

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência
hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo
orgânico e submetidos a restrição alimentar**

Maria Amélia Agnes Weiller

Pelotas, 2016

Maria Amélia Agnes Weiller

**Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência
hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo
orgânico e submetidos a restrição alimentar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Márcio Nunes Corrêa

Coorientador (es): Dr. Carlos Castillo de Barros

Dra. Carolina Bespalhok Jacometo

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

W422p Weiller, Maria Amélia Agnes

Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo orgânico e submetidos a restrição alimentar / Maria Amélia Agnes Weiller ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Carolina Bessalho Jacometo, Carlos Castillo de Barros, coorientadores. — Pelotas, 2016.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Metabolismo. 2. Fígado. 3. Butafosfan. 4. Camundongos. 5. Genes. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Jacometo, Carolina Bessalho, coorient. III. Barros, Carlos Castillo de, coorient. IV. Título.

CDD : 636.0

Maria Amélia Agnes Weiller

Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo orgânico e submetidos a restrição alimentar

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Rafael da Rosa Ulguim
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Joabel Tonello dos Santos
Doutor em Sanidade e Reprodução Animal pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Simone Pieniz
Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**À minha mãe, meu porto seguro;
Aos meus irmãos e, em especial,
À Antônio Heck Weiller (*in memoriam*)...
...dedico.**

Agradecimentos

À minha mãe, que me apoiou de maneira incondicional durante toda esta jornada, seja emocional ou financeiramente;

Aos meus irmãos Carlos, Ana e Elis que, tenho certeza, torcem por mim;

Ao meu orientador, prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa, pela confiança em mim depositada desde o princípio, pelos conselhos, ensinamentos e até mesmo “puxões de orelha”;

Aos meus co-orientadores Dra. Carolina Jacometo e Dr. Carlos Castillo de Barros pela paciência, pela disponibilidade de compartilhar seus conhecimentos, pela amizade;

Aos amigos Gabi Power, Gabi Luz, Joice, Liane, Marcia, entre tantos outros que sempre se fizeram presentes durante esta jornada – gurias, muito obrigada! Vocês também foram peças fundamentais durante todo este período;

Aos colegas do NUPEEC pelo companheirismo, troca de informações e experiências que só nos engrandecem;

À UFPEL, à Faculdade de Veterinária e aos professores desta instituição, por colaborarem com a minha formação;

Ao CNPQ pela bolsa a mim concedida – sem ela também não seria possível;

Enfim, à todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho...

...muito obrigada.

“Estou convencido das minhas próprias limitações - e esta convicção é minha força”.

Mahatma Gandhi

Resumo

WEILLER, Maria Amélia Agnes. **Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo orgânico e submetidos a restrição alimentar**. 2016. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O fósforo apresenta um papel essencial em diversas rotas metabólicas uma vez que intermediários precisam ser fosforilados, sendo também fundamental no processo de sinalização celular. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do butafosfan, uma fonte de fósforo orgânico, sobre o metabolismo e vias de sinalização à insulina no fígado. Foram alojados, durante dez semanas, 42 camundongos machos, da linhagem C57BL/6, com 90 dias de idade. Nas primeiras 9 semanas, dois grupos com 7 animais cada foram alimentados com dieta comercial, e quatro grupos com 7 animais cada, alimentados com uma dieta hipercalórica. Na nona semana, os animais foram aleatorizados conforme tipo de alimentação e regime alimentar, sendo realizada também aplicação de solução salina ou butafosfan (50 mg/Kg), a cada 12 horas, via subcutânea, durante 7 dias, dando origem aos seguintes grupos experimentais: CRS (dieta comercial, submetidos a restrição alimentar e aplicação de solução salina), CRB (dieta comercial, submetidos a restrição alimentar e aplicação de butafosfan), HSRS (dieta hipercalórica, sem restrição alimentar e com aplicação de solução salina), HSRB (dieta hipercalórica, sem restrição alimentar e com aplicação de butafosfan), HCRS (dieta hipercalórica, com restrição alimentar e com aplicação de solução salina), HCRS (dieta hipercalórica, com restrição alimentar e com aplicação de solução salina). Após o período experimental, realizou-se eutanásia. Análise sérica de fósforo, AGNE, insulina, glicose e teste de sensibilidade à insulina foram realizadas, além de expressão hepática de genes relacionados a metabolismo lipídico, de glicose e de sinalização à insulina. O butafosfan não promoveu resistência hepática à insulina, aumentou a expressão de genes relacionados ao processo de sinalização pela insulina, assim como a expressão de genes relacionados a síntese de glicose, refletindo-se em maiores concentrações desta no soro, e também aumentou a expressão de genes relacionados ao processo de β oxidação. Os resultados indicam que o butafosfan estimula a síntese de glicose, e também tem potencial efeito em reduzir o desenvolvimento de esteatose hepática e transtornos metabólicos associados.

