

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária



**CARACTERÍSTICAS DA ADAPTAÇÃO GENÉTICA DA LACTOPOIESE EM CONDIÇÕES
TROPICAIS DE EXPLORAÇÃO DO GADO BOVINO**

DANIELA WETZEL GASTAL

Orientadores: Professor Doutor Luis Granger Alfaro Cardoso
Professora Doutora Deodália Maria Antunes Dias

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária,
especialidade de Produção Animal

2015

LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária



CARACTERÍSTICAS DA ADAPTAÇÃO GENÉTICA DA LACTOPOIESE EM CONDIÇÕES TROPICAIS DE EXPLORAÇÃO DO GADO BOVINO

DANIELA WETZEL GASTAL

Orientadores: Professor Doutor Luis Granger Alfaro Cardoso
Professora Doutora Deodália Maria Antunes Dias

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias,
especialidade de Produção Animal

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Presidente: Doutor Rui Manuel de Vasconcelos e Horta Caldeira

Vogais: Doutor Alfredo Manuel Franco Pereira

Doutor Julio Gil Vale Carvalheira

Doutor Luís Lavadinho Telo da Gama

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

2015

LISBOA

Aos meus pais que me ensinaram a voar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força para seguir sempre em frente.

Ao investigador Doutor Luis Alfaro Cardoso, a quem sempre chamei com muita humildade de professor, pela orientação, dedicação e empenho ao longo destes anos. Agradeço pelos conselhos, críticas, entusiasmos e por fazer parte nesta caminhada científica.

À Professora Doutora Deodália Dias quero agradecer a sua co-orientação e apoio e manifestar-lhe a minha gratidão por ter aberto as portas da Faculdade de Ciências para que eu pudesse realizar grande parte dos estudos transcriptômicos presentes neste trabalho.

À Professora Doutora Marília Viviane Snel Oliveira, pelo auxílio nos procedimentos experimentais realizados no Brasil. Agradeço pela amizade incondicional.

À equipe da Professora Doutora Maria Salomé Paes do BIOFIG, nomeadamente a Doutora Mónica Sebastiana, Andreia Figueiredo e Filipa Monteiro que me acolheram e muito me ensinaram a cerca da identificação de genes.

À Doutora Sofia van Harten, por todo o seu apoio, amizade e disponibilidade durante todo o processo de desenvolvimento desta Tese. Aos momentos de entusiasmos e de grandes frustrações que passamos durante estes anos.

Aos pesquisadores Mestre Frederico Feitor, Tânia Cruz e Luís Miguel Fonseca Alves pelo grande auxílio nas análises laboratoriais.

Ao Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal (CIISA) por ter financiado parte deste trabalho e a Fundação para a Ciência e Tecnologia pela Bolsa de Doutoramento (SFRH / BD / 48549 / 2008) que possibilitou à minha dedicação exclusiva a este trabalho.

A EMBRAPA – CERNAGEN por permitir a realização dos procedimentos experimentais realizados no Brasil. Ao Prof. Maurício Machain meu especial agradecimento.

Às explorações comerciais de Brasília, Brasil e de Azambuja, Portugal, que gentilmente ofereceram seus animais para participarem deste estudo.

Aos meus amigos que durante estes anos me acompanharam e se cansaram de ouvir falar de glândula mamária de vacas.

Aos meus pais, Luis Fernando Vieira Gastal e Cleusa Wetzel Gastal, e irmãos, Fernanda Wetzel Gastal e Luis Edmundo Wetzel Gastal, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram mesmo quando meus sonhos me levaram para longe deles.

Ao meu marido e companheiro João Santos que participou de todas as minhas conquistas e frustrações durante todos estes anos. Obrigada por nunca me ter deixado desistir e ainda me presentear com a maior fonte de alegria de nossas vidas, nossos filhos.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Wetzel-Gastal D, van Harten S, Cruz T, Sebastiana M, Sousa L M R, Cardoso L A. 2013. Genomic study of mammary gland in bovine acclimated to tropical environment. South African Journal of Animal Science 2015.

Wetzel-Gastal D, Feitor F, van Harten S, Sebastiana S, Sousa L M R, Cardoso L. 2013. A Genomic study on the Holstein cattle mammary gland adaptation to tropical environment. South African Journal of Animal Science 2015.

Snel-Oliveira MV, Wetzel-Gastal D, Sartori R, Neves LP, 2013. Influência de procedimentos ginecológicos frequente no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas bubalinas Murrah. Ciência Animal Brasileira, [S.l.], 14(4):468-472. DOI 10.5216/cab.v14i4.16377

Castro Filho M A, Barbosa M A A F, Oliveira R L, Bagaldo A R, Wetzel-Gastal D, 2007. Nutritional value of the straw of green maize for bovines. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.8, n.2, p. 112-121

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Wetzel-Gastal D, van Harten S V, Cruz T Sebastiana M, Paes M S, Cardoso L A, 2013. Genomic study of mammary gland in bovine adapted to tropical environment. Anais... 50th Annual Meeting of the Brazilian Animal Science Society. Campinas– SP, Brasil.

Snel-Oliveira M V & Wetzel-Gastal D, 2012. Efeito da somatotropina bovina recombinante na produção de leite de búfalas Murrah sem bezerro ao pé. 2012. Anais... 49th Annual Meeting of the Brazilian Animal Science Society ".2012. Brasília - DF, Brasil.

Snel-Oliveira M V, Souza R W, Barros E L E, Wetzel-Gastal D, 2012. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on weight gain and body development in Murrah buffalo heifers. Anais XXVII World Buiatrics Congress, Lisbon.

Wetzel-Gastal D, Feitor F, van Harten S V, Sebastiana M, Paes M S, Cardoso L A, 2011 A Genomic studies on the Holstein cattle mammary gland adaptation to tropical environment. Anais... 48th Annual Meeting of the Brazilian Animal Science Society. Belém – PA, Brasil.

RESUMO

As alterações climáticas em curso têm induzido elevações globais de temperatura e uma escassez de recursos de água que tendem a atingir regiões tropicais e de clima temperado. Estas alterações ambientais têm um impacto significativo nas produções agrárias, em particular nas que exigem o consumo de volumes significativos de água e de energia, como a produção de leite. Estes factos têm induzido estudos genómicos da adaptação ao *stress* abiótico de plantas e animais nomeadamente relativos à produção de leite nas regiões temperadas (região Mediterrânea) e tropicais. No entanto poucos estudos têm sido feitos relativamente à adaptação genética e fisiológica da glândula mamária a condições de *stress* abiótico em ambientes tropicais. O nosso trabalho pretende estudar a eventual aclimatização de animais de raça Holstein ao ambiente tropical com particular incidência nos perfis genómicos da glândula mamária, comparando-os com animais de 2 grupos genéticos diferentes e com animais da raça Holstein submetidos a ambientes temperados. Para este objectivo identificamos expressões genéticas diferenciais, através de *microarrays* e PCR em tempo real, da glândula mamária dos animais em experiência. O trabalho foi dividido em dois estudos. No primeiro utilizaram-se vacas lactantes de três grupos genéticos (Holstein Brasil, Gyrolando e Gyr) submetidos a ambientes tropicais, e sob as mesmas condições de manejo e dieta. Foram identificados 14 genes com expressão diferencial na glândula mamária de pelo menos um dos três grupos associados a funções de desenvolvimento da glândula mamária, tolerância ao *stress* térmico e composição do leite. No segundo estudo foram utilizadas vacas Holstein em dois grupos experimentais, sendo um relativo a um ambiente tropical (Brasil) e outro a um ambiente temperado (Portugal). Os dois grupos em experiência foram submetidos aos mesmos sistemas de manejo e dietas com mesmo nível nutricional. Identificaram-se neste estudo 12 genes com expressão diferencial nos dois grupos experimentais relativos à composição do leite, desenvolvimento da glândula mamária e tolerância ao *stress* térmico. Conclui-se dos dois estudos e sem prejuízo do seu aprofundamento, que o grupo Holstein mantidos em condições tropicais de exploração apresentaram perfis compatíveis com um processo de aclimatização a ambientes tropicais tendo sido identificados transcritos com função relevante neste processo.

PALAVRAS-CHAVE: expressão genética; glândula mamária; ambientes tropicais; *stress* térmico; *Bos taurus*; *Bos indicus*

ABSTRACT

Ongoing climate change is inducing global temperature increases and a shortage of water resources which tends to reach temperate and tropical regions. These environmental changes have a significant impact on agricultural production, particularly the ones requiring the consumption of significant amounts of water and energy, as milk production does. These facts have induced genomic studies of adaptation to abiotic *stress* of plants and animals namely regarding increased of milk production in temperate (Mediterranean region) and tropical regions. However few studies have been made on the genetic and physiological adaptation of the mammary gland to abiotic stress conditions concerning tropical environment. Our study aims at studying the eventual acclimatization of Holstein animals to tropical environment with specific incidence of mammary gland genomic profile, comparing it with two different genetic groups and with Holstein bovines submitted to temperate environments. For this purpose we identified differential gene expressions, through microarray and real-time PCR, within the mammary gland of experimental animals. Our work was divided in two studies. On the first one three genetic groups (Holstein Brasil, Gyrolando and Gyr) lactating bovines submitted to tropical environment and to the same diet and managing conditions were used. We identified 14 genes with differential expression in the mammary gland in at least one of the three groups, associated with the function of mammary gland development, thermal stress tolerance and milk composition. In the second study, Holstein cows were used in two experimental groups, one concerning tropical environment, (Brazil), and the other regarding temperate climate (Portugal). All animal had same management system and nutritional levels. In this study we identified, within the two experimental groups, 12 genes with differential associated with milk composition, mammary gland development and heat stress tolerance. From these studies and without neglecting further work, we concluded that the Holstein breed animals kept in tropical conditions of production, presented profiles which are compatible with a acclimatization process to tropical environment. Transcripts that can have a relevant role in this process were identified.

KEYWORDS: genetics expression, mammary gland, tropical environment, heat *stress*, *Bos taurus*, *Bos indicus*.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
1.1.1 Stress por Elevadas Temperaturas.....	3
1.1.2 Aclimatização, Aclimatação, Adaptação.	7
1.1.3 Efeito do Stress por Elevadas Temperaturas na Produção de Leite.	9
1.1.3.1 <i>Bos taurus</i> – RAÇA HOLSTEIN	12
1.1.3.2 <i>Bos indicus</i> – RAÇA GYR.	14
1.1.3.3 HÍBRIDOS <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> – Gyrolando.	15
1.1.4 Glândula Mamária.....	17
1.1.5 Mecanismos Genéticos de Tolerância ao Stress por Elevadas Temperaturas.....	19
1.2 OBJECTIVOS	21
1.3 PLANO DE TRABALHO	22

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE GENES NA GLÂNDULA MAMÁRIA ASSOCIADOS A ADAPTAÇÃO E A ACLIMATIZAÇÃO EM CONDIÇÕES TROPICAIS DE EXPLORAÇÃO DO GADO BOVINO	23
2.1 RESUMO.....	24
2.2 INTRODUÇÃO	26
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.3.1 Caracterização dos Animais	31
2.3.2 Localização Geográfica e Condições Climáticas.....	32
2.3.3 Recolha de Amostras e Biópsia de Tecido do Parênquima Mamário	34
2.3.4 Estudo Transcriptómico	35
2.3.5 Análises Estatísticas	40
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.4.1 Perfis Hormonais.....	41
2.4.2 Estudo Transcriptómico	44
2.4.2.1 Genes Associados à Estrutura da Glândula Mamária.....	49
2.4.2.2 Genes Associados à Tolerância ao Stress a Elevadas Temperaturas.....	53
2.4.2.3 Genes associados à Composição do Leite	55
2.5 CONCLUSÃO	57

CAPÍTULO 3

ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BOVINOS HOLSTEIN EM AMBIENTES TROPICAIS.....58

3.1 RESUMO.....59

3.2 INTRODUÇÃO61

3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....63

3.3.1 Caracterização dos Animais55

3.3.2 Localização Geográfica e Condições Climáticas.....64

3.3.3 Recolha de Amostras e Biópsia de Tecido do Parênquima Mamário67

3.3.4 Estudo Transcriptómico68

3.3.5 Validação dos Dados – PCR em Tempo Real.....68

3.3.6 Análises Estatísticas69

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO70

3.4.1 Perfis Hormonais70

3.4.2 Estudo Transcriptómico71

3.4.2.1 Genes Associados à Estrutura da Glândula Mamária.....78

3.4.2.2 Genes Associados à Tolerância ao Stress por Elevadas Temperaturas.....80

3.4.2.3 Genes Associados à Composição do Leite81

3.5 CONCLUSÃO83

CAPÍTULO 4

4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS85

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS89

ANEXO I.....103

ANEXO II.....108

FIGURAS

Figura 1.1: Variação na temperatura corporal de um animal homeotérmico em função da temperatura ambiente.....	4
Figura 1.2: Índice de Temperatura e Humidade para bovinos.....	6
Figura 1.3: Declínio da Produção de leite de acordo com o Índice de Temperatura e Humidade.	10
Figura 1.4: Vaca da raça Holstein	13
Figura 1.5: Vaca da raça Gyr.....	14
Figura 1.6: Modelo do cruzamento da formação da raça híbrida Gyrolando.....	16
Figura 2.1: Normal Climatológica da região experimental (Brasil).	33
Figura 2.2: Desvio Padrão dos genes testados para a escolha do <i>housekeeping</i>	40
Figura 2.3: Frequência das principais categorias ontológicas de função molecular dos genes diferencialmente expressos.....	45
Figura 3.1: Normal Climatológica de acordo com a região experimental.....	66
Figura 3.2: Índice de Temperatura e Humidade mensal de acordo com a região experimental	67
Figura 3.3: Desvio padrão dos genes testados para a escolha do <i>housekeeping</i>	69
Figura 3.4: Frequência das principais categorias ontológicas de função molecular dos genes diferencialmente expressos.....	72

TABELAS

Tabela 2.1: <i>Primers</i> utilizados na validação do experimento de <i>microarrays</i> através de PCR em Tempo Real (<i>housekeeping</i> e genes estudados).....	39
Tabela 2.2: Perfil hormonal (Prolactina, T ₃ , IGF-1 e Hormona do Crescimento) do sangue dos animais em experiência de acordo com o grupo genético.	42
Tabela 2.3: Clones da <i>Bovine EST and Microarray Web Resource</i> com maior expressão em tecido da glândula mamária de acordo com o grupo experimental	47
Tabela 2.4: Expressão génica relativa dos transcritos utilizados no PCR em Tempo Real de acordo com os grupos genéticos.....	48
Tabela 3.1: Perfil hormonal (Prolactina, T ₃ , IGF-1 e Hormona do Crescimento) do sangue dos grupos de animais em experiência	71
Tabela 3.2: Transcritos diferencialmente expressos na glândula mamária de bovinos com sobre expressão no grupo experimental Holstein Brasil.....	73
Tabela 3.3: Transcritos diferencialmente expressos na glândula mamária de bovinos com sobre expressão no grupo experimental Holstein Portugal.....	75
Tabela 3.4: Expressão génica relativa e <i>Fold Change</i> (razão HB/HP) dos transcritos utilizados no PCR em Tempo Real de acordo com os grupos experimentais	77

ABREVIACOES

BLO – *Bovine Long Oligonucleotide Library*

EST – *Expressed sequence tag*

EVHL – *Evaporative heat loss* - Perda de calor por evaporação

FC – *Fold Change* - razão entre dois genes

FDR – *False Discovery Rate* - Percentagem de Falso Positivo

GH – Hormona do Crescimento

GG – Gyr

HG – Gyrolando

HB – Holstein Brasil

HP – Holstein Portugal

HSP – *Heat shock protein*

HSF1 – *Heat shock factor 1*

ICTB – Índice de Conforto Térmico para Bovinos

IGF 1 – Factor de Crescimento semelhante a Insulina tipo 1

ICTP - *International Commission for Thermal Physiology*

IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change*

ITH – Índice de Temperatura e Humidade

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

QTL – *Quantitative trait locus*

RP – *Rank Product Test*

RT PCR – PCR em Tempo Real

T₃ – Triiodotironina 3

T₄ - Tiroxina

ZTN – Zona de termoneutralidade

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

O aquecimento global, a escassez de água, a produção de energia e a produção de alimentos estão entre as grandes questões de sustentabilidade do ambiente e da vida. As mudanças climáticas terão, nas várias regiões do globo, impactos sobre os diversos sectores socioeconómicos e sistemas biofísicos sensíveis ao clima.

As perspectivas de alterações climáticas futuras indicam que os fenómenos decorrentes do aquecimento global que se têm feito sentir tornar-se-ão mais frequentes com consequências gravosas nos sistemas biofísicos e em vários sectores socioeconómicos (Santos *et al.*, 2002). No continente europeu prevê-se que os impactos sejam bastantes mais negativos no Sul do que no Norte (*Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC, 2007*).

Estudos realizados pelo Projecto *Mudanças Climática em Portugal – Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação - SIAM II* (Santos e Miranda, 2006), que constituíram uma avaliação integrada dos impactos e medidas de adaptação às alterações climáticas em Portugal Continental, indicam que os seus efeitos serão particularmente negativos nos recursos hídricos, na biodiversidade, na saúde e na produção de alimentos.

Em 2007, o IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007*) lançou o seu quarto relatório sobre os avanços da ciência referente às mudanças climáticas globais. Na avaliação realizada pelo IPCC salientou-se que em Portugal Continental, em particular no último quarto de século, registou-se um aumento significativo das temperaturas máximas e mínimas médias, com redução da amplitude térmica. Destacou-se a necessidade de se estabelecerem estratégias de mitigação e adaptação às mudanças climáticas visando reduzir a vulnerabilidade dos sistemas produtivos.

A produção animal global enfrentará grandes desafios nas próximas décadas, a fim de atender ao aumento do consumo de proteínas por parte de uma crescente população mundial ameaçada pela mudança climática e mudança de expectativas sociais (Mandonnet *et al.*, 2012). Os parâmetros de seleção animal visando uma maior produtividade devem adaptar-se a esta procura associada aos indicativos climáticos recorrentes (Bilby, 2011). Para tanto esta seleção deve ser efetuada no sentido de aumentar, entre outros fatores, a tolerância ao *stress* por altas temperaturas, incrementando a ingestão de alimentos, diminuindo a produção de

calor metabólico e aumentando a capacidade animal para perda de calor (Renaudeau *et al.*, 2012).

Esta questão tem especial importância quando se considera a produção de leite. Mandonnet *et al.* (2012) identifica três áreas chaves para o futuro da produção leiteira: (1) identificação de animais com capacidade de adaptação e/ou aclimatização a uma mudança no ambiente e nos seus recursos disponíveis; (2) utilização estratégica de alimentação local; (3) implementação de sistemas de produção que correspondam a territórios e mercados globais, com foco em sistemas mistos. Adiante discutiremos os conceitos de adaptação e aclimatização.

O nosso trabalho incide em particular sobre o estudo de indicativos (genes expressos na glândula mamária) da possível existência de um processo de aclimatização dos animais da raça Holstein em experiência a ambientes com elevadas temperaturas.

1.1.- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. STRESS POR ELEVADAS TEMPERATURAS

Os animais constituem-se em sistemas termodinâmicos abertos, que continuamente trocam energia e massa com o ambiente. Neste processo, os fatores externos ambientais tendem a produzir variações internas no animal, afetando a quantidade de energia trocada entre ambos, induzindo a necessidade de ajustes fisiológicos para a ocorrência do balanço térmico (Azevêdo e Alves, 2009). Para a manutenção da temperatura corporal os animais homeotérmicos trocam calor com o meio através de variações fisiológicas, comportamentais e metabólicas (Howard, 2012; Guimarães *et al.*, 2002).

A homeotermia é um estado fisiológico onde o animal mantém a temperatura corporal em níveis pouco variáveis, independentes de alterações da temperatura ambiente. Os animais homeotérmicos possuem uma zona de termoneutralidade - ZTN (Figura 1.1), ou seja, uma faixa de temperatura ambiente, associada a umidade relativa e radiação solar, em que os animais não despendem de energia adicional para a termorregulação de forma a manterem a sua temperatura dentro dos limites fisiológicos normais. Essa faixa de temperatura favorece a expressão do seu máximo potencial genético.

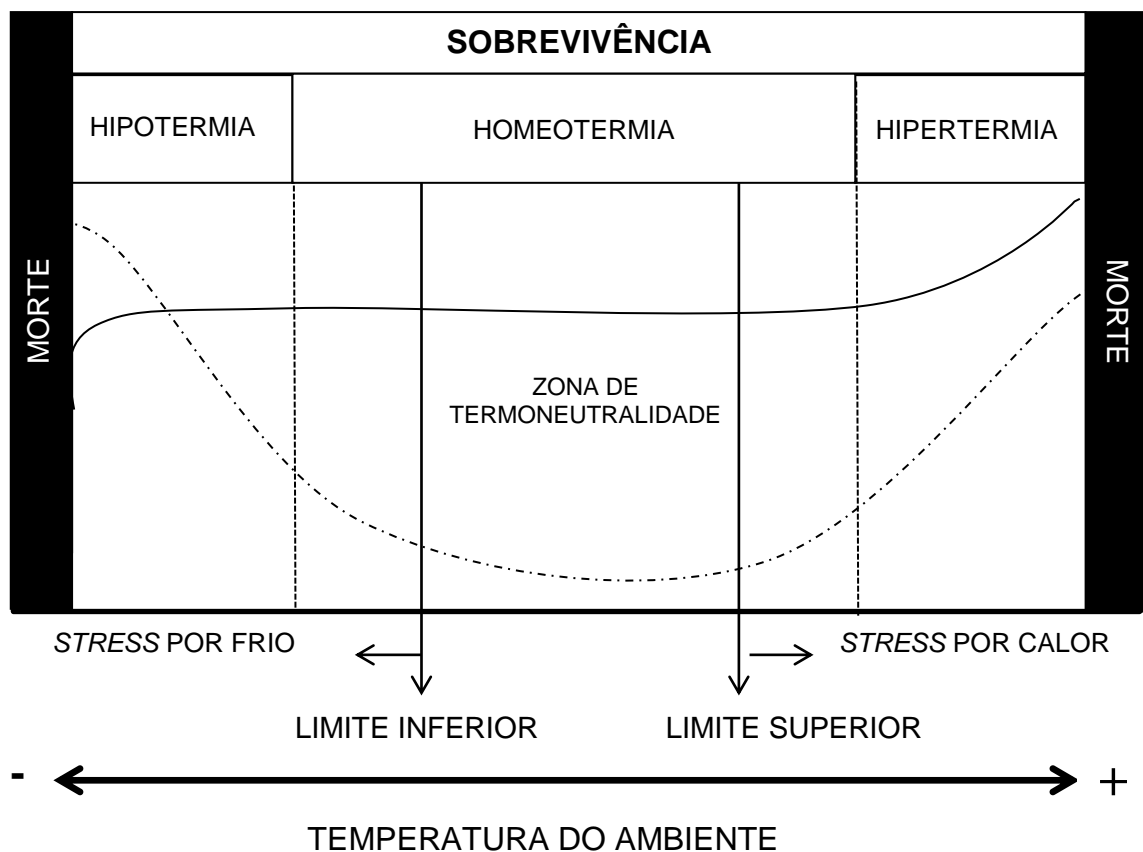


Figura 1.1: Variação na temperatura corporal de um animal homeotérmico em função da temperatura ambiente. (Adaptado de Hafez, 1973). ____ Representação da variação da temperatura corporal do animal; Representação da utilização de energia do animal para a termorregulação.

A zona de termoneutralidade para cada animal é dependente de diversos fatores, sendo alguns ligados ao animal, como peso, idade, estado fisiológico, dimensão da manada, nível de alimentação, genética, outros, ligados ao ambiente como a temperatura, velocidade do vento, humidade relativa do ar (Howard, 2012; Kadzere *et al.*, 2002). Na ZTN o custo fisiológico é mínimo para o animal, havendo o máximo de aproveitamento da energia da dieta e, o mínimo de gasto energético para a manutenção do animal. A energia do organismo é direcionada para os processos produtivos, sem que haja desvios de energia para manter o equilíbrio fisiológico do animal (Azevêdo e Alves, 2009).

Apesar de ser o meio natural de controlo da temperatura do organismo, a termorregulação representa um esforço extra quando o animal está fora da zona de termoneutralidade, o que tem por consequência uma alteração na produtividade. A

manutenção da homeotermia é prioritária para os animais e sobrepõe-se às funções produtivas (Martello *et al.*, 2004).

Quando as respostas a um estímulo *estressor* não conseguem compensar seus efeitos, verificando-se um desvio à homeostase, considera-se que o animal está em *stress*. Um animal é considerado em estado de *stress* quando se fazem necessários ajustes (naturais ou artificiais) no seu comportamento e/ou fisiologia, com a finalidade de facilitar a expressão de seu genótipo e/ou fenótipo frente aos aspectos anti homeostáticos do ambiente (Renaudeau *et al.*, 2012; Columbano, 2007).

Quando as variáveis ambientais como temperatura, humidade e radiação, combinadas com o estado fisiológico do animal, ultrapassam o limite superior da Zona de Termoneutralidade os animais entram em um estado denominado *stress* por altas temperaturas, ou *stress* calórico (Bernabucci *et al.*, 2010). A temperatura do ar é considerada o fator climático com influência mais importante sobre o ambiente físico do animal (Dahl, 2010; Souza, 2007).

Nas regiões denominadas tropicais, de clima quente, predomina o *stress* climático por altas temperaturas, resultantes de condições ambientais adversas (alta temperatura ambiente, alta humidade relativa do ar e alta radiação solar) que aliadas a alta produção de calor metabólico dão origem a uma acumulação de calor corporal excedente. Quando o animal não consegue eliminar para o ambiente esse excedente, ocorre o *stress* por elevadas temperaturas (Azevêdo e Alves, 2009).

Armstrong (1994) propôs um Índice de Conforto Térmico para Bovinos, correspondente ao Índice de Temperatura e Humidade (ITH), tendo como referência estas duas variáveis climáticas. O mesmo autor classificou o *stress* por calor de acordo com a variação de ITH em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98), (Figura 1.2). ITH inferior a 72 caracterizaria um ambiente sem *stress* por calor. De acordo com West (2003), valores de ITH a partir de 72 resultam em uma diminuição de 0,2 kg de leite por unidade de ITH acrescida. Este índice foi proposto inicialmente para animais de clima temperado. Azevedo *et al.* (2005), determinaram um ITH de 76 como o valor crítico a partir do qual animais adaptados a ambientes tropicais começariam a apresentar sinais de *stress* brando por elevadas temperaturas.

Temperatura °C	HUMIDADE RELATIVA																						
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
23,89															72	72	73	73	74	74	75	75	
26,67									72	72	73	73	74	74	75	76	76	77	78	78	79	79	80
29,44																							
32,22																							
35,00																							
37,78																							
40,55																							
43,33																							
46,11																							
48,89																							

Stress ameno
Stress moderado
Stress severo

Figura 1.2: Índice de Temperatura e Humidade para bovinos (Adaptado de Armstrong, 1994).

Os processos de troca de calor dão-se através de mecanismos de radiação, convecção, condução e evaporação (Renaudeau *et al.*, 2012), cuja velocidade e sentido em que ocorrem dependem da idade, da espécie, da raça, do consumo alimentar, da aclimatização, do nível de produção, entre outros (Robinson, 2004).

O animal em *stress* por altas temperaturas inicia uma resposta comportamental e fisiológica, considerada como mecanismos homeostáticos que incluem o aumento do consumo de água, da sudorese, da salivação e da frequência respiratória, e redução do consumo alimentar e da frequência cardíaca (Renaudeau *et al.*, 2012). A variação destes parâmetros está na dependência da intensidade e da duração do *stress* a que estão submetidos os animais.

A resposta animal ao aumento da temperatura depende da sua termotolerância. O seu efeito sobre os sistemas fisiológicos dos bovinos pode ser de tal magnitude, que afete sua capacidade de crescimento, reprodução e produção (Yousef, 1985). Esta resposta compreende três componentes principais: o reconhecimento da ameaça à homeostase ou ao bem-estar; resposta ao *stress* calórico; consequências da indução do *stress* (Azevêdo e Alves, 2009).

A suscetibilidade dos bovinos ao *stress* por elevadas temperaturas aumenta à medida que o binómio humidade relativa e temperatura ambiente ultrapassa a zona de termoneutralidade, o que dificulta a dissipação de calor que, por sua vez, aumenta a temperatura corporal, com efeito negativo sobre o seu desempenho. Do ponto de vista bioclimático, mesmo para animais híbridos (*Bos taurus* x *Bos indicus*),

considerados tolerantes ao calor, podem ocorrer alterações comportamentais e fisiológicas (Costa *et al.*, 2015; Nardone, 1998).

A *International Commission for Thermal Physiology (International Commission for Thermal Physiology - ICTP, 2001)* definiu os termos utilizados para descrever como os animais respondem as variações térmicas, sendo eles aclimatização, aclimatação e adaptação.

1.1.2. – ACLIMATIZAÇÃO, ACLIMATAÇÃO, ADAPTAÇÃO

A aclimatização animal consiste num conjunto de ajustamentos fisiológicos adaptativos duradouros, que resultam no aumento de tolerância a contínuas ou repetitivas exposições a vários fatores de *stress* climáticos e comumente produzido em condições de campo (Collier *et al.*, 2012; Cincovic *et al.*, 2011; ICTP, 2001).

O processo de aclimatização, conforme o ICTP (2001) diferencia-se da adaptação genética animal na medida em que esta última refere-se a um conjunto de alterações hereditárias nas características que favorecem a sobrevivência de uma população de indivíduos a um determinado ambiente total e que podem envolver modificações evolutivas em muitas gerações (seleção natural) ou a aquisição de propriedades genéticas específicas (seleção artificial).

A aclimatização está associada a adaptações fenotípicas num período de vida animal para componentes climáticos específicos, enquanto na adaptação (genotípica) não há uma especificação dos componentes climáticos e sim de um ambiente total (Bernabucci, *et al.*, 2010; ICTP, 2001). O termo adaptação fenotípica também pode ser utilizado para denominar o processo de aclimatização/aclimatação (Renaudeau *et al.*, 2012; ICTP, 2001).

