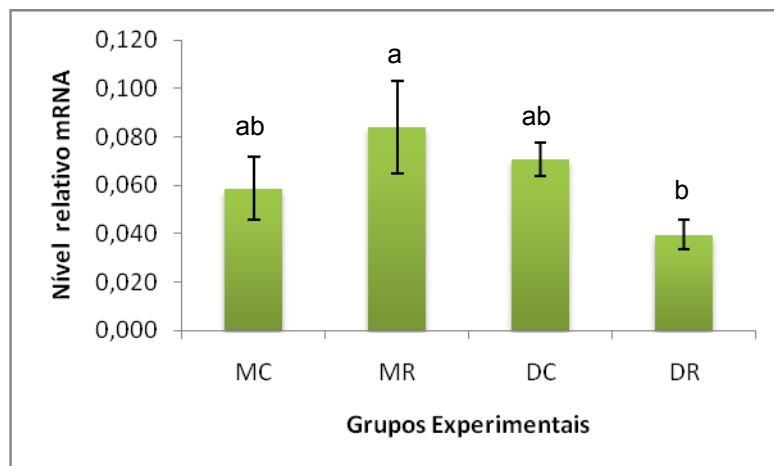
Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição



Para a G6P foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de controlo e de restrição em ambas as raças. Em qualquer um dos casos, a expressão génica revelou-se inferior nos animais sujeitos a restrição alimentar – Gráfico 6.

**Gráfico 7** – Expressões génicas relativas da Glicogénio-Sintase (GS)

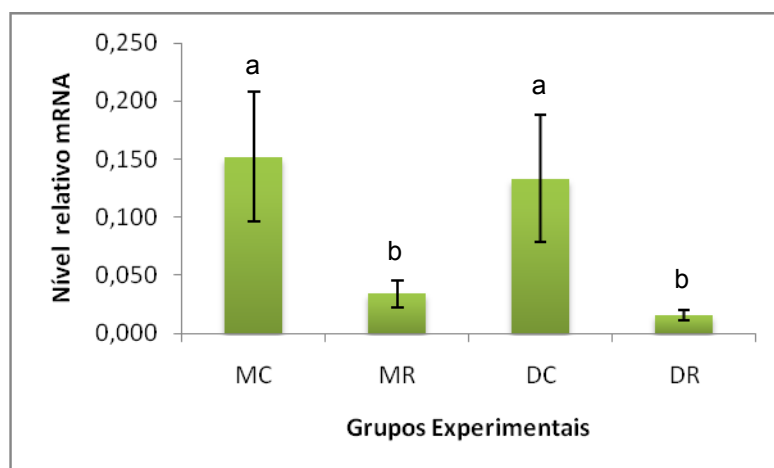


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

A GS revelou diferenças significativas para os dois grupos de animais restringidos. A expressão génica nos grupos restringidos revelou-se superior para a raça Merino Australiano – Gráfico 7.

**Gráfico 8** – Expressões génicas relativas da Sintase de Ácidos Gordos (FAS)

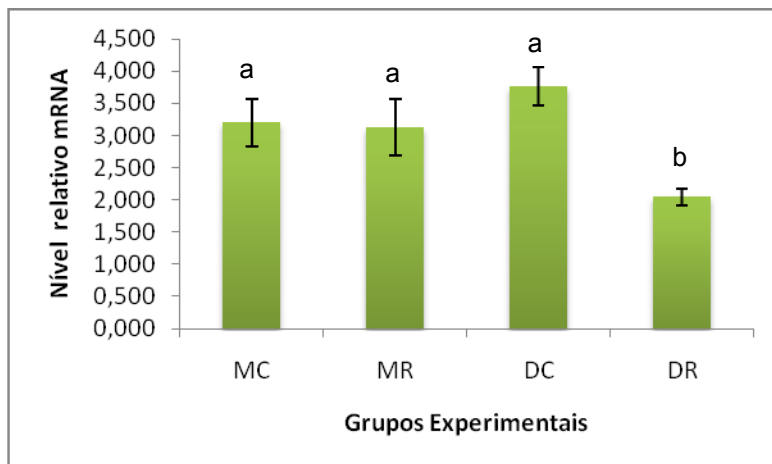


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Na FAS foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de controlo e de restrição em ambas as raças. Em qualquer um dos casos, a expressão génica revelou-se inferior nos animais sujeitos a restrição alimentar – Gráfico 8.

**Gráfico 9** – Expressões génicas relativas da Glutamato Desidrogenase (GDH)

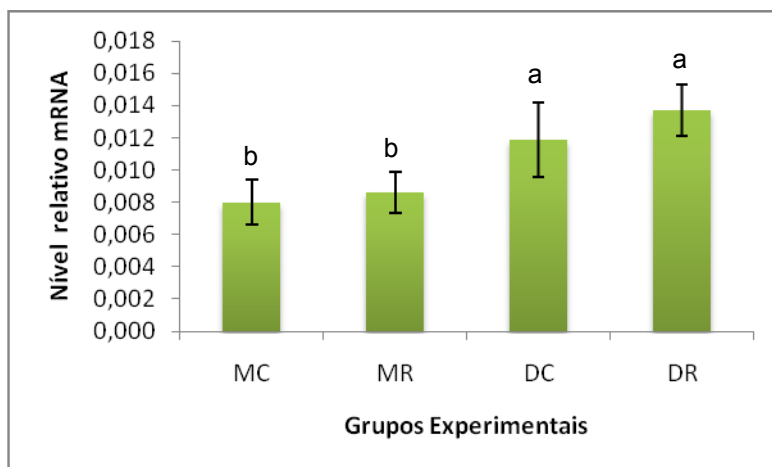


Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Para a GDH foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de controlo e de restrição da raça Dorper. A restrição alimentar conduziu, neste caso, a um decréscimo da expressão dos genes que codificam a GDH nos animais Dorper – Gráfico 9.

**Gráfico 10** – Expressões génicas relativas da Carbamoil-Fosfato Sintase (CPS)



Letras minúsculas diferentes evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

MC- Merino Australiano Controlo; MR- Merino Australiano Restrição; DC- Dorper Controlo; DR- Dorper Restrição

Tal como a PEPCK, também a CPS apenas revelou um efeito da raça. Os valores da expressão génica obtidos para os animais Dorper foram significativamente superiores aos valores encontrados nos animais da raça Merino Australiano – Gráfico 10.

A tabela seguinte (Tabela 9) mostra os valores obtidos, por PCR em Tempo Real, para a transcrição dos genes, das diversas enzimas reguladoras.