Palavras-chave: metabolismo; fígado; butafosfan; camundongos; genes

Abstract

WEILLER, Maria Amélia Agnes. **Metabolic parameters and expression of genes linked to hepatic insulin resistance in mice treated with an organic phosphorus source and submitted to feed restriction.** 2016, 51f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Phosphorus plays an essential role in metabolism once intermediates must be phosphorylated, and is also essential in cellular signaling process. The aim of this study was to evaluate the effect of butafosfan, a source of organic phosphorus, on metabolism and insulin signaling pathways in the liver. Were housed, for ten weeks, 42 C57BL/6 male mice, with 90 days of age. In the first 9 weeks, two groups of 7 animals each other were fed with commercial diet and four groups with 7 animals fed with a high calorie diet. At the ninth week, the animals were randomized according food and diet, and also according to saline application or butafosfan (50mg / kg), every 12 hours, subcutaneously, for 7 days, giving rise to the following experimental groups: CRS (commercial diet fed restricted and saline application), CRB (commercial diet fed restricted and application butafosfan) HSRS (high calorie diet without food restriction and saline application), HSRB (calorie diet without food restriction and butafosfan application) HCRS (high calorie diet with food restriction and saline application) HCRS (high calorie diet with food restriction and saline application). After the trial, they were submitted to euthanasia. Analysis of serum phosphorus, NEFA, insulin, glucose and insulin sensitivity test were performed, and hepatic expression of genes related to lipid metabolism, glucose and insulin signaling. The butafosfan do not promote hepatic insulin resistance, increased expression of genes related to signaling by insulin process as well as the expression of genes related to glucose synthesis, reflected in higher concentrations of this serum, and also increased the expression of genes related to the process of β oxidation. The results indicate that butaphosphan stimulates glucose synthesis, and also have potential effect in reducing the development of hepatic steatosis and metabolic disorders.

Keywords: metabolismo; liver; butaphosphan; mice; gene

Lista de Figuras

Figura 1	Desenho Experimental.....	25
Figura 2	Peso médio dos camundongos alimentados com dieta comercial e dieta hipercalórica nas primeiras 9 semanas de alojamento.....	29
Figura 3	Concentrações séricas de insulina (a), glicose (b) e AGNE (c) contrastados entre as dietas comercial e hipercalórica.....	30
Figura 4	Concentrações séricas de insulina (a), glicose (b) e AGNE (c) contrastados entre os grupos que receberam aplicação de butafosfan ou solução salina.....	30
Figura 5	Valores médios de Índice de HOMA obtidos nos diferentes grupos tratamento (a) e na comparação entre os grupos que receberam a aplicação de butafosfan ou de solução salina (b).....	31
Figura 6	Abundância relativa de diferentes genes quando comparados os grupos CRS e CRB.....	33
Figura 7	Abundância relativa de diferentes genes entre grupos HCRS vs. HCRB, e entre HSRS vs.HSRB.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1	Lista de genes com seus respectivos nomes oficiais e sequencia dos <i>primers</i> utilizados para a análise de expressão gênica através de RT PCR.....	27
Tabela 2	Marcadores bioquímicos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais.....	30
Tabela 3	Resumo dos valores de <i>P</i> obtidos entre a comparação entre a média da abundância relativa dos genes a partir de “teste <i>t</i> ”.....	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