Aclimatização e aclimatação são definidas como sendo o mesmo processo, apenas diferenciado pelo facto do primeiro ocorrer em condições naturais (de campo) e o segundo em condições artificiais (câmaras bioclimáticas) (ICTP, 2001).

Em bovinos leiteiros, o processo de aclimatização dá-se quando o animal não foi sujeito a extremos térmicos, indutores de hipertermia ou hipotermia aguda e que impeçam o animal de manter a sua temperatura interna relativamente estável, independentemente da temperatura ambiente (Cincovic, *et al.*, 2011). Segundo este autor, a aclimatização será eficaz quando o animal consegue, ao longo do tempo, reestabelecer a termoneutralidade, mantendo a taxa respiratória e a temperatura

rectal normal. Verifica-se assim um ajuste da zona de termoneutralidade às novas temperaturas críticas.

Algumas características fenotípicas associadas à tolerância animal ao *stress* por elevadas temperaturas, tais como superfície corporal, não se alteram durante o processo de aclimatização. Contudo características como comprimento, cor e espessura da pelagem e morfologia das glândulas sudoríparas tendem a ajustar-se ao processo adaptativo do animal (Azevêdo e Alves, 2009).

Animais adaptados a regiões com temperaturas ambientais mais elevadas (tropicais ou subtropicais) apresentam pelagem mais curta, de cor clara, pelo grosso, medulados e bem assentes sobre a epiderme bem pigmentada (Silva, 2000). Estas características físicas da pelagem favorecem a convecção e a evaporação cutânea, sendo que altos níveis de melanina na epiderme protegem-na contra a radiação ultravioleta. Contudo, animais aclimatizados tendem a alterar a sua pelagem para melhor aumentar o índice de reflexão à radiação, característica dos animais adaptados (Azevêdo e Alves, 2009).

Outra alteração observada em animais aclimatizados refere-se às glândulas sudoríparas (Silanikove *et al.*, 2009). Segundo este autor, animais de origem europeia aclimatizados a ambientes tropicais apresentam glândulas sudoríparas saculiformes com diâmetros aumentados e em maior quantidade face aqueles não aclimatizados (glândula de aparência envelada e em menor número).

Diversos autores (Renaudeau, *et al.*, 2012; Cincovic, *et al.*, 2011; Bernabucci *et al.*, 2010; Collier *et al.*, 2008; Horowitz, 2002) estudaram a aclimatização/aclimatação a partir de uma revisão do conceito proposto pelo ICTP (2001). Neste sentido estes autores caracterizaram a aclimatização ao *stress* por calor como processo temporal bifásico (fase aguda e crónica), que inclui um processo de curto prazo (resposta ao *stress* momentâneo por calor) e um de longo prazo (resposta a repetitivos estímulos estressores). A curto prazo o animal diminui a ingestão de matéria seca, e aumenta o consumo de água, diminuindo a produção de leite, enquanto a longo prazo ocorre uma reprogramação da expressão de genes associados a lactopoiese e à tolerância ao *stress* por altas temperaturas (Cincovic *et al.*, 2011; Bernabucci *et al.*, 2010; Collier *et al.*, 2008).

No presente trabalho, nos termos das condições experimentais, estudamos a aclimatização a longo prazo, conforme definida por Horowitz (2002), em que há alteração da expressão génica. Estudamos também, nas mesmas condições,

características de adaptação genética de acordo com o conceito do ICTP (2001). O estudo incide sobre características genéticas expressas na glândula mamária de animais considerados geneticamente adaptados a ambientes tropicais (Gyr), animais não adaptados, mas eventualmente em processo de aclimatização a longo prazo em que podem ocorrer alterações na expressão genética (Holstein Brasil) e a um cruzamento entre estas duas raças (Gyrolando).

Alterações na expressão genética, associadas com a reacção ao *stress* ambiental, podem envolver respostas agudas ao nível celular bem como modificações em vários órgãos e tecidos associados com a resposta a aclimatização (Collier *et al.*, 2006).

1.1.3. – EFEITO DO STRESS POR ELEVADAS TEMPERATURAS NA PRODUÇÃO DE LEITE

Atualmente estima-se que cerca de 65% da produção de leite mundial está situada em áreas tropicais ou subtropicais (FAO statistics, 2014). Desta forma há a necessidade de que as raças especializadas na actividade leiteira estejam adaptadas ou aclimatizadas a estes ambientes para poderem melhor expressar o seu potencial genético na produção de leite.

O aumento na produção de leite está associado à maior ingestão de matéria seca, com conseqüente aumento na produção de calor metabólico, o que diminui a eficiência da termorregulação de vacas leiteiras em lactação (Renaudeau *et al.*, 2012). Altas temperaturas do ar, principalmente quando associadas a elevados graus de humidade e à radiação solar directa, como é o caso de regiões de clima tropical, são elementos climáticos responsáveis por baixos desempenhos do gado leiteiro (Pinheiro *et al.*, 2005). As vacas leiteiras de raças especializadas, em lactação, e de alta ou mesmo moderada produção, são particularmente sensíveis ao *stress* por elevadas temperaturas, devido à função produtiva especializada e alta eficiência na utilização dos alimentos (Baccari Junior, 1998).

O efeito da alteração de humidade e temperatura de acordo com a estação do ano sobre a produção de leite foi demonstrado por vários investigadores (Renaudeau *et al.*, 2012; Bionaz e Loor 2007; Baccari Junior, 1998). Collier *et al.* (1981), demonstraram que a produção de leite começa a apresentar um declínio detectável com temperaturas acima de 26°C o que corresponde a um ITH acima de 72 (Figura 1.2). Zimbleman *et al.* (2009) recalcularam o ITH para vacas em lactação

considerando os avanços tecnológicos e de seleção animal na atividade leiteira. De acordo com estes autores, para vacas de alta produção (mais que 35 kg de leite/dia) o limite de ITH seria 68. Para animais com produção de leite de 30 kg /dia o ITH crítico para que o animal entre em *stress* por altas temperaturas permanece em 72.

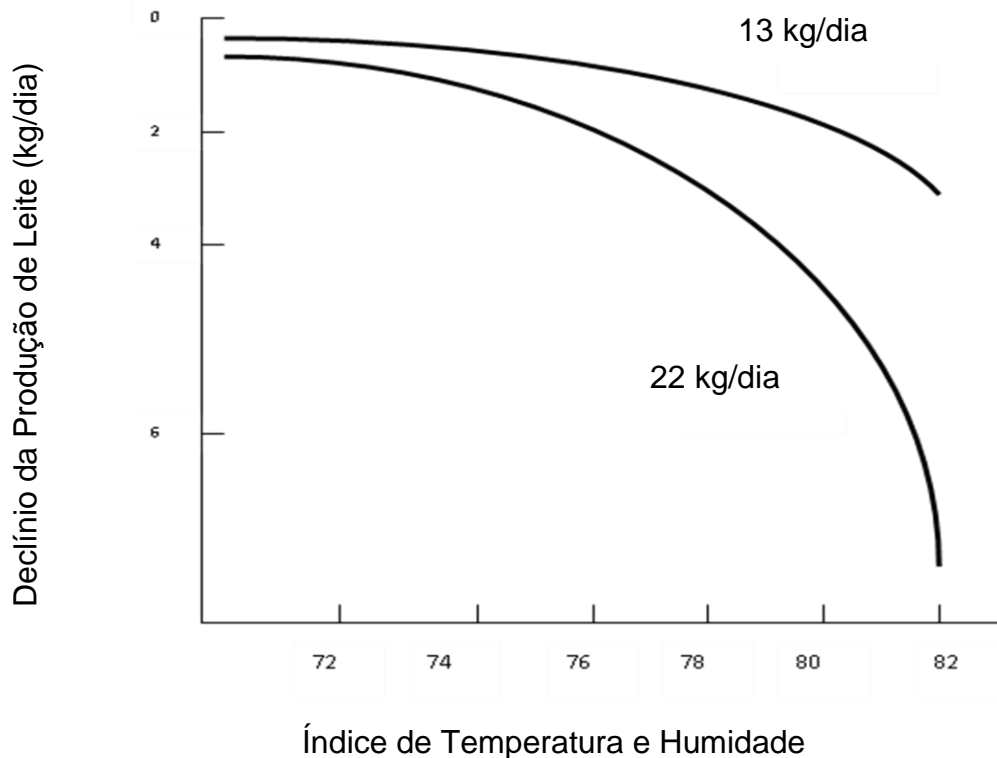


Figura 1.3: Declínio da produção de leite de acordo com o Índice de Temperatura e Humidade. (Adaptado de Collier, 1981).

De modo geral, a zona de termoneutralidade para vacas Holstein em lactação, varia de 4 °C a 26 °C (Periccionoto *et al.*, 2009). O limite superior da zona de termoneutralidade para vacas em lactação *Bos taurus* pode chegar a 29 °C, enquanto para vacas leiteiras *Bos indicus* pode chegar aos 35 °C, dependendo da humidade relativa do ar (Nääs e Arcaro JR, 2001). Kadzere *et al.*(2002) relata que o consumo de alimentos por vacas *Bos taurus* diminui quando a temperatura é superior a 26° C, indicando que o animal está em estado de *stress* por altas temperaturas.

De acordo com Pinarelli (2003) pode-se observar um decréscimo de 17% na produtividade de vacas com produção média de 15 kg de leite/dia e de 22% em

vacas de 40 kg de leite/dia quando o ITH é maior que 72. Igono *et al.* (1997), em estudos realizados no Maine (EUA), encontraram reduções na produção de leite de vacas Holstein de 11,5 a 16,0 kg/vaca/dia, comparando produções de Verão com as de meses com temperaturas amenas. Bernabucci *et al.* (2010), em estudos comparativos realizados no sul dos Estados Unidos, indicam para vacas *Bos taurus* em situações de *stress* térmico no início da lactação uma redução de 14% na produção de leite e de 35% após o pico da lactação. Esta redução normalmente é explicada pela diminuição na ingestão de matéria seca por estes animais.

A redução do consumo de alimentos em animais em estado de *stress* por altas temperaturas resulta no decréscimo do aporte de nutrientes disponibilizado através do sangue pelo sistema porta (Bernabucci, *et al.*, 2002). Segundo este autor, como consequência da diminuição da disponibilidade de nutrientes há uma alteração na percentagem de alguns componentes da proteína do leite, nomeadamente da fração da caseína.

Os animais em *stress* por elevadas temperaturas apresentam uma alteração no equilíbrio ácido-base do sangue, o que pode resultar em uma alcalose respiratória que é compensada pelo organismo animal com um aumento da excreção de bicarbonato pela urina e consequente diminuição da concentração de bicarbonato no sangue podendo causar acidose metabólica (West, 2003).

Entre as estratégias para diminuir o efeito de ambientes com elevadas temperaturas podemos citar aquelas associadas ao ambiente tais como o aumento do sombreamento; medidas de arrefecimento das instalações (água e ventilação), alteração na composição e na concentração de nutrientes da dieta; utilização de sistemas silvipastoris (Cruz *et al.*, 2011). Estas medidas envolvem custos elevados e em alguns casos não são totalmente eficientes.

Outra alternativa é utilizar raças adaptadas a ambientes tropicais. Contudo, normalmente estas raças são de origem zebuína (*Bos indicus*) e apresentam índices de produtividade menores face aquelas conseguidas por animais *Bos taurus*, nomeadamente animais da raça Holstein. Mesmo em cruzamentos entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, os índices de produtividade conseguidos ficam aquém daqueles verificados em animais Holstein (Azevedo *et al.*, 2005).

As características de um animal ideal para ambientes tropicais ou subtropicais seriam: (i) alta eficiência na utilização de alimentos; (ii) capacidade para promover a perda de calor corporal eficazmente; (iii) capacidade para conservar a produção

corporal de calor permitindo que os processos produtivos ocorram em um nível normal, mesmo quando a temperatura do ar for alta; (iv) isolamento contra a radiação solar (características de pele e pelos); (v) capacidade para suportar um alto grau de desidratação e elevação da temperatura corporal; (vi) maior resistência às doenças mais comuns em regiões tropicais (Azevêdo e Alves, 2009).

Animais *Bos indicus* apresentam maior resistência a temperaturas elevadas que *Bos taurus* (Kadzere, *et al.*, 2002), contudo algumas raças taurinas apresentam características que podem favorecer a aclimatização a ambientes tropicais. A identificação de animais bem adaptados ou com capacidade de aclimatização de/e nas diferentes raças pode ser uma solução alternativa para a seleção animal nos trópicos. Assim podem-se selecionar fenótipos termotolerantes, identificando genes e suas expressões relativas associadas a termotolerância em animais de raças com conhecida capacidade produtiva.

1.1.3.1. – *Bos taurus* – RAÇA HOLSTEIN

A raça bovina de vocação leiteira Holstein (*Bos taurus*) é considerada como a de maior produtividade. Nestes animais verificam-se valores médios de produção na ordem dos 8.000Kg de leite/ lactação (*World Holstein-Frisian Federation*, 2009).

Vacas de raça Holstein (Figura 1.4) e que possuem alta produtividade, apresentam um elevado incremento de calor metabólico, tornando-se mais suscetíveis ao *stress* por elevadas temperaturas (Pires, 2004). Klosowski *et al.* (2002), relatam uma superioridade produtiva de cerca de 15% na generalidade das explorações de clima temperado em relação às explorações de clima tropical, tendo em conta as condições de exploração.



Figura 1.4: Vaca da raça Holstein. (Fonte: Associação Brasileira de Criadores de Bovinos de Raça Holandesa, www.gadoholandes.com.br).

O melhoramento genético obtido na raça Holstein fundamenta-se na aplicação de programas de seleção em populações de grande efetivo e o uso generalizado da inseminação artificial, que permite a utilização de sémen de elevado valor genético. A seleção destes animais tem sido realizada no sentido de aumentar a sua produtividade, em detrimento do aumento da tolerância ao *stress* térmico (Renaudeau *et al.*, 2012; Azevêdo e Alves, 2009).

As explorações comerciais nos trópicos que utilizam animais da raça Holstein tendem a fazer grandes investimentos em instalações com sistemas que melhorem a ambiência animal além do manejo nutricional específico que permitam a manutenção da homeostase ou menor esforço para a aclimatização ao ambiente adverso (Renaudeau *et al.*, 2012; Azevêdo e Alves, 2009).

Diversos autores comparando animais da raça Holstein com animais com diferentes graus de sangue Holstein em cruzamento com Gyr (*Bos indicus*), no Planalto Central Brasileiro, observaram que as condições ambientais afectaram negativamente o desempenho produtivo dos animais Holstein puros face aos cruzados (McMannus *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2002; Faccó *et al.*, 2008).

Por outro lado, alguns autores relatam que animais da raça Holstein apresentam algumas características que podem evidenciar uma capacidade de se aclimatizarem a ambientes desde que as condições ambientais a que forem submetidos não ultrapassem valores de ITH que induzam *stress* severo por elevadas temperaturas. Srikandakumar e Jonhson, 2004, em trabalho sobre os efeitos do *stress* por elevadas temperaturas na produtividade e no metabolismo de vacas leiteira, verificaram que animais da raça Holstein em estado de *stress* calórico apresentaram capacidade de manter o equilíbrio ácido-básico do sangue similar a de

animais *Bos indicus*. De acordo com Columbiano (2007), citando Carvalho *et al.*, 1985, animais *Bos taurus* nascidos e criados em ambientes tropicais apresentam temperatura rectal menor (38,9° C) face aqueles importados de ambientes temperados (40,5° C) e criados em ambientes tropicais. Estes podem ser indicativos da capacidade de se aclimatizarem a ambientes com altas temperaturas destes animais.

1.1.3.2. - *Bos indicus* – RAÇA GYR

A raça Gyr (*Bos indicus*), criada no Brasil, corresponde à sua homóloga da Índia. Historicamente os primeiros exemplares da raça Gyr foram introduzidos no Brasil por volta de 1906. Os trabalhos de selecção do Gyr Leiteiro foram iniciados no final da década de 30. A selecção para as características produtivas do Gyr acabou por modelar dois tipos distintos na raça, separando-a no sentido mais específico para o *Gyr carne* ou *Gyr leite* (Associação Brasileira dos Criadores de Gyr Leiteiro - ABCGIL). Animais do tipo *Gyr leite* (Figura 1.5) apresentam produtividade média de cerca de 4000 kg de leite por lactação, sendo considerada uma raça de média produtividade e com baixa pressão de selecção para produção de leite, mas que apresenta uma boa produtividade face a animais europeus em sistemas de níveis tecnológicos mais baixos (Reis Filho *et al.*, 2010).



Figura 1.5: Vaca da raça Gyr. (Fonte: Fazenda Palma, Brasil).

Esta raça apresenta entre as suas características mais importantes a alta tolerância ao *stress* por altas temperaturas, sendo utilizada como material genético de referência no estudo da produção de leite em ambientes tropicais (Reis Filho *et al.*, 2010).

A elevada capacidade de tolerância ao *stress* por altas temperaturas da raça Gyr dá-se porque animais *Bos indicus* apresentam metabolismo basal mais baixo do que o verificado nos *Bos taurus*, menor produção de leite, menor produção de calor corporal, e maior capacidade de sudorese (Bernabucci *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2005). Comparados aos bovinos europeus, os indianos são mais resistentes ao *stress* calórico e a outros factores ambientais que limitam a expressão das características produtivas nas áreas tropicais e subtropicais (Bó *et al.*, 2003). Em situações de *stress* calórico, os zebuínos podem sustentar seus níveis metabólicos sem queda no consumo de O₂, até temperaturas mais elevadas do que as toleradas pelas raças europeias (Azevedo *et al.*, 2005; Kadzeres *et al.*, 2002). Normalmente, em ambientes de elevada temperatura, animais *Bos indicus* apresentam temperatura rectal menor (38,5° C) face a animais *Bos taurus* (39,5° C).

A resposta de animais *Bos indicus* em termo de sudorese é mais rápida que a dos *Bos taurus* (Azevêdo e Alves, 2009). Animais *Bos indicus* apresentam maior número de glândulas sudoríparas que animais *Bos taurus* (Columbiano, 2007), além de que estes animais apresentam maior superfície corporal na área do pescoço, onde a concentração de glândulas sudoríparas tende a ser maior e a sudorese mais intensa.

1.1.3.3. – HÍBRIDOS *Bos taurus* x *Bos indicus* – GYROLANDO

A variação genética entre raças de diferentes origens pode ser utilizada na selecção da melhor raça; na formação de nova raça; e na utilização permanente de cruzamentos. Assim, animais da raça Gyr e da raça Holstein têm sido cruzados para aumentar a produção de leite e baixar os seus custos nos trópicos (Borges *et al.*, 2012, Facó *et al.*, 2008; Sandoval-Castro *et al.*, 1999). Esta estratégia implica a criação de vacas Gyr continuamente seleccionadas para esta atividade (Souza *et al.*, 1996). Contudo, diferentes autores têm comparado a utilização de animais F1 oriundos destes cruzamentos e não encontraram diferenças na produção de leite face aos animais Gyr (Porcionato *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2001).

A utilização de maior parcela de grau de sangue Holstein nos cruzamentos com animais Gyr tem sido amplamente estudados (Perotto *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2001; Sandoval-Castro, 1999;) e destes trabalhos resultou a criação da raça híbrida Gyrolando, que apresenta uma maior produtividade e tolerância ao *stress* térmico (Borges *et al.* 2012; McManus *et al.*, 2008), Figura 1.3. Esta raça híbrida está em formação e apresenta uma grande variabilidade genética, sendo que diferentes autores encontraram média de produção total de leite nestes animais variando de cerca 3000 kg leite a 6500 kg leite por lactação (Borges *et al.* 2012; Perotto *et al.*, 2010; Junqueira Filho *et al.*, 1992).



Figura 1.6- Modelo do cruzamento da formação da raça híbrida Gyrolando (Fonte: Associação Brasileira de Criadores da Raça Gyrolando). As setas indicam o trajeto do cruzamento.

Por estarem mais adaptadas ao ambiente tropical (Perotto *et al.*, 2010), as vacas Gyrolando podem ser muito produtivas se selecionadas e sujeitas ao manejo adequado (Borges, *et al.*, 2012).

1.1.4. - GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária é o órgão responsável pela transformação em leite dos nutrientes que lhe chegam por via sanguínea. O seu desenvolvimento envolve a interação complexa e integrada de hormonas, factores de crescimento, e vias metabólicas conduzindo à expressão regulada de genes determinantes na evolução do órgão.

Em consequência de sua ação sobre o consumo de alimentos, o *stress* térmico causa efeitos marcantes sobre o metabolismo da glândula mamária e da composição do leite (Arcaro Jr *et al.*, 2003). A redução da ingestão de alimentos, assim como a ocorrência de vasodilatação periférica, tem por consequência um menor fluxo de sangue à veia porta (fígado) e à glândula mamária, acarretando um menor aporte de nutrientes e energia disponível á produção de leite (Azevêdo e Alves, 2009).

A exposição contínua das células, incluindo as células epiteliais da glândula mamária, a cargas térmicas ambientais acima da zona de termoneutralidade provoca anomalias a nível do seu funcionamento (Collier *et al.*, 2006; Sonna *et al.*, 2002), alterando a transcrição de genes da síntese proteica em resposta ao choque térmico (Bionaz, *et al.*, 2012), dando início ao processo de aclimatização (Collier *et al.*, 2008).

Ao nível da glândula mamária o *stress* térmico desencadeia um processo de alterações da expressão genética no parênquima mamário (Collier *et al.*, 2006). Alterações essas que incluem a inibição de síntese de ADN, transcrição, processamento e tradução de ARN e que por sua vez desencadeiam diferentes processos, tais como (Sonna *et al.*, 2002): 1) inibição da proliferação celular; 2) apoptose; 3) desnaturação e agregação das proteínas; 4) aumento da degradação das proteínas; 5) rotura das componentes do citoesqueleto; 6) alterações no metabolismo que levam a redução no ATP celular; e 7) mudanças na permeabilidade da membrana que conduz a um aumento das concentrações intracelulares de Na⁺, de H⁺, e de Ca²⁺. As células do epitélio mamário, quando expostas a temperaturas elevadas que provoquem *stress* térmico, limitam processos necessários para o crescimento, desenvolvimento e produção de leite, e aceleram os mecanismos para sobreviverem ao *stress*.

Collier (2012) sugere que até 50% da redução da produção de leite durante o *stress* calórico pode ser devido a efeitos directos do *stress* sobre a síntese de leite pelo epitélio mamário ou a um inibidor localizado na glândula mamária associado a utilização de nutrientes. Silanikove *et al.* (2009), relatam uma possível alteração do metabolismo energético em animais sob *stress* por elevadas temperaturas, com maior utilização da glicose pelos tecidos periféricos e reduzida oxidação de lipídios.

O *stress* térmico na glândula mamária provoca também modificações na expressão de genes associados ao perfil das hormonas reguladoras da lactopoiese.

A hormona do crescimento (GH) e a prolactina estimulam a produção de leite. Embora os efeitos directos da prolactina sobre o epitélio mamário sejam bem documentados, os mecanismos de ação da GH, que parecem ser mediados indirectamente pelo IGF-1, não são bem conhecidos (Caldoncelli *et al.*, 2002). A prolactina, um polipeptídeo secretado pela hipófise anterior (Brym *et al.*, 2007) desempenha uma função reguladora importante no desenvolvimento da glândula mamária, na secreção de leite e na expressão genética de proteínas do leite (Horseman *et al.*, 1997). De acordo com Schoenau *et al.* (2005), o IGF afecta o desenvolvimento, a lactação e a reprodução animal por meio do estímulo do crescimento, diferenciação, metabolismo e sobrevivência de vários tipos celulares, utilizando vias endócrinas, parácrinas e autócrinas. O IGF-I regula o desenvolvimento da glândula mamária no que se refere à progressão do ciclo celular quanto à apoptose, com implicações na regulação da involução daquela glândula (Schoenau *et al.*, 2005).

A concentração das hormonas referidas tende a diminuir quando os animais estão em *stress* térmico pontual, podendo ser reestabelecida e até aumentada durante o processo de aclimatização (Collier *et al.* 2012).

A expressão genética da glândula mamária tem sido alvo de estudos concentrados na identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento desta glândula nas suas fases de pré-puberdade e de lactação (Bionaz e Loor, 2007; Suchyta *et al.*, 2003a; Suchyta *et al.*, 2003b, Sonstegard *et al.*, 2002), relacionadas com a composição proteica e lipídica do leite (Karninski *et al.*, 2005; Malewski e Zwierzchowski, 2001) e com o estudo de resistência a mastites (Kerr e Wellnitz, 2003). Destes trabalhos construíram-se bibliotecas de cDNA integrando vastas coleções de Expressed Sequence Tag (EST) correspondentes ao tecido mamário bovino como a BLO (Suchyta *et al.*, 2003a). Contudo pouco se sabe sobre e

expressão genética diferencial entre raças/genótipos que apresentem diferentes capacidades de adaptação e/ou aclimatização ao *stress* abiótico correspondentes a condições tropicais de exploração, e que conseqüentemente afetem a produção de leite.

1.1.5. - MECANISMOS GENÉTICOS DE TOLERÂNCIA AO STRESS POR ELEVADAS TEMPERATURAS

Apesar da tolerância genética à temperatura variar com as raças de bovinos, têm sido mostrado, como atrás referido, que apenas quando as temperaturas ambientais igualam ou excedem os 29°C para *Bos taurus* e 35°C para *Bos indicus*, os animais começam a usar energia adicional para abaixar a temperatura corporal com possível alteração a expressão de genes associados a defesa celular (Collier *et al.*, 2006; Keister *et al.*, 2002).

A tolerância genética à temperatura altera-se de acordo com a raça de bovinos. Contudo quando as temperaturas ambientais igualam ou excedem os 29°C, mesmo com medidas de arrefecimento adotadas, a maioria das raças bovinas leiteiras começa a utilizar energia adicional para o processo de homeostase, reduzindo ou redirecionando a energia metabolizável da produção (Collier, 2012; Keister *et al.*, 2002). De acordo com Hansen (2004), isto pode ser explicado provavelmente porque animais *Bos indicus* e *Bos taurus* se desenvolveram ao longo dos anos em ambientes distintos, que teve como conseqüência a maior expressão de genes associados a capacidade de termotolerância pelos animais zebuínos. De acordo com esta teoria, a utilização contínua de animais Holstein (*Bos taurus*) em ambientes com temperaturas mais elevadas poderia vir a aumentar a expressão de genes associados a termotolerância nestes animais, e aumentar a sua capacidade de aclimatização.

As respostas genéticas dentro e através das células e tecidos respondem a cargas térmicas ambientais acima da zona de termoneutralidade com sinais intra e extracelulares que coordenam o metabolismo celular dos animais. A activação desses sistemas parece ser iniciada quando os animais começam a acumular calor e aumentam rapidamente os mecanismos de perda de calor evaporativo (EVHL – *evaporative heat loss*) (Collier *et al.*, 2008).

O controlo genético da resposta ao *stress* térmico é regulado por cerca de 120 genes com capacidades de adaptação às mudanças de temperatura (Auliciens, 2013). Estes genes estão descritos e classificados ontologicamente de acordo com a sua função, localização nos cromossomas, espécie animal, tecido em que é expresso e os modos em que foram estudados (*in vitro*, *in vivo*) na base de dados *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>). Hansen *et al.* (2004) descreve estes genes como termotolerantes com capacidade de regular os processos associados à capacidade do animal em responder aos efeitos adversos do *stress* térmico.

A capacidade de termotolerância de um animal está associada às Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins – HSP's) presente em todas as células (Auliciens, 2013; Collier *et al.*, 2008, Kuhl e Rensing, 2000). Estas proteínas são utilizadas como indicador de resposta ao *stress* térmico, uma vez que a expressão dos genes responsáveis pela sua síntese e a sua própria síntese aumentam durante aquele *stress* (Collier *et al.*, 2006; Pirkkala *et al.*, 2001; Kuhl e Rensing, 2000). Estas proteínas atuam na estabilização de outras expostas às condições adversas evitando ou minimizando a sua desnaturação (Kuhl e Rensing, 2000).

As modificações na expressão genética provocadas pelo *stress* ambiental incluem (Collier *et al.*, 2008): 1) a ativação do fator de transcrição de “choque térmico” 1 (HSF1 – *heat shock factor 1*); 2) o aumento da expressão da proteína do “choque térmico” (HSP – *heat shock protein*) e diminuição da expressão e síntese de outras proteínas; 3) aumento da oxidação da glicose e dos aminoácidos e diminuição do metabolismo dos ácidos gordos; 4) ativação do sistema endócrino para a resposta ao *stress*; 5) e ativação do sistema imunitário através da secreção pela via extracelular da HSP.

Collier *et al.* (2006), em trabalho com cultura de células do epitélio mamário submetidos a diferentes temperaturas, observaram que genes associados a promoção do crescimento do ducto mamário, estrutura, metabolismo e biossíntese celular apresentavam-se com menor expressão sob *stress* por elevadas temperaturas. Em contrapartida neste trabalho estes autores observaram uma maior expressão daqueles genes associados à renovação celular, apoptose e renovação proteica.

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de identificar genes associados a termotolerância (Moran *et al.*, 2006; Horowitz, 2002) na tentativa de

alterar a expressão destes genes (Collier *et al.*, 2012; Collier *et al.*, 2008). Estes trabalhos são possíveis devido a utilização da metodologia baseada em *microarrays*, que possibilita o acesso a informação relativa à expressão de uma grande quantidade de transcriptos simultaneamente (Renaudeau *et al.*, 2012). Os resultados experimentais destes autores induzem-nos a contribuir para o estudo da expressão, na glândula mamária, de genes associados a lactopoiese em animais em processo de aclimatização ou adaptados a ambientes tropicais.

1.2. OBJETIVOS

O nosso trabalho teve como objetivo geral o estudo da adaptação genética e da aclimatização de animais Holstein a ambientes tropicais, com particular incidência nos perfis genómicos da glândula mamária.