**Tabela 9** – Quantificação relativa da transcrição do mRNA por PCR em Tempo Real (média  $\pm$  erro padrão da média)

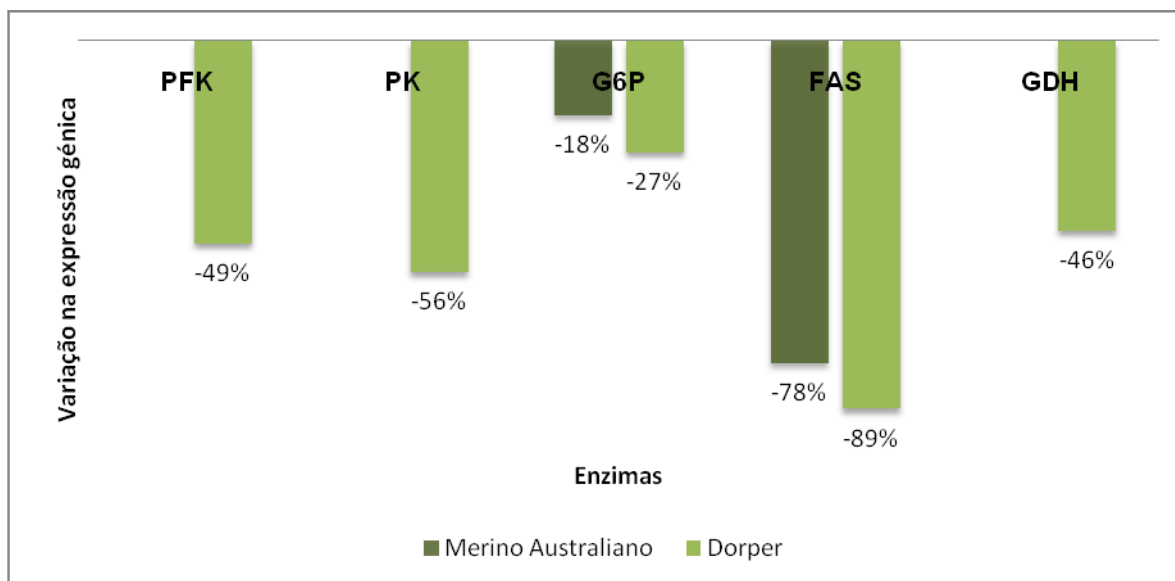
Enzimas	Raça Merino		Raça Dorper	
	Controlo (MC)	Restrição (MR)	Controlo (DC)	Restrição (DR)
<b>PFK</b>	0,047 <sup>a</sup> $\pm$ 0,006	0,051 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	0,043 <sup>a</sup> $\pm$ 0,006	0,022 <sup>b</sup> $\pm$ 0,003
<b>PK</b>	0,166 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,026	0,259 <sup>a</sup> $\pm$ 0,038	0,255 <sup>a</sup> $\pm$ 0,047	0,113 <sup>b</sup> $\pm$ 0,004
<b>PEPCK</b>	5,210 <sup>a</sup> $\pm$ 0,635	5,429 <sup>a</sup> $\pm$ 0,798	3,742 <sup>b</sup> $\pm$ 0,357	3,522 <sup>b</sup> $\pm$ 0,488
<b>FBP</b>	2,964 <sup>b</sup> $\pm$ 0,462	4,405 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,332	5,570 <sup>a</sup> $\pm$ 0,804	4,037 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,622
<b>G6P</b>	4,121 <sup>a</sup> $\pm$ 0,325	3,393 <sup>b</sup> $\pm$ 0,539	4,006 <sup>a</sup> $\pm$ 0,155	2,924 <sup>b</sup> $\pm$ 0,491
<b>GS</b>	0,059 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,013	0,084 <sup>a</sup> $\pm$ 0,019	0,071 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,007	0,039 <sup>b</sup> $\pm$ 0,006
<b>FAS</b>	0,152 <sup>a</sup> $\pm$ 0,056	0,034 <sup>b</sup> $\pm$ 0,012	0,133 <sup>a</sup> $\pm$ 0,055	0,015 <sup>b</sup> $\pm$ 0,004
<b>GDH</b>	3,200 <sup>a</sup> $\pm$ 0,363	3,132 <sup>a</sup> $\pm$ 0,437	3,766 <sup>a</sup> $\pm$ 0,306	2,047 <sup>b</sup> $\pm$ 0,132
<b>CPS</b>	0,008 <sup>b</sup> $\pm$ 0,001	0,009 <sup>b</sup> $\pm$ 0,001	0,012 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002	0,014 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002

Letras minúsculas diferentes na mesma linha evidenciam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

PFK- Fosfofructocinase; PK- Piruvato-Cinase; PEPCK- Fosfoenolpiruvato-Carboxicase; FBP- Frutose-1,6-Difosfatase; G6P- Glucose-6-Fosfatase; GS- Glicogénio-Sintase; FAS- Sintase de Ácidos Gordos; GDH- Glutamato Desidrogenase; CPS- Carbamoil-Fosfato Sintase

No gráfico seguinte (Gráfico 11) estão evidenciadas as diminuições significativas detectadas, como resultado da restrição alimentar imposta aos animais, para cada uma das raças experimentais.

**Gráfico 11** – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras para os animais Merino Australiano e Dorper.



PFK- Fosfofructocinase; PK- Piruvato-Cinase; G6P- Glucose-6-Fosfatase; FAS- Sintase de Ácidos Gordos; GDH- Glutamato Desidrogenase

### 3. Novas sequências nucleotídicas

As sequências parciais obtidas a partir deste estudo foram colocadas no banco de dados GenBank, com os seguintes números de acesso:

PC – HQ853232

FBP – HQ853230

GS – HQ853231

CPS – HQ853229

## **V. Discussão de Resultados**

### **1. Pesos Vivos**

As taxas médias de crescimento para cada uma das raças apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais de controlo e de restrição.

A condição de restrição alimentar conduziu assim a um decréscimo significativo no peso vivo dos animais em ambas as raças.

Os animais Merino Australiano restringidos perderam 5,39 kg (uma diminuição de 15,3% relativamente ao início do ensaio experimental), e os animais Dorper restringidos perderam 2,97 kg (uma diminuição de 7,5% relativamente ao início do ensaio experimental).

A evolução dos pesos vivos mostra que os animais Dorper parecem apresentar um melhor desempenho nutricional quando comparados com os animais da raça Merino Australiano, utilizando mais eficientemente o alimento. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos anteriormente citados, desenvolvidos por Brand e por Cloete, em 2000, que relataram, igualmente, menores variações sazonais no peso vivo dos animais da raça Dorper quando comparados com animais Merino Australiano.

### **2. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Glucídico**

#### **Glicólise**

Após o estudo da expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras da Glicólise, concluiu-se que a PFK e a PK, não sofreram influência da restrição alimentar imposta nos animais da raça Merino Australiano. Também Hotta *et al.*, em 1991, no seu estudo com ratos, não detectaram diferenças significativas ao nível da expressão génica da PFK nos animais aos quais foi imposta a condição alimentar de restrição durante 72h. Após as 72h de restrição alimentar, os ratos foram realimentados, com uma dieta rica em glúcidos, não tendo ficado evidenciada nenhuma diferença significativa ao nível do mRNA transcrito da PFK no final do ensaio experimental. O recente estudo desenvolvido por van Harten e Cardoso (2010), envolvendo duas raças de coelhos (coelho neozelandês e coelho bravo) obteve resultados similares. As enzimas PFK e PK não demonstraram

influência da restrição alimentar (cerca de 30% da alimentação *ad libitum*) imposta durante um período de 30 dias, nos coelhos da raça Neozelandesa, não se tendo, no entanto, verificado a mesma situação com os coelhos brancos, nos quais estas duas enzimas revelaram comportamentos contraditórios.