Pi	Fósforo Inorgânico
AGNE	Ácidos graxos não-esterificados
Insr	Receptores de insulina (“Insulin receptor”)
Irs1	Substrato para receptor de insulina 1
Irs2	Substrato para receptor de insulina 2
Pik3c2a -	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha
PtdIns (3,4,5) P3	Fosfatidil Inositol –4,4,5 trifosfato
Akt/PKB	Proteína quinase B
Foxo1	Forkhead box O1
GSK3	Glicogênio sintase quiinase
GS	Glicogênio sintase
Srebf1	Sterol regulatory element binding protein
Ppargc1a	Receptor ativador da proliferação de peroxissomo gama
G6pc	Glicose 6 fosfatase
Pck1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<i>INSR</i>	Gene que codifica a expressão de receptor de insulina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
BHBA	Beta hidroxí butirato

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Hipótese.....	18
3 Objetivos.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4 Artigo.....	19
5 Considerações Finais.....	42
Referências.....	43
Anexos.....	48

1 Introdução

Essencial para qualquer organismo, o fósforo desempenha papel importante em diversos processos biológicos nos tecidos corporais, sendo necessário a uma gama de reações enzimáticas, especialmente as relacionadas ao metabolismo energético (RAINA et al., 2012). Sintetizado através de várias reações bioquímicas como a da glicólise e da β -oxidação, o fósforo está também envolvido no crescimento e diferenciação celular, na composição dos ácidos nucleicos, associando-se ainda a lipídeos para a formação das membranas plasmáticas e, assim, manter a integridade, estrutura e funcionalidade das células (MALLETTTE et al.; 1960, RAINA et al., 2012). No metabolismo hepático de carboidratos, o fósforo tem papel importante, uma vez que os intermediários da via gliconeogênica precisam ser fosforilados, e a taxa de gliconeogênese e glicólise são reguladas pela disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) (BERG et al., 2006). Ainda, o fósforo apresenta papel essencial nos processos de sinalização celular, destacando-se aqui o processo de sinalização celular pela insulina (FARESE et al., 2012), situação que requer ação conjunta de sinais envolvendo, novamente, processos de fosforilação e defosforilação (PERRY et al., 2014).

Em situação normal, o processo de sinalização celular estimulada pela insulina se inicia quando a insulina se liga aos receptores da membrana (Insr), os quais têm atividade de quinase, ou seja, capacidade de modificar sua estrutura e se auto-fosforilar, assim como fosforilar substratos para os receptores de insulina 1 e 2 (Irs1 e Irs2) (PERRY et al., 2014; SALTIEL e KAHN, 2001). A fosforilação do Irs2 gera sítios de ligação para fosfatidil inositol 3-OH quinase (Pik3c2a), promovendo o recrutamento de fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3), o qual por sua vez interage com proteína quinase B (Akt2/PKB) (SALTIEL e KAHN, 2001), culminando com a fosforilação da Akt2 (WHITE, 2003). A Akt2, juntamente com Foxo 1 (forkhead box O1), são as principais enzimas reguladoras da produção de glicose pelo metabolismo hepático (PERRY et al., 2014; WHITE, 2003).