Os objetivos específicos pretendidos foram:

- (i) O estudo da expressão de genes diferencialmente expressos nas glândulas mamárias de vacas de raças correspondentes à eventual aclimatização a ambientes tropicais (Holstein) e a diferentes níveis de adaptação a estes ambientes (Gyr e Gyrolando);
- (ii) A identificação de genes diferencialmente expressos nas glândulas mamárias de vacas da raça Holstein, eventualmente aclimatizados ao ambiente tropical (Brasil) e adaptadas a ambiente temperado (Portugal).

1.3. PLANO DE TRABALHO

Nos termos da revisão bibliográfica efetuada constata-se que os estudos referentes as adaptações metabólicas em animais a ambientes tropicais tem normalmente como base a regulação térmica sistêmica. Contudo, a extensão das alterações na expressão genética na glândula mamária de bovinos, induzidas pelo *stress* por elevadas temperaturas, não é bem compreendida. A relevância dos mecanismos de adaptação e de aclimatização ao *stress* da glândula mamária e a escassez de informação sobre as mesmas justifica a proposta deste trabalho. Este contribuirá para a identificação, na glândula mamária, de transcritos que podem representar alvos ou marcadores para futuras seleções de gado leiteiro no processo de adaptação às condições ambientais tropicais.

Este trabalho está dividido em dois estudos: o primeiro, descrito no Capítulo 2 desta Tese, refere-se à identificação diferencial de genes expressos na glândula mamária de três grupos genéticos (Holstein, Gyr e Gyrolando) expostos ao mesmo ambiente tropical. O segundo, descrito no Capítulo 3, descreve a análise da expressão diferencial de genes expressos também na glândula mamária de dois grupos experimentais de animais da raça Holstein, sendo um mantido em ambiente temperado (Portugal) e outro em ambiente tropical (Brasil).

O trabalho foi desenvolvido de forma a identificar genes associados aos mecanismos genéticos da adaptação (Gyr e Gyrolando) e eventual aclimatização (Holstein) a ambientes tropicais na medida em que os níveis alimentares dos animais de experiência respeitaram as suas necessidades de manutenção e de produção otimizada. Assim pretendeu-se: I) identificar, através da metodologia de *microarrays*, genes da glândula mamária com diferentes níveis de expressão nas raças dos animais em experiência, nomeadamente genes expressos associados a lactopoiese e a aclimatização às condições de *stress* por altas temperaturas; II) quantificar, através de PCR em Tempo Real, genes diferencialmente expressos associados a lactopoiese e a tolerância a *stress* térmico.

Este projeto pretendeu incluir uma abordagem integrada no estudo da aclimatização da glândula mamária à ambientes tropicais. É nossa expectativa que este trabalho forneça novas ferramentas para seleção animal nestes ambientes com menor prejuízo à produtividade de leite.

CAPÍTULO 2

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES NA GLÂNDULA MAMÁRIA ASSOCIADOS A
ADAPTAÇÃO E A ACLIMATIZAÇÃO EM CONDIÇÕES TROPICAIS DE
EXPLORAÇÃO DO GADO BOVINO**

2..1. RESUMO

Os bovinos de raças leiteiras de alta produção tendem a diminuir suas produtividades quando expostos a temperaturas acima da sua zona termoneutralidade (ZTN) (18-20°C) ao contrário do que acontece com as raças leiteiras adaptadas a climas tropicais ou subtropicais. A identificação de genes associados a lactopoiese e à tolerância ao *stress* térmico representa uma mais-valia no âmbito do estudo da biodiversidade com aplicabilidade prática e consequências económicas. Este trabalho tem o objetivo de contribuir para o estudo da expressão de um conjunto de genes relacionados com a produção de leite em vacas de raças correspondentes a diferentes níveis de adaptação a *stress* por elevadas temperaturas (*Bos taurus* e *Bos indicus*). Foram utilizados, para os estudos transcriptómicos (*microarrays* e PCR em tempo real), ARN obtido do parênquima mamário de 18 vacas de três grupos genéticos, Holstein, Gyr e Gyrolando, todos na mesma fase de lactação e submetidos a mesmas condições de manejo. Foi retirado sangue arterial e venoso para determinação do perfil hormonal (Prolactina, Triiodotironina - T₃ e Hormona do crescimento - GH) e da química do sangue (ácidos gordos e aminoácidos). As hormonas prolactina e hormona do crescimento apresentaram concentrações plasmáticas maiores nos animais Holstein ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças nas concentrações de IGF-1 entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$). Contudo as concentrações de T₃ foram iguais ($p > 0,05$) entre os grupos Holstein e Gyr, mas superiores ($p < 0,05$) no grupo Holstein face ao Gyrolando. Do total de 4608 transcritos contidos na biblioteca BLO (*Bovine Long Oligo Library*, Michigan, USA) utilizada neste trabalho, foram identificados 105 transcritos diferencialmente expressos em pelo menos um dos grupos genéticos estudados. Foram identificados 14 genes distribuídos entre as funções relacionadas com estrutura da glândula mamária (CRDGF; CD97; GH1; Endoglina; LTF; INPP; PTP), resposta ao *stress* térmico (Crh_11; v-Fos; e Cdc37): e proteína do leite (RPL35; κ-caseína; β-caseína e α-s2-caseína). Destes genes, 8 foram utilizados para validação através de RT-PCR (CRDGF, CD97, LTF, PTP, INPP, LPL, RPL35, CDC37). Nos animais do grupo Gyr foram identificados transcritos sobre expressos associados a defesa celular, regulação de processos de apoptose, maior concentração proteica do leite e maior tolerância ao *stress* térmico. No grupo experimental Holstein foram identificados transcritos sobre expressos associados ao

desenvolvimento do epitélio mamário e rendimento leiteiro e baixa tolerância ao *stress* por elevadas temperaturas. O grupo Gyrolando apresentou resultados de expressão relativa dos transcritos identificados neste estudo mais próximos ao grupo Gyr em relação à tolerância ao *stress* a altas temperaturas, defesa celular e mais próximo ao grupo Holstein em relação a expressão de transcritos associados a estrutura da glandula mamária.

PALAVRAS-CHAVE: glândula mamária; *microarrays*; *stress* térmico; expressão genética.

2.2. INTRODUÇÃO

A maior parte do efetivo bovino de interesse económico encontram-se nas regiões tropicais (FAOstatistics, 2014) onde as condições climáticas sazonais influenciam as suas produtividades, como é o caso em particular, da produção de leite. (Collier, *et al.*, 2012; Mondonnet, *et al.*, 2012; Steinfield *et al.*, 2006). As alterações climáticas em curso tendem a aumentar as áreas do globo em que o aquecimento global afeta, entre outras, as produções agrárias (Aydinalp e Cresser, 2008).

A produção de leite é uma atividade altamente dependente dos fatores ambientais (Renaudeau *et al.*, 2012), cujas alterações podem afetar a produtividade e o manejo dos animais. O *stress* é definido como um evento externo ou condição que produz "uma tensão" num sistema biológico (Lee, 1965). Buffington *et al.* (1981) definem *stress* térmico como qualquer combinação de fatores ambientais que originem condições que se situem fora da zona de neutralidade térmica do animal.

As altas temperaturas ambientais, principalmente quando associadas a elevadas humidades e a radiação solar direta, características das regiões tropicais e subtropicais, como é o caso do Brasil, são os principais elementos climáticos estressantes causadores de baixos desempenhos do gado leiteiro (Azevêdo e Alves, 2009; Kadzere *et al.*, 2002). Estes ambientes quentes e húmidos, podem tornar-se desfavoráveis para a produção leiteira, principalmente em animais em lactação e de alto potencial para esta actividade (Deitos *et al.*, 2010; Baccari Junior., 2003). Isto, porque devido à sua função produtiva mais especializada, que requer uma grande disponibilidade energética e intensa atividade metabólica, são animais com uma elevada produção de calor endógeno (Collier, *et al.*, 2012; Damasceno *et al.*, 1998). E, segundo Marcheto *et al.* (2002), quanto maior a produtividade animal, maior produção de calor metabólico e maior, também, a sensibilidade ao *stress* motivado pelo calor.

Quando expostos de forma constante à condições ambientais adversas, os animais desencadeiam um processo de aclimatização de forma a minimizar o impacto sofrido por estas condições (West, 2003; Nääs *et al.*, 2001). Na produção de leite, o processo de aclimatização dos animais faz-se através de alterações metabólicas que induzidas geneticamente atingem sistemicamente o metabolismo e especificamente a fisiologia da glândula mamária (Collier *et al.*, 2012), de modo que

ao final o animal faça um ajuste a sua zona de termoneutralidade. O processo de aclimatização ocorre em duas fases (aguda e crónica), envolvendo o controlo endócrino e genético. O tempo requerido para a aclimatização completa poderá ser de meses. Caso o animal esteja em ambientes onde a aclimatização é um processo constante, este pode tornar-se irreversível (Collier *et al.*, 2012; Cincovic *et al.*, 2011; Collier *et al.*, 2006).

Quando os animais estão expostos a *stress* por calor por um período de tempo prolongado o processo de aclimatização é ativado (Bernabucci *et al.*, 2010; Horowitz, 2002) e pode ser caracterizado inicialmente pela redução dos níveis plasmáticos das hormonas do crescimento, tiroxina (T₄) e triiodotironina (T₃). Esta alteração fisiológica é uma resposta animal ao calor na tentativa de reduzir seu metabolismo basal (Bernabucci *et al.*, 2010; Yousef, 1987). Collier *et al.* (2006) propõe um mecanismo de alteração no limite de ITH onde esta resposta animal inicia, assim como o tempo de recuperação e ajuste a homeostase pelo animal. O processo de aclimatização só é detectado entre 5 a 10 dias após o animal não estar mais sob *stress* por elevadas temperaturas (Renaudeau *et al.*, 2012).

A lactopoiese requer estímulos para promover a produção de leite e retirar ou inibir os factores que atrasam a produção de leite (Silanikove *et al.*, 2009). Para a manutenção da lactação é necessária a conservação do número de células alveolares, de natureza contráctil e mioepitelial que estão relacionadas com o reflexo de ejeção do leite (Akers, 2006), a capacidade de síntese de leite das células (Capuco *et al.*, 2003) e a eficácia do reflexo de ejeção do leite (Theil *et al.*, 2006). O processo de lactopoiese é amplamente afetado por factores que induzem a uma situação de *stress* ao animal, seja este de origem ambiental (temperatura e humidade), alimentar ou sanitária.

Azêvedo e Alves (2009) afirmam que a fisiologia termorreguladora de vacas leiteiras tem sido alterada em resposta à seleção genética para aumentar a produção de leite. Segundo estes autores, a resposta animal à seleção para produtividade têm sido mais eficaz do que a resposta animal para aumento da tolerância ao *stress* por altas temperaturas. Este fato, pode indicar que, em ambientes tropicais, para além da seleção animal para a produtividade, existe a necessidade de um trabalho de seleção para características de maior tolerância ao *stress* por altas temperaturas.

Ravagnolo *et al.* (2000), ao estudarem parâmetros genéticos para o *stress* térmico em gado leiteiro nos EUA, concluíram que a seleção somente para características de produção diminuiu a tolerância ao calor, dado que a correlação genética entre estas ser -0,36.

Columbiano (2007), identificou regiões no cromossoma 11 com QTL's (*Quantitative trait loci*) associadas à tolerância ao *stress* térmico, tais como o comprimento de pelo e a taxa de sudorese. Existe uma correlação positiva entre o número de glândulas sudoríparas e a produção de leite (Silva, 2000). Estes estudos sugerem que há regiões com marcadores que podem ser utilizados como ferramentas na seleção genética de animais termotolerantes.

O *stress* a altas temperaturas induzido aos animais nas regiões tropicais conduz a mecanismos de expressão genética que alteram a regulação de várias funções celulares (Renaudeau *et al.*, 2012). Essas alterações, que incluem mecanismos de adaptação aos ecossistemas, podem levar a decréscimos na produção de leite (Columbiano, 2007). A identificação de genes associados a estes processos permite-nos uma maior percepção sobre os impactos do *stress* por elevadas temperaturas no normal funcionamento das células, participando na resolução de alguns dos desafios que os produtores enfrentam para minimizar a redução de produtividade nos animais. Hansen *et al.* (2004) denominaram como genes termotolerantes aqueles cuja expressão regulam processos metabólicos que auxiliam a capacidade de adaptação ou de aclimatização dos animais à elevadas temperaturas. Estes genes estão expressos em diferentes tecidos, inclusivamente a glândula mamária.

Apesar do indiscutível interesse económico da produção leiteira e da seleção de raças de modo a compatibilizar o incremento das produtividades com as limitantes edafo-climáticas a que se têm que se adaptar, os mecanismos moleculares que regulam a expressão genética desta adaptação são ainda pouco conhecidos (Bionaz *et al.*, 2012; Collier *et al.*, 2006; Malewski and Zwierzchowski, 2001). Diversos autores desenvolveram investigações no sentido de se conhecer a base genética das diferenças na eficiência da transformação da energia recebida pelos alimentos (Burrow, 2012; Bionaz e Loor, 2007; Kaminski *et al.*, 2005) e a interacção genótipo-ambiente desta eficiência (Cincovic *et al.*, 2011; Sonstegard *et al.*, 2002), assim como a possível aplicação da heterose nos sistemas de produção de leite (Lopez-Villalobos *et al.*, 2000). Contudo, pouco se sabe sobre a expressão

genética diferencial entre raças/genótipos que apresentem diferentes capacidades de adaptação e/ou aclimatização ao *stress* abiótico correspondentes a condições tropicais de exploração, e que conseqüentemente afetem a produção de leite.

Em grande parte das regiões tropicais predominam as explorações de leite com manadas de bovinos *Bos indicus* puros ou cruzados com animais da raça Holstein (Assis *et al.*, 2005). A exploração de animais puros da raça Holstein, para a produção leiteira naqueles países é ainda bastante reduzida, apresentando, no entanto níveis de produção elevados (World Holstein-Frisian Federation, 2009). Estes valores de produtividade devem-se, não só à capacidade produtiva das vacas Holstein, mas também à exploração dos animais desta raça ser feita, na sua generalidade, através de sistemas de produção intensivos (Assis *et al.*, 2005).

A utilização de animais zebuínos, como os da Raça Gyr, tem sido muito comum em países tropicais, nomeadamente o Brasil, por estes animais, apesar de apresentarem produtividade inferior às Holstein, estarem adaptados a ambientes tropicais (Teodoro *et al.*, 2000). A alternativa para aumentar a produtividade leiteira sem que os efeitos deletérios do *stress* ambiental (humidade e temperatura) sejam limitadores é a utilização de grupos genéticos híbridos, como a Gyrolando (raça híbrida formada por $\frac{5}{8}$ Holstein e $\frac{3}{8}$ Gyr. Estes animais apresentam uma produtividade de 30 a 40% superior aos Gyr (Associação Brasileira de Criadores de Gyrolando).

O Brasil é um país de clima tropical/subtropical, onde o gado bovino leiteiro está grande parte do ano submetido a temperaturas e humidades relativas do ar acima das condições ótimas de produção. O efeito destes dois fatores climáticos pode então tornar-se limitante ao nível do desenvolvimento, produção e reprodução dos animais, em função do *stress* a eles associado.

O clima no Brasil apresenta-se bastante diversificado como consequência de vários fatores, podendo destacar-se as suas características geográficas, a extensão territorial e a dinâmica das massas de ar. Esta última condição é de extrema importância dado que atua diretamente sobre a temperatura e a pluviosidade.

O índice pluviométrico médio anual de Brasília, Distrito Federal, onde se situaram os animais em estudo, é de cerca de 1500 mm e 95% das chuvas ocorrem no período de Outubro a Abril, com destaque para os meses de Dezembro e Janeiro, que registam valores de pluviosidade em torno de 200 – 300 mm. Os meses menos chuvosos apresentam valores de pluviosidade entre os 00 mm e os 60 mm.

As temperaturas médias mensais em Brasília não oscilam muito durante todo o ano, com valores entre 19°C e 23°C, sendo o mês mais quente Dezembro e os mais frios Junho e Julho.

O Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (www.inmet.gov.br, 2013) fornece dados dos últimos 30 anos relativos ao Índice de Temperatura e Humidade (ITH). O INMET, tal como Ravagnolo *et al.* (2000) e Azevedo *et al.* (2005), referem que para que os animais se encontrem na sua zona de termoneutralidade (ZTN) os valores de ITH devem ser iguais ou inferiores a 72, definindo ainda níveis de alarme em relação ao conforto/desconforto térmico dos animais. Em bovinos adaptados a climas temperados, quando o ITH ultrapassa o valor de 72, considera-se que o animal se encontra em *stress* térmico (Allen *et al.* 2015; Pires e Campos, 2004). Este ponto representa o limite superior da zona de termoneutralidade (ZTN) para vacas em produção, ou seja, é o ponto até onde o animal mantém a temperatura corporal normal sem alterar a sua taxa metabólica. Em animais *Bos indicus* e híbridos *Bos indicus/Bos taurus* o ponto crítico é um ITH de 76 (Azevedo *et al.*, 2005). Baccari Junior (1998) refere que o limite superior da ZTN de vacas da raça Holstein, em lactação, situa-se próxima dos 26°C de temperatura de bolbo seco, e a humidade relativa ideal de 38%. Em contrapartida, animais Zebuínos apresentam ZTN próximo a 32°C.

Nesta medida o processo de incremento da produção de leite em países tropicais induz ao estudo genético dos mecanismos de adaptação e ou aclimatização ao *stress* abiótico (ambiental) em plantas forrageiras e em animais de interesse pecuário. No âmbito destes últimos, estão por estudar, entre outros, a presença e os mecanismos genéticos e funcionais de adaptação do parênquima da glândula mamária ao *stress* por elevadas temperaturas de condições tropicais de exploração relativas à temperatura e humidade. Este facto fundamenta que os animais experimentais deste trabalho se situem no Brasil.

O presente trabalho pretende contribuir para o estudo da expressão de um conjunto de genes relacionados com a produção de leite em vacas de raças correspondentes a diferentes níveis de adaptação e de aclimatização a *stress* a elevadas temperaturas. Para este efeito foram utilizadas vacas leiteiras de raças Gyr, Holstein e Gyrolando, com idades, fases de lactação e maneios semelhantes, sujeitas às mesmas condições edafo-climáticas, de uma empresa pecuária do Brasil. Foram feitos estudos de expressão genética (biopsia da glândula mamária), e

hormonal, com efeitos na estrutura desta glândula, na produção leiteira e em mecanismos de adaptabilidade e aclimatização a altas temperaturas dos animais em experiência.

2..3. MATERIAL E MÉTODOS

2..3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 18 animais bovinos de três diferentes grupos genéticos, separados em três grupos experimentais, cada um dos quais com 6 animais, Holstein Brasil, Gyr e Gyrolando. Os animais foram todos provenientes da Fazenda Palma, situada no Distrito Federal, Brasil. Os animais do grupo experimental Holstein Brasil estão registados na Associação Brasileira de Criadores de Bovinos de Raça Holandesa, (www.gadoholandes.com.br); os do grupo Gyr estão registados na Associação Brasileira de Criadores de Gyr Leiteiro (www.Gyrleiteiro.org.br); e os do grupo Gyrolando estão registados na Associação Brasileira de Criadores de Gyrolando (www.Gyrolando.org.br/).

Os animais em estudo foram vacas multíparas de 3ª ou 4ª lactação, no 3º mês de lactação, com produção de leite média diária dentro dos parâmetros normais das raças em estudo. O grupo Holstein Brasil apresentava uma média de produção, considerando duas ordenhas diárias, de 29,5 kg de leite/animal/dia e o grupo Gyr 17,5 kg de leite/animal/dia e o Gyrolando 25,9 kg de leite/animal/dia. As vacas estavam entre o 1º e 2º mês de gestação, confirmada por exame ginecológico e determinação da concentração de Progesterona no sangue (Método de RIA).

Os animais dos três grupos experimentais foram submetidos a um sistema de manejo confinado, em estábulo com cobertura com ventilação natural e sistema de arrefecimento por água no piso para os dias mais quentes, sendo a alimentação fornecida composta por alimento concentrado (Farelo de Soja e Milho triturado), uma fonte de alimento volumosa (Silagem de Milho) e suplemento mineral durante todo o ano. A ração concentrada dos animais em estudo obedecia aos seguintes níveis nutricionais: 9,8 kg de Matéria Seca consumida com 22% de Proteína Bruta e 78% de NDT, no grupo Holstein Brasil; 6,7 Kg de Matéria Seca; 18% de Proteína Bruta e 65% de NDT nos animais Gyr e 7.6 kg de Matéria Seca; 20% de Proteína Bruta e 72% de NDT, no grupo Gyrolando. A Silagem de milho foi fornecida na quantidade complementar para consumo de 1,5% do peso vivo animal. Os níveis alimentares

dos animais em estudo respeitaram as suas necessidades de manutenção e de produção otimizada (NRC, 2001).

As concentrações de aminoácidos totais dos sangues arteriais recolhidos da artéria coccígea (20 mL) dos três grupos experimentais eram: Holstein Brasil=1983,46 ± 233,10; Gyrolando=1691,02 ± 275,48; Gyr=1811,46 ± 130,06 ($p > 0,05$). As concentrações de ácidos gordos totais entre os três grupos experimentais eram: Holstein Brasil=110,54±-31,94; Gyrolando=113,52±-12,57; Gyr=134,79±-30,14 ($p > 0,05$). Estas concentrações de aminoácidos e ácidos gordos do sangue arterial (ANEXO I) foram determinadas para caracterizar a amostra animal e verificar se as dietas experimentais utilizadas corresponderam a níveis iguais de aporte destes nutrientes à glândula mamária nos animais em experiência. As análises dos aminoácidos totais e de ácidos gordos totais foram realizadas por GC-MS e HPLC na Faculdade de Farmácia e na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, respectivamente.

Foi realizada a identificação da expressão do gene da Δ -9-desaturase, presente na biblioteca de genes BLO (*Bovine Long Oligo*; Michigan, USA) utilizada neste estudo, como um indicativo da equivalência de ácidos gordos da dieta de todos os grupos experimentais (Duchemin *et al.*, 2013).

O protocolo experimental obedeceu à Legislação Europeia (nº86/609/CEE) e foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária.

2..3.2. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

Os animais dos três grupos experimentais pertenciam a uma exploração comercial, onde foram realizadas as recolhas de amostras, localizada em Brasília (Fazenda Palma), Distrito Federal, Brasil, região caracterizada por duas estações definidas como Seca e Chuva. A Estação Seca, que se estende de Junho a Setembro apresenta temperaturas médias que variam de 23° (Junho e Julho) com humidade relativa do ar média de 45%, a 27° (Agosto e Setembro), com humidade média de 30%. A Estação de Chuva, entre Outubro e Abril, caracteriza-se por temperaturas que variam de 27°C (Outubro-Novembro; Março-Abril) a 30°C (Dezembro-Fevereiro), com humidade entre 75 e 80%. Os dados de Normal Climatológica (média dos parâmetros mensais dos últimos 30 anos) para

temperatura média e humidade relativa do ar média e do ITH estão dispostos na Figura 2.1.

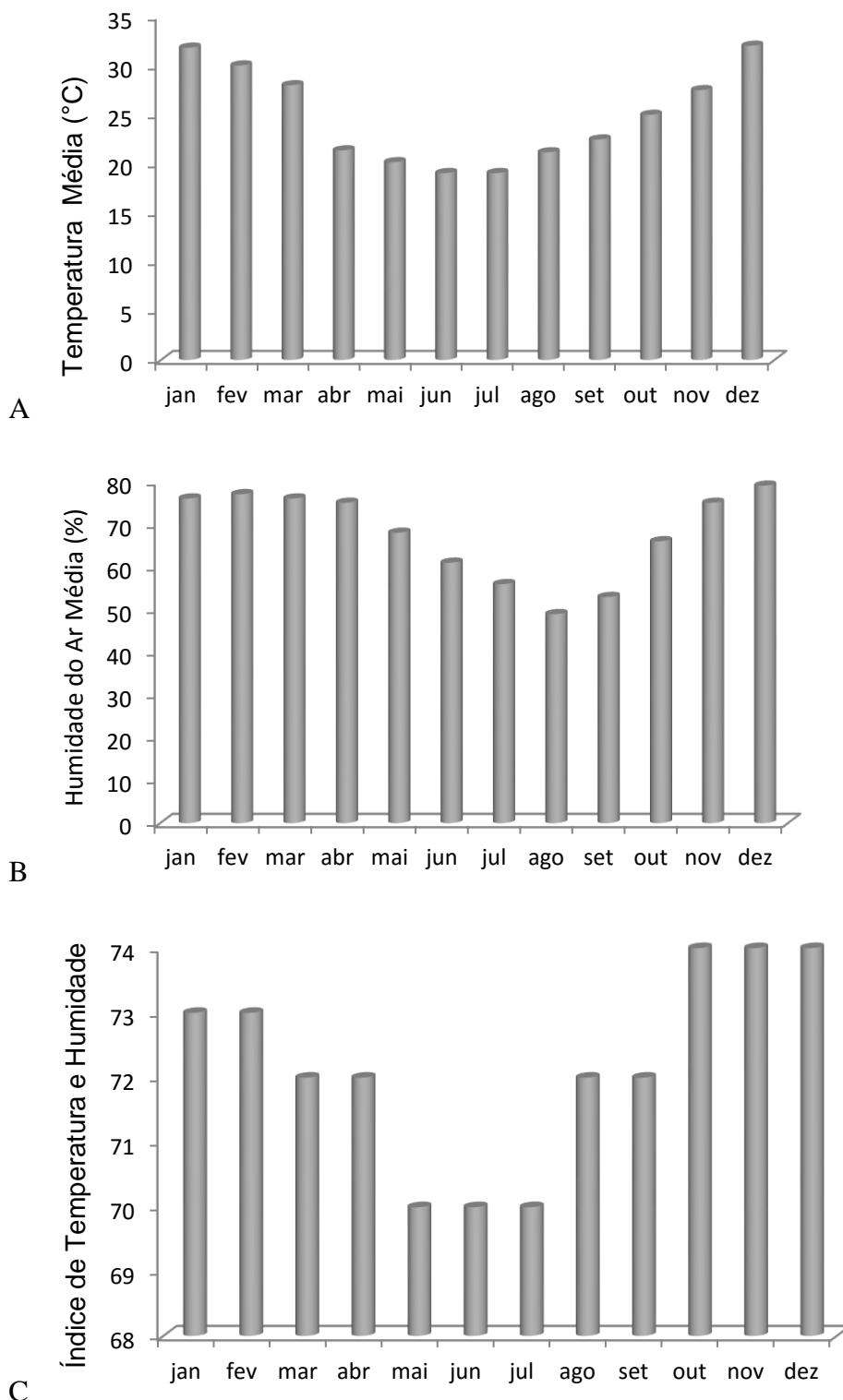


Figura 2.1: Normal Climatológica da região experimental (Distrito Federal, Brasil). A) Temperatura Média (°C); B) Humidade Relativa do Ar (%) e C) Índice de Temperatura e Humidade (Instituto Nacional de Meteorologia – Brasil; <http://www.inmet.gov.br>).

As datas das amostragens foram escolhidas de modo a que o efeito do *stress* por altas temperaturas no momento da recolha de amostras não interferisse nos resultados. Assim, foi determinado o Índice de Conforto Térmico para Bovinos (ICTB; Instituto Nacional de Meteorologia – Brasil; <http://www.inmet.gov.br>), baseado nos dados de Temperatura e Humidade Relativa do Ar das Normais Climatológicas da região experimental (Figura 1). A recolha das amostras na Fazenda Palma, Brasil, foi realizada no mês de Abril de 2008 (ICTB/ITH=69). Deste modo as recolhas das amostras foram realizadas quando os animais estavam numa zona de termoneutralidade (ICTB/ITH <72).

2..3.3. RECOLHA DE AMOSTRAS E BIÓPSIA DE TECIDO DO PARÊNQUIMA MAMÁRIO

Para as análises de perfil hormonal (Prolactina – DPC-IKPR1, Progesterona – DPC-TKPG1, Hormona do crescimento DSL-1900, IGF1- DSL-2800 e T₃- DPC-TKT31), foram colhidas 20 mL de sangue diretamente da veia mamária, em *containers* de heparina, sendo em seguida centrifugadas e armazenadas a -70°C. As amostras foram realizadas pelo método de RIA, conforme protocolo do fabricante. As análises do perfil hormonal dos animais foram realizadas na EMBRAPA – CERNAGEN, Brasil.

Os animais foram anestesiados regionalmente com cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na região Epidural na dose de 1 mL para cada 100kg de peso vivo por infiltração de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na dose média de 10 mL. Foi realizada tricotomia e a assepsia da região do parênquima do quarto mamário esquerdo com solução de Iodopovidona (Braun®). Para a biópsia utilizou-se o kit *Bard® Monopty Disposable Biopsy Instrument 14G/16cm* (Buehring *et al.*, 1990). De cada animal foram recolhidas amostras de cerca 100mg de tecido mamário. As amostras foram armazenadas em RNAlater™ *RNA Stabilization Reagent* (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA) a -80°C para posteriores análises transcriptômicas.

Após as biópsias foi administrado antimastítico (amoxicilina, ácido clavulânico e prednisolona - Synulox – Phiser) intramamário, durante 3 dias com esgotamento do quarto mamário posterior esquerdo.

2.3.4. ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO

A extração do ARN e análise de microarrays foram realizadas no BIOFIG, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Extração do ARN: 30 mg de ARN total do parênquima mamário de cada animal foi extraído, segundo Looor *et al* (2005), com TRIzol® *Reagent* (Invitrogen), e purificado utilizando *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade e a qualidade do ARN total foi estimada utilizando NanoDrop (Thermo Scientific) e a integridade do ARN confirmada por electroforese em gel de agarose 1,2%.