Nos animais Dorper, as mesmas enzimas, revelaram diferenças significativas nos grupos sujeitos a restrição alimentar quando comparados com os respectivos grupos de controlo. Em ambos os casos, elas apresentaram uma menor expressão génica nos animais da raça Dorper sujeitos a restrição alimentar. O animais Dorper restringidos sofreram uma diminuição de 49% na transcrição da PFK relativamente ao grupo de controlo. Para a PK foi observada uma redução média de 56% relativamente ao grupo de animais Dorper com alimentação *ad libitum*.

Ficou portanto evidenciado, neste caso o efeito da restrição alimentar na diminuição da expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas glicolíticas nos animais da raça Dorper. Vários estudos envolvendo situações de restrição alimentar foram desenvolvidos no sentido de avaliar as modificações fisiológicas ao nível da expressão génica do mRNA do metabolismo glucídico. Já em 1988, Feurs *et al.*, relatavam uma diminuição significativa da actividade enzimática da PK, de 48%, como resultado da acção da restrição calórica imposta a ratos (60% da alimentação *ad libitum*, fornecida ao grupo de controlo). O nosso estudo corrobora também os dados obtidos por Dhahbi *et al.* (1999), que utilizando dois grupos de ratos sujeitos a condições alimentares distintas (grupo de controlo com consumos de ~105 kcal/sem e grupo de restrição com ~52 kcal/sem), evidenciaram uma redução média de 14% na transcrição da PFK, e de aproximadamente 60% na transcrição da PK, ao nível do mRNA, para os animais subalimentados. Num novo estudo, em 2001, com o objectivo de confirmar os dados anteriormente obtidos, Dhahbi *et al.*, utilizaram animais nas mesmas condições experimentais e confirmaram uma diminuição do nível de transcrição do mRNA da PK nos animais aos quais foi imposta a condição de restrição alimentar. O nosso estudo consolida também os dados obtidos por Hagopian *et al.* (2003b). Com o objectivo de avaliar o efeito da restrição calórica na actividade das enzimas glicolíticas, ratos com 1 mês de idade foram submetidos a uma alimentação *ad libitum*, e quando completaram os 2 meses estes animais foram divididos em dois grupos experimentais distintos. O grupo de controlo ingeriu 12 kcal por dia, tendo o grupo restringido apenas ingerido 9 kcal por dia. O estudo desenvolvido avaliou ainda diferenças entre ratos jovens (com 3 meses de idade) e ratos adultos (com 30 meses de idade). A restrição alimentar conduziu a um decréscimo significativo da actividade enzimática da PFK de 12% e de 37%, para ratos jovens e adultos, respectivamente. A PK revelou de modo homólogo uma diminuição da actividade enzimática de 27% e de 37% (ratos jovens e

adultos, respectivamente) associada à condição de restrição calórica. Finalmente há ainda que citar os resultados obtidos, mais recentemente, em 2006, por Ugochukwu e Figgers, que relatam uma diminuição da actividade da PFK em ratos associada à condição de restrição alimentar (diminuição de 30% da ingestão diária de alimento).

### **Neoglucogénese**

No que se refere à neoglucogénese, a PEPCK e a FBP não apresentaram diferenças significativas ao nível da expressão génica nos animais sujeitos a restrição alimentar quando comparados com os animais alimentados *ad libitum* em ambas as raças. A PEPCK revelou o efeito da raça, tendo-se verificado valores de expressão génica inferiores para os animais Dorper em comparação com os Merino Australiano. Estudos em vacas leiteiras foram desenvolvidos por forma a avaliar o efeito da restrição alimentar na expressão génica de enzimas gluconeogénicas (Velez e Donkin, 2005). Neste estudo os animais foram sujeitos a um ensaio experimental, com a duração total de 20 dias, contemplando 3 fases distintas: numa primeira fase os animais tiveram acesso a alimentação *ad libitum*, de seguida sofreram um período de restrição alimentar (de cerca de 50% da alimentação *ad libitum* fornecida anteriormente), e numa última fase foram realimentados. Tal como no nosso estudo, também estes autores não encontraram diferenças significativas ao nível da expressão dos genes que codificam para a PEPCK durante as 3 fases distintas do ensaio experimental. No que se refere à FBP, os nossos resultados são consistentes com os dados obtidos em ratos restringidos por Dhahbi *et al.* (1999), no qual também não foi detectada influência da restrição calórica (grupo de restrição sofreu uma redução de ~50% da alimentação fornecida ao grupo de controlo) na transcrição da FBP ao nível do mRNA. Em 2010, van Harten e Cardoso, também não encontraram diferenças significativas ao nível da expressão génica destas duas enzimas nos coelhos Neozelandeses restringidos, sujeitos a uma restrição alimentar de 30% da alimentação *ad libitum*, durante os 30 dias do ensaio experimental.

No que se refere à PEPCK, Dhahbi *et al.* (1999), relataram no seu trabalho valores de expressão génica da PEPCK 1,9 e 2,2 vezes superiores (ratos jovens e adultos, respectivamente) aos encontrados no grupo de controlo. Os trabalhos desenvolvidos por Hagopian *et al.*, em 2003a, consolidam também a hipótese de uma neoglucogénese estimulada em situações de restrição alimentar. Estes autores evidenciaram aumentos de actividade enzimática de 76% para a PEPCK e de 14 % para a FBP, nos ratos adultos restringidos, que apenas consumiram 9 kcal/dia, quando comparados com o grupo de controlo, que consumiu 12 kcal/dia, confirmando a hipótese de que as enzimas reguladoras

do processo da neoglicogénese se encontram estimuladas em situações de privação alimentar, quando as reservas de glicogénio se esgotam.