Uma vez ativada, a Akt2 suprime a produção de glicose hepática por diminuir a expressão de enzimas gliconeogênicas através da fosforilação e inativação de Foxo1 (PERRY et al., 2014), e também promove fosforilação e inativação de glicogênio sintase quinase 3 (Gsk3), aumentando atividade da glicogênio sintase (Gs) (GUO,2014), levando ao acúmulo de glicogênio, além de uma redução na fosforilação e degradação de *sterol regulatory element binding protein* (Srebf1) (LU et al., 2012). No fígado, Foxo1 está relacionada, juntamente com receptor ativador da proliferação de peroxissomo gama, coativador 1 alfa (Ppargc1a), a aumentar a expressão de glicose 6 fosfatase (G6pc) e fofoenolpiruvato carboxiquinase (Pck1) (RODRIGUES e GARCIA, 2010; GUO, 2014) enzimas relacionadas à gliconeogênese e que, respectivamente, convertem a glicose 6 fosfato até glicose, e oxaloacetato até fofoenolpiruvato (HARVEY e FERRIER, 2005). Assim, este efeito antagônico da Akt2 sobre Foxo1 é o mecanismo predominante pelo qual a insulina suprime a síntese de glicose hepática após alimentação (LU et al., 2012).

Em situações em que este processo de sinalização hepática não ocorre de maneira adequada, por exemplo em casos com deficiência de fósforo para realizar fosforilações, pode ocorrer o desenvolvimento de resistência hepática à insulina, definida como um *status* no qual uma concentração normal de insulina induz a uma diminuição da resposta biológica dos tecidos responsivos à insulina (De KOSTER e OPSOMER, 2013). Nestes casos, não ocorre a fosforilação da Akt2 a qual, por sua vez, não age sobre Foxo1 e Ppargc1a. Assim, Foxo1 não é inibida e, ao invés de haver supressão da produção de glicose hepática, este mecanismo de resistência acaba gerando aumento na produção, mesmo que as concentrações de glicose séricas já estejam elevadas (OTERO et al, 2014). As concentrações de glicose sérica aumentam, a utilização celular da glicose sérica diminui e o uso de gorduras e proteínas se eleva (GUYTON, 2006).

Em humanos, a resistência à insulina está diretamente relacionada a obesidade. Em obesos, ocorre um aumento de AGNE devido a maior taxa de lipólise, e consequente acúmulo de ácidos graxos no fígado, caracterizando a lipidose hepática (FARESE et al., 2012). Normalmente, os ácidos graxos não esterificados (AGNE) circulam entre o fígado e adipócitos periféricos sem qualquer acúmulo considerável nas células. Contudo, se a β -oxidação mitocondrial e a produção e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) forem insuficientes para

lidar com a excessiva lipomobilização e aumento do fluxo de AGNE, pode ocorrer acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos (BORGES, 2008). Este excesso de AGNE pode prejudicar o bom funcionamento do metabolismo hepático (FABBRINI e MAGKOS, 2015) através da redução da ativação de *Pik3c2a*, levando a uma interferência no transporte de glicose (BASTARD et al., 2006), assim como pode interferir na funcionalidade dos hepatócitos, especialmente com a capacidade de eles responder a mudanças nas concentrações de insulina (FARESE et al 2012). Ainda, a ativação da via lipogênica através de genes envolvidos na síntese lipídica (AGUIRRE et al., 2000) pode induzir estresse no retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos, devido a um intensa mobilização de ácidos graxos saturados, e ativar a via *c-Jun NH2 terminal kinase*, a qual inibe a sinalização de insulina através da inativação ou degradação de *Irs1*, levando a resistência à insulina (PURI et al., 2008), o que tem sido demonstrado em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em animais obesos.

Esta condição de resistência à insulina também é observada em bovinos leiteiros no período de transição, entre o final da gestação e início da lactação (ZACHUT et al., 2013; XU et al, 2014). Acredita-se que esta condição seja fruto de seleção genética de vacas altamente produtoras de leite, uma vez os tecidos periféricos se tornam resistentes à insulina permitindo que a glicose disponível seja direcionada principalmente para a síntese de leite (BELL e BAUMANN, 1997; De KOSTER e OPSOMER, 2013).