Design dos Microarrays: Para a análise do perfil de expressão genética dos transcritos presentes na glândula mamária dos animais em estudo foi utilizado um *microarray* de cDNA bovino (BLO – *Bovine Long Oligonucleotide Library*) desenvolvido pela *Michigan State University* – EUA, como parte do *National Bovine Functional Genomics Consortium* (<http://www.cafg.msu.edu/index.htm>). O Banco de dados BLO – *Bovine EST* (<http://nbfgc.msu.edu>) e *Microarrays WEB Resource* (<http://amadeus.biosc.arizona.edu/bovine>), descrito na plataforma GPL 8564 inscrita no *Gene Expression Omnibus* (GEO) do NCBI, foi utilizado para identificar o perfil de expressão genética diferencial entre os grupos de animais em experiência. Cada *array* foi composto por 4608 sondas únicas, com 70-mer representando sHSPs bovinos preditos plotados em duplicado bem como controlos positivos e negativos destinados aos procedimentos de avaliação de qualidade e normalização durante a análise dos resultados. Cada *array* foi utilizado para as hibridações entre as sondas e os cDNA sintetizados a partir do ARN extraído do parênquima mamário dos animais em experiência.

No estudo da expressão genética na glândula mamária dos três grupos genéticos, foi utilizada para a descrição ontológica e funcional dos genes estudados, a biblioteca de EST's *Bovine EST* e *Microarray Web Resource* (<http://amadeus.biosci.arizona.edu/bovine>), que fornece informações sobre os clones contidos nos *microarrays* utilizados neste trabalho. Estas informações foram complementadas com recurso à base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os *microarrays* utilizados eram compostos por 4608 genes de *Bos taurus* e outras

espécies com informação de sequência BLAST conhecida para *Bos taurus* (por exemplo *Homo sapiens*). Todos os genes escolhidos para estudo neste trabalho foram caracterizados quanto a sua função morfológica e fisiológica de acordo com a classificação fornecida pelo *MIPS Functional Catalogue* (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB>) e *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>), com a atribuição da classificação para cada clone baseada no valor BLASTn, da *Bovine EST and Microarray Web Resource* (<http://amadeus.biosci.arizona.edu/bovine>).

Foram utilizadas 3 réplicas biológicas por cada população estudada, sendo cada réplica constituída por uma *pool* de ARN (n=2 animais/pool) e, para cada uma das réplicas biológicas, geraram-se 2 réplicas técnicas. A quantidade de ARN de cada animal utilizada para a hibridação envolvido na experiência foi sempre a mesma.

Amplificação do ARN, Síntese, Purificação e Marcação do cDNA: Foi realizada a amplificação do ARN de todas as réplicas biológicas. 100ng de ARN total foi utilizado para a síntese de ARN antisense (aRNA) através do *MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit* (Ambion, Applied Biosystems). 2 µg de aRNA de cada réplica biológica foi utilizada para a síntese e marcação de cDNA através do *Amersham CyScribe Post-Labeling Kit* (GE Healthcare). A síntese de cDNA foi realizada com a utilização de Transcriptase Reversa com a incorporação de nucleótidos (aminoallyl-dUTP's). O cDNA de cada grupo experimental foi marcado com marcador fluorescente Cy 3-dUTP ou Cy5-dUTP de acordo com as hibridações realizadas em cada *array*. A purificação dos cDNA's marcados foi realizada utilizando o *CyScribe™ GFXTM Purification Kit* (Amersham, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Hibridação: Cada lâmina de *microarray* foi hibridada com dois cDNA's marcados, representantes de cada grupo experimental, de acordo com a comparação a ser realizada (Holstein Brasil x Gyr; Holstein Brasil x Gyrolando; Gyr x Gyrolando). A pré-hibridação ou *blocking* das lâminas de *microarrays* foi realizada a partir de duas lavagens, a primeira em solução de SDS 0,1% e a segunda em H₂O MiliQ, seguida de incubação em solução de BSA, 20x SSC e SDS 10%. Após o *blocking* foram feitas novamente duas lavagens com solução de 2x SSC e 0,2SSC x

para a remoção de sais residuais e excesso de ADN que rodeia os *spots*, da superfície das lâminas. Desta forma garantiu-se que as moléculas marcadas utilizadas na hibridação não se fixassem à superfície da lâmina, fora dos *spots* (Sebastiana *et al.*, 2009).

A solução de hibridação, contendo os cDNA's marcados, *Denhardt's* 50x, SS ADN, ADN 10%, SSC 20x e tampão DIG *blocking*, foi aplicada à lâmina de *microarrays*. A hibridação foi realizada segundo o protocolo do Laboratório BioFIG da faculdade de Ciências - UL em câmara de hibridação (*ArrayIt Telechem International*, Sunnyvale, CA, USA) a 65°C por 17 horas, imersa em banho-maria. As lâminas foram então lavadas em soluções de 0.5x SSC e SDS 0.1%, seguido por 0.5x SSC e SDS 0.01% e duas vezes em 0.06x SSC.

Foram realizadas três hibridações para cada comparação entre os grupos experimentais, com duas réplicas técnicas para cada uma, num total de 18 hibridações.

Deteção do sinal e análise dos dados dos microarrays: A imagem de fluorescência dos *microarrays* foi obtida usando o *VersArray ChipReader*® da Bio-Rad, USA e o seu *software*. Foi realizada a avaliação gráfica do sinal Cy5/Cy3, através da análise das diferentes intensidades de fluorescência, em função dos diferentes níveis de expressão de cada gene. O valor de intensidade de fluorescência em cada *spot* e do *background* foi calculado com o auxílio do *software VersArray Analyzer* (Bio-Rad, USA). O *background* foi calculado como a média ponderada da intensidade dos pixels nos cantos de cada *spot*. *Spots* com sinal de baixa intensidade (média ponderada da intensidade bruta/média ponderada de *background* <1.5), com *background* com sinal irregular (razão entre a média ponderada de intensidade bruta e o desvio padrão de *background* <2.5), com sinal irregular (razão entre a média aparada da intensidade bruta e o desvio padrão de *background* <1) e *spots* que não foram validados (*flags*) foram removidos das análises antes da normalização. Os dados foram importados para a ferramenta da Web de análise de dados de expressão génica em *microarrays*, GEPAS (*Gene Expression Pattern Analysis Suite 3.1* - <http://gepas.bioinfo.cipf.es>) e analisados com *Diagnosis and Normalization for MicroArrays Data* (Quackenbush, 2002), para redução do *background* e normalização pelo método *print-tip loess*.

O processo de normalização (ANEXO II) utilizado foi um método local robusto, o método de *Loess* (Yang *et al.*, 2002), que tem como base que a maior parte dos genes possui a mesma abundância nas duas amostras marcadas com os diferentes fluorocromos, e portanto a razão média entre as intensidades dos dois canais deve ser igual a um. Este método é utilizado para eliminar possíveis desvios sistemáticos, muitas vezes encontrados em *spots* com intensidades mais baixas (Yang *et al.*, 2002), detectando-os e corrigindo-os através de uma regressão linear local, em função da intensidade (Quackenbush, 2002; Yang *et al.*, 2002). Os valores das réplicas técnicas combinadas a partir dos dados normalizados foram posteriormente filtrados e foi realizado o *input* dos valores em falta (Herrero *et al.*, 2003).

Validação dos Dados - PCR em Tempo Real: Dos 14 genes com função fisiológica associadas à estrutura da glândula mamária ou tolerância ao *stress* térmico identificados através dos *microarrays*, oito (CRDGF, CD97, IGF, LTF, PTP, INPP, LPL, RPL35, CDC37) foram selecionados para a realização da validação por PCR em Tempo Real. Estes transcritos apresentavam expressão genética diferencial em pelo menos um grupo genético estudado. A análise de PCR em Tempo Real foi realizada no Laboratório do Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A análise de PCR em Tempo real foi realizada utilizando o protocolo do *Amersham CyScribe Pos-Labeling Kit* (GE Healthcare) modificado. Desta forma, 500 ng de ARN total de cada amostra foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit comercial *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). Foi preparado um volume de solução de 20 µL contendo 500 ng de ARN, 10 µL de 2X RT *Reaction Mix* e 2 µL de *RT Enzyme Mix* para cada amostra. A solução foi incubada durante 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. Posteriormente, foi adicionado a cada tubo 1 µL (2U) de *E. coli* RNAse H e a solução foi novamente incubada durante 20 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C.

Foram selecionados 5 genes candidatos a *housekeeping*: β -Actina, Proteína Ribossomal L0 (RPL0), Ciclofilina (Ciclo), PPR11 e o Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Estes genes foram escolhidos de acordo com diversos autores (Goossens *et al.*, 2005; Bionaz e Loor, 2007; Mustafa, *et al.*, 2005, Collier, *et*

al., 2006) que trabalharam com glândula mamária bovina de *Bos taurus* e/ou *Bos indicus* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Primers utilizados na validação dos *microarrays* através de PCR em Tempo Real (*housekeeping* e genes estudados).

Gene sigla	Gene	Foward	Reverse	Amp (pb)
ACTB	β - actina	GGCCAACCGTGAGAAGATGA	GCATACAGGGACAGCACAG C	169
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	CTCTGCTCCTGCCCCGTTT	CCGTTCACTCCGACCTTCA	76
PPPR11	proteína fosfatase 1 subunidade regulatória 11	ACCATCAAACCTTCGAAACGG	CCTCCTCTTCCTCGTCATCA CT	166
RPLPL	Proteína Ribossomal P0	GCATCCCGCTTCTTGG	GCGCTTGATCCATTGATGA	109
Ciclo	Peptidylpropylisomerase B - Ciclofilina	TCCGTCCTCCCTGCTGTTG	CCAAATCGCAGGTCAAAGTA C	98
CRDGF	Amfiregulina	CTTCGTCTCTGCCATGACCTT	CGTTCTTCAGCGACACCTTC A	100
GH	Hormona do Crescimento	AGCTGGCTGCTGACACCTTC	CCTGGGTGTTCTGGATGGAG	81
RPLP35	Proteína Ribossomal P35	AGAAGGAGGAGCTGCTGAAACA	ACGGGCGATGGATTTACG	132
CD97	Proteína CD97	CGACCCCTTGAGAGTTGTG	GTAGCCCCCTTCCGTGTTCT	100
INPP	Inusitol polifosfato	TTGGATCGCCATTACAC	GGGGATGTCCATGGGTTTCT	140
CDc37	Proteína associada ao HSP90	TTTTGTCTGACCATCCATACCTTG	TGCTTGATGTGCTATTTGTTT CA	119
PTP	Tirosina fosfato	CGAAGACATCCGTCGTGAGA	TTGGTCCAGGCAGGGTACAT	103
LTF	Lactotransferrina	GGACTGCAGGCTGGAACATC	CCAGCACACAAGGCACAGA G	133

Os resultados das expressões dos diferentes *housekeepings* foram analisados através das aplicações geNorm (<http://medgen.ugert.be/~jrdesomp/genorm>) e Norm-Finder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>), conforme o protocolo descrito nos manuais (<http://genex.gene-quantification.info/>) e o β -Actina foi o *housekeeping* que apresentava a menor variação entre as amostras estudadas. (Figura 2.2).

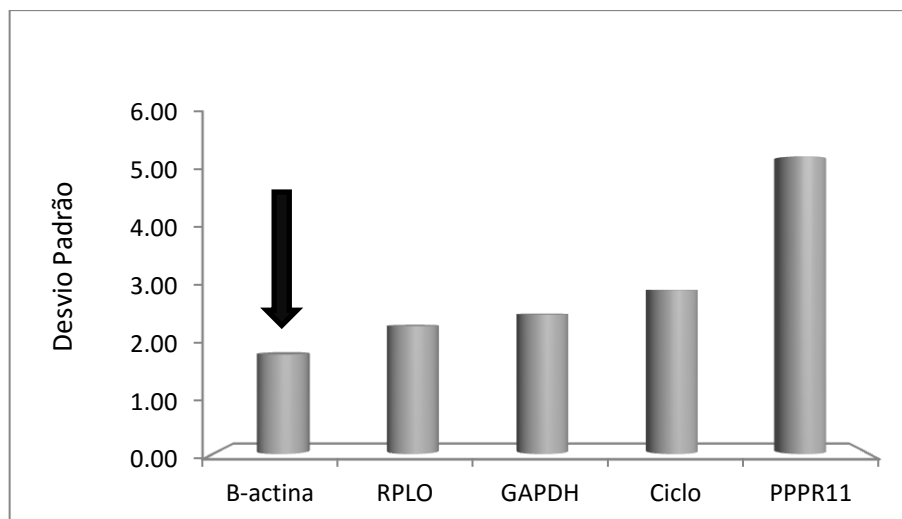


Figura 2.2: Desvio Padrão dos genes testados para a escolha do *houseskeeping* (β -actina, Proteína Ribossomal L0 – RPL0, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – GAPDH, Ciclofilina – Ciclo, PPR11).

O programa PCR *Miner* (Zhao and Fernald, 2005) foi utilizado para calcular a eficiência da reação e os limiares do ciclo das leituras de fluorescência de poços individuais durante a reação de cadeia de polimerase (<http://www.miner.ewindup.info/>).

2..3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi desenvolvido seguindo um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (grupos genéticos) de acordo com o modelo matemático a seguir:

$$\hat{Y} = \mu + t_i + \varepsilon \text{ onde,}$$

\hat{Y} é a resposta do animal;

μ é a média geral;

t_i é o efeito do i -ésimo tratamento (grupo genético), com $i = 1, 2, 3$;

ε é o erro aleatório.

Os dados de expressão genética foram analisados estatisticamente pelo Método do *Rank Products* (RP), (Breitling *et al*, 2004). O Método RP, é um teste estatístico não paramétrico indicado para o estudo mais preciso de grupos de dados biológicos que apresentam pequeno número de repetições (Breitling e Herzyk,

2005). O valor do *Rank Product Test* para cada gene foi comparado com os *Rank Product's* de 1000 permutações aleatórias, com o mesmo número de réplicas e genes que a experiência real. EST's com percentagem de Falso Positivo (FDR, *False Discovery Rate*) inferior a 10% e *Fold Change* (FC - razão da expressão relativa entre dois grupos experimentais) superior a 1.5 foram considerados como diferencialmente expresso no parênquima mamários dos grupos experimentais em estudo (Suchyta *et al.*, 2003b).

Segundo Suchyta *et al.* (2003b), o uso de um limite de diferença de expressão superior a 1,5 (*Fold Change* > 1,5) permite reduzir a taxa de falsos positivos a valores muito baixos. Entendem-se, no nosso estudo, por falsos positivos os transcritos que se mostram diferencialmente expressos quando os seus níveis de expressão podem ser iguais (Suchyta *et al.*, 2003a). Portanto, para a análise dos resultados foi usado um limiar de FC de 1,5, combinado com uma significância entre réplicas de genes inferior ou igual a 0,1 (FDR \leq 0,1) (Singh *et al.*, 2008; Suchyta *et al.*, 2003b). Assim, apenas os genes com valor de *Fold Change* \geq 1,5 ou \leq -1,5 e FDR \leq 0,1 foram considerados significativamente diferentes.

Os perfis hormonais e as expressões génicas relativas foram comparados entre os grupos experimentais, utilizando um Análise de Variância *One-way* e as médias comparadas através do Teste de Tukey ($p > 0,05$)

2..4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2..4.1. PERFIS HORMONAIIS

A concentração de prolactina (ng/mL) dos animais do grupo genético Holstein Brasil foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a dos outros dois grupos estudados (Gyr e Gyrolando). Esta diferença também foi observada nos resultados de concentração da hormona do crescimento no sangue ($p < 0,05$). Contudo, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) na concentração plasmática de IGF-1 entre os três grupos genéticos (Tabela 2.2). Os teores de T₃ foram iguais entre os animais Holstein Brasil e Gyr e entre os animais Gyr e Gyrolando, mas estes últimos foram diferentes dos Holstein Brasil ($p < 0,05$).

Tabela 2.2: Perfil hormonal* (Prolactina, Triiodotironin - T₃, Factor de Crescimento Semelhante à Insulina -IGF-1 e Hormona do Crescimento- GH) do sangue dos animais em experiência de acordo com o grupo genético.

Hormona	Holstein Brasil	Gyrolando	Gyr	P**
Prolactina (ng/mL)	37,97 ^a (6,68)	23,82 ^b (2,74)	28,52 ^b (6,64)	0,0004
Triiodotironina - T ₃ (ng/mL)	1,07 ^a (0,39)	0,77 ^b (0,10)	0,97 ^{ab} (0,15)	0,049
Hormona do Crescimento - GH (ng/dL)	16,01 ^a (2,02)	13,21 ^b (1,49)	14,15 ^b (2,98)	0,049
Factor de Crescimento Semelhante à Insulina - IGF-1 (ng/mL)	98,38 (16,72)	112,32 (12,67)	108,24 (16,57)	Ns

**Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tuckey (p<0,05).

A hormona prolactina atua na regulação do desenvolvimento da glândula mamária, na secreção de leite e na expressão genética de proteínas do leite (Brym *et al.*, 2004). A prolactina, juntamente com a hormona do crescimento controlam os processos de lactogenese e de galactopoese, que são essenciais para a transição de células mamárias em proliferação para células produtoras de leite (Lü *et al.*, 2010; Akers, 2006). A hormona prolactina está presente em maior quantidade no sangue de animais com maior desenvolvimento mamário e conseqüentemente mais produtivos (Akers, 2006) o que está de acordo com os resultados da concentração desta hormona encontrados neste trabalho.

A hormona triiodotironina (T₃) é um importante regulador da função da glândula mamária. Esta hormona, assim como a hormona do crescimento, apresentam valores séricos maiores em animais mais produtivos o que se reflete na maior produção de leite dos animais *Bos taurus* face aos animais *Bos indicus* (Nascimento *et al.*, 2013, Morales *et al.*, 2005). Devido ao balanço energético negativo, a qual as vacas de alta produção estão sujeitas, os níveis de T₃ no início da lactação é menor, aumentando ao longo da lactação.

A liberação das hormonas tireoidianas causa aumento no consumo de energia e na termogénese; por conseguinte, espera-se que a disponibilidade dessas

hormonas responda a mudanças na condição térmica do corpo, (Nascimento *et al.*, 2006) e também a fase da lactação (Morales *et al.*, 2005). T_3 , juntamente com a hormona tiroxina (T_4), fazem parte do mecanismo de aclimatização do animal, sendo a concentração destas hormonas menores nos animais aclimatizados e também naqueles adaptados a climas com altas temperaturas (Bernabucci *et al.*, 2010; Horowitz, 2002).

Quando um animal inicia o período de *stress* por altas temperaturas os níveis de T_3 circulantes tendem a ser reduzidos (Azêvedo e Alves, 2009). Contudo no processo de aclimatização ocorre um ajuste à zona de termoneutralidade e os efeitos a longo prazo da exposição a ambientes tropicais, com sazonalidade de temperaturas e humidade altas, induzem a um reajuste dos níveis séricos de T_3 (Nascimento *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2008). Estas diferenças devem-se ao processo de aclimatização do animal que acarreta mudanças endócrinas que podem ser diferentes daquelas condicionadas pelo *stress* momentâneo.

Neste trabalho não encontramos diferenças entre as concentrações séricas de animais de raças adaptadas (Gyr) e não adaptadas (Holstein), sendo os valores encontrados semelhantes aqueles verificados por Silva (2000). Morais (2008) encontrou valores de T_3 de 1,46 ng/mL em animais Holstein aclimatizados a elevadas temperaturas, mas em fase mais adiantada de lactação. Nascimento (2010), trabalhando com animais Gyrolando na metade da lactação observou concentrações séricas de T_3 de 1,70 ng/mL em período de ITH menor que 72. Os valores apresentados neste trabalho são menores que os verificados por estes autores, mas espera-se que no início da lactação, tal como ocorre nos nossos trabalhos, os valores de T_3 sejam menores.

Os valores séricos iguais verificados entre as raças Gyr e Holstein podem se justificar devido ao facto de uma das raças ser adaptada a climas tropicais (Gyr) e outra estar em possível processo de aclimatização.

Desta forma, os resultados deste estudo estão de acordo com Nascimento *et al.* (2013), indicando que os animais Holstein não estavam sujeitos a *stress* por altas temperaturas momentâneo.

A hormona do crescimento está associada à produção de leite e ao desenvolvimento da glândula mamária, pelo que animais mais produtivos apresentam maiores concentrações plasmáticas desta hormona (Mullen *et al.*, 2011).

As concentrações de hormona do crescimento diminuem quando o animal está sujeito a condições de *stress* por elevadas temperaturas (Akers, 2006), o que não foi observado nos animais da raça Holstein Brasil utilizados neste estudo. Estes animais na altura da colheita de amostras encontravam-se num período onde o ITH era inferior a 72 após 6 meses de temperaturas médias elevadas. O perfil endocrinológico estudado no grupo genético Holstein Brasil parece compatível com seu potencial genético de produtividade leiteira. Nossos resultados estão de acordo com os estudos realizados por Bernabucci *et al.* (2010), que não encontrou diferenças nas concentrações de GH de animais sob *stress* por elevadas temperaturas e animais em termoneutralidade.

Os resultados observados de concentração de GH nos animais Gyr e Gyrolando correspondem aos seus níveis de produtividade.

Os níveis séricos de IGF-1 são iguais nos três grupos genéticos ($p > 0,05$). Este resultado está de acordo com os estudos de outros autores (Gabai, 2003; Knight *et al.*, 1994) que indicam que os níveis séricos de IGF-1, apesar desta hormona estar associada à concentração sanguínea da hormona do crescimento, não se refletem necessariamente na produção de leite. Os nossos resultados parecem sugerir que, nas condições experimentais utilizadas, não se verificaram variações dos níveis séricos de IGF-1.

2.4.2. ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO

Foram identificados 105 genes, dos 4608 transcritos contidos nas sondas de microarrays, com expressão diferencial na glândula mamária de, pelo menos, um dos grupos genéticos estudados. Os clones identificados nos *microarrays* foram classificados em 17 categorias funcionais (Figura 2.3), quanto à sua ontologia, de acordo com a classificação do *MIPS Functional Catalogue* (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB>) e *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>), com a atribuição da classificação para cada clone baseada no valor BLASTn, da *Bovine EST and Microarray Web Resource* (<http://amadeus.biosci.arizona.edu/bovine>) para sequências de cDNA presentes nos *microarrays* desta biblioteca.

As categorias morfológicas, com maior representação nos transcritos diferencialmente expressos neste estudo, encontram-se associadas, de acordo

àqueles catálogos, à síntese proteica, ao metabolismo e à comunicação celular, incluindo-se nestas funções, a síntese e composição proteica do leite, adaptação ao *stress* e desenvolvimento do parênquima mamário.

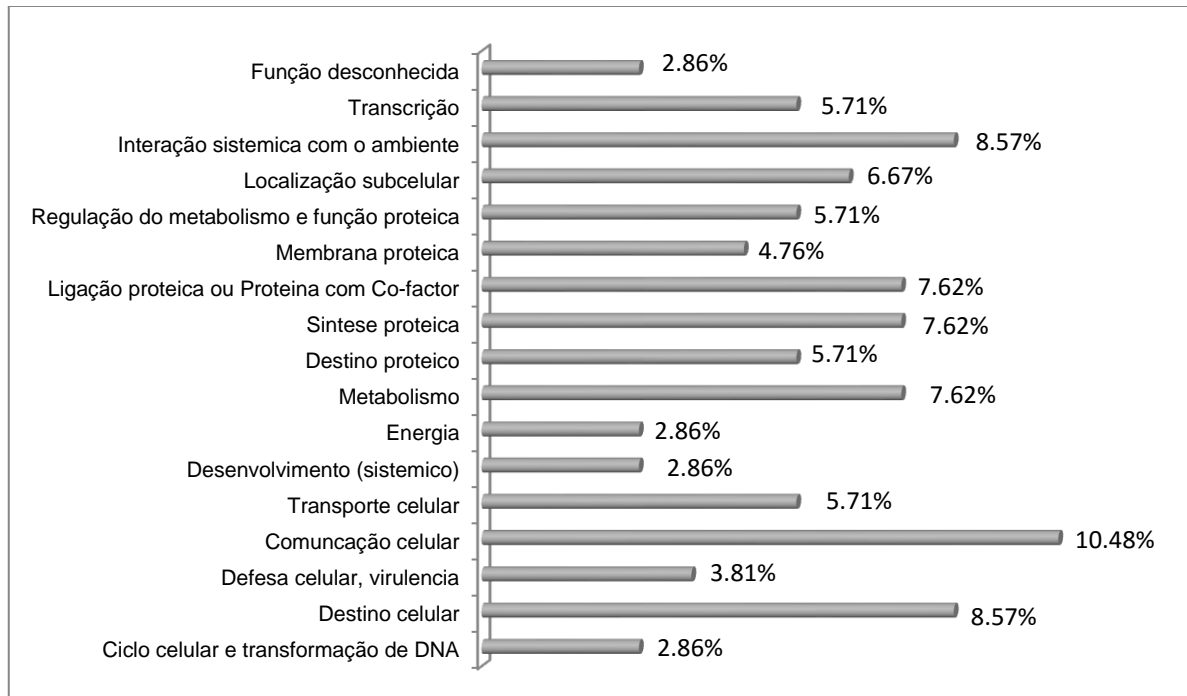


Figura 2.3: Frequência das principais categorias ontológicas de função molecular dos genes diferencialmente expressos (MIPS *Functional Catalogue*) em relação ao total de genes presentes nos slides de microarrays.

Do conjunto de EST's expressos diferencialmente (105 no total), um conjunto de 35 tiveram maior expressão no tecido da glândula mamária dos bovinos provenientes do grupo experimental Holstein Brasil, isto é, EST's que apresentavam $Fold\ Change \geq 1,5$ e $FDR \leq 0,1$. Destes, 22 estavam sobre expressos em relação ao grupo genético Gyr e 13 sobre expressos em relação ao grupo Gyrolando. Foram identificados 40 transcritos com maior expressão ($FC \geq 1,5$ e $FDR \leq 0,1$) no tecido da glândula mamária no grupo experimental Gyrolando, sendo 17 sobre expressos em relação aos Holstein Brasil e 23 em relação ao grupo genético Gyr. Um total de 30 transcritos teve maior expressão ($FC \geq 1,5$ e $FDR \leq 0,1$) no tecido da glândula mamária no grupo experimental Gyr. Destes, 16 estavam sobre expressos em relação aos Holstein Brasil 14 em relação ao grupo Gyrolando.

Os genes associados a hormona Prolactina (M35587.1; V00112.1; M36874.1) e a hormona T_3 (NM006757.1), presentes na Biblioteca BLO, utilizada neste estudo,

não apresentaram expressão diferencial em pelo menos um dos grupos experimentais (*Fold Change* $\leq 1,5$ e *FDR* $\geq 0,1$).

Para efeito deste estudo foram selecionados para discussão 14 genes distribuídos entre as funções relacionadas com estrutura da glândula mamária (CRDGF; CD97; GH1; Endoglin; LTF; INPP5B; PTPN9), com a resposta ao *stress* térmico (Crh_11; v-Fos; e Cdc37), e com a composição do leite (e RPL35; κ -caseína; β caseína e α -s2-caseína). Os genes escolhidos estão descritos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3- Clones da *Bovine EST and Microarray Web Resource* com maior expressão em tecido da glândula mamária de acordo com o grupo experimental.

Identificação (GeneBank)	Gene	Fold Change*		
		Holstein Brasil/ Gyr	Gyr/ Gyrolando	Holstein Brasil/ Gyrolando
Desenvolvimento da Glândula Mamária				
CRDGF (BC142081)	<i>Bos taurus</i> amphiregulin	2,67	<1,5	1,77
GHI (NM_180996.1)	<i>Bos taurus</i> growth hormone 1	3,49	-1,66	2,57
Endoglin (Z23142.1)	<i>S.scrofa</i> Endoglin	1,79	<1,5	2,48
LTF (NM_180998.2)	<i>Bos taurus</i> lactotransferrin (LTF), mRNA	-2,54	1,75	-1,88
PTPN9 (NM_002833.2)	<i>Bos taurus</i> protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	-3,02	2,91	<1,5
CD97 (AJ416058.1)	<i>Bos taurus</i> mRNA for CD97 protein	<1,5	2,19	1,59
INPP5B (XM_002686466.1)	<i>Bos taurus</i> inositol polyphosphate-5-phosphatase	-3,98	3,42	-2,29
Tolerância ao Stress Térmico				
Chr_11 (NW_001492966)	<i>Bos taurus</i> chromosome 11 cdc.	-3,69	<1,5	-2,61
v-Fos (BC118280)	<i>Bos taurus</i> murine FBJ osteosarcoma viral (v-Fos) oncogene homolog (FOS)	4,75	<1,5	2,31
CDC37L1 (NM_017913.1)	<i>Homo sapiens</i> Hsp90-associating relative of Cdc37 (HARC), mRNA	4,06	-2,11	<1,5
Proteína do Leite				
RPL35 (BC105179)	<i>Bos taurus</i> ribosomal protein L35	3,89	-2,44	1,74
κ-casein (X14908.1)	Bovine gene for kappa-casein exons 3-5	-3,07	<1,5	-1,65
β-casein (AF409096.1)	Bovine beta-casein gene	-3,11	<1,5	-1,96
α-s2-like casein (M16644.1)	Bovine alpha-s2-like casein mRNA	4,09	-1,72	<1,5

Os valores negativos indicam que os genes naquele grupo apresentam-se *down-regulated*.

Destes genes selecionados, foram escolhidos oito, associados ao desenvolvimento do parênquima mamário e à tolerância ao *stress* térmico, para validação através de PCR em tempo real. Foi utilizado o gene β -actina (F: GGC CAA CCG TGA GAA GAT GA; R: GCA TAC AGG GAC AGC ACA GC) como *housekeeping*.

Todos os genes seleccionados que foram analisados através de PCR em Tempo Real, tiveram resultados similares aos encontrados nas análises de microarrays, com excepção dos genes Cdc37 e CD97 (Tabela 2.4). Para estes dois genes não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os três grupos experimentais. Os níveis de expressão genética relativa encontrados para estes genes apresentaram uma variabilidade muito grande, o que pode justificar o fato de não ter sido possível detectar diferenças entre os grupos.