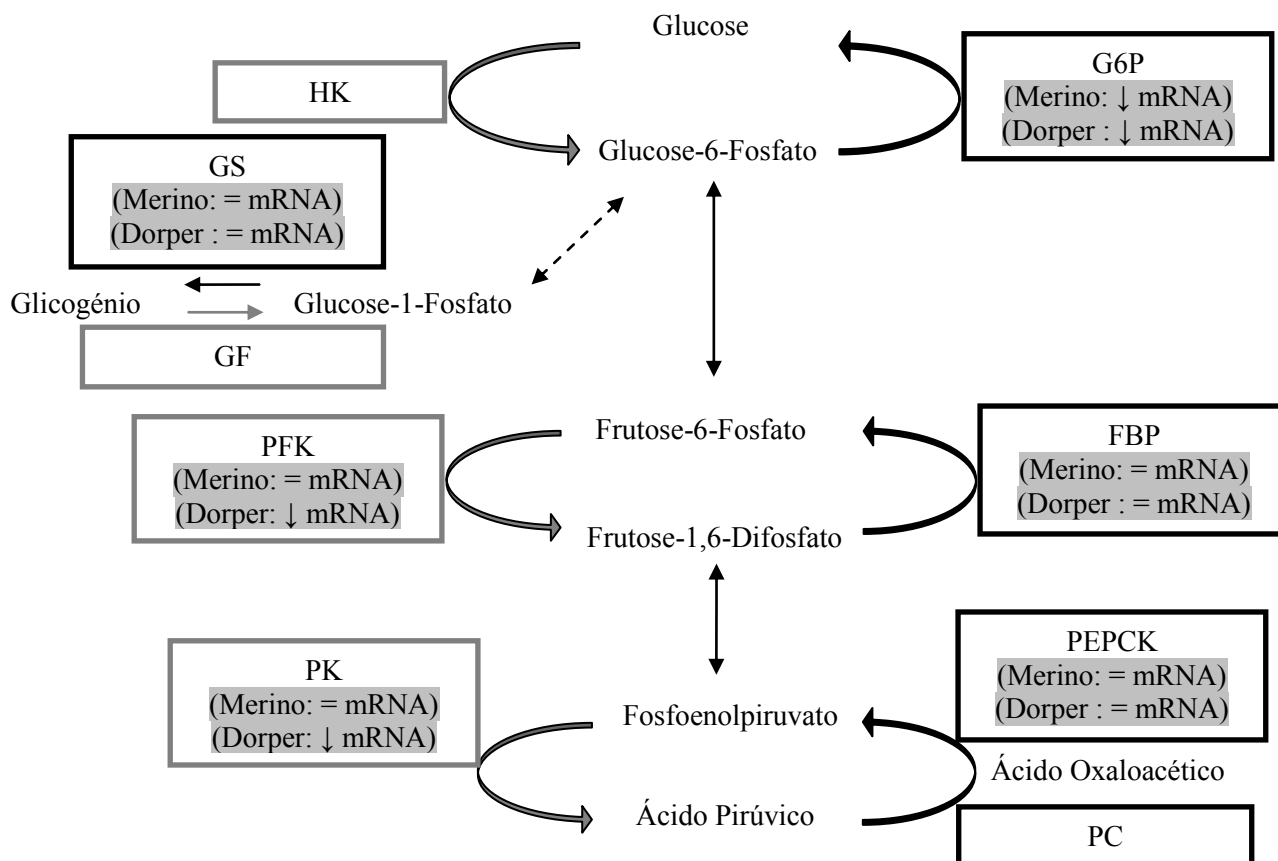
Ainda relativamente à neoglicogénese, a G6P, enzima que desempenha o importante papel de fornecer glucose durante períodos de restrição alimentar, demonstrou uma diminuição na sua expressão génica como resultado da imposição da restrição alimentar, quer nos animais da raça Merino Australiano, quer nos animais Dorper. O nível de transcrição do mRNA da G6P sofreu uma redução de 18%, para a raça Merino Australiano, e de 27%, para a raça Dorper, relativamente aos respectivos grupos de controlo.

Também neste caso seria de esperar que o grupo experimental de restrição apresentasse valores de expressão génica superiores aos do grupo de controlo, corroborando uma estimulação dos fenómenos neoglicogénicos em situações de limitação alimentar, o que acabou por não se verificar. Existem na bibliografia vários trabalhos nos quais ficou bem evidenciado o aumento do nível da expressão dos genes que codificam para a G6P e/ou da sua actividade enzimática como resultado da imposição da condição de restrição alimentar. Podemos referir os resultados obtidos em 1999, e posteriormente em 2001, por Dhahbi *et al.* Em ambos os estudos, estes autores observaram um aumento da expressão génica desta mesma enzima em ratos sujeitos a restrição alimentar quando comparados com os ratos alimentados *ad libitum*. No ano de 1999, os ratos restringidos, sujeitos a uma dieta de cerca de 50% da dieta fornecida ao grupo de controlo, demonstraram no final do ensaio experimental que o nível do mRNA para a G6P se revelou 1,6 vezes maior para ratos jovens, e 2,3 vezes superior para ratos adultos, quando comparado com o grupo de controlo. Em 2001, Dhahbi *et al.*, evidenciaram novamente uma expressão da G6P significativamente maior para o grupo de ratos restringidos. De citar ainda os resultados obtidos por Hagopian *et al.*, em 2003a, em ratos adultos restringidos, sujeitos a uma restrição calórica de 9 kcal/dia, que demonstraram um aumento de 19% na actividade enzimática da G6P quando comparado com o grupo de controlo, com consumos diários de 12 kcal/dia. Ugochukwu e o seu colaborador Figgers obtiveram, no ano de 2006, um aumento significativo da actividade enzimática da G6P como resultado da imposição de uma redução de 30% na ingestão diária de alimento em ratos, testemunhando um aumento da actividade das enzimas chave da neoglicogénese em situações de carência alimentar.



## **Glicogénese**

A GS, principal enzima limitante da formação do glicogénio, não demonstrou influência da restrição alimentar na expressão génica nos animais de ambas as raças. Os nossos resultados estão de acordo com Nur *et al.* (1995), que num estudo envolvendo ratos, avaliaram o efeito da restrição alimentar na expressão dos genes que codificam a GS. Este estudo envolveu dois grupos distintos de animais: um grupo de controlo, com acesso a alimentação *ad libitum*, e um grupo de restrição alimentar, no qual os animais estiveram privados de alimento durante 72h e após este período foram realimentados. Também aqui, não foi detectada nenhuma diferença significativa na expressão ao nível do mRNA da GS entre os animais que tiveram acesso a alimentação *ad libitum* e os que foram sujeitos a uma restrição alimentar de 72h seguida de um período de realimentação. De acordo com a bibliografia citada, a restrição alimentar conduz ao processo de glicogenólise, com degradação do glicogénio de reserva e produção de glucose (Bollen *et al.*, 1998). Seria portanto de prever, que a expressão dos genes que codificam para a GS fosse diminuída em situação de carência alimentar, no entanto, isso não ficou evidenciado neste trabalho experimental. van Harten e Cardoso, em 2010, obtiveram resultados que corroboram uma glicogénese inactiva ou diminuída em situações de alimentação restrita. No seu estudo, ficou evidente uma diminuição da expressão génica da GS, tendo-se verificado que o nível de transcrição do mRNA para esta enzima nos coelhos bravos foi 16 vezes inferior ao relatado para o grupo de controlo.



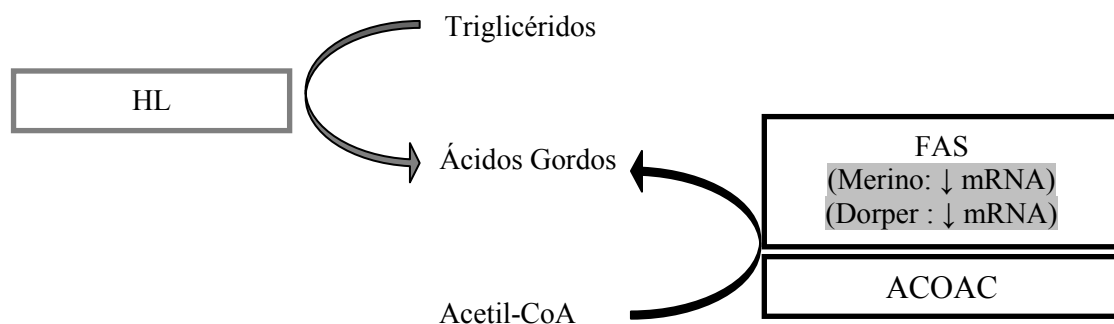
**Figura 11** – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo glicídico para ambas as raças

### 3. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Lipídico

No que se refere ao metabolismo lipídico, a FAS, que representa uma das enzimas envolvidas na síntese dos ácidos gordos, sofreu influência da restrição alimentar na expressão génica nos animais de ambas as raças, apresentando, uma menor expressão génica para os animais subalimentados.