O acúmulo de lipídeos no fígado, segundo LaBreque et al., (2014) a causa número um de doenças hepáticas em humanos nos países americanos, apresenta relação estreita com a obesidade, diabetes e redução da tolerância à glicose, podendo levar também ao desenvolvimento de doenças hepáticas severas como esteatohepatite e fibrose hepática (LAW e BRUNT, 2010). A esteatose é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica, e a resistência à insulina um fator chave no desenvolvimento desta (YILMAZ, 2012). Devido a esta importância da esteatose como fator predisponente ao desenvolvimento de doenças hepáticas mais graves, é crescente a busca por medicamentos e nutrientes capazes de reduzir o acúmulo de triglicerídeos no fígado. Estudos tem demonstrado que o fósforo apresenta papel importante tanto em reduzir o desenvolvimento de esteatose hepática

e conseqüentemente desenvolvimento de resistência à insulina, quanto em promover/auxiliar no processo de reparação de danos no tecido hepático.

Tanaka et al., (2013) realizaram estudo com ratos e observaram que uma restrição de Pi aumentou de maneira significativa o acúmulo de lipídeos no fígado de animais alimentados com uma dieta contendo 2% de colesterol. No mesmo estudo, os autores demonstraram que a restrição de fosfato inorgânico induziu à redução na expressão de genes hepáticos envolvidos no metabolismo do colesterol e biossíntese de ácidos graxos. Outro estudo realizado em ratos submetidos a restrição de fosfato demonstrou que os animais apresentaram significativa perda de peso, queda na ingestão e déficit energético, mas não observaram o desenvolvimento de lipidose hepática em animais que ingeriram uma dieta de alta energia e déficit de fósforo (ELHALABI, 2014).

Com relação ao processo de reparação tecidual em casos de doenças hepáticas, Chung et al., (2003) observaram que pós injúria, o fígado, para se regenerar consome energia (ATP), e desta forma o fósforo seria necessário. Descreveram ainda que baixas concentrações de fósforo foram observadas em pacientes após a recuperação, em contraste com aqueles que vieram a óbito, sugerindo que o fósforo foi utilizado para a regeneração celular. O mesmo foi demonstrado em estudo realizado com ratos transplantados, onde através de ressonância magnética, pode-se observar significativa redução de ATP e ADP pós transplante (YANG et al., 1995). Segundo Chung et al. (2003), as concentrações de fósforo sérica podem ser utilizadas como um fator preditor ao desenvolvimento de doença hepática fulminante em pacientes humanos, podendo esta ser uma consequência da lipidose/esteatose hepática (COHN et al., 2008).

Dentre as diversas fontes de fornecimento de fósforo disponíveis no mercado, sejam elas fontes inorgânicas ou orgânicas, destaca-se aqui o butafosfan, uma fonte orgânica de fósforo bastante utilizada em Medicina Veterinária. Quimicamente conhecido como 1-butilamino-1-metil ácido etilfosfórico, o butafosfan é um derivado orgânico do ácido fosfórico capaz de fornecer íons fosfato, essenciais para a catálise de várias reações celulares, como as reações de síntese de energia (DENIZ et al., 2008; GONZÁLEZ e SILVA, 2006), tendo a capacidade de estimular o metabolismo gliconeogênico, assim como de manter a integridade do tecido e o correto funcionamento hepático (CUTERI et al., 2008), além de apresentar benefício nas

reações metabólicas de estresse, reduzindo os níveis de cortisol e elevando as concentrações de insulina, hormônio que melhora a entrada de glicose na célula, otimizando o metabolismo gerador de energia (CUTERI et al., 2008, DENIZ et al., 2008).