Tabela 2.4: Expressão genética relativa* dos transcritos utilizados no PCR em Tempo Real de acordo com os grupos genéticos.

Gene	Grupo Genético			p
	Holstein Brasil	Gyrolanda	Gyr	
CRDGF	0,1004 ^a (0,0502)	0,0004 ^b (0,00001)	0,0038 ^b (0,0008)	0,049
CD97	0,0186 (0,0030)	0,0062 (0,0026)	0,0180 (0,0041)	ns
INPP	0,0266 ^c (0,0013)	0,1046 ^b (0,0180)	0,1551 ^a (0,0083)	0,017
GH	0,351 ^a (0,0002)	0,180 ^b (0,0009)	0,152 ^b (0,0025)	0,023
RPL35	15,8628 (9,2812)	11,9804 (1,2845)	9,3414 (7,9693)	0,049
LTF	5,1109 ^b (1,1590)	6,6045 ^b (0,2609)	9,4350 ^a (2,9825)	0,019
CDc37	1,0354 ^a (0,4010)	0,7002 ^a (0,2568)	5,7744 ^a (2,7943)	ns
PTP	0,0126 ^b (0,0035)	0,0219 ^a (0,0054)	0,0140 ^b (0,0032)	0,041

*média e desvio padrão.

**médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si estatisticamente pelo teste Tuckey ($p < 0,05$)

2..4.2.1. GENES ASSOCIADO À ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Entre os transcritos estudados, referentes ao desenvolvimento da glândula mamária destacamos os genes CRDGF, GH, Endogлина, CD97, INPP (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB>; *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>), pelas suas intervenções na estrutura desta glândula.

CRDGF - *Bos taurus* similar to Amphiregulin precursor (AR) (Colorectum cell-derived growth factor) (CRDGF) (LOC538751), mRNA

O transcrito CRDGF, é uma proteína similar à Anfiregulina (Culouscou *et al.*, 1992), ou seja, é um factor de crescimento similar à EGF, que activa um receptor de EGF (Shoyab *et al.*, 1989). Segundo Sternlicht *et al.* (2005) através da enzima ADAM17, a Anfiregulina é libertada da parede epitelial e vai activar receptores de EGF no estroma que desencadeiam um conjunto de respostas promotoras do desenvolvimento do epitélio mamário, nomeadamente o crescimento do ducto mamário (Capuco *et al.*, 2011). Nas comparações entre o grupo genético Holstein Brasil e os demais grupos foi observado que este transcrito estava sempre sobre expresso nos animais Holstein Brasil ($FC_{HB/GG}=2,67$; $FC_{HB/HG}=1,77$; $FDR<0,1$). Não foi observada expressão diferencial, para este transcrito, entre os grupos Gyr e Gyrolando ($FC<1,5$ e $FDR>0,1$).

As vacas da raça Holstein apresentam maior produção de leite do que as vacas Gyrolanda (Porcionato *et al.*, 2005) e, quanto maior a contribuição genética da raça Holstein no cruzamento Gyr x Holstein, maiores são os índices de produção (McManus *et al.*, 2008). Este fato, pode estar associado ao desenvolvimento da glândula mamária, que se reflete na quantidade de epitélio mamário e no tamanho da cisterna da glândula mamária. Cisternas maiores estão relacionadas com uma melhor adaptação à ordenha (Ayadi *et al.*, 2003), maior produção, secreção e melhor ejeção do leite (Nudda *et al.*, 2000). Em função da correlação entre produção de leite e características morfológicas do úbere, estas últimas têm importância na selecção dos animais para a produção de leite (Teodoro *et al.*, 2000). De acordo com os nossos resultados parece haver uma relação entre a expressão do transcrito em análise e a produtividade leiteira.

GH - Bos taurus growth hormone, mRNA

Foi observado que o gene da hormona do crescimento se apresentava sobre expresso no grupo Holstein Brasil, quando comparado com o grupo Gyr ($FC_{HB/GG}=3,49$; $FDR<0,1$) e com o Gyrolando ($FC_{HB/HG}=2,57$; $FDR<0,1$). Este resultado não se verificou no perfil hormonal dos animais, onde o grupo Holstein Brasil apresentou médias de concentrações plasmáticas iguais aos dos outros grupos ($p>0,05$).

O gene que codifica a hormona de crescimento é fundamental na lactoioiese e no rendimento leiteiro (Akers, 2006; Bauman, 1992), bem como no desenvolvimento e crescimento da glândula mamária (Mullen *et al.*, 2011; Tucker, 2000). A hormona GH aumenta a produção de leite, direccionando os nutrientes para a glândula mamária. De acordo com McGuire *et al.* (1991) a hormona de crescimento diminui durante as condições de *stress* calórico e West (2003) acrescenta que a concentração da hormona do crescimento diminui com valores de Índice de Temperatura e Humidade (conforto térmico) superiores a 70. Contudo, alguns autores não têm verificado uma redução nos níveis plasmáticos de GH de animais sujeitos a condições de *stress* térmico face a animais em termoneutralidade (Rhoads *et al.*, 2009), o que está de acordo com os nossos resultados.

Endoglin -S.scrofa endoglin mRNA, complete CDS

Não foi observada expressão diferencial entre os grupos Gyr e Gyrolanda para o gene da Endoglin ($FC<1,5$ e $FDR>0,1$). O grupo Holstein Brasil apresentou uma sobre expressão face aos grupos Gyr e Gyrolando ($FC_{HB/GG}=1,79$; $FC_{HB/HG}=2,48$; $FDR<0,1$).

O gene da Endoglin tem função morfológica associada a regulação do desenvolvimento da glândula mamária através da diferenciação, proliferação desenvolvimento celular e apoptose (Matsuo *et al.*, 2006). A Endoglin é uma glicoproteína pertencente ao complexo receptor *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β receptor) (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Barbara *et al.*, 1999). Verifica-se assim uma proporcionalidade entre a expressão do gene da Endoglin e a produtividade leiteira nos grupos de animais em experiência.

CD97 - *Bos taurus* mRNA for CD97 protein

O transcrito CD97, é uma glicoproteína, presente nos leucócitos e funciona como receptor envolvido nos processos de adesão e sinalização após a ativação daqueles glóbulos (Gray *et al.*, 1997; Hamman *et al.*, 1997). Esta EST está associada à síntese da região terminal do EGF, que desempenha um papel na regulação do cálcio, que por sua vez é essencial para a manutenção das interações proteína - proteína da família de receptores de sinais EGF-TM7 (Eichler *et al.*, 2004).

Este transcrito não teve expressão diferencial entre Gyr e Holstein Brasil ($FC < 1,5$ e $FDR > 0,1$). No entanto quando estes grupos genéticos foram comparados com Gyrolando, a expressão deste último foi sempre menor face aos outros dois ($FC_{GG/HG} = 2,19$; $FC_{HB/HG} = 1,59$; $FDR < 0,1$). Este resultado pode traduzir interações genéticas que diminuem a sua expressão neste híbrido relativamente as duas raças puras, Gyr e Holstein Brasil.

LTF- *Bos taurus* lactotransferrin (LTF), mRNA

A Lactotransferrina é uma glicoproteína multifuncional encontrada nas secreções mamárias das células epiteliais e actua essencialmente como factor de defesa da glândula mamária, estando associado à regulação do processo de apoptose (Legrand *et al.*, 2004; Baumrucker *et al.*, 2002). Esta proteína encontra-se em altas concentrações durante a gestação e a involução mamária (Baumrucker *et al.*, 2006). O grupo experimental Holstein Brasil apresentou uma expressão diminuída em relação aos grupos Gyr e Gyrolando para o transcrito LTF ($FC_{HB/GG} = -2,54$; $FC_{HB/HG} = -1,88$; $FDR < 0,1$). Ao se comparar os grupos Gyr e Gyrolando observou-se que, para este transcrito os animais Gyr apresentaram-se sobre expressos em relação aos primeiros ($FC_{GG/HG} = 1,75$; $FDR < 0,1$).

Estes resultados podem sugerir que animais do grupo Gyr apresentam maior expressão de iniciadores de processos de apoptose na glândula mamária, essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase celular (Baumrucker *et al.*, 2006).

PTP – *Homo sapiens* protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9 (PTPN9), mRNA

O transcrito PTP é um indutor de apoptose, que regula a apoptose por intermédio de diversos agentes, incluindo factores de crescimento, como o factor de

crescimento epidermal (Zhang *et al.*, 2007; Rishi *et al.*, 2006). Estes receptores de EGF causam uma elevada fosforilação da tirosina da PTP, que assim promove a apoptose através da activação de uma caspase (caspase-9) (Richi *et al.*, 2006). A caspase-9 é activada pelas mitocôndrias quando as células recebem estímulos apoptóticos. Estas caspases irão então activar caspases efectoras (caspase-3, -6 e -7) que, em cascata, executam o processo de apoptose (Lavrik *et al.*, 2005; Thornberry e Lazebnik, 1998).

Os grupos experimentais Holstein Brasil e Gyrolando apresentaram-se com uma expressão diminuída em relação ao grupo Gyr, para o transcrito PTP ($FC_{HB/GG}=-3,02$; $FC_{GG/HG}=2,91$; $FDR<0,1$), e foram iguais entre si ($FC<1,5$ e $FDR>0,1$). Este resultado pode indicar uma maior disponibilidade para renovação de células epiteliais na glândula mamária do grupo Gyr (Richi *et al.*, 2006).

INPP - Bos taurus inositol polyphosphato 5-phosphatase

O transcrito INPP codifica a enzima inositol polifosfato-5-fosfatase, que está associada ao metabolismo interno dos hidratos de carbono e participa na regulação de funções celulares tais como proliferação, diferenciação e apoptose (Gewinner *et al.*, 2009). Esta enzima actua como facilitador no transporte de glicose na glândula mamária (Zhao e Keating, 2007).

Este gene apresentou-se sobre expresso para o grupo experimental Gyr em relação aos outros dois grupos de animais em experiência ($FC_{HB/GG}=-3,98$; $FC_{GG/HG}=3,42$; $FDR<0,1$), que foram iguais entre si.

Destes resultados constatamos que, relativamente à estrutura da glândula mamária, observa-se que os genes associados à diferenciação e proliferação do epitélio celular mamário e rendimento leiteiro apresentaram-se com maior expressão no grupo experimental Holstein Brasil face aos outros dois grupos genéticos.

Os animais Gyrolando, por sua vez, apresentaram uma expressão genética igual ao grupo Holstein os genes associados à diferenciação e proliferação celular.

O grupo experimental Gyr apresentou maior expressão relativa dos transcriptos associados a defesa celular e aos processos de apoptose.

O *Fold Change* observado para os transcritos associados a diferenciação, proliferação, rendimento leiteiro (com exceção da Endoglina e do CD97) na razão HB/GG foi maior que o verificado na razão HB/HG. Este facto pode indicar que para

estes transcritos (com exceção da Endoglina e do CD97) as características dos animais da raça Gyrolando estão mais próximas dos animais da raça Holstein.

Nos termos dos nossos resultados a maior expressão de transcritos associados ao desenvolvimento mamário verificado no grupo Holstein pode indicar que estes animais não apresentavam *stress* pontual por altas temperaturas, o que está de acordo com Collier *et al.* (2006).

2..4.2.2. GENES ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA AO STRESS A ELEVADAS TEMPERATURAS

Os genes associados à resposta ao *stress* por elevadas temperaturas identificados neste estudo foram CDc37, v-FOS, CHR11 (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB>; *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>).

Cdc37 - Homo sapiens Hsp90-associating relative of Cdc37 (HARC), mRNA

Este transcrito está associado à expressão de uma “90-kDa heat shock protein” (HSP90), faz parte da família das proteínas *heat shock*, que estão envolvidas com o crescimento e diferenciação celular. Este grupo de proteínas está associado à tolerância ao *stress* térmico a nível celular (Collier *et al.*, 2008). Animais que estão expostos ao *stress* térmico pontual tendem a aumentar a síntese desta proteína. Collier *et al.* (2012) observou que durante o processo de aclimatização a síntese de HSP90 também pode manter-se alta. Segundo este autor há um esforço do animal no sentido de uma auto-regulação térmica, característica da aclimatização.

Nas análises dos microarrays, este transcrito apresentou-se sobre expresso nos animais Holstein Brasil face ao grupo Gyr ($FC_{HB/GG}=3,06$; $FDR<0,1$), no tendo sido observado diferenças estatísticas em relação ao grupo Gyrolando; ($FC<1,5$ e $FDR>0,1$).

A maior expressão deste transcrito encontrada no grupo experimental Holstein Brasil demonstra que estes animais não estão adaptados ao clima tropical, mas podem estar em processo de aclimatização.

v-FOS - Bos taurus murine FBJ osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog (FOS), mRNA, complete cds

O murine FBJ osteosarcoma viral ou v-FOS é uma proteína que provoca alterações na sobrevivência das células e na expressão de proteínas relacionadas com o *stress* (Ramirez, 2014; Fabre-Jonca *et al.*, 1995). Segundo o mesmo autor, este transcrito está associado a uma menor tolerância ao *stress* térmico.

A maior expressão do EST relativo à v-Fos observada no grupo de animais Holstein Brasil face aos outros dois grupos ($FC_{HB/GG}=3,75$; $FC_{HB/HG}=2,31$; $FDR<0,1$), revelando uma menor resistência às temperaturas elevadas nos animais taurinos. Este facto pode ser considerado natural pois este grupo experimental, mesmo que aclimatizado, não apresenta as mesmas condições de adaptabilidade que os outros dois grupos estudados. Os grupos Gyr e Gyrolando não apresentaram expressão diferencial entre si ($FC<1,5$ e $FDR>0,1$), salientando a adaptação destes dois grupos genéticos a estas condições.

Chr 11 - Bos taurus chromosome 11

O transcrito Chr11 é referente a um cromossoma onde foram mapeados QTL's associados a características de adaptação ao *stress* térmico, mais especificamente à sudação (Columbiano, 2007). De acordo com o mesmo autor, a quantidade de suor produzido depende, entre outros fatores, do número de glândulas sudoríparas ativas, pelo número de glândulas por unidade de área epidérmica e pela estrutura das mesmas. Animais adaptados a climas tropicais, como os zebuínos, tendem a apresentar uma maior densidade numérica de glândulas sudoríparas, sendo estas saculiformes e de maior diâmetro.

Observou-se que o grupo Holstein Brasil apresentou uma menor expressão deste transcrito quando comparado com os grupos Gyr e Gyrolando ($FC_{HB/GG}=-3,69$; $FC_{HB/HG}=-2,61$; $FDR<0,1$), que apresentaram expressões iguais entre si. Este resultado está de acordo com diversos autores que indicam que animais *Bos indicus* possuem maior quantidade de glândulas sudoríparas que animais *Bos taurus* (Columbiano, 2007; Hansen, 2004).

Nos animais do grupo experimental Holstein Brasil os genes associados a menor tolerância ao *stress* por altas temperaturas apresentaram-se sobre expressos, face ao que acontece no grupo Gyr.

Verifica-se que as razões das expressões destes genes (*Fold Change*) entre os grupos Holstein Brasil e Gyr foram maiores que as verificadas entre os grupos Holstein Brasil e Gyrolando, o que está de acordo com as capacidades de adaptação dos diferentes grupos de animais em experiência.

2.4.2.3. GENES ASSOCIADOS À COMPOSIÇÃO DO LEITE

Analisando o conjunto de transcritos selecionados verificamos que a sua atividade revelou a expressão diferencial de alguns genes associados com a síntese proteica (RPL35) e a síntese de caseína no leite (κ -caseína, β - caseína, α -s2-caseína) (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB>; *The Gene Ontology - Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>)). Não foram identificados genes com expressão diferencial entre os grupos em estudo relacionados com a composição de triglicéridos do leite.

RPL35 - Bos taurus similar to ribosomal protein L35, mRNA (cDNA clone MGC:128342 IMAGE:7960639), complete cds.

O EST RPL35 é uma proteína associada à regulação do teor de proteína no leite, mas que tem a sua função pouco estudada (Bionaz e Loor, 2007). É codificada pelo cromossoma 11, que apresenta QTL's associados ao *stress* térmico, não se podendo por isso eliminar uma possível função na resposta ao *stress* térmico (Columbiano, 2008). Neste estudo observou-se que este gene esteve sobre expresso no grupo Holstein Brasil face aos outros dois grupos genéticos ($FC_{HB/GG}=3,89$; $FC_{HB/HG}=1,74$; $FDR<0,1$). O grupo Gyrolando apresentou maior expressão deste transcrito face ao grupo Gyr ($FC_{GG/HG}=-2,54$; $FDR<0,1$), o que pode indicar um efeito do cruzamento entre animais taurinos e zebuínos para este transcrito.

K-casein - Bovine gene for kappa-casein exons 3-5;

β -caseína - Capra hircus beta-casein precursor (csn2) gene, complete cds;

α -s2-caseína - Bovine alpha-s2-like casein mRNA, complete cds

O gene da κ -caseína apresentou-se *down-regulated* para o grupo Holstein Brasil, face aos grupos Gyr e Gyrolando ($FC_{HB/GG}=-3,07$; $FC_{HB/HG}=-1,65$; $FDR<0,1$),

sendo que entre estes últimos grupos experimentais não foi observada expressão diferencial ($FDR > 0,1$; $FC < 1,5$) para este gene. Este resultado também foi verificado para o gene da β -caseína ($FC_{HB/GG} = -3,11$; $FC_{HB/HG} = -1,96$; $FDR < 0,1$). Os nossos resultados estão de acordo com Collier, *et al.* (2012) que relata a existência de um efeito negativo do *stress* por elevadas temperaturas e a expressão de genes da proteína do leite. Refere ainda que o aumento da síntese de HSP's compete com a síntese proteica na glândula mamária. O mesmo autor (Collier *et al.*, 2008) refere os níveis elevados de HSP's nos animais em processo de aclimatização.

Segundo Bionaz *et al.* (2012) a quantidade e composição da proteína do leite é amplamente dependente do grupo genético do animal, tendendo os animais zebuínos a apresentar maior teor de proteína no leite do que animais taurinos (Fonseca e Santos, 2000). Em bovinos, os genes das caseínas estão localizados no cromossoma 6 estendendo-se por uma região de 200 kb (Owlsen *et al.*, 2005), tendo sido associados a diferenças na produção, composição e processamento do leite (Ron *et al.*, 2001). A variante B do genótipo da κ -caseína está associada a maior tolerância ao *stress* térmico e menor tempo de coagulação do leite (Pacheco-Contreras *et al.*, 2011). Kemenes *et al.* (1999), verificou uma maior frequência destes alelos para estes genes em *Bos indicus* quando comparado a *Bos taurus* o que é compatível com os nossos resultados.

A expressão da α -s2-caseína foi menor nos animais Gyr quando comparado aos animais Holstein Brasil e Gyrolando ($FC_{HB/GG} = 3,09$; $FC_{GG/HG} = -1,72$; $FDR < 0,1$).

Os resultados dos genes estudados associados às caseínas demonstram uma semelhança entre os grupos genéticos Gyr e Gyrolando face ao grupo Holstein Brasil.

Os animais do grupo Holstein Brasil apresentaram transcritos sobre expressos associados a características que são afectadas por *stress* por elevadas temperaturas, tais como desenvolvimento mamário (CRDGF e Endoglina) e rendimento leiteiro (GH). Verificaram-se também nestes animais transcritos sobre expressos associados a menor tolerância ao *stress* térmico (ν -FOS) e à defesa celular face ao *stress* por elevadas temperaturas (cdc37). Estes resultados parecem mostrar o reflexo da componente “a longo prazo” do processo de aclimatização.

2..5. CONCLUSÃO

As condições tropicais de exploração a que bovinos leiteiros estão sujeitos revelaram exercer efeitos na expressão de transcritos na glândula mamária e estes efeitos foram diferentes nos grupos genéticos em experiência.

Animais Gyr apresentaram transcritos sobre expressos, face aos outros grupos experimentais, associados à defesa celular, regulação de processos de apoptose, maior tolerância ao *stress* a altas temperaturas e maior concentração de proteína do leite.

Os níveis hormonais verificados nos animais do grupo Holstein Brasil não foram inferiores aos valores normais da raça. Relativamente aos transcritos estudados constatamos que neste grupo se encontram sobre expressos os genes associados a características de desenvolvimento da glândula mamária e a menor tolerância a altas temperaturas.

O grupo Gyrolando apresentou resultado intermédios face aos restantes grupos genéticos, com a proximidade (*Fold Changes*) da expressão relativa dos genes maior ao grupo Gyr relativamente à tolerância ao *stress* a altas temperaturas, defesa celular e ao grupo Holstein na expressão de transcritos associados a estrutura da glândula mamária e rendimento leiteiro.

Na medida em que o processo de aclimatização se inicia após o período de *stress* por elevadas temperaturas, o estudo hormonal e transcriptômico efectuado sugere que o grupo Holstein em experiência apresentou perfis de uma possível aclimatização aos ambientes tropicais sem prejuízo da sua produtividade.

CAPÍTULO 3

ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BOVINOS HOLSTEIN EM AMBIENTES TROPICAIS

3..1. RESUMO

As condições ambientais a que estão sujeitas as regiões de clima tropical podem induzir a um estado de *stress* térmico nos animais que altera a regulação da expressão de genes associados a diferentes funções celulares. Estas mudanças provocam a diminuição na produção de leite. A identificação de genes associados com estes mecanismos pode fornecer mais informações no que se refere ao impacto do *stress* térmico no funcionamento celular, contribuindo para a resolução de problemas que afectam a produtividade animal. Este trabalho teve o objectivo de identificar genes expressos na glândula mamária associados ao processo de aclimatização de vacas Holstein a ambientes tropicais. Para esta proposta, 12 animais da raça Holstein, na mesma fase de lactação e submetidos às mesmas práticas de manejo, foram divididos em 2 grupos. Um integrando animais Holstein com genealogia comprovada no Brasil e localizados em uma exploração comercial situada no Planalto Central Brasileiro (clima tropical). Outro, composto por vacas Holstein registradas e em sistema de produção situado em Portugal (clima temperado). Foram realizadas biópsias do parênquima mamário para futura extração de ARN utilizado nos estudos transcriptômicos. Foram recolhidas amostras de sangue arterial e venoso para determinação do perfil hormonal (venoso) e química do sangue (arterial). A expressão genética diferencial na glândula mamária dos dois grupos experimentais foi determinada utilizando a metodologia de microarrays de cDNA e validada através de PCR em Tempo Real. Identificou-se um total de 65 EST's dos 4608 transcritos contidos nas lâminas de *microarrays* com expressão diferencial nos dois grupos. Destes, oito foram relacionados com as funções relativas ao desenvolvimento do parênquima mamário e de adaptação ou aclimatização ao *stress* ambiental. Transcritos associados ao desenvolvimento da glândula mamária e respostas ao *stress* térmico foram identificados, com maior expressão nos animais Holstein Brasil (CD97, CRDG, GH, Chr11_QTL, RPL35). Em animais Holstein Portugal observou-se o aumento da expressão dos transcritos associados à apoptose e desenvolvimento vascular e uma diminuição da expressão daqueles associados à resistência ao *stress* térmico (Endoglin, CCAR1, v -Fos). Os animais do grupo experimental Holstein Brasil apresentaram níveis mais altos da hormona do crescimento face aos animais do grupo Holstein Portugal ($p < 0,05$). No entanto os níveis sanguíneos de prolactina e

T3 foram semelhantes para os dois grupos ($p > 0,05$). Os nossos resultados indicam que a existência de um processo de aclimatização dos animais do grupo experimental Holstein Brasil a ambientes tropicais, nomeadamente o Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Holstein, glândula mamária; *stress* térmico; ambiente tropical

3..2. INTRODUÇÃO

A produção de leite representa para os países em vias de desenvolvimento, que na sua maioria se situam em regiões tropicais, uma componente importante no âmbito da segurança alimentar e económica (Steinfeld *et al*, 2006). No esforço de melhorar seus rendimentos leiteiros, os produtores de leite dos países tropicais têm recorrido à utilização de cruzamentos com raças exóticas de maior potencial produtivo, como a raça Holstein, que gradualmente vão substituindo as raças autóctones na produção de leite.

As raças leiteiras altamente produtivas são sensíveis ao *stress* abiótico (temperatura e humidade) comum a regiões tropicais sendo esta sensibilidade proporcional à produtividade dos animais (Ravagnolo *et al.*, 2000).

A adaptação ou a aclimatização animal a um agente de *stress* é dependente da capacidade das células em induzirem uma resposta fisiológica que permita ao organismo regressar à sua zona de conforto (Collier, *et al.*, 2012). Os efeitos do *stress* por elevadas temperaturas sobre a função celular incluem a inibição da síntese de ADN, da transcrição e da tradução de ARN (Sonna, *et al*, 2002.). Segundo o mesmo autor esses efeitos também compreendem a desnaturação e degradação proteica, a perturbação dos componentes do citoesqueleto, alterações no metabolismo que levam a uma redução líquida de ATP celular e a alterações na permeabilidade da membrana que levam a um aumento intracelular de Na⁺, H⁺ e Ca²⁺. As mudanças na expressão de genes associados ao efeito do *stress* por elevadas temperaturas envolvem respostas agudas ao processo de aclimatização ao nível celular, e de uma variedade de órgãos e tecidos associados (Cincovic, *et al*, 2011;. Collier, *et al*, 2006). O *stress* térmico agudo por elevadas temperaturas afecta o tecido epitelial mamário reduzindo o crescimento celular e o número de ramificações dos ductos mamários (Collier, *et al.*, 2012), além de aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas e diminuir a produção de leite (Allen *et al.*, 2015; Bernabucci, *et al.*, 2010). Contudo, animais submetidos a ambientes tropicais, podem se aclimatizar a temperaturas mais elevadas e desenvolver termotolerância devido a acção de proteínas presentes em todas as células conhecidas como proteínas de choque térmico -HSP (Collier, *et al.*, 2006).

A raça de gado leiteiro Holstein tem vindo a desempenhar um papel cada vez mais importante na produção de leite nas regiões tropicais, nomeadamente no cruzamento com raças de fraca vocação leiteira originárias destas regiões. O

objectivo destes hibridismos tem sido a produção de animais que reúnem capacidades de adaptação aos perfis alimentares, climáticos e sanitários regionais com produtividades acrescidas pelos genótipos importados.

A seleção intensiva para a característica de maior produtividade em animais de vocação leiteira tem sido realizada principalmente em climas temperados (Keister *et al.*, 2002). Quanto maior a produção de leite maior é a produção de calor metabólico, tornando os animais mais sensíveis a hipertermia. Assim a selecção animal para maior produtividade realizada em climas temperados, induz, por consequência, a que os animais se tornem menos tolerantes a elevadas temperaturas. Devido a este facto os bovinos da raça Holstein podem encontrar-se hoje mais sensíveis ao calor do que no passado (Ravagnolo *et al.*, 2000).

Os sistemas de produção leiteira de alta produtividade correspondem a regimes de confinamento semelhantes nas regiões temperadas e tropicais. Nestas surgem custos acrescidos no sentido de modificar os ambientes das instalações do gado garantindo produtividades correspondentes aos potenciais genéticos dos animais em exploração (Assis *et al.*, 2005) São assim sistemas de produção dispendiosos, em particular os que se situam em regiões tropicais. Surge portanto, nestas regiões, a necessidade de selecções de raças que sintetizam componentes de produtividade e adaptação ou de aclimatização às mesmas.

Apesar deste contexto de interesse económico inequívoco na produção leiteira e na selecção de raças para perfis edafoclimáticos aos quais o gado se deve adaptar, os mecanismos moleculares que regulam a expressão de genes de tais adaptações são ainda bastante desconhecidos (Collier, *et al.*, 2006; Malewski e Zwierzchowski, 2001). No caso da produção de leite, as modificações genéticas e fisiológicas decorrentes dos perfis ambientais de exploração, implicam as vias metabólicas sistémicas (metabolismo intermediário) e em particular a glândula mamária.

São conhecidas alterações na expressão genética associadas à reacção a um *stress* ambiental envolvendo respostas agudas ao nível celular bem como modificações daquela expressão em vários órgãos e tecidos associados (Collier *et al.*, 2006). A expressão genética da glândula mamária tem sido estudada relativamente à identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento desta glândula na puberdade e na lactação (Suchyta *et al.*, 2003a; Sonstegard *et al.*, 2002) e na composição do leite em gordura e proteínas (Bionaz *et al.* 2012; Kaminski *et al.* 2005).

Um conjunto de 16 genes preferencialmente expressos no desenvolvimento da glândula mamária da vaca pré-púbere e em lactação foi identificado através de tecnologias de microarrays (Suchyta *et al.*, 2003a). O banco de dados de 160 genes expressos em diferentes fases fisiológicas da glândula mamária da vaca está agora disponível, incluindo transcritos associados a composição lipídica e proteica do leite (Bionaz *et al.*, 2012; Kaminski *et al.*, 2005; Malewski e Zwierzchowski de 2001). A partir destes resultados, várias bibliotecas de cDNA foram produzidas integrando vastas coleções de *Expressed Sequence Tag* (EST) do tecido mamário bovino como BMAM (*Bovine Mammary Library*) e BLO – *Bovine Long-Oligo Library* (Suchyta *et al.*, 2003b). Como consequência, estão disponíveis bancos de dados públicos utilizáveis em microarrays. Este fato permite a meta-análise em larga escala, aumentando o poder estatístico, facilitando a confirmação de hipóteses de estudos da expressão de um número elevado de genes (Larson, *et al.*, 2006). No entanto, poucos estudos têm sido realizados no âmbito da adaptação e aclimatização genética e fisiológica da glândula mamária a condições de *stress* abiótico em climas tropicais.

Neste contexto, o nosso trabalho visa a identificação de genes diferencialmente expressos nas glândulas mamárias em dois grupos experimentais de animais da raça Holstein, um deles em um possível processo de aclimatização ao ambiente tropical (Brasil) e o outro (controle) nunca retirado de um clima temperado (Portugal).