Nos animais Merino Australiano e Dorper restringidos ficaram evidenciadas diminuições de 78% e de 89% na transcrição da FAS, comparativamente aos valores detectados nos respectivos grupos de controlo, indicando uma lipogénese inactiva ou diminuída sob condições de privação alimentar (Kozloski, 2002; Paulino e Sartori, 2006).

Relativamente ao metabolismo lipídico, o nosso estudo apresenta resultados similares aos apresentados por Kim e Freake (1996). Estes autores testaram o efeito da restrição alimentar na expressão génica da síntese de enzimas lipogénicas, em vários tecidos, utilizando ratos como modelo experimental. Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais. O grupo de controlo teve acesso a alimentação *ad libitum*; o grupo de restrição foi privado de alimento durante 24 a 48h, tendo sido realimentado após este período. Verificaram que a restrição alimentar imposta a ratos durante as primeiras 24h reduziu os níveis de mRNA da FAS e da ACOAC na maioria dos tecidos. No entanto as maiores diferenças significativas foram detectadas após 2 dias de subnutrição, tendo sido verificadas reduções de 50 a 80% nos níveis de mRNA transcrito para estas duas enzimas. A realimentação após o período de privação alimentar de 48h estimulou drasticamente a expressão génica destas enzimas, tendo-se observado valores 20 a 30 vezes superiores aos detectados no período de restrição alimentar de 48h.



**Figura 12** – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo lipídico para ambas as raças.

#### **4. Efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do Metabolismo Proteico**

No metabolismo proteico, a GDH, enzima interveniente no catabolismo das proteínas, revelou comportamentos distintos nas duas raças animais, como resultado da imposição da condição de restrição alimentar. A raça Merino Australiano não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais de controlo e de restrição. Nos animais Dorper, a GDH, teve um comportamento diferente, revelando influência da restrição

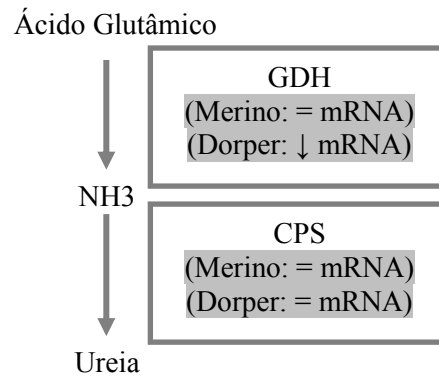
alimentar e apresentando uma redução de 46% nos animais Dorper restringidos quando comparados com os animais alimentados *ad libitum* desta raça.

Em situações de carência alimentar é imprescindível que surja uma fonte de glucose alternativa àquela que é absorvida na dieta. Decorrente desta necessidade, tem início um aumento das vias de degradação de proteínas no músculo, com subsequente conversão destas em glucose, através das vias de oxidação dos aminoácidos. Os aminoácidos constituem assim as principais fontes de carbono para a síntese de glucose nesta situação (Kozloski, 2002; Paulino e Sartori, 2006).

O nosso trabalho experimental apresentou resultados distintos aos apresentados em diversos trabalhos experimentais. Em 1899, Feuers *et al.*, detectaram no final do seu ensaio experimental, um aumento da actividade enzimática de 42% da GDH em ratos sujeitos a restrição alimentar (60% da alimentação *ad libitum*) quando comparados com o grupo de controlo. Dhahbi *et al.*, em 1999, também estudou o efeito da restrição calórica no metabolismo azotado, utilizando ratos sujeitos a dois tratamentos nutricionais distintos: um grupo de controlo (com consumos de ~105 kcal por semana) e um grupo de restrição (com consumo de ~52 kcal por semana.) Os resultados obtidos demonstraram um aumento da expressão génica para a glutaminase. Em ratos jovens o valor encontrado para o grupo restringido foi 2,5 vezes superior ao do grupo de controlo, e para ratos adultos foi 2,2 vezes superior. A glutaminase e a glutamato desidrogenase desempenham papéis semelhantes dentro metabolismo proteico. A glutaminase é a enzima que catalisa a reacção de desaminação da glutamina. No fígado, a glutaminase liberta amoníaco e ácido glutâmico. O ácido glutâmico no fígado pode suprir mais amoníaco através da glutamato desidrogenase. A GDH, enzima estudada neste trabalho experimental, teria à partida um comportamento semelhante à glutaminase, avaliada por Dhahbi. No trabalho desenvolvido pelos mesmos autores em 2001, em ratos sob as mesmas condições experimentais, ficou evidenciada, mais uma vez, o aumento da expressão génica ao nível do mRNA da glutaminase nos ratos restringidos. Também Hagopian *et al.*, em 2003a, utilizando um grupo de ratos restringidos e um grupo de controlo, com consumos diários de 9 e 12 kcal, respectivamente, avaliou o efeito da restrição calórica na actividade da GDH, verificando que a condição de restrição estava associada a um aumento da actividade desta enzima. Os valores obtidos revelaram aumentos de actividade enzimática de 44% (ratos adultos ~ 30 meses) e de 31% (ratos jovens ~ 3 meses) no grupo de animais aos quais se impôs a restrição calórica. van Harten e Cardoso (2010) obtiveram para coelhos bravos restringidos valores 2,28 maiores aos detectados no respectivo grupo de controlo.

Ainda no metabolismo proteico, a enzima CPS não apresentou diferenças significativas nos animais sujeitos a restrição alimentar quando comparados com os animais alimentados *ad libitum* de ambas as raças, tendo apenas ficado evidenciado o efeito da raça na expressão génica desta enzima. Neste caso, os valores da expressão génica da CPS obtidos para os animais Dorper foram significativamente superiores aos valores encontrados nos animais da raça Merino Australiano.

Tal como a GDH, a CPS é uma enzima reguladora do catabolismo proteico, e portanto seria de se esperar, que apresentasse expressões enzimáticas aumentadas em situação de restrição alimentar, como resultado de uma degradação proteica activa, com consequente aumento de aminoácidos disponíveis como fonte de carbono. Neste caso específico, não se conseguiu evidenciar esta situação; a CPS manteve a sua expressão génica inalterada pela condição de alimentação restrita nos animais de ambas as raças. No entanto, existem na bibliografia vários trabalhos, onde ficou demonstrado o aumento da expressão génica dessas enzimas como resultado da restrição alimentar, provando que o catabolismo proteico está, de facto, aumentado nessa situação. É de salientar o trabalho desenvolvido no ano de 1996, por Tillman *et al.*, no qual os ratos restringidos (restrição calórica de 50% da alimentação *ad libitum* do grupo controlo) revelaram valores da actividade enzimática para CPS 5 vezes superiores aos do grupo de controlo, e valores de expressão génica para esta enzima, aproximadamente 3 vezes maiores. Para a CPS, Dhahbi *et al.*, em 1999, detectaram valores para os ratos restringidos (jovens e adultos) aproximadamente 2 vezes superior ao evidenciado nos grupos de controlo. Mais recentemente, van Harten e Cardoso (2010), obtiveram dois resultados distintos no seu trabalho. No seu estudo, utilizando coelhos da raça neozelandesa e coelhos bravos, sujeitos a duas condições nutricionais distintas, controlo, com alimentação *ad libitum*, e restrição (~30% da alimentação *ad libitum*), verificaram que os coelhos neozelandeses, não sofreram influência da condição de restrição alimentar na expressão génica da enzima CPS. No entanto, nos coelhos bravos a limitação alimentar conduziu a um aumento da expressão génica dessa mesma enzima, com valores 2,52 vezes maiores aos obtidos no grupo de coelhos com alimentação *ad libitum*, o que corrobora uma degradação de proteínas aumentada em situações de alimentação restrita.