Poucos trabalhos têm sido realizados avaliando as respostas de produção, de metabolismo hepático e de sinalização celular em decorrência do uso isolado do butafosfan. A maioria dos trabalhos publicados avaliam o uso do Catosal®, uma associação entre butafosfan e cianocobalamina. Füll et al. (2010), em trabalho realizado com bovinos leiteiros, demonstraram que múltiplas injeções de Catosal® promoveram efeitos benéficos no metabolismo do periparto, pois reduziu o balanço energético negativo e aumentou a produção de leite. Em trabalho realizado com suínos, demonstrou-se que o Catosal diminuiu as concentrações séricas de cortisol, podendo ter efeitos benéficos em animais confinados, uma vez que diminuiu os efeitos relacionados ao estresse (VAN DER STAY et al., 2007). Deniz et al. (2008) também demonstraram que o Catosal® diminuiu significativamente as concentrações de AGNE, aumentou a concentração de glicose sanguínea, demonstrando uma maior funcionalidade hepática. Tabeleão (2014), em trabalho realizado com bovinos leiteiros demonstrou que o Catosal® levou a um incremento na produção leiteira, sugerindo que isto ocorreu em função de uma maior produção de glicose nos animais tratados, uma vez que a glicose é precursora da síntese de lactose, sendo a lactose o principal regulador da pressão osmótica, determinando parcialmente a produção de leite (MATTMILLER et al., 2011).

Trabalhos realizados apenas com o butafosfan ou apenas a cianocobalamina tornam-se importantes para definir se os efeitos benéficos já comprovados do Catosal® são em decorrência do butafosfan, da cianocobalamina, ou da associação entre os dois. Nuber et al. (2015) compararam os efeitos isolados do butafosfan e da associação de cianocobalamina e butafosfan em vacas leiteiras em início de lactação e que apresentavam cetose subclínica. Em seu estudo, aplicaram três doses de 10mL/100KgPV, a cada 24 horas, de butafosfan, de butafosfan associado a cianocobalamina (Catosal®) e solução salina como grupo controle. Observaram que o butafosfan pode ter estimulado a glicólise em decorrência dos maiores níveis de glucagon séricos encontrados neste grupo, quando comparado aos demais. Além disso, tanto o grupo butafosfan quanto o grupo butafosfan associado a

cianocobalamina apresentaram concentrações numéricas maiores de glicose, assim como menores concentrações de AGNE, quando comparados ao controle. Segundo os autores, a combinação do fósforo com a cianocobalamina promoveu uma maior disponibilidade de piruvato a ser transformado a oxaloacetato no ciclo de Krebs, impedindo o metabolismo de acetil CoA e, conseqüentemente, reduzindo a formação de corpos cetônicos como o beta-hidroxi-butilato (BHBA).

Apesar dos avanços já obtidos nas pesquisas com a utilização de diferentes fontes de fósforo em diversas espécies, ainda é necessário esclarecimento do mecanismo pelo qual o butafosfan age no metabolismo, mais especificamente, de que maneira esta fonte de fósforo interfere na atividade hepática e no mecanismo de resistência hepática à insulina.

2 Hipótese

A hipótese deste estudo é de que o butafosfan aumenta a resistência hepática à insulina em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica e submetidos a restrição alimentar.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do butafosfan sobre marcadores sanguíneos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à insulina e metabolismo energético em camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com uma dieta hipercalórica e submetidos a restrição alimentar.

3.2 Objetivos Específicos

Compreender o mecanismo de ação do butafosfan no metabolismo hepático de camundongos tratados com esta fonte de fósforo orgânico, submetidos ou não a uma dieta hipercalórica, e que passaram ou não por uma restrição alimentar, através da expressão de genes relacionados ao processo de sinalização da insulina, oxidação de ácidos graxos e rota gliconeogênica.

Determinar se o butafosfan altera as concentrações de insulina e glicose séricas em animais que receberam dieta hipercalórica ou não, e que sofreram ou não restrição alimentar.

Através do Índice de HOMA, determinar se o butafosfan está relacionado a maior resistência hepática à insulina em animais alimentados com dieta hipercalórica ou não, sofrendo ou não restrição alimentar.