3..3. MATERIAL E MÉTODOS

3..3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizados neste estudo 12 animais da raça Holstein separados em dois grupos experimentais: “Holstein Brasil” (HB) - grupo experimental de 6 animais Holstein PO (Puros de Origem), da Fazenda Palma, região de Brasília, Distrito Federal, Brasil; “Holstein Portugal” (HP) - grupo de 6 animais Holstein PO de uma empresa de produção de leite, concelho de Azambuja, Portugal. Os animais do grupo experimental Holstein Brasil têm sua registo genealógico inscrito na Associação Brasileira de Criadores de Bovinos de raça Holandesa, disponível em www.gadoholandes.com.br, e os do grupo Holstein Portugal na Associação Portuguesa de Produtores de raça Frízia, <http://www.apcrf.pt>.

Cada grupo experimental constituía-se por vacas multíparas de 3^a ou 4^a lactação, no 3^o mês de lactação. O grupo Holstein Brasil apresentava uma média de produção, considerando duas ordenhas diárias (sem amamentação de bezerro), de 29,5 kg de leite/animal/dia e o grupo Holstein Portugal 30,7 kg de leite/animal/dia. Os animais estavam todos no 2^o mês de gestação, confirmado por exame ginecológico e determinação da concentração de Progesterona no sangue (Método de RIA).

Os animais dos dois grupos experimentais foram submetidos a um sistema de manejo confinado, sendo a alimentação composta por concentrado (Farelo de Soja e Milho triturado), uma fonte de alimento volumosa (Silagem de Milho) e suplementação mineral durante o ano todo. A ração concentrada administrada aos animais em estudo obedecia aos seguintes níveis nutricionais: 9,8 kg de Matéria Seca consumida com 22% de Proteína Bruta e 78% de NDT, no grupo Holstein Brasil e 10,1 Kg de MS consumida com 22,7% de proteína bruta e 81% de NDT no grupo Holstein Portugal. Os níveis alimentares dos animais em estudo respeitaram as suas necessidades de manutenção e de produção otimizada, sendo que ambos os grupos experimentais apresentaram um consumo total MS aproximado de 20kg/animal/dia.

As dietas experimentais utilizadas corresponderam a níveis iguais na soma de aminoácidos e de ácidos gordos no sangue arterial afluyente à glândula mamária dos animais em experiência. Estes resultados são consequentes dos perfis destes metabolitos no sangue arterial (artéria coccígea). Verificou-se que a soma das concentrações de aminoácidos totais dos sangues arteriais foi igual nos dois grupos (Holstein Brasil=1983,46 ± 233,10; Holstein Portugal=1855,66 ± 336,37; p> 0,05). As concentrações de ácidos gordos totais também são iguais entre os dois grupos (Holstein Brasil=110,54+-31,94; Holstein Portugal =112,45+-10,98; p> 0,05).

O protocolo experimental esteve de acordo com a Legislação Europeia (nº86/609/CEE) e foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária.

3..3.2. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

Os animais do grupo experimental Holstein Brasil foram provenientes de Brasília, Distrito Federal, Brasil, região caracterizada por duas estações definidas como Seca e Chuva. A Estação Seca, que se estende de Junho a Setembro apresenta temperaturas médias que variam de 23^o (Junho e Julho) com humidade

relativa do ar média de 45%, a 27° (Agosto e Setembro), com humidade média de 30%. A Estação de Chuva, entre Outubro e Abril, é caracterizada por temperaturas que variam de 27°C (Outubro-Novembro; Março-Abril) a 30°C (Dezembro-Fevereiro), com humidade entre 75 e 80%.

A região experimental em Portugal apresenta um clima temperado com temperatura média anual de 16°C e humidade de 77%, embora existam variações sazonais características do clima mediterrâneo, com os meses de Verão a registar médias de temperatura e humidade relativa de 21° C e 67%, respectivamente, e com os meses mais frios (Inverno) com média de temperatura de 10°C e humidade relativa de 87%. Os dados climatológicos (temperatura média e humidade relativa do ar média) estão dispostos na Figura 3.1.

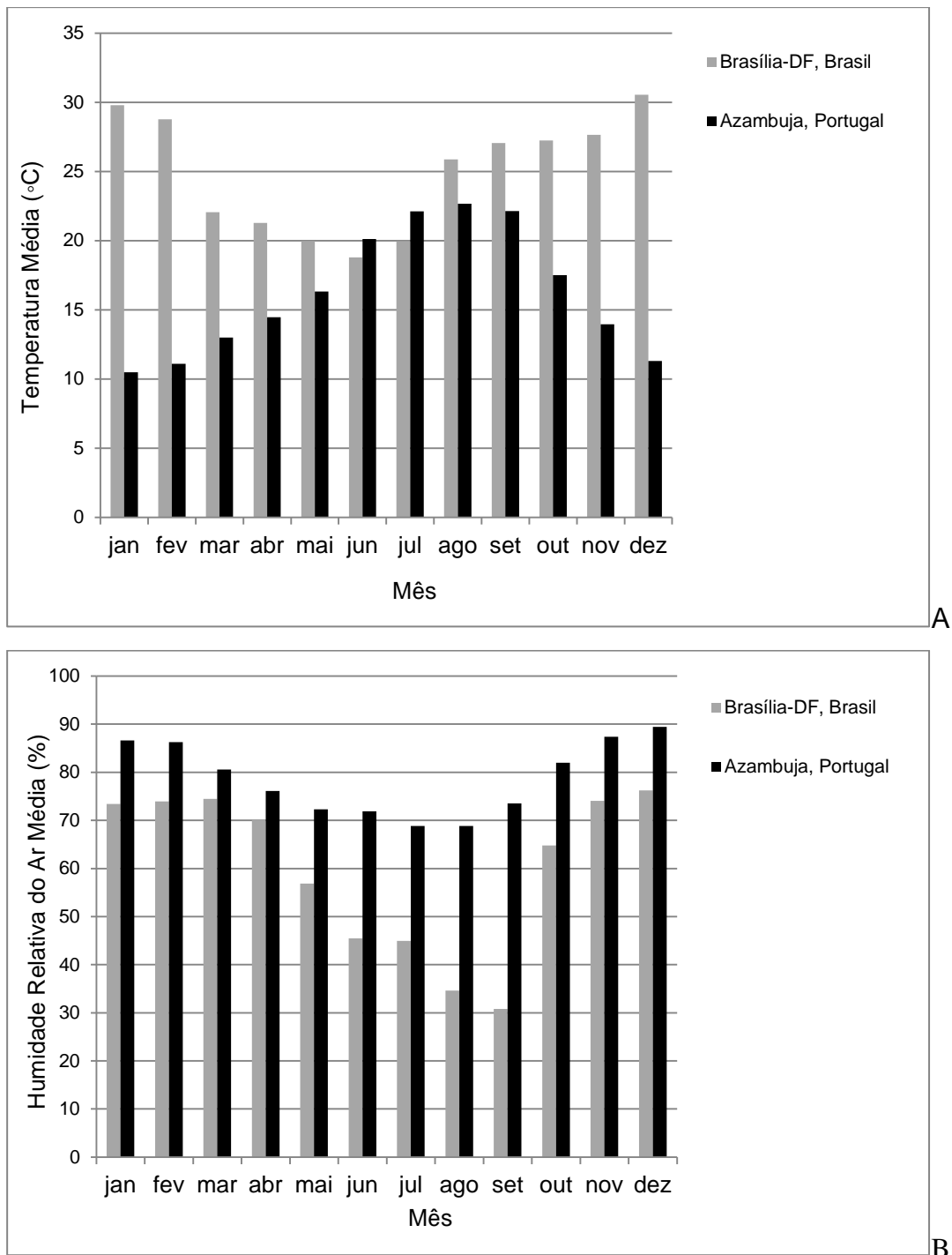


Figura 3.1: Normal Climatológica (média dos últimos 30 anos) de acordo com a região experimental (Brasil e Portugal. A) Temperatura Média (°C); B) Humidade Relativa do Ar (%) (<http://www.inmet.gov.br>, 2015; <https://www.ipma.pt/pt/index.html>, 2015).

As datas das amostragens foram escolhidas para que o efeito do *stress* ambiental no momento da colheita não interferisse nos resultados. Assim, foi determinado o Índice de Temperatura e Humidade (ITH; Instituto Nacional de

Meteorologia – Brasil; <http://www.inmet.gov.br>), baseado nos dados de Temperatura e Humidade Relativa do Ar das Normais Climatológicas das duas regiões experimentais (Figura 3.2). As recolhas das amostras foram realizadas nos meses de Abril (ITH=69), no Brasil e Novembro (ITH=60) em Portugal. Deste modo as recolhas de amostras foram realizadas quando os animais estavam em uma zona de termoneutralidade (ITH <72).

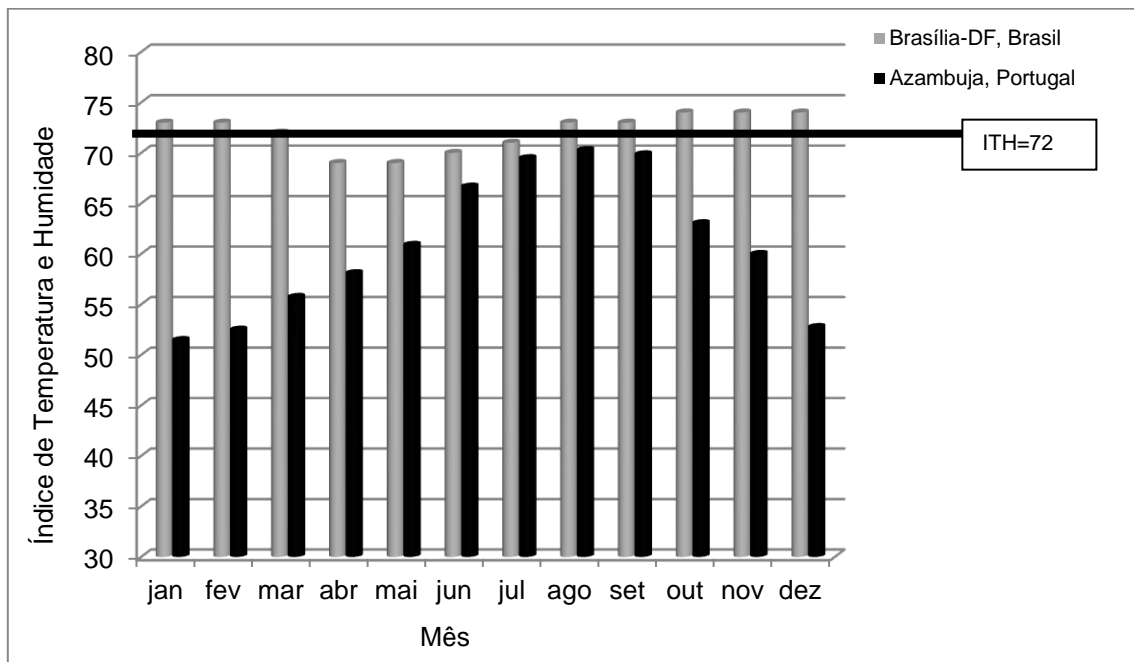


Figura 3.2: Índice de Temperatura e Humidade mensal de acordo com a região experimental (%) (<http://www.inmet.gov.br>, 2015; <https://www.ipma.pt/pt/index.html>, 2015).

3..3.3. RECOLHA DE AMOSTRAS E BIÓPSIA DE TECIDO DO PARÊNQUIMA MAMÁRIO

Os animais foram anestesiados com cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na região epidural na dose de 1 mL para cada 100kg de peso vivo. Foi realizada tricotomia e anti-sepsia da região do parênquima do quarto mamário esquerdo com solução de Iodopovidona (Braun®). A anestesia local foi feita pela infiltração de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na dose média de 10 mL. Foi realizada a biópsia utilizando o *kit Bard® Monopty Disposable Biopsy Instrument 14G/16cm* (Buehring *et al.*, 1990). De cada animal foram recolhidas amostras de cerca 100mg de tecido mamário e em seguida estas foram

armazenadas em RNAlater™ ARN Stabilization Reagent (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA) a -80°C para posteriores análises transcriptômicas.

Após as biópsias foi realizada administração de Antiasfíctico (Synulox – Phiser) intramamário, durante 3 dias com esgotamento do quarto mamário posterior esquerdo.

3..3.4. ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO

A extração do ARN e a análise dos microarrays foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no Capítulo 2 desta Tese.

Cada slide de microarray foi utilizado para a hibridação entre as sondas e os cDNA sintetizados a partir do ARN extraído do parênquima mamário dos animais em experiência.

Foram utilizadas 3 réplicas biológicas por cada população estudada, sendo cada réplica constituída por uma pool de ARN (n=2 animais/pool) e, para cada uma das réplicas biológicas, geraram-se 2 réplicas técnicas. A quantidade de ARN de cada animal utilizada para a hibridação envolvido no experimento foi o mesmo.

Cada lâmina de microarray foi hibridada com dois cDNA's marcados, representantes de cada grupo experimental, Holstein Brasil e Holstein Portugal. Foram realizadas um total de 6 hibridações, com 12 réplicas técnicas.

Os trabalhos de análise de expressão genética decorreram no laboratório BioFIG da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

3..3.5. VALIDAÇÃO DOS DADOS - PCR EM TEMPO REAL

Dos genes com funções fisiológicas associadas à estrutura da glândula mamária ou tolerância ao *stress* térmico identificados através dos *microarrays*, quatro (CD97, CRDGF, LPL e RPL35 e v-FOS) foram selecionados para a realização da validação do experimento de *microarray* por PCR em Tempo Real. Estes transcritos apresentaram expressão genética diferencial em pelo menos um grupo experimental estudado.

A análise de PCR em Tempo real foi realizada utilizando o protocolo do *Amersham CyScribe Pos-Labeling Kit* (GE Healthcare) modificado, conforme descrito no Capítulo 2 desta tese.

Foram selecionados 5 genes candidatos a *housekeeping*: β -Actina, Proteína Ribossomal L0 (RPL0), Ciclofilina (Ciclo), β -2-microglobulina (B2MG) e o Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Estes genes foram escolhidos de acordo com diversos autores (Goossens *et al.*, 2005; Bionaz e Loor, 2007; Mustafa, *et al.*, 2005, Collier *et al.*, 2006) que trabalharam com glândula mamária bovina de *Bos taurus* e/ou *Bos indicus*.

O nível de estabilidade das expressões dos diferentes *housekeepings* foram analisados através das aplicações geNorm (<http://medgen.ugert.be/~jrdesomp/genorm>) e Norm-Finder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>), conforme o protocolo descrito nos seus manuais (<http://genex.gene-quantification.info/>) e o gene GAPDH (F: CTCTGCTCCTGCCCGTTC; R:CCGTTCACTCCGACCTTCA) foi o *housekeeping* que apresentava a menor variação entre as amostras estudadas. (Figura 3.3).

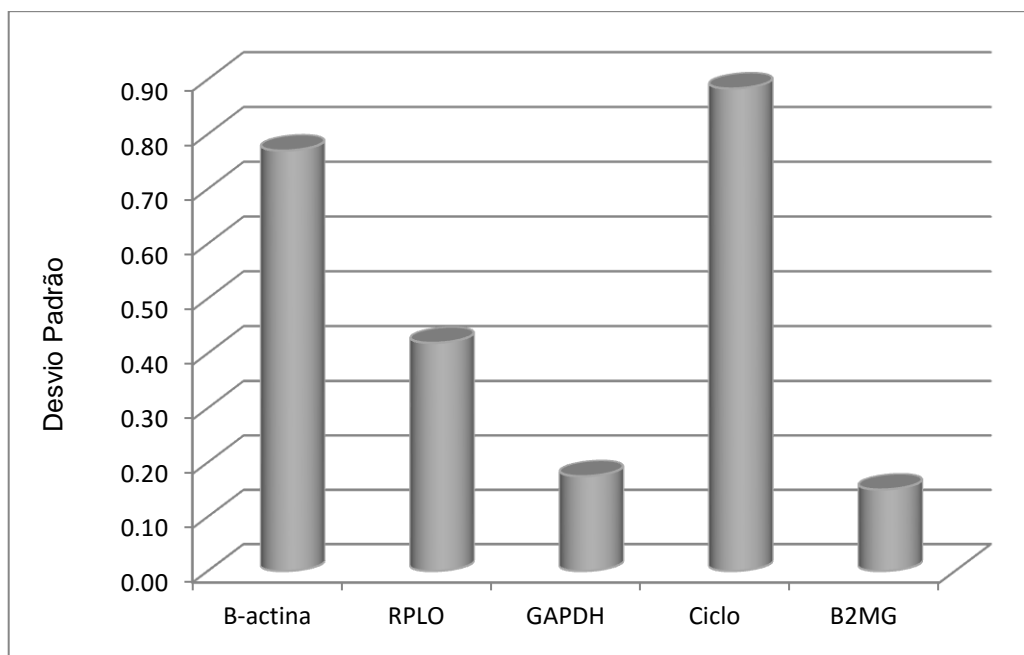


Figura 3.3: Desvio padrão dos genes testados para a escolha do *housekeeping*.

3.3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi desenvolvido de acordo com um delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos (grupos genéticos) seguindo o modelo matemático:

$$\hat{Y} = \mu + t_i + \varepsilon \text{ onde,}$$

\hat{Y} é a resposta do animal;

μ é a média geral;

t_i é o efeito do i-ésimo tratamento (grupo genético), com $i = 1, 2$;

ε é o erro aleatório.

Os dados de expressão genética foram analisados estatisticamente pelo Método do *Rank Products* (RP), (Breitling *et al*, 2004). EST's com percentagem de Falso Positivo (FDR, *False Discovery Rate*) inferior a 10% e *Fold Change* (FC, razão entre HP/HB) superior a 1,5 foram considerados como diferencialmente expresso no parênquima mamários dos grupos experimentais em estudo.

O *software* PCR *Miner* (Zhao e Fernald, 2005) foi utilizado para calcular a eficiência da reação e os limiares do ciclo das leituras de fluorescência de poços individuais durante a reação de PCR em tempo real (<http://www.miner.ewindup.info/>).

Os resultados de perfil hormonal dos dois grupos foram comparados através do Teste t de Student, utilizando o *software* STATISTICA 8.0.

3..4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3..4.1. PERFIS HORMONAIS

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na concentração sanguínea de prolactina entre os dois grupos experimentais. Este resultado também se verificou para as concentrações de Triiodotironina T_3 (Tabela 3.1).

Em paralelo a este resultado, a os genes associados a hormona da Prolactina (M35587.1; V00112.1; M36874.1) e de T_3 (NM006757.1) contidos na Biblioteca BLO utilizada nas análises transcriptômicas deste estudo não apresentaram expressão diferencial entre os dois grupos experimentais (*Fold Change* $\leq 1,5$ e FDR $\geq 0,1$).

Como discutido no Capítulo 2 deste trabalho, apesar da concentração sanguínea de T_3 ser menor quando os animais estão sob efeito de *stress* momentâneo por elevadas temperaturas, esta concentração tende a normalizar-se quando o animal está num processo de aclimatização (Nascimento, *et. al*, 2013).

Nascimento *et al.* (2013) estudando animais Holstein em ambientes tropicais verificou uma diminuição da concentração de T_3 apenas no mês de Dezembro

(maiores temperaturas anuais), havendo o restabelecimento dos valores normais nos meses seguintes. O autor salienta que devido ao estudo ter sido feito em condições naturais (sem câmara climática), a duração do calor a que os animais estão submetidos ao longo do dia afecta a sua capacidade de se aclimatizar a estes ambientes. Os animais do grupo Holstein Brasil presentes neste estudo também estavam submetidos a condições naturais o que pode ter influenciado nos resultados verificados.

A concentração sanguínea da hormona do crescimento apresentou-se maior nos animais Holstein Brasil face aos Holstein Portugal ($p < 0,001$; Tabela 3.1). Este resultado também foi verificado em relação a análise transcriptómica (Tabela 3.2), em que o transcrito GH apresentou-se sobre expresso no grupo Holstein Brasil em experiência face ao Holstein Portugal.

Tabela 3.1 – Perfil Hormonal (Prolactina, Triiodotironina- T_3 e Hormona do Crescimento) dos grupos de animais em experiência.

Hormona	Concentração Plasmática		p
	Holstein Brasil	Holstein Portugal	
Prolactina (ng/mL)	37,97 (4,09)	35,64 (2,08)	ns
Triiodotironina T_3 (ng/mL)	1,065 (0,375)	1,151 (0,132)	ns
Hormona do Crescimento (ng/dL)	16,01 (2,05)	7,06 (2,01)	**
IGF-1 (ng/mL)	98,38 (16,72)	249,10 (27,09)	**

*Média e desvio padrão

** Diferenças significativas pelo Teste t de Student ($p < 0,001$)

3..4.2. ESTUDO TRANSCRIPTÓMICO

A biblioteca de EST's utilizada no estudo foi caracterizada a partir de *Bovine EST and Microarray Web Resource* (<http://amadeus.biosci.arizona.edu/bovine>), que inclui referências sobre os clones contidos nos *microarrays* utilizados neste trabalho. Estas referências foram complementadas com o recurso à informação disponível na base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os clones disponíveis nos *microarrays* foram classificados funcionalmente, quanto à sua ontologia, de acordo

com a classificação do MIPS *Functional Catalogue* (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB>). A classificação ontológica foi ainda auxiliada recorrendo ao AmiGO!, um browser para o *The Gene Ontology*, *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org>). Os microarrays utilizados foram compostos por 4608 genes de *Bos taurus* e outras espécies com informação de sequência BLAST conhecida para *Bos taurus* (e. g. *Homo sapiens*).

A expressão diferencial dos transcritos, analisada com recurso a *microarrays* de cDNA, permitiu, dos 4608 genes dispostos nas lâminas, identificar 65 com expressão diferencial na glândula mamária dos grupos Holstein Brasil e Holstein Portugal. Os transcritos identificados foram classificados num total de 17 categorias funcionais, de acordo com a função dos genes homólogos na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e segundo a classificação funcional do MIPS *Functional Catalogue* com a atribuição da classificação para cada clone baseada no valor BLASTn, da *Bovine EST and Microarray Web Resource* (<http://amadeus.biosci.arizona.edu/bovine>) para sequências de cDNA presentes nos *microarrays* desta biblioteca (Figura 3.4). As categorias morfológicas, com maior representação nos transcritos diferencialmente expressos neste estudo, encontram-se associadas à regulação metabólica (12,8%), à comunicação celular (15,4%) e síntese proteica (12,8).

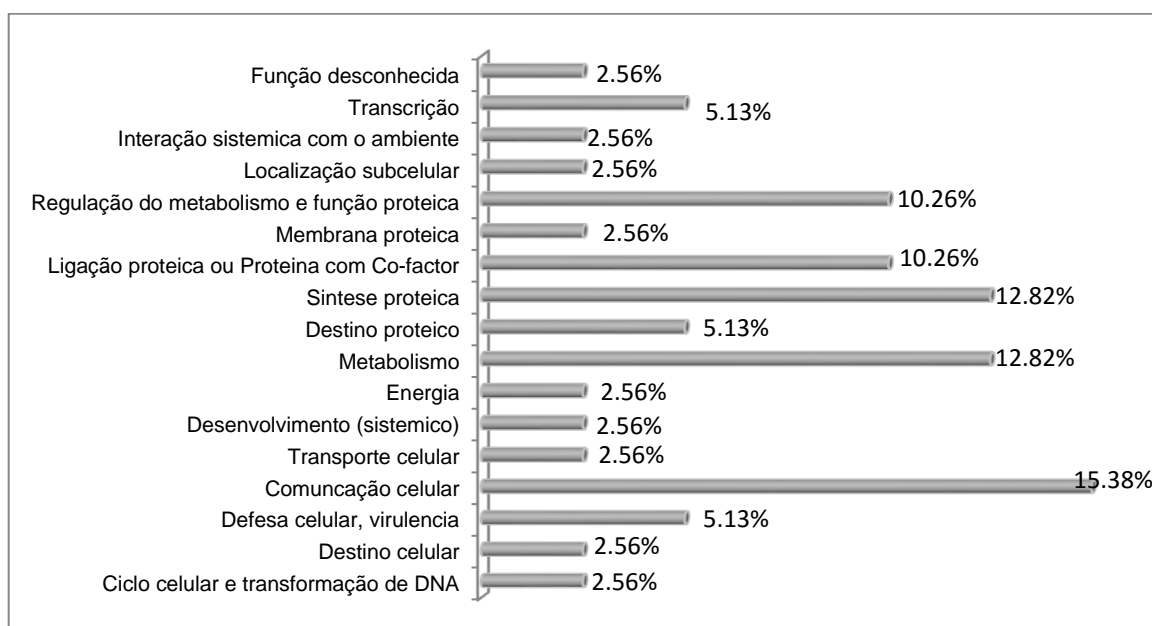


Figura 3.4 – Frequência das principais categorias ontológicas de função molecular dos genes diferencialmente expressos (MIPS *Functional Catalogue*).

Os transcritos com maior expressão no grupo Holstein Brasil estão associados na sua maioria com a síntese proteica, metabolismo e defesa celular (apoptose) e os com maior expressão no grupo Holstein Portugal estão associados com a comunicação celular e metabolismo (Tabela 3.4).

Do conjunto de genes diferencialmente expressos, 34 tiveram maior expressão no tecido da glândula mamária dos bovinos provenientes do grupo experimental Holstein Brasil, isto é, transcritos que apresentaram *Fold Change* $\geq 1,5$ e *FDR* $\leq 0,1$. Destes 34 genes, 25 tiveram correspondência com a base de dados do NCBI e do MIPS *Functional Catalogue* (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Transcritos diferencialmente expressos na glândula mamária de bovinos com sobre expressão no grupo experimental Holstein Brasil.

GenBank/NCBI Acc. No.	p-value	Descrição dos genes	<i>Fold Change*</i>
<i>Síntese proteica</i>			
AB060107	0.0	<i>Bos taurus</i> eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1), mRNA.	3,29
AAI02522	0.0	<i>Bos taurus</i> ribosomal protein L4, mRNA (cDNA clone MGC:127841 IMAGE:7956073), complete cds	2,19
BC105179	3e-143	<i>Bos taurus</i> similar to ribosomal protein L35, mRNA (cDNA clone MGC:128342 IMAGE:7960639), complete cds.	2,15
<i>Ciclo celular</i>			
NM_001081735	0.0	<i>Homo sapiens</i> small fragment nuclease (DKFZP566E144), mRNA	3,06
<i>Defesa Celular e Virulência</i>			
NW_001492966	1e-138	<i>Bos taurus</i> chromosome 11, reference assembly (based on Btau_4.0), whole genome shotgun sequence	2,75
<i>Regulação do Metabolismo e Função proteica</i>			
AF175263	0.0	<i>Bos taurus</i> ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) (RAC2), mRNA	2,68
BC114008	0.0	<i>Homo sapiens</i> small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa, mRNA (cDNA clone MGC:23207 IMAGE:4872279), complete cds.	1,98
<i>Energia</i>			
M22559	0.0	Bovine ATP synthase inhibitor protein mRNA, complete cds	2,51

Comunicação Celular			
<u>AJ416058</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> mRNA for CD97 protein.	2,54
<u>BC142081</u>	0.0	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to Amphiregulin precursor (AR) (Colorectum cell-derived growth factor) (CRDGF) (LOC538751), mRNA	1,92
Localização celular			
<u>BC114896</u>	0.0	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to Trefoil factor 2 precursor (Spasmolytic polypeptide) (SP) (LOC616105), mRNA	2,39
Função Proteica, Co-factores, enzimas			
<u>BC102437</u>	0.0	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to antioxidant protein 1, transcript variant 4 (LOC613998), mRNA	2,30
<u>XM_607943</u>	0,0	<i>Homo sapiens</i> similar to KIAA1148 protein (LOC92333), mRNA	1,92
<u>M27325</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> growth hormone (GH), mRNA	1,72
Destino proteico			
<u>AB009010</u>	7e-120	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> polyubiquitin, transcript variant 27 (UBC), mRNA	2,28
Metabolismo			
<u>AY515690</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase (GPAM), mRNA	1,99
<u>AB075020</u>	0.0	<i>Capra hircus</i> stearyl-CoA mRNA, complete cds	1,93
<u>XM_587031</u>	0.0	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to Gastroke-1 precursor (18 kDa antrum mucosa protein) (AMP-18) (CA11 protein) (LOC509961), mRNA	2,65
Função desconhecida			
<u>AY995140</u>	0.0	Cloning vector pBS 35S attR-hRluc, complete sequence	2,80
<u>XM_587031</u>	0.0	PREDICTED: <i>Bos taurus</i> similar to Gastroke-1 precursor (18 kDa antrum mucosa protein) (AMP-18) (CA11 protein) (LOC509961), mRNA	2,65
<u>AB226326</u>	7e-124	<i>Aspergillus oryzae</i> cDNA, contig sequence: AoEST3188	2,51
<u>XM_874550</u>	6e-155	<i>Bos taurus</i> isolate 32027 mitochondrion, complete genome	2,28
<u>AC010289</u>	8e-13	<i>Homo sapiens</i> chromosome 16 clone CTA-989F12, complete sequence.	2,24
<u>AY995140</u>	0.0	Cloning vector pBS 35S attR-hRluc, complete sequence.	2,19
<u>AC022088</u>	1e-37	<i>Homo sapiens</i> chromosome 5 clone CTB-110D2, complete sequence	1,87

* Fold Change – razão HB/ HP

Um total de 31 transcritos teve maior expressão no tecido da glândula mamária no grupo experimental Holstein Portugal, ou seja, valores superiores ou iguais a um *Fold Change* $\geq - 1,5$ e *FDR* $\leq 0,1$. Apenas 23 dos 31 transcritos referidos apresentaram correspondência com a base de dados do NCBI e do MIPS *Functional Catalogue* (Tabela 3.3).

Tabela 3.3- Transcritos diferencialmente expressos na glândula mamária de bovinos com sobre expressão no grupo experimental Holstein Portugal.