**Figura 13** – Resumo do efeito da restrição alimentar na expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras do metabolismo proteico para ambas as raças

## **VI. Conclusões**

As condições experimentais deste trabalho contribuíram para performances produtivas distintas no metabolismo intermediário entre os diferentes grupos de animais.

A condição de restrição alimentar (80% das necessidades diárias de manutenção) conduziu a um decréscimo significativo no peso vivo dos animais em ambas as raças, evidenciando diminuições de 15,3% e de 7,5%, respectivamente, para os animais Merino Australiano e Dorper restringidos, relativamente ao início do ensaio experimental. Desta forma, os animais Dorper parecem apresentar um melhor desempenho nutricional quando comparados com os animais da raça Merino Australiano, convertendo mais eficientemente os suplementos em ganhos de peso.

A condição experimental de limitação alimentar apresentou ainda os seguintes efeitos, ao nível da expressão de genes que codificam para a síntese de enzimas reguladoras, nos respectivos metabolismos intermediários:

### ***METABOLISMO GLUCÍDICO:***

#### ***a) Glicólise***

A condição de restrição alimentar diminuiu significativamente a expressão dos genes que codificam a síntese da PFK e da PK nos animais da raça Dorper. Como foi descrito, numa situação de limitação alimentar, os animais tendem a alterar as suas funções fisiológicas no sentido de diminuir a actividade glicolítica e estimular a actividade neoglucogénica das enzimas reguladoras do metabolismo intermediário. Assim a diminuição significativa dos fenómenos glicolíticos nos animais Dorper verificada neste ensaio experimental permite-nos concluir que esta raça poderá manter melhor que a Merino, uma homeostase glicémica perante uma situação de restrição alimentar. De salientar ainda que estes resultados são consistentes com as variações dos pesos vivos encontradas, que apontam para um melhor desempenho nutricional dos animais da raça Dorper.

#### ***b) Neoglucogénese***

Os fenómenos neoglucogénicos não apresentaram na maioria dos casos alterações significativas entre as duas raças experimentais. Apenas a PEPCK demonstrou o efeito da raça no sentido de uma diminuição destes fenómenos nos animais Dorper, o que é coerente com a diminuição das expressões génicas das suas enzimas glicolíticas.

A restrição alimentar apenas conduziu a diferenças significativas na expressão génica da G6P, que revelou uma diminuição significativa nos grupos experimentais de restrição quando comparados com os respectivos grupos de controlo.

### **c) Glicogénese**

A GS não demonstrou influência da restrição alimentar, tendo apenas se verificado que os animais Merino Australiano sobre restrição alimentar apresentaram maior expressão génica quando comparados com os animais da raça Dorper sobre a mesma condição experimental. A raça Dorper, pode estar, neste caso específico, a sintetizar menos glicogénio que a raça Merino Australiano, o que poderá indicar a uma melhor utilização do glicogénio hepático, em situação de restrição alimentar.

### **METABOLISMO LIPÍDICO:**

No metabolismo lipídico, a FAS, enzima interveniente na síntese dos ácidos gordos, sofreu influência da restrição alimentar na expressão génica nos animais de ambas as raças, apresentando, uma menor expressão génica para os animais subalimentados, o que indica uma lipogénese inactiva ou diminuída sob condições de privação alimentar. Este decréscimo na síntese de ácidos gordos como resultado da imposição da condição de restrição alimentar foi verificado de igual forma para a raça Merino Australiano e para a raça Dorper.

### **METABOLISMO PROTEICO:**

No metabolismo azotado, a restrição alimentar conduziu a diferenças significativas na expressão génica da GDH. A expressão da GDH foi menor nos animais Dorper sujeitos a restrição alimentar quando comparados com os animais em restrição da raça Merino Australiano, indicando que a utilização de aminoácidos como fonte de energia não aumentou nestes animais. Ficou assim evidenciado um menor recurso ao catabolismo de aminoácidos nos animais de raça Dorper.

A enzima CPS apenas demonstrou o efeito da raça. Os animais da raça Dorper apresentaram expressões génicas superiores aos animais Merino Australiano sobre ambas as condições experimentais. Este resultado traduz um aumento significativo do metabolismo da ureia para os animais Dorper, com uma maior síntese de ureia nos animais Dorper, quando comparados com os animais Merino Australiano. Este fenómeno pode concorrer para uma excreção facilitada deste metabolito nestes animais.



O estudo efectuado na expressão dos genes que codificam a síntese das diversas enzimas reguladoras do metabolismo intermediário de ovinos de raça Merino e Dorper, indicia, nestes últimos, um quadro de maior preservação homeostática do metabolismo glucídico e proteico, sob efeito de restrição alimentar. Este quadro é compatível com os efeitos desta restrição na evolução dos pesos vivos destes animais, submetidos à experiência.

Salientamos a necessidade de, no futuro, se elaborarem novos estudos envolvendo as mesmas raças experimentais e introduzindo novas condições de limitação alimentar, e a determinação de níveis de metabolitos relevantes por forma a aprofundar os conhecimentos adquiridos com o presente trabalho.

## VII. Bibliografia

ALMEIDA, A. M. d. (2008). A produção de ovinos Damara e Dorper e de caprinos silváticos em sistemas extensivos de produção na Austrália. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 103 (567-568): 127-134.

ALVES, D.D (2004). Nutrição animoacídica de bovinos. *R. Bras. Agrociência*, 10 (3): 265-271.

ANDRIGUETTO, J. M. (1981). Nutrição Animal: As Bases e os Fundamentos da Nutrição Animal. São Paulo, Nobel Editora.

ARIKAWA, E. e J. Yang (2007). Comparing Algorithms for Calculating Amplification Efficiencies of Real-Time PCR, disponível em <http://www.gene-quantification.de/poster-eff-superarray-2007.pdf>.

AUSTRALIAN BUREAU OF STATISTICS (ABS) - Western Australian Sheep Statistics, *Department of Agriculture and Food*, cat. no. 7113.0, Canberra

AUSTRALIAN BUREAU OF STATISTICS (ABS) - *Year Book Australia*, cat. no. 1301.0, Canberra

BELONJE, P. C. e L. P. Vosloo, (1972). The Role of the Merino in Medicine. *Faculty of Agriculture, University of Stellenbosch, Stellenbosch, CP*: 1496-1498.

BERGMAN, E. N. (1971). Hyperketonemia-Ketogenesis and Ketone Body Metabolism. *J. Dairy Sci.* 54(6): 936-948.

BOLLEN, M., S. Keppens e W. Stalmans (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336: 19 - 31.

BRAND, T. S. (2000). Grazing behaviour and diet selection by Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36(2): 147-158.

BUDHIA, S., L. F. Haring, I. McConnell e B. A. Blacklaws (2006). Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* 309(1-2): 160-172.

BUSTIN, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.

BUSTIN, S. A., V. Benes, T. Nolan e M. W. Pfaffl (2005). Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 34(3): 597-601.