GenBank/NCBI Acc. No.	e-value*	Descrição dos genes	Fold Change**
<i>Síntese Proteica</i>			
D88033	0.0	<i>Bos taurus</i> gene for selenoprotein P-like protein, complete cds	3,02
XM_001790009	0.0	<i>Bos taurus</i> similar to ribosomal protein S23, transcript variant 1 (LOC614219), mRNA	2,65
<i>Apoptose</i>			
BC118090	0.0	<i>Bos taurus</i> cell division cycle and apoptosis regulator 1. CCAR1	3,62
<i>Defesa celular, virulência</i>			
BC118280	0.0	<i>Bos taurus</i> murine FBJ osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog (FOS), mRNA (cDNA clone MGC:139881 IMAGE:8284506), complete cds	2,96
BC114801	0.0	<i>Bos taurus</i> cDNA clone MGC:140380 IMAGE:8188713, complete cds	2,63
<i>Regulação do metabolismo e função proteica</i>			
AF515786	0.0	<i>Bos taurus</i> beta-1,4-galactosyltransferase mRNA, partial cds	3,96
NM_001075507	0.0	<i>Homo sapiens</i> , cholinephosphotransferase 1, clone MGC:23876 IMAGE:4696613, mRNA, complete cds	3,64
<i>Desenvolvimento (sistémico)</i>			
DQ522305	0.0	<i>Bos taurus</i> lactoferrin mRNA, partial cds	5,21
<i>Comunicação celular</i>			
Y00712	0.0	Bovine mRNA for bone proteoglycan II	3,55
AY858551	0.0	<i>Homo sapiens</i> deiodinase, iodothyronine, type II (DIO2), transcript variant 1, mRNA	2,83
X62916	0.0	<i>Bos taurus</i> mRNA for immunoglobulin G1 heavy chain	2,66

<u>NM_001076397</u>	0.0	<i>Sus scrofa</i> endoglin mRNA, complete CDS	3,17
Transporte celular			
<u>NM_001076171</u>	0.0	<i>Homo sapiens</i> tubulin tyrosine ligase-like 1 (TTLL1), mRNA	3,38
Função Proteica, Co-factores, enzimas (estrutural ou catalítica)			
<u>AY216661</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> lipoprotein lipase, transcript variant 2 (LPL), mRNA	4,85
Destino proteico			
<u>X94982</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> mRNA for tryptase	3,96
Metabolismo			
<u>NW_001494427</u>	7e-46	<i>Bos taurus</i> similar to leucine rich repeat containing 3B (LOC617983), mRNA	5,19
<u>U85945</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> frizzled-related protein FrzA mRNA, complete cds	3,73
<u>AF268373</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> glycine receptor beta subunit (GlrB) gene, exon 8	3,79
Interacção de membrana			
<u>BT030729</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> similar to signal recognition particle 68kDa, transcript variant 7 (LOC538777), mRNA	2,72
Interacção sistémica com o ambiente			
<u>AM086793</u>	0.0	<i>Sus scrofa</i> complement component C3 (C3) mRNA, complete cds	2,78
Transcrição			
<u>NM_174257</u>	0.0	<i>Bos taurus</i> calbindin 3, (vitamin D-dependent calcium binding protein) (CALB3), mRNA	2,30
<u>XM_001249783</u>	0.0	<i>Homo sapiens</i> chromosome 6 open reading frame 37 (C6orf37), mRNA	2,48
Função desconhecida			
<u>XM606192</u>	0.0	<i>Homo sapiens</i> KIAA1607 protein (KIAA1607), mRNA	2,28

** Fold Change – razão HP/HB

Quatro genes (CD97, CRDGF, RPL35 e V-FOS) que apresentaram expressão diferente em ambos os grupos experimentais através da hibridação de cDNA nos *microarrays* foram validados por PCR em tempo real (Tabela 3.4).

Os genes CD97 e CRDGF estão associados a função de desenvolvimento celular e apresentaram-se sobre expressos no grupo experimental Holstein Brasil. O gene RPL35 apresentou-se também com maior expressão no grupo experimental Holstein Brasil e está associado a maior síntese proteica. O gene V-FOS está

associado a menor tolerância ao *stress* abiótico e mostrou-se sobre expresso em Holstein Portugal. Os resultados verificados por PCR em tempo real estavam de acordo com os verificados nas análises de *microarrays*.

Tabela 3.4 – Expressão genética relativa¹ e *Fold Change* (razão HB/HP) dos genes CD97, AMP, RPL35 and V-FOS determinada através do PCR em Tempo Real de acordo com o grupo experimental.

Gene	Expressão Relativa		Fold Change	P
	Holstein Portugal	Holstein Brasil		
CD97	0,0035 (0,00050)	0,0006 (0,00004)	5,88	*
CDRGF	0,1076 (0,0775)	0,0345 (0,0059)	3,12	*
LPL	0,107 (0,02)	0,029 (0,01)	3,69	*
RPL 35	9,7148 (0,1789)	3,9912 (1,9306)	2,43	**
V-FOS	0,0324 (0,0023)	0,1339 (0,0017)	- 4,13	*

1-Média e desvio padrão

*p<0.05; **p<0.01 através de Teste t de Student.

CD97 – CD97 proteína;

CRDGF - *Collectorum cell-derived growth factor*;

RPL35 – Proteína Ribossomal L35;

LPL – Lipoproteína lipase

V-FOS - murine FBJ osteosarcoma viral.

Dos 65 genes que apresentaram expressão diferencial na glândula mamária dos dois grupos experimentais, foram seleccionados para discussão aqueles que apresentavam características associadas a produção leiteira, desenvolvimento e proliferação celular e resposta ao *stress* térmico. De acordo com Collier *et al.* (2006) a expressão de genes associados ao crescimento do epitélio mamário e á síntese proteica é afectada pelo *stress* por altas temperaturas, o que justifica a escolha dos genes para discussão deste estudo.

3..4.2.1. GENES ASSOCIADOS À ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Do conjunto de transcritos com associação à estrutura da glândula mamária, três apresentaram maior expressão no grupo Holstein Brasil – CD97, *Colorectum cell-derived growth factor* ou CRDGF e GH (hormona do crescimento) - e dois no

grupo Holstein Portugal – Endogлина (NM_001076397) e o EST referente a “*Bos taurus cell division cycle and apoptosis regulator 1*” ou CCAR1 (BC118090).

Os três EST's com maior expressão no grupo Holstein Brasil relacionados com a estrutura da glândula mamária, regulam o desenvolvimento desta através de funções associadas à interação entre proteínas (CD97) e ao desenvolvimento da glândula mamária (CRDGF e GH).

Bos taurus mRNA for CD97 protein – CD97

O transcrito CD97 apresentou uma maior expressão no grupo experimental Holstein Brasil face aos animais Holstein Portugal ($FC_{HB/HP}=2,54$; $FDR <0,1$). Este funciona como receptor nos processos de adesão e sinalização após a ativação de leucócitos (Gray *et al.*, 1996; Hamman *et al.*, 1997). Este EST está associado à manutenção das interações proteína-proteína da família de receptores de sinais EGF-TM7, participando da regulação dos processos de comunicação celular (Eichler *et al.*, 2004).

Bos taurus similar to Amphiregulin precursor - Colorectum cell-derived growth factor - CRDGF

O transcrito CRDGF, sobre expresso no grupo Holstein Brasil ($FC_{HB/HP}=1,92$; $FDR <0,1$), é um gene que codifica uma proteína similar à Anfirregulina (Culouscou *et al.*, 1992). A Anfirregulina, é um factor de crescimento similar à EGF, que quando liberada pelo epitélio ativa os receptores de EGF (Capuco e Ellis., 2013; Sternlicht *et al.*, 2005; Shoyab *et al.*, 1989).

Bos taurus growth hormone - GH

O grupo Holstein Brasil também apresentou sobre expressão face ao grupo Holstein Portugal ($FC_{HB/HP}= 1,72$; $FDR \leq 0,1$) para a EST da GH (*Bos taurus growth hormone*). Este gene codifica a hormona de crescimento (GH), que é importante para o processo de lactopoiése e para o rendimento leiteiro (Bauman, 1992), bem como para desenvolvimento e crescimento da glândula mamária (Tucker, 2000). Segundo McGuire, *et al.* (1991) a hormona de crescimento diminui durante as condições de *stress* calórico, principalmente quando os valores de Índice de Temperatura e Humidade (conforto térmico) são superiores a 70 (West, 2003). Contudo Collier *et al.* (2012), observa que animais aclimatizados, ou em processo de

aclimatização, tendem a aumentar as concentrações plasmáticas desta hormona, o que pode explicar resultado encontrado neste trabalho relativamente ao perfil hormonal e transcriptómico desta hormona.

Os genes Endoglina e CCAR1, com maior expressão no grupo Holstein Portugal, estão associados a renovação celular, através dos processos de apoptose.

Sus scrofa endoglin mRNA, complete CDS - Endoglin

O EST Endoglina, que regula no desenvolvimento da glândula mamária através da diferenciação e proliferação celular apresentou expressão aumentada no grupo experimental Holstein Portugal face ao grupo Holstein Brasil ($FC_{HP/HB}=3,17$; $FDR<0,1$). O gene da Endoglina é expresso na superfície das células endoteliais (Waresia *et al.*, 2001) e codifica uma glicoproteína pertencente ao complexo receptor *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Barbara *et al.*, 1999). O complexo TGF- β controla vários processos incluindo a renovação celular e a apoptose (Matsuo *et al.*, 2006).

Bos taurus cell division cycle and apoptosis regulator 1 - CCAR1

O EST CCAR1, com função associada ao desenvolvimento da glândula mamária apresentou maior expressão no grupo experimental Holstein Portugal face ao grupo Holstein Brasil ($FC_{HP/HB}=3,62$; $FDR<0,1$). O transcrito CCAR1 é um indutor de apoptose, que regula a apoptose por intermédio de diversos agentes, incluindo fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (Zhang *et al.*, 2007; Rishi *et al.*, 2006). Estes receptores de EGF causam uma elevada fosforilação da tirosina da CCAR1, que assim promove a apoptose através da ativação de uma caspase (caspase-9) (Richi *et al.*, 2006). A caspase-9 é ativada pelas mitocôndrias quando as células recebem estímulos apoptóticos. Estas caspases ativam caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) que, em cascata, executam o processo de apoptose (Lavrik *et al.*, 2005; Thornberry e Lazebnik, 1998). Este resultado pode indicar uma maior disponibilidade para renovação de células epiteliais e uma maior expressão de iniciadores de processos de apoptose na glândula mamária do grupo Holstein Portugal, essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase celular (Richi *et al.*, 2006).

Nos dois grupos há genes sobre expressos que evidenciam o desenvolvimento da glândula mamária. O fato do grupo Holstein Brasil apresentar sobre expressão de transcritos associados ao desenvolvimento desta glândula, apesar de estarem em ambientes com longos períodos de elevadas temperaturas, pode indicar um processo de aclimatização.

3..4.2.2. GENES ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA AO STRESS POR ELEVADAS TEMPERATURAS

Neste estudo foram encontrados dois transcritos com expressão diferencial na glândula mamária com possível associação ao *stress* térmico, o *Bos taurus* chromosome 11 (Chr11) e o murine FBJ osteosarcoma viral ou v-fos (Tabela 3.2 e Tabela 3.3).

Bos taurus chromosome 11 – Chr11

O transcrito Chr11, sobre expresso no grupo Holstein Brasil ($FC_{HB/HP}=2,75$; $FDR<0,1$), está associado a um cromossoma onde foram mapeados QTL's, como referido no Capítulo 2 desta Tese, relativos a características de adaptação ao *stress* térmico, mais especificamente associados à sudação (Columbiano, 2007).

Bos taurus murine FBJ osteosarcoma viral (v-FOS)

O transcrito v-FOS (*oncogene homolog*, murine), apresentou-se sobre expresso no grupo Holstein Portugal ($FC_{HP/HB}=2,96$; $FDR<0,1$). Este gene codifica uma proteína que provoca diminuição na sobrevivência das células e na expressão de proteínas associadas a tolerância ao *stress*, em particular ao *stress* a elevadas temperaturas (Ramirez *et al.*, 2014; Fabre-Jonca *et al.*, 1995). A maior expressão do EST relativo à v-FOS revela por isso uma menor resistência às temperaturas elevadas no grupo Holstein Portugal face ao Holstein Brasil, o que pode ser considerado natural pois este grupo experimental não está adaptado a condições de *stress* por elevadas temperaturas.

Collier *et al.* (2012) refere que no processo de aclimatização há uma reprogramação genética dos animais para que ocorra um reajustamento a zona de termoneutralidade.

Nos termos dos nossos resultados o transcrito relacionado com a maior capacidade de sudação (Crh11) apresentou-se sobre expresso no grupo Holstein Brasil o que está de acordo com Columbiano (2007) que indica que animais *Bos taurus* em ambientes tropicais modificam a morfologia das glândula sudoríparas de forma a que elas fiquem similares a dos animais *Bos indicus* e assim melhorem sua eficiência na dissipação de calor (Azevedo *et al.*, 2005). Constatamos também que o grupo Holstein Portugal apresentou face ao grupo Holstein Brasil sobre expresso o transcrito v-FOS, associado a menor tolerância ao *stress* térmico.

3.4.2.3. GENES ASSOCIADOS À COMPOSIÇÃO DO LEITE

Analisando o conjunto de transcritos selecionados verificamos que a sua atividade revelou a expressão de alguns genes com função importante na química do leite: o GPAM (AY515690), o RPL4 (AAI02522), o beta-1,4-galactosyltransferase (AF515786) e o LPL (AY216661).

Bos taurus similar to ribosomal protein L35 - RPL35

O EST RPL35 também com expressão aumentada em Holstein Brasil face ao grupo Holstein Portugal ($FC_{HB/HP}=2,15$; $FDR<0,1$), está associado à regulação do teor de proteína do leite (Bionaz e Loo, 2007) e é codificada pelo cromossoma 11, que apresenta QTL's associados ao *stress* térmico, não se podendo por isso eliminar uma possível função na resposta ao *stress* térmico. (Columbiano, 2007).

Bos taurus glycerol-3-phosphate acyltransferase 1- GPAM

O gene GPAM apresentou-se com maior expressão no grupo Holstein Brasil face ao grupo Holstein Portugal ($FC_{HB/HP}=1,99$; $FDR <0,1$). O GPAM é o gene que codifica a enzima glycerol-3-fosfato acyltransferase 1, que, de acordo com Igal *et al.* (2001), catalisa o processo de síntese de triglicéridos. Neste EST foram ainda mapeados *Quantitative Trait Loci* (QTL's) que afetam a produção de leite e a sua composição proteica e lipídica (Roy *et al.*, 2006).

Bos taurus Monogalactosyldiacylglycerol synthase

O gene *Monogalactosyldiacylglycerol synthase* apresentou-se sobre expresso no grupo Holstein Brasil face ao grupo Holstein Portugal ($FC_{HB/HP}=2,19$; $FDR <0,1$). Este transcrito codifica a enzima Monogalactosyldiacylglycerol synthase, também

relacionada com o metabolismo dos triglicéridos (Dubots *et al.*, 2010). Esta enzima é uma glicosiltransferase que transfere um monossacárido (glicosil) da UDP-galactose (Uridina difosfato galactose), para um aceitador de glicosil, o 1,2-diacil-sn-glicerol (Maréchal *et al.*, 1993).

Bos taurus β -1,4-Galactosyltransferase

O gene β -1,4-Galactosyltransferase apresentou-se com maior expressão no grupo Holstein Portugal face aos animais Holstein Brasil ($FC_{HP/HB}=3,96$; $FDR<0,1$). O gene β -1,4-Galactosyltransferase codifica uma enzima, de mesmo nome, que está associada ao metabolismo dos triglicéridos, pertencente à família das glicosiltransferases e, segundo Charron *et al.* (1998), participa na biossíntese de lactose, interagindo com a α -lactalbumina.

Bos taurus lipoprotein lipase - LPL

O gene LPL apresentou-se sobre expresso no grupo Holstein Portugal face aos animais Holstein Brasil ($FC_{HP/HB}=4,85$; $FDR<0,1$). O transcrito LPL (Tabela 3.3), sobre expresso para o grupo Holstein Portugal é expresso no coração, tecido muscular e tecido adiposo, codifica a enzima lipoproteína lipase, responsável pela hidrólise de triglicéridos, libertando ácidos gordos e uma molécula de glicerol (Niu *et al.*, 2004; Merkel *et al.*, 2002). Esta enzima é encontrada essencialmente em células endoteliais, o que sugere um maior aporte de triglicéridos na glândula mamária dos bovinos Holstein Portugal.

Verifica-se portanto que os animais do grupo Holstein Portugal apresentaram maior expressão nos transcritos associados à síntese da lactose e a lipólise em contraste com os animais Holstein Brasil que apresentaram sobre expressão em relação a transcritos associados com à síntese de triglicéridos. Animais da raça Holstein criados em ambientes tropicais tendem a apresentar concentrações de gordura do leite menor face a animais de clima temperado. Isto ocorre devido a vários factores, entre eles a diminuição no consumo de alimentos e consequente diminuição do aporte de ácidos gordos na glândula mamária (Bernabucci *et al.*, 2010). Contudo neste trabalho isto não se verificou, pois os dois grupos não apresentaram diferenças nos consumos de alimentos, na concentração arterial de ácidos gordos e na composição de lipídeos do leite (ANEXO I).

3..5. CONCLUSÃO

Os perfis hormonais identificados no grupo experimental Holstein Brasil estão de acordo com os valores esperados para esta raça sugerindo que estes animais não se encontravam em *stress* por elevadas temperaturas.

Estes resultados associam-se aos relativos a estrutura da glândula mamária, que demonstram que os animais do grupo Holstein Brasil apresentaram transcritos sobre expressos que são associados ao desenvolvimento desta glândula.

A interpretação da integração, na medida em que em simultâneo temos uma sobre expressão de transcritos directamente relacionados com a hipertermia e com o desenvolvimento da glândula mamária é compatível com a existência de um processo de aclimatização a longo prazo.

Destes resultados podem-se identificar tendências futuras de seleção para o aumento da produtividade na pecuária leiteira nas regiões tropicais, incluindo nos programas de seleção animal o estudo de perfis genéticos com incidência na expressão de genes associados a produção leiteira e ao processo de aclimatização a longo prazo.

CAPÍTULO 4

4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No processo de homeotermia os fatores ambientais tendem a induzir variações na troca de energia entre os animais e o ambiente, havendo necessidade de ajustes equilíbrios fisiológicos para a manutenção da homeostase.

As condições ambientais nos trópicos podem causar prejuízos económicos à produção animal, reduzindo índices de crescimento, produções de leite e desempenho reprodutivo. Esses efeitos são devidos, principalmente, às temperaturas elevadas (excedendo os limites ditados pela genética), às intensas radiações solares e à elevada umidade relativa, que combinados entre si provocam alterações na fisiologia animal. A estes ambientes, os animais podem estar adaptados ou apenas aclimatizados.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as condições tropicais de exploração afetam os mecanismos genéticos que determinam o desenvolvimento da glândula mamária e a produtividade leiteira, havendo diferenças entre os animais adaptados a estes climas ou àqueles, apenas em processo de aclimatização.

Deste trabalho resultam as seguintes conclusões: animais do grupo genético Gyr (*Bos indicus*), adaptados a ambientes tropicais e com níveis produtivos menores que animais Holstein (*Bos taurus*), apresentaram uma maior expressão de transcritos associados a defesa celular, processos apoptóticos e maior tolerância ao *stress* térmico em detrimento da expressão de transcritos associados à produtividade animal. Os perfis hormonais dos animais experimentais Gyr confirmam este resultado, visto que as concentrações de prolactina, hormona do crescimento e IGF-1 foram sempre superiores nos animais Holstein. Em relação a hormona T₃, não se verificaram diferenças de concentração entre os grupos em estudo, o que pode estar associada ao efeito do ambiente nos animais Holstein.

Das hormonas acima referidas, apenas a hormona do crescimento apresentou um transcrito associado sobre expresso em animais Holstein Brasil. Este resultado foi observado quando este grupo experimental foi contrastado com os animais Gyr e Gyrolando e quando comparado com os animais do grupo Holstein Portugal. Este fato pode ser um indicativo que os animais Holstein quando em processo de

aclimatização a longo prazo, apresentam alterações genéticas e fisiológicas no sentido de manterem seus níveis de produtividade.

Os transcritos associados à estrutura da glândula mamária com maior expressão nos animais do grupo experimental Gyr são relativos à síntese proteica e renovação celular (proliferação e apoptose). Em contrapartida, animais do grupo experimental Holstein Brasil apresentaram sobre expressão face aos animais Gyr em transcritos associados ao desenvolvimento do epitélio mamário e rendimento leiteiro. Animais *Bos indicus* tendem a apresentar um desenvolvimento do parênquima mamário menor que a de animais *Bos taurus*, o que justifica os resultados encontrados neste estudo.

De registrar que mesmo quando os animais Holstein Brasil são comparados com o seu homólogo de regiões temperadas (Portugal) também transcritos associados ao desenvolvimento da glândula mamária estão sobre expressos. O pode ser um indicativo de que há um esforço de aclimatização do grupo Holstein Brasil.

Os transcritos com maior expressão no grupo Holstein Brasil face aos grupos Gyr e Gyrolando estão associados ao rendimento leiteiro em detrimento daqueles associados à tolerância ao *stress* térmico. Contudo, quando os animais Holstein Brasil foram comparados aos animais da mesma raça de regiões temperadas (Holstein Portugal), apresentaram maior expressão nos transcritos associados à tolerância ao *stress* térmico.

Uma das práticas para aumentar a produtividade leiteira nos trópicos é a utilização de híbridos *Bos taurus* x *Bos indicus*. Esta prática pretende associar a maior tolerância ao *stress* térmico de animais *Bos indicus* com a maior produtividade dos animais *Bos taurus*. Neste estudo o grupo experimental de raça híbrida Gyrolando apresentou resultados de expressão genética intermediários face aos outros dois grupos genéticos de raça pura estudados. Também se observou que estes animais estão mais próximos aos animais Gyr nos transcritos associados a defesa celular e tolerância ao *stress* por elevadas temperaturas, e mais próximos ao grupo Holstein Brasil em relação ao desenvolvimento mamário e rendimento leiteiro.

O estudo hormonal e transcriptômico efetuado sugere que o grupo Holstein estudado em ambientes tropicais apresentou, sem prejuízo da sua produtividade, perfis compatíveis com um processo de aclimatização aos ambientes tropicais. Neste contexto, e sem prejuízo do aprofundamento destes estudos, os resultados

obtidos, em complemento com os de outros autores, indicam a necessidade de que a seleção dos animais Holstein seja realizada considerando: a expressão evidenciada de genes reguladores da estrutura da glândula mamária, de genes associado à capacidade de defesa desta glândula e aumento da sua tolerância ao *stress* térmico; e menor expressão de genes associados a uma diminuição desta tolerância.

CAPÍTULO 5

5..1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akers, RM 2006. Major Advances Associated with Hormone and Growth Factor Regulation of Mammary Growth and Lactation in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89, 1222–1234.
- Allen JD, Hall LW, Collier RJ, Smith JF, 2015. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. *J Dairy Sci*; 98 :118–127
- Armstrong DV, 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science* 77:2044-2050.
- Arcaro Jr I, Arcaro JRP, Pozzi CR, Fagundes H, Matarazzo SV, Oliveira CA, 2003. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* 7(2):2.
- Assis AG, Stock LA, Campos OF, Zoccal R, Silva MR, 2005. Sistema de produção de leite no Brasil. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, Technic Book, 85p.
- Auliciens A, 2013. Thermal sensation and cell adaptability. *Int J Biometeorol.* Review Paper. *Int J Biometeorol.* 11p. DOI 10.1007/s00484-013-0680-9
- Ayadi M, Caja G, Such X, Knight CH, 2003. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70:1-7.
- Aydinalp C & Cresser MS, 2008. Red soils under mediterranean type of climate: their properties use and productivity. *Bulgarian journal of agricultural science*, 14(6): 576-582.
- Azevedo M, Pires MFA, Saturnino HM, Lana AMQ, Sampaio IBM, Monteiro JBN, Morato LE, 2005. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-Zebu em lactação. *R. Bras. Zootec.* 34(6):2000-2008. ISSN 1806-9290.
- Azevêdo DMMR & Alves AA, 2009. Bioclimatologia aplicada à produção de bovinos leiteiros nos trópicos. *Documentos / Embrapa Meio-Norte.* 83p.
- Baccari Júnior F, 1998. Manejo ambiental para produção de leite em climas quentes. in: *Congresso Brasileiro de Biometeorologia, 2.* Goiânia. Anais... Goiânia: Universidade Católica de Goiás. p 136-161.

- Baccari Júnior F, 2003. Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes. Editora UEL. Londrina, PR, 142 p.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M, 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 274(2):584-94.
- Bauman DE, 1992. Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology. *J Dairy Sci.* 75:3432-3451.
- Baumrucker CR, Gibson CA, Zavodovskaya M, Schanbacher FL, Green MH, 2002. Interaction of lactoferrin and IGFBP-3 with the retinoid signaling system: cell growth and apoptosis of mammary cells. In: Proceedings of the 84th endocrine annual meeting p 362.
- Baumrucker CR, Schanbacher F, Shang Y, Green MH, 2006. Lactoferrin interaction with retinoid signaling: Cell growth and apoptosis in mammary cells. *Domestic Animal Endocrinology* 30: 289–303.
- Bernabucci U, Lacetera N, Ronchi B and Nardone A, 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science* 85, 2173–2179.
- Bernabucci, U, Lacetera, N, Baumgard LH, Rhoads, RP, Ronchi, B and Nardone, A 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4(7), 1167–1183.
- Bilby TR, 2011. Nutritional, managerial and hormonal strategies to mitigate the negative effects of heat stress on reproduction. *R. Bras. Zootec.*, 40:365-378.
- Bionaz M & Looor JJ, 2007. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genomics* 29:312-319. doi:10.1152/physiolgenomics.00223.2006
- Bionaz M, Hurley W, Looor JJ, 2012. Milk Protein. Synthesis in the Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses. Edited by Walter L. Hurley, 340 p. ISBN 978-953-51-0743-9
- Bó Ga, Baruselli PS, Martinez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78:307-326.
- Borges CRA, Azevedo M, Lima IA, Brasil LHA, Ferreira MA, 2012. Heterogeneous genetic cows of three genetic groups in feedlot system in the state of Pernambuco, Brazil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 34(1): 91-96.

- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P, 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters* 573:83–92.
- Breitling R & Herzyk P, 2005. Rank-based methods as a nonparametric alternative of the T-statistic for the analysis of biological microarray data. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 3:1171–1189.
- Brym P, Malewski T, Starzynski R, Flisikowski K, Wojcik E, Rusc A, Zwierzchowski L, Kaminski S, 2007. Effect of New SNP WILTHn Bovine Prolactin Gene Enhancer Region on Expression in the Pituitary Gland. *Biochem Genet* 45:743–754.
- Buehring G C, 1990. Culture of Mammary Epithelial Cells from Milk. *J. Dairy Sci.* 73:956-963.
- Buffington DE, Collazo Arocho A, Canton GH, Pitt D, 1981. Black globe humidity index (BGHI) as a comfort equation for dairy cows. *Trans. ASAE, St. Joseph*, 24 (3):711-714.
- Burrow HM, 2012. Importance of adaptation and genotype 3 environment interactions in tropical beef breeding systems. *Animal* 6:729–740.
- Capuco AV, Ellis SE, Hale SA, Long E, Erdman RA, Zhao X, Paape MJ, 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 3):18–3.
- Capuco AV, Choudhary RK, Daniels M, Li RW and Evock-Clover CM, 2011. Bovine mammary stem cells: cell biology meets production agriculture. *Animal* 6(3):382–393.
- Capuco AV and Ellis SE, 2013. Comparative Aspects of Mammary Gland Development and Homeostasis. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1: 179-202.
- Caldoncelli FF, Farias RE, Guerra MO, 2002. Apoptose na involução da glândula mamária. *Rev. Bras. Mastol.* 12:39-44.
- Cincovic MR, Belic B, Toholj B, Potkonjak A, Stevancevic B, Lako B, Radovic I 2011. Metabolic acclimation to heat stress in farm housed Holstein cows with different body condition scores. *African Journal of Biotechnology* 10(50):10293-10303.
- Charron M, Shaper JH e Shaper NL, 1998. The increased level of b1,4-galactosyltransferase required for lactose biosynthesis is achieved in part by translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14805–14810.

- Collier RJ, Eley RM, Sharma AK, Pereira RM, Bufington DE, 1981. Shade management in a subtropical environment for milk yield and composition in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 64: 844 – 849.
- Collier R J, Stiening CM, Pollard BC, VanBaale MJ, Baumgard LH, Gentry PC, Coussens PM, 2006. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. *J Anim Sci*. 84: E1.
- Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH, 2008. Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response, *Journal of Dairy Science*, 91(2): 445-454.
- Collier RJ, Rungruang S, Zimbleman RB, Hal LW, 2012. Metabolic Implications of Heat Stress. *Proceedings of the 27th Annual Southwest Nutrition and Management Conference*. Tempe, Arizona. pp57 – 64.
- Columbiano VS 2007. Identificação de QTL's nos cromossomas 10, 11 e 12 associados ao stress calórico em bovinos. *Thesis Masters Science*. Univ. Fed. Viçosa. Brasil. 60p.
- Costa ANL, Feitosa JV, Montezuma Junior PA, Souza PT e Araújo AA, 2015. Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of Girolando cows in the state of Ceará-Brazil. *International Journal of Biometeorology*. 59(2):2331-2336.
- Culouscou JM, Remacle-Bonnet M, Carlton GW, Plowman GD and Shoyab M, 1992. Colorectum cell-derived growth factor (CRDGF) is homologous to amphiregulin, a member of the epidermal growth factor family. *Growth Factors*. 7(3),195-205.
- Cruz LV, Angrimani DSR, Rui BR, 2011. Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* - ISSN: 1679-7353, Garça, Ano IX, número 16, periódicos semestrais, janeiro de 2011.
- Dahl GE, 2010. Efeito do estresse térmico durante o período seco no desempenho pós-parto. In: XIV CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2010. Uberlândia, MG. Anais... 2010, p. 357-362.
- Damaceno JC, Baccari F, Targa LA, 1998. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas com acesso a sombra constante ou limitada. *Rev. Bras. Zoot*. 27(3):395-602.