CAMPBELL, I. (2008). Intermediary metabolism. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 9(4): 177-179.

CAMPOS, L. S. (2002). Entender a Bioquímica (3ª Edição), Escolar Editora.

CLOETE, S. W. P., M. A. Snyman e M. J. Herselman (2000). Productive performance of Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36: 119-135.

COMBELLAS, J. d. (1980). Production and Reproduction Parameters of Tropical Sheep Breeds in Improved Production Systems. *Tropical Animal Production*: 266-272.

CORRADELLO, E. d. F. A. (1988). Criação de Ovinos: antiga e contínua actividade lucrativa. São Paulo, Icone Editora.

CROKER, K. e P. Watt (2001). The Good Food Guide for Sheep. Department of Agriculture, South Perth.

CUNNINGHAM J.G, 2004. Tratado de Fisiologia Veterinária – Terceira Edição, Guanabara Koogan.

CURTIS, K. (2009). Recent Changes in the Australian Sheep Industry (The Disappearing Flock). Department of Agriculture and Food Western Australia: 1-15.

D'ARCY, J. B. (1990). Sheep Management and Wool Technology. Australia, New South Wales University Press LTD.

de WAAL, H. O. e W. J. Combrinck (2000). The development of the Dorper, its nutrition and a perspective of the grazing ruminant on veld. *Small Ruminant Research* 36: 103-117.

DEGOIS, É. (1985). Manual do Criador de Ovinos. Portugal, Publicações Europa-America.

DHAHBI, J. M., P. L. Mote, J. Wingo, B. C. Rowley, S. X. Cao, R. L. Walford e S. R. Spindler (2001). Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mechanisms of Ageing and Development* 122(10): 1033-1048.

DHAHBI,, J. M., P. L. Mote, J. Wingo, J. B. Tillman, R. L. Walford e S. R. Spindler (1999). Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277(2): E352-360.

DIEZ-TASCÓN, C., R. P. Littlejohn, P. A. R. Almeida e A. M. Crawford (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *International Society for Animal Genetics* 31: 243-251.

DOOLITTLE, M., H. Wong, R. Davis e M. Schotz (1987). Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J. Lipid Res.* 28(11): 1326-1334.

DUCHARME, N. A. e P. E. Bickel (2008). Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology* 149(3): 942-949.

DUNAWAY, A. G., P. T. Kasten, T. Sebo e R. Trapp (1988). Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem. J.* 251: 677-683.

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, disponível em <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>

FEUERS, R. J., P. H. Duffy, J. A. Laekey, A. Turturro, R. A. Mittelstaedt e R. W. Hart (1988). Effect of chronic caloric restriction on hepatic enzymes of intermediary metabolism in the male Fisher 344 rat. *Mechanisms of Ageing Development* 48: 179-189.

FRASER, A. e J. T. Stamp (1989). Ganado Ovino : producción y enfermedades. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

FREER, M., A. D. Moore e J. R. Donnelly (1997). GRAZPLAN: Decision support systems for Australian grazing enterprises--II. The animal biology model for feed intake, production and reproduction and the GrazFeed DSS. *Agricultural Systems* 54(1): 77-126.

GARCIA-CRESPO, D., R. Juste e A. Hurtado (2005). Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet Res* 1: 3.

GIGLIO, S., P. T. Monis e C. P. Saint (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucl. Acids Res.* 31(22): e136

GILLESPIE, J. R. e F. B. Flanders (2009). Modern Livestock and Poultry Production, 8th Edition, 498- 508.

GOTTSCHLICH, M. M. (2000). The science and practice of nutrition support: a case-based core curriculum, *Kendall Hunt Pub Co.* 17: 17-29.

HAGOPIAN, K., J. J. Ramsey e R. Weindruch (2003 a). Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Experimental Gerontology* 38(3): 267-278.

HAGOPIAN, K., J. J. Ramsey e R. Weindruch (2003 b). Influence of age and caloric restriction on liver glycolytic enzyme activities and metabolite concentrations in mice. *Experimental Gerontology* 38(3): 253-266.

HANSON, R. W. e L. Reshef (1997). Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry* 66(1): 581-611.

HEID, C. A., J. Stevens, K. J. Livak e P. M. Williams (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10): 986-994.

HINTON, D. G. (2006). Running a Small Flock of Sheep. Australia, Landlinks Press.

HOBSON, P. N. e C. S. Stewart (1997). The rumen microbial ecosystem (Second Edition). London, Blackie Academic& Professional.

HOTTA, K., H. Nakajima, T. Yamasaki, T. Hamaguchi, M. Kuwajima, T. Noguchi, T. Tanaka, N. Kono e S. Tarui (1991). Rat-liver-type phosphofructokinase mRNA. *European Journal of Biochemistry* 202(2): 293-298.

IÑIGUEZ, L. (2004). Goats in resource-poor systems in the dry environments of West Asia, Central Asia and the Inter-Andean valleys. *Small Ruminant Research* 51(2): 137-144.

JANOVICK-GURETZKY, N. A., H. M. Dann, D. B. Carlson, M. R. Murphy, J. J. Loo e J. K. Drackley (2007). Housekeeping Gene Expression in Bovine Liver is Affected by Physiological State, Feed Intake, and Dietary Treatment. *J. Dairy Sci.* 90(5): 2246-2252.

JITRAPAKDEE, S. e J. C. Wallace (1999). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340(1): 1-16.

JOSEPH, S. B., B. A. Laffitte, P. H. Patel, M. A. Watson, K. E. Matsukuma, R. Walczak, J. L. Collins, T. F. Osborne e P. Tontonoz (2002). Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *J. Biol. Chem.* 277(13): 11019-11025.

KEBREAB, E., T. Smith, J. Tanner e P. O. Osuji (2005). Review of undernutrition in smallholder ruminant production systems in the tropics. Nairobi (Kenya), *International Livestock Research Institute (ILRI)*: 3-94.

KERSTEN, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* 2(4): 282-286.

KILMINSTER, T. (2007). Evaluating the performance of Dorper, Damara, Wiltshire Horn and Merino breeds in the low rainfall wheatbelt of Western Australia. *Departament of Agriculture and Food WA, Meridind*.

KIM, T. S. e H. C. Freake (1996). High Carbohydrate Diet and Starvation Regulate Lipogenic mRNA in Rats in a Tissue-Specific Manner. *J. Nutr.* 126(3): 611-617.

KNIGHTS, R. (2010). Dorper Sheep and the production of lean lamb in arid Australia. *International ISS Institute/DEEWR Trades Fellowship*.

KOZLOSKI, G. V. (2002). Bioquímica dos Ruminantes. Santa Maria, UFSM.

KUBISTA, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg e N. Zoric (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3): 95-125.

LIVAK, K. e T. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *METHODS* 25: 402-408.

MCDONALD, L. (1998). The Ketogenic Diet: A complete guide for the Dieter and Practitioner. 1th Edition.

MADAN, M. L. (2005). Animal biotechnology: applications and economic implications in developing countries. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 24(1): 127-139.

MAJERUS, P. W. e E. Kilburn (1969). Acetyl Coenzyme A Carboxylase. The roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in rat liver. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6254-6262.

MAUGHAN, R. (2005). Basic metabolism II: carbohydrate. *Surgery (Oxford)* 23(5): 154-158.

MCGIVAN, J. D., N. M. Bradford, M. Crompton e J. B. Chappell (1973). Effect of L-Leucine on the Nitrogen Metabolism of Isolated Rat Liver Mitochondria. *Biochem. J.* 134: 209-215.

MILNE, C. (2000). The history of the Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36: 99-102.

MORON-FUENMAYOR, O. E. e T. Clavero (1999). The effect of feeding system on carcass characteristics, non-carcass components and retail cut percentages of lambs. *Small Ruminant Research* 34(1): 57-64.

NEWSHOLME, P., J. Procopio, M. M. R. Lima, T. C. Pithon-Curi e R. Curi (2003). Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem. Funct.* 21: 1-9.

NORDLIE, R. C., J. D. Foster e A. J. Lange (1999). Regulation of Glucose Production by the Liver. *Annual Review of Nutrition* 19(1): 379-406.

NUR, T., I. Sela, N. J. G. Webster e Z. Madar (1995). Starvation and Refeeding Regulate Glycogen Synthase Gene Expression in Rat Liver at the Posttranscriptional Level. *J. Nutr.* 125(10): 2457-2462.

OSUJI, P. O., E. M. Saarisalo, A. Tegegne e N. N. Umunna (2005). Undernutrition of dairy cattle in smallholder production systems in East Africa. Nairobi (Kenya), *International Livestock Research Institute (ILRI)*: 97-120.

PARRILLA, R. e M. N. Goodman (1975). Nitrogen Metabolism in the Isolated Perfused Rat Liver. *Biochem. J.* 138: 341-348.

PAULINO, M. d. L. M. V. e D. R. d. S. Sartori, Eds. (2006). Metabolismo e Transporte de Nutrientes 2006 (Capitulo 3). *Agronomia - Bases da Fisiologia Animal*.

PEARCE, J. (1983). Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society* 42(02): 263-271.

PFAFFL, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR (Chaper 3) in: A-Z of quantitative PCR (S.A Bustin). *International University Line (IUL)*: 87 - 112.

PRAYAGA, K. C., W. Barendse e H. M. Burrow (2006). Genetics of Tropical Adaptation. *8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*: 13-18.

RHOADS, R. P., C. McManaman, K. L. Ingvarsten e Y. R. Boisclair (2003). The Housekeeping Genes GAPDH and Cyclophilin Are Regulated by Metabolic State in the Liver of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86(11): 3423-3429.

ROBERT, C., S. McGraw, L. Massicotte, M. Pravetoni, F. Gandolfi e M.-A. Sirard (2002). Quantification of Housekeeping Transcript Levels During the Development of Bovine Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction* 67(5): 1465-1472.

ROSA, J. L., R. Bartrons e A. Tauler (1992). Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J* 287 ( Pt 1): 113-6.



ROSSI JR., P., A. A. M Sampaio, P. F. Vieira (2007). Disponibilidade e absorção de aminoácidos em bovinos alimentados com diferentes fontes de compostos nitrogenados. *R. Bras. Zootec.*, 36(4): 960-967.

RUSSELL, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest e C. J. Sniffen (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim Sci.* 70(11): 3551-3561.

SANAN, D., J. Fan, A. Bensadoun e J. Taylor (1997). Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J. Lipid Res.* 38(5): 1002-1013.

SCHMITTGEN, T. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46(1-2): 69-81.

SHEEP MEAT FAST FACTS 2008 - Meat & Livestock Australia, Setembro 2008

SMITH, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 8(15): 1248-1259.

SOEST, P. J. V. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant (Second Edition)*, Cornell University Press.

THELLIN, O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout e E. Heinen (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75(2-3): 291-295.

THODEN, J. B., H. M. Holden, G. Wesenberg, F. M. Raushel e I. Rayment (1997). Structure of Carbamoyl Phosphate Synthetase: A Journey of 96 Å from Substrate to Product. *Biochemistry* 36: 6305-6316.

TILLMAN, J. B., J. M. Dhahbi, P. L. Mote, R. L. Walford e S. R. Spindler (1996). Dietary Calorie Restriction in Mice Induces Carbamyl Phosphate Synthetase I Gene Transcription Tissue Specifically. *Journal of Biological Chemistry* 271:: 3500-3506.

TILLMANN, H., D. Bernhard e K. Eschrich (2002). Fructose-1,6-bisphosphatase genes in animals. *Gene* 291: 57-66.

TOWLE, H. C. (1995). Metabolic Regulation of Gene Transcription in Mammals. *Journal of Biological Chemistry* 270(40): 23235-23238.

TRIVERS, M. T., A. J. Vallance, H. T. Gourlay, C. A. Gill, I. Klein, C. B. K. Bottema e M. C. Barber (2001). Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes. *Biochem. J.* 359: 273-284.

UGOCHUKWU, N. H. e C. L. Figgers (2006). Modulation of the flux patterns in carbohydrate metabolism in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats by dietary caloric restriction. *Pharmacological Research* 54(3): 172-180.

VAN BEERS, E. H., E. H. H. M. Rings, G. Posthuma, M. A. Dingemans, J. A. M. J. Taminiu, H. S. A. Heymans, A. W. C. Einerhand, H. A. Buller e J. Dekker (1998). Intestinal Carbamoyl Phosphate Synthase I in Human and Rat: Expression During Development Shows Species Differences and Mosaic Expression in Duodenum of Both Species. *J. Histochem. Cytochem.* 46(2): 231-240.

VAN HARTEN, S. e L. A. Cardoso (2010). Feed restriction and genetic selection on the expression and activity of metabolism regulatory enzymes in rabbits. *The Animal Consortium 2010*, Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, Portugal & Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, Lisboa, Portugal: 1-11.

VAN SCHAFTINGEN, E. e I. Gerin (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362: 513-532.

VELEZ, J. C. e S. S. Donkin (2005). Feed Restriction Induces Pyruvate Carboxylase but not Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88(8): 2938-2948.

VISCHER, U., B. Blondel, C. B. Wollheim, W. Hoppner, H. J. Seitz e P. B. Iynedjian (1987). Hexokinase isoenzymes of RIN-m5F insulinoma cells. Expression of glucokinase gene in insulin-producing cells. *Biochem. J.* 241(1): 249-255.

WANG, Y., A. Bell, M. Hermodson e P. Roach (1986). Liver isozyme of rabbit glycogen synthase. Amino acid sequences surrounding phosphorylation sites recognized by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261(36): 16909-16915.

WETTER, T. J., A. C. Gazdag, D. J. Dean e G. D. Cartee (1999). Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276(4): E728-738.

WILHELM, J. e A. Pingoud (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4(11): 1120-1128.

WILLIAMSON, G. e W. J. A. Payne (1980). An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics. New York (USA), Longman Group.

WRIGHT, P. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology* 198(2): 273-281.

YAMADA, K. e T. Noguchi (1999). Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* 337(1): 1-11.

YÁÑEZ, A. J., R. Bertinat, I. I. Concha e J. C. Slebe (2003). Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver. *FEBS letters* 550(1): 35-40.

ZHANG, L. e W.-H. Li (2004). Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly than Tissue-Specific Genes. *Mol Biol Evol* 21(2): 236-239.

ZHAO, S. e R. D. Fernald (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology* 12 (8): 1047-1064.