- Deitos AC, Maggioni D, Romero ÉA, 2010. Produção e Qualidade de Leite de Vacas de Diferentes Grupos Genéticos. *Campo Digital*, 5(1):26-33.
- Dubots E, Audry M, Yamaryo Y, Bastien O, Ohta H, Breton C, E. Maréchal e Block MA, 2010. Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase, MGD1, by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:6003-6011.
- Duchemin S, Bovenhuis H, Stoop WM, Bouwman AC, van Arendonk JAM, Visker MHPW, 2013. Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and DGAT1 and SCD1 by season interactions. *Journal of Dairy Science* 96 (1), 592–604.
- Eicher SD, McMunn KA, Hammon HM, Donkin SS, 2004. Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 115–125.
- Fabre-Jonca N, Gonin S, Diaz-Latoud C, Rouault JP and Arrigo AP 1995. Thermal Sensitivity in NIH 3T3 Fibroblasts Transformed by the v-Fos Oncogene. *Eur. J. Biochem.* 232, 118-128.
- Facó O, Lobo RNB, Martins Filho R, 2008. Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holandês x Gyr. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(1):48-53.
- FAO statistics, 2014. <http://faostat.fao.org>
- Fonseca LFL & Santos MV, 2000. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial 141p.
- Freitas MS, Durães MC, Freitas AF, Barra RB, 2001. Comparação da produção de leite e de gordura e da duração da lactação entre cinco “graus de sangue” originados de cruzamentos entre Holandês e Gyr em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53(6):708-713.
- Gabai G, 2003. Physiological and Metabolic Adaptations in the Mammary Gland and Consequences for the Dairy Cow. *Veterinary Research Communications*, 27(Suppl. 1): 129–136.
- Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, Cantley LC, 2009. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer cell*, 16(2): 115-125.

- Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ, 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC developmental biology*, 5(1): 27-34.
- Gray JX, Haino M, Roth MJ, 1997. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.* 157 (12): 5438–5447. PMID 8955192
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C, 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 277(32):29197-209.
- Guimarães JD, Alves NG, Costa EP, Silva MR, Costa FMJ, Zamperlini B, 2002. Eficiências Reprodutiva e Produtiva em Vacas das Raças Gyr, Holandês e Cruzadas Holandês x Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(2), 641-647.
- Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA, 1997. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, AF). *J. Exp. Med.* 184 (3):1185–1189. doi:10.1084/jem.184.3.1185. PMID 9064337.
- Hansen PJ, 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science.* 82: 349–360.
- Herrero J, Díaz-Uriarte R, Dopazo J, 2003. Gene Expression Data Preprocessing. *Bioinformatics.* 19: 655-656.
- Horowitz M, 2002. From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(3): 475-483.
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the Prolactin gene. *Emb J.* 16: 6926-6935.
- Howard JT, 2012. The impact of genetic background on body temperature regulation in beef cattle during periods of heat and cold stress. *Theses and Dissertations in Animal Science.* Paper 58.
- Igono MO, Bjtved G, Sanford-Crane HT, 1997. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holsteins cows in desert climate. *International Journal of Biometeorology, Heidelberg*, 36:77-87.
- ICTP - International Commission for Thermal Physiology 2001. Glossary of terms for thermal physiology, 3rd edition. *The Japanese Journal of Physiology* 51, 245–280.

- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. Contribuição do Grupo de Trabalho I para o Quarto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudança Climática. Paris, França, 21p.
- Junqueira Filho GN, Verneque RS, Lemos AM, Silva HCM, Reis 1992. Fatores fisiológicos e de meio sobre a produção de leite por vacas mestiças leiteiras no CNPGL/Embrapa. *Pesq Agropec. Bras.* 27(1):153-162.
- Kadzere CT, Murphy MR, Silznikove N, Maltz E, 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77:59–91.
- Kaminski S, Ahman A, Ruse A, Wojcik, E, Malewski T, 2005. Milk ProtChip – a microarray of SNP's in candidate genes associated with milk protein biosynthesis. *J. Appl. Gene.* 46(1):45-58.
- Keister ZO, Moss KD, Zhang HM, Teegerstrom T, Edling RA., Collier RJ, Ax RL, 2002. Physiological Responses in Thermal Stressed Jersey Cows Subjected to Different Management Strategies, *Journal of Dairy Science*, 85(12):3217-3224.
- Kemenes PA, Regitano LCA, Rosa AJM, 1999. K-casein, B-lactoglobulin and growth hormone allele genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.
- Kerr DE & Wellnitz O, 2003. Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J Anim Sci.* 81(Suppl 3):38-47. Review
- Klosowski ES, Campos AT, Campos AT, Gasparino E, 2002. Estimativa do declínio na produção de leite, em período de verão, para Maringá-PR. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 10(2):283-288.
- Knight CH, France J, Beever DE, 1994. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. *Livestock Production Science*, 39:129–137.
- Kühl NM and Rensing L, 2000. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci.* 57:450–463.
- Larsson, O and Sandberg, R 2006. Lack of correct data format and comparability limits future integrative microarray research, *Nat. Biotechnol.* 24 (11), 1322–1323.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH, 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2665-2672.
- Lee DHR, 1965. Climatic stress indices for domestic animals. *Internatq. J. Biometeorol.* 9:29.

- Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J, 2004. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*, 17(3):225-229.
- Lopez-Villalobos N, Garrick DJ, Holmes CW, Blair HT, Spelman RJ, 2000. Profitabilities of some mating systems for dairy herds in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 83:144-53.
- Lü A, Hu X, Chen H, Jiang J, Zhang C, Xu H, Gao X, 2010. Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins. *Mol Biol Rep.*, 37:547-551
- Malewski T & Zwierzchowski L, 2001. Genes expressed in cattle mammary gland – computational analysis of 5'- upstream sequences in search for factors conferring a tissue – and stage – specific transcription. *Animals Science Papers and Reports*. 20(01): 5-20.
- Mandonnet N, Mahieu M, Boval M, 2012. Foreword: Sustainable animal production in the tropics: farming in a changing world. *Animal* 6 (5): 705–706.
- Marcheto FG, Nääs IA, Salgado DD'A, Souza SRL, 2002. Efeito das temperaturas de bulbo seco e de globo negro e do índice de temperatura e umidade, em vacas em produção alojadas em sistema de free stall. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39:320 323.
- Maréchal E, Block MA, Joyard J e Douce R, 1994. Kinetic Properties of Monogalactosyldiacylglycerol Synthase from Spinach Chloroplast Envelope Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:5788-5798.
- Martello LS, Savastano Jr H, Silva SL, Titto EAL, 2004. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33 (1):3-11.
- Matsuo SE, Leoni SG, Colquhoun A, Kimura ET, 2006. Transforming growth factor-b1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology*. 190:141-150.
- McGuire MA, Beede DK, Collier RJ, Buonomo FC, DeLorenzo MA, Wilcox CJ, Huntington GB, Reynolds CK, 1991. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 69:2050–2056.

- McManus C, Teixeira RA, Dias LT, Louvandini H, Oliveira LMB, 2008. Production and reproduction traits in Holstein and Gyr crossbred cows in the Central Plateau, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(5): 819-823.
- Merkel M, Eckel RH e Goldberg IJ, 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of Lipid Research*. 43:1997-2006.
- Morais DAEF, Maia ASC, Silva RG, Vasconcelos AM, Lima PO, Guilhermino MM, 2008. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(3): 538-545.
- Morales CA & Rodríguez N, 2005. Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 18:2.
- Mullen MP, Lynch CO, Waters SM, Howard DJ, O'Boyle P, Kenny DA, Buckley F, Horan B, Diskin MG, 2011. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows *Genet. Mol. Res.* 10 (3): 1819-1830
- Mustafa T, Eckert A, Klonisch T, 2005. Expression of the Epidermal Growth Factor Seven-Transmembrane Member CD97 Correlates with Grading and Staging in Human Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:108-119.
- Nääs IA & Arcaro JR I, 2001. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 5(1): 139-142.
- Nardone A, 1998. Thermoregulatory capacity among selection objectives in dairy cattle in hot environment. *Zootec. Nutr. Anim.* 24:295-306.
- Nascimento MRBM, Vieira RC, Silva GC, 2006. Effects of month, order and lactation stage on the thyroid hormones of heifers and cows of the Holstein breed. *Archives of Veterinary Science*, 11(2): 55-60.
- Nascimento MRBM, Vieira RC, Silva GC, 2010. Efeitos de mês, ordem e estágio de lactação sobre os hormônios tireoideanos de vacas e novilhas holandesas. *Archives of Veterinary Science, Curitiba*, 11(2): 55-60.

- Nascimento MRBM, Storti AA, Guimarães EC, Simioni VM, 2013. Thyroid hormone profile of holstein and guzerat dairy cattle in a tropical environment. *Bioscience Journal*. 29 (1): 179-184.
- Niu YG, Hauton D e Evans RD, 2004. Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *The Journal of Physiology*. 558: 225-237.
- Nudda A, Pulina G, Vallebella R, 2000. Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *J. Dairy Res.*, 67: 101-106.
- Owlsen HG, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg PR, Meuwissen TH, 2005. Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics*, 169(1): 275-283.
- Pacheco Contreras VI, Lourenco Jaramillo DL, Parra Bracamonte GM, Martínez González JC, Sifuentes Rincón AM, 2011. Convenient genotyping of nine bovine K-casein variants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(4):12-12.
- Perissinotto M., Moura DJ, Cruz VF, Souza SRL, Lima KAO, Mendes AS, 2009. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. *Ciência Rural*, 39: 1492-1498.
- Perotto D, Kroetz IA, Rocha JL, 2010. Milk production of crossbred Holstein x Zebu cows in the northeastern region of Paraná State. *R. Bras. Zootec.*, 39(4):758-764.
- Pinarelli C, 2003. The effect of heat stress on milk yield. *Latte*, Milan, 28(12):36-38.
- Pinheiro MG, Nogueira JR, Lima MLP, Leme PR, Macari M, Nääs IA, Laloni LA, Titto, EAL, Pereira AF, 2005. Efeito do ambiente pré-ordenha (sala de espera) sobre a temperatura da pele, a temperatura retal e a produção de leite de bovinos da raça jersey. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 12:37-43.
- Pires MFA e Campos AT, 2004. Modificações ambientais para reduzir o estresse calórico em gado de leite. *Technic Book 42*. EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, 15 p.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*. 15:1118–1131.
- Porcionato MAF, Negrão JA, Lima MLP, 2005. Milk yield, residual milk, oxytocin concentration and cortisol release in Holstein and Gyr x Holstein cows machine

- milked without stimulus from a calf. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, .57(6): 820-824.
- Quackenbush J 2002. "Microarray data normalization and transformation". *Nature Genetics* 32, 496-501.
- Ramirez VP, 2014. Gene Expression Profile Reveals the Novel Repression of Heat Shock Protein Expression by TNIP1 in Keratinocytes Doctoral Dissertations. University of Connecticut Graduate School. Pp 380.
- Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G, 2000. Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Development of Heat Index Function. *J Dairy Sci* 83:2120–2125.
- Renaudeau et al. D, Collin A, Yahav S, Basilio V, Gourdiene JL, Collier RJ, 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6 (5):707–728 & The Animal Consortium 2011 doi:10.1017/S1751731111002448
- Reis Filho JC, Lopes, PS, Verneque RS, Torres RA, Teodoro RL, Carneiro PLS 2010. Population structure of Brazilian Gyr dairy cattle. *R. Bras. Zootec*, 39 (12):2640-2645.
- Rishi AK, Zhang L, Yu Y, Jiang Y, Nautiyal J, Wali A, Fontana JA, Levi E, Majumdar APN, 2006. Cell Cycle- and Apoptosis-regulatory Protein-1 Is Involved in Apoptosis Signaling by Epidermal Growth Factor Receptor *J. Biol. Chem.* 281: 13188-13198.
- Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, Crooker BA and Baumgard LH 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. production, metabolism and aspects of circulating somatotropin. *Journal of Dairy Science* 92, 1986–1997.
- Robinson NE, 2004. Homeostase, Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J. G.; *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. p. 550-561.
- Ron M, Kliger D, Feldmesser E, Seroussi E, Ezra E, Weller JI, 2001. Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics*, 159(2): 727-735.
- Roy A, Ordovas L, Taourit S, Zaragoza P, Eggen T, Rodellar C, 2006. Genomic structure and an alternative transcript of bovine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (GPAM). *Cytogenet Genome Res* 112:82-89

- Sandoval – Castro CA, Anderson S, Leaver JD, 1999. Influence of milking and restricted suckling regimes on milk production and calf growth in temperate and tropical environments. *Anim. Sci.*, 69:287-296.
- Santos FD, Forbes K, Moita R 2002. *Climate Change in Portugal. Scenarios, Impacts and Adaptation Measures – SIAM Project*, Gradiva. Lisboa. 300p
- Santos FD e Miranda P, 2006. *Climate Change in Portugal. Scenarios, Impacts and Adaptation Measures – SIAM Project II*, Gradiva. Lisboa. 505p.
- Schoenau W, Porciuncula PM, Zamberlan G, Mesquita FS, Vieira V, Oliveira JFC, Gonçalves PBD, 2005. Association between IGF-IR gene polymorphisms and productive and reproductive traits in Holstein cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57(6):772-776.
- Sebastiana M, Figueiredo A, Acioli B, Sousa L, Pessoa F, Baldé A, Pais M, 2009. Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa*—European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *Eur J Soil Biol* 45:275–282
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG and Todaro GJ 1989. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science*. 243, 1074–6.
- Silanikove N, Shapiro F, Shinder D, 2009. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. *BMC Physiology.*, 9:13. doi:10.1186/1472-6793-9-13
- Silva RG, 2000. *Introdução à bioclimatologia animal*. São Paulo, Nobel, 286p.
- Singh K, Davis SR, Dobson JM, Molenaar AJ, Wheeler TT, Prosser CG, Farr VC, Oden K, Swanson KM, Phyn CVC, Hyndman DL, Wilson T, Henderson HV, Stelwagen K, 2008. cDNA Microarray Analysis Reveals that Antioxidant and Immune Genes Are Upregulated During Involution of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 91:2236–2246.
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM, 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92:1725–1742.
- Sonstegard TS, Capuco AV, White J, Van Tessel CP, Connor EE, Cho J, Sultana R, Shade L, Wray JE, Wells KD, Quackenbush J, 2002 .Analysis of bovine mammary gland EST and functional annotation of the *Bos Taurus* gene. *Index. Mamm. Genome* 13: 373-379.

- Souza BB, 2007. Parâmetros fisiológicos e índice de tolerância ao calor de bovinos da raça Sindi no semi-árido paraibano. *Ciência e Agrotecnologia*. 31(3):883-888.
- Souza EM, Milagres JC, Regazzi AJ, 1996. Genetic and environmental effects on milk yield in Gyr dairy herds. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, 25:889-901.
- Srikandakumar A and Jonhson EH, 2004. Effect of Heat Stress on Milk Production, Rectal Temperature, Respiratory Rate and Blood Chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu Cows. *Tropical Animal Health and Production* 36(7):685-692.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, Haan C, 2006. *Livestock Long Shadow*. Ed FAO. Rome. 24p.
- Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC, Werb Z, 2005. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*. 132:3923-3933.
- Suchyta SP, Sipkovsky S, Kruska R, Jeffers A, McNulty A, Coussens MJ, Tempelman RJ, Halgren RG, Saama PM, Bauman DE, Boisclair YR, Burton JL, Collier RJ, DePeters EJ, Ferris TA, Lucy MC, McGuire MA, Medrano JF, Overton TR, Smith TP, Smith GW, Sonstegard TS, Spain JN, Spiers DE, Yao J, Coussens PM, 2003a. Development and testing of a high-density cDNA microarray resource for cattle. *Physiol Genomics*. 15:158-164.
- Suchyta SP, Sipkovsky S, Halgren RG, Kruska R, Elftman M, Weber-Nielsen M, Vandelaar MJ, Xiao L, Tempelman RJ, Coussens PM, 2003b. Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary-specific transcripts. *Physiol Genomics* 16:8-18.
- Teodoro RL, Verneque RS, Martinez ML, Cruz M, Paula LRO, Campos JP, 2000. Study of the Udder System Characteristic and its Relations with Milk Production on Cows from Gyr Breed. *Rev. bras. zootec.*, 29(1):131-135.
- Theil PK, Sørensen IL, Therkildsen M, Oksbjerg N, 2006. Changes in proteolytic enzyme mRNAs relevant for meat quality during myogenesis of primary porcine satellite cells. *Meat Sci.*, 73:335-343.
- Thornberry NA and Lazebnik Y, 1998. Caspases: enemies with Hn. *Science*. 281:1312-1316.

- Tucker HA, 2000. Symposium: Hormonal regulation of milk synthesis: Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-Year Perspective. *J Dairy Sci.* 83:874–884.
- Wareskia P, Motyla T, Ryniewicz Z, Orzechowska A, Gajkowskac B, Wojewodzkac U, Ploszaja T, 2001. Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Ruminants Review.* 40(3): 279 – 289.
- West JW, 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86, 2131–2144
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J and Speed TP, 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systemic variation. *Nucleic Acids Research* 30, 15-19.
- Yousef MK, 1987. *Stress physiology in livestock.* Boca Raton: CRC Press, 217p.
- Zhang L, Levi E, Majumder P, Yu Y, Aboukameel A, Du J, Xu H, Mohammad R, Hatfield JS, Wali A, Adsay V, Majumdar APN and Rishi AK, 2007. Transactivator of transcription–tagged cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 peptides suppress the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther May.* 6:1661-1672.
- Zhao S & Fernald RD, 2005 Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal Computational Biology.* 12(8):1045-1062.
- Zhao F & Keating AF, 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics.* 8: 113-128.
- Zimbleman RB, Rhoads RP, Baumgard LH and Collier RJ, 2009. Revised temperature humidity index (THI) for high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:E-Suppl. 1:347.

ANEXO I

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SANGUE ARTERIAL E DO LEITE

Tabela A1: Concentrações plasmáticas do sangue arterial de aminoácidos dos animais de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil, Gyr e Gyrolando).

Aminoácido		Grupo Experimental ¹			P
		Holstein Brasil	Gyrolando	Gyr	
Ala	Alanina	240,55 (58,32)	264,63 (50,48)	281,62 (61,09)	ns
Sar	N-metil-Glicina	5,89 (2,41)	4,17 (0,53)	5,35 (1,26)	ns
Gly	Glicina	179,18 (10,50)	245,91 (22,99)	190,23 (10,22)	ns
Val	Valina	278,87 ^a (62,41)	144,38 ^b (18,77)	216,04 ^a (75,00)	*
Leu	Leucina	161,16 ^a (25,53)	97,38 ^b (13,79)	140,96 ^a (39,46)	*
Ile	Isoleucina	129,64 ^a (22,09)	68,30 ^c (10,09)	90,12 ^b (12,97)	*
Thr	Treonina	79,21 ^a (11,76)	43,93 ^b (17,99)	51,94 ^b (6,80)	*
Ser	Serina	57,32 (10,21)	56,40 (37,37)	47,53 (0,75)	ns
Pro	Prolina	78,29 (9,09)	53,08 (7,33)	62,72 (3,92)	ns
Asn	Asparagina	11,79 ^b (2,48)	17,80 ^a (4,87)	20,41 ^a (3,65)	*
Met	Metionina	7,79 (2,63)	13,40 (2,27)	8,10 (2,63)	ns
Hyp	Hidroxiprolina	7,04 (3,69)	5,40 (4,11)	12,07 (7,89)	ns
Glu	Glutamato	148,50 ^a (41,74)	57,63 ^b (7,28)	68,20 ^b (5,38)	*
Phe	Fenilalanina	46,23 (7,44)	41,23 (9,78)	43,58 (9,27)	ns
Gln	Glutamina	265,08 (72,03)	187,08 (71,82)	197,62 (62,50)	ns
Orn	Ornitina	44,84 (4,14)	34,49 (4,02)	38,78 (16,74)	ns
Lys	Lisina	85,23	62,18	83,09	ns

		(11,15)	(7,04)	(24,88)	
His	Histidina	42,82	38,11	43,55	ns
		(4,04)	(8,73)	(8,29)	
Tyr	Tirosina	48,05	34,21	50,25	ns
		(11,14)	(10,17)	(16,22)	
Trp	Triptofano	45,75	27,91	32,79	ns
		(45,75)	(7,17)	(10,84)	

¹Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey (p>0,05);

Tabela A2: Concentrações plasmáticas do sangue arterial de Ácidos Gordos dos animais de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil, Gyr e Gyrolando).

Ácidos Gordos**	Grupo Experimental ¹			P
	Holstein Brasil	Gyrolando	Gyr	
Σ SFA	31,92	32,53	28,62	ns
Σ MUFA	42,95 ^a	27,04 ^b	10,11 ^c	*
Σ PUFA	24,26 ^c	39,76 ^b	60,92 ^a	*
C18:2c9t11 (CLA)	0,22	0,17	0,27	ns
CC (C 12:0)	0,03	0,05	0,04	ns
CM	25,05	19,85	22,98	ns
Isómero C:18	2,07	2,40	2,11	ns

SFA – Ácidos Gordos Saturados; MUFA – Ácidos Gordos Monossaturados; PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados; CLA – Ácido Linoleico Conjugado; CC – Cadeia Curta; CC – Cadeia Longa.

¹Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey (p>0,05);

Tabela A3: Composição do leite de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil, Gyr e Gyrolando).

Contituente	Grupo Experimental ¹			P
	Holstein Brasil	Gyrolando	Gyr	
Gordura (%)	3,50	3,51	3,65	ns
	(0,21)	(0,38)	(0,16)	
Proteína (%)	3,15	3,18	3,43	ns
	(0,32)	(0,17)	(0,11)	
Sólidos Totais (%)	13,59	14,01	13,06	ns
	(1,25)	(1,69)	(1,38)	
Extrato Seco Desengordurado (%)	10,09	10,20	9,12	ns
	(2,16)	(2,08)	(1,87)	

¹Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey (p>0,05);

Tabela A4: Concentrações plasmáticas do sangue arterial de aminoácidos dos animais de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil, Holstein Portugal).

Aminoácido	Grupo Experimental		P	
	Holstein Brasil	Holstein Portugal		
Ala	Alanina	240,55 (58,32)	235,90 (53,39)	ns
Sar	N-metil-Glicina	5,89 (2,41)	5,56 (0,23)	ns
Gly	Glicina	179,18 (10,50)	166,51 (16,76)	ns
Val	Valina	278,87 (62,41)	241,07 (57,60)	ns
Leu	Leucina	161,16 (25,53)	143,04 (27,73)	ns
Ile	Isoleucina	129,64 (22,09)	108,73 (18,60)	ns
Thr	Treonina	79,21 (11,76)	75,19 (13,54)	ns
Ser	Serina	57,32 (10,21)	54,72 (11,42)	ns
Pro	Prolina	78,29 (9,09)	74,17 (13,23)	ns
Asn	Asparagina	11,79 (2,48)	9,26 (1,62)	ns
Met	Metionina	7,79 (2,63)	6,99 (2,53)	ns
Hyp	Hidroxiprolina	7,04 (3,69)	6,84 (3,24)	ns
Glu	Glutamato	148,50 (41,74)	159,08 (19,168)	ns
Phe	Fenilalanina	46,23 (7,44)	44,96 (6,91)	ns
Gln	Glutamina	265,08 (72,03)	249,93 (80,22)	ns
Orn	Ornitina	44,84 (4,14)	44,18 (3,15)	ns
Lys	Lisina	85,23 (11,15)	79,45 (13,09)	ns
His	Histidina	42,82	36,47	ns

		(4,04)	(3,01)	
Tyr	Tirosina	48,05 (11,14)	46,29 (10,23)	ns
Trp	Triptofano	45,75 (45,75)	46,92 (4,68)	ns

Tabela A5: Concentrações plasmáticas do sangue arterial de Ácidos Gordos dos animais de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil e Holstein Portugal).

Ácidos Gordos**	Grupo Experimental ¹		P
	Holstein Brasil	Holstein Portugal	
Σ SFA	31,92	27,82	ns
Σ MUFA	42,95	31,11	*
Σ PUFA	24,26	21,07	ns
C18:2c9t11 (CLA)	0,22	0,25	ns
CC (C 12:0)	0,03	0,03	ns
CM	25,05	15,08	*
Isómero C:18	2,07	1,95	ns

SFA – Ácidos Gordos Saturados; MUFA – Ácidos Gordos Monossaturados; PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados; CLA – Ácido Linoleico Conjugado; CC – Cadeia Curta; CC – Cadeia Longa.

¹Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey (p>0,05);

Tabela A6: Composição do leite de acordo com o grupo genético (Holstein Brasil e Holstein Portugal).

Constituinte	Grupo Experimental		P
	Holstein Brasil	Holstein Portugal	
Gordura (%)	3,50 (0,21)	3,63 (0,68)	ns
Proteína (%)	3,15 (0,32)	3,23 (0,36)	ns
Sólidos Totais (%)	13,59 (1,25)	14,02 (1,08)	ns
Extrato Seco Desengordurado (%)	10,09 (2,16)	9,76 (2,01)	ns

ANEXO II

ANÁLISE E NORMALIZAÇÃO DE UM ARRAY

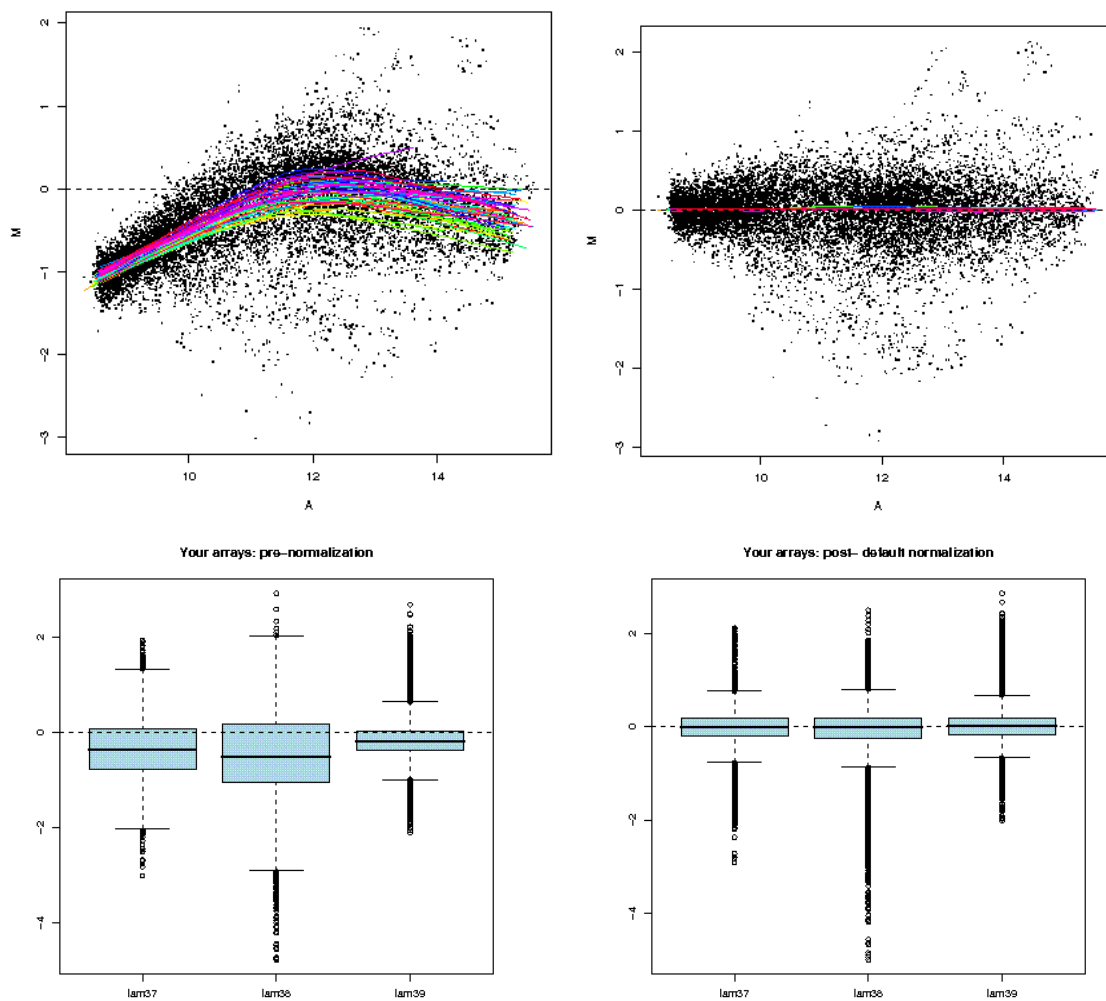


Figura A1- MA-plots antes e após a normalização dos dados de uma das lâminas analisadas pelo método de Loess (Yang et al., 2002). M representa a diferença entre rácios (rácio de log(base 2) do sinal Cy5/Cy3) e A a média dos sinais ($0.5 * (\log \text{Cy5} + \log \text{Cy3})$).

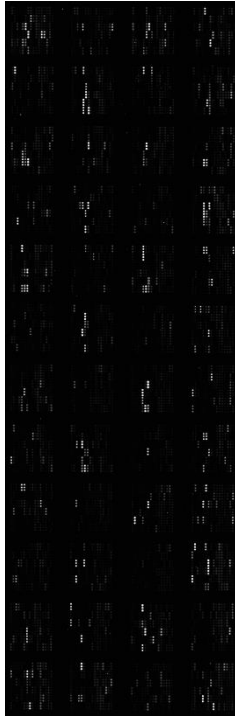


Figura A2: Lâmina de um dos *arrays* após a hibridação.