4 Artigo

Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à insulina em camundongos tratados com uma fonte orgânica de fósforo e submetidos a restrição alimentar

WEILLER, MAA; JACOMETO, CB; DE BARROS, CC; PEREIRA, RA, de SOUZA, IC;
CORREA, MN

Submetido à revista ***Acta Scientiae Veterinariae***

1 **Acta Scientiae Veterinariae**

2 RESEARCH ARTICLE

3 **Parâmetros metabólicos e expressão de genes relacionados a resistência hepática à**
4 **insulina em camundongos tratados com uma fonte de fósforo orgânico e submetidos**
5 **a restrição alimentar**

6 Maria Amélia Agnes Weiller, Carolina Bespalhok Jacometo, Carlos Castillo de Barros,
7 Rubens Alves Pereira, Izabel Cristina de Souza, Joao Alvarado Rincón, Lucas Hax, Márcio
8 Nunes Correa*

9 Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão/RS/Brasil.
10 Autor para correspondência: M. Nunes Corrêa [marcio.nunescorreia@gmail.com]
11 Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de
12 Pelotas, Capão do Leão/RS/Brasil. CEP 96160-000.

13
14 **ABSTRACT**

15 **Background:** Phosphorus is an essential macromineral because it plays an essential role in
16 several metabolic pathways such as gluconeogenesis -biochemical pathway which
17 intermediates must be phosphorylated- and is also essential in cellular signaling process.
18 Butafosfan is an organic phosphorus source used in several animal such as pigs, cattle, poultry
19 with several beneficial effects. However, butafosfan is normally offered in combination with
20 vitamin B12. So, we can not determine if the beneficial effects are due to the butafosfan, vitamin
21 B12 or association between them. The aim of this study was to determine the effect of
22 butafosfan on liver metabolism and insulin signaling pathways.

23 **Material, Method & Results:** Forty two twelve month old male mice (C57BL / 6) were housed
24 in groups with seven animals each other for ten weeks. The mice were housed at an temperature
25 of 23° C. In the first nine weeks, two groups of 7 animals each were fed with commercial diet
26 *ad libitum*, and four groups of 7 animals fed a high calorie diet *ad libitum*. At the beginning of
27 the tenth week, the groups of animals receiving commercial diet were submitted to two different
28 treatments, both suffering food restriction, differing in the applied solution (butafosfan vs.

29 saline), giving rise to the following groups: CRS (commercial diet fed restricted and saline
30 application), CRB (commercial diet fed restricted and butafosfan application). Also the other
31 four groups were randomized. Those groups that received the high calorie diet were again
32 randomized as diet and applied solution. Two groups were submitted to food restriction in the
33 last week, and the other two kept with *ad libitum* diet, giving rise to groups: HSRS (high calorie
34 diet without food restriction and saline application), HSRB (high calorie diet without food
35 restriction and butafosfan application) HCRS (high calorie diet with food restriction and saline
36 application) HCRS (high calorie diet with food restriction and saline application). The food
37 restriction was 40%. Butafosfan or saline application were performed every 12 hours, totaling
38 14 applications, subcutaneously. After ten weeks, the mice suffer euthanasia with an
39 inhalational anesthesia. Analysis of phosphorus, NEFA, insulin, glucose and insulin sensitivity
40 were performed. Hepatic gene expression linked to lipid metabolism, glucose metabolism and
41 insulin signaling process also were performed. Butafosfan do not promote hepatic insulin
42 resistance since they increased the expression of genes related to the insulin signaling process
43 (*Irs1*, *Irs2*). Butafosfan also increased expression of genes related to glucose synthesis (*G6pc*),
44 reflecting itself in higher concentrations of this serum, as well as increasing the expression of
45 genes related to the β oxidation process (*Cpt1a*, *Acox1*, *PPARG*, *Ppargc1a* and *Fbp1*).

46 **Discussion:** Several studies have shown that phosphorus plays essential role in human and
47 animal metabolism by stimulating gluconeogenesis metabolic pathways, influencing cell
48 signaling processes and thus reducing the fatty acid liver disease. This study demonstrates that
49 butafosfan can change the fatty acids liver metabolism in mice since the route of hepatic β -
50 oxidation become more active in response to a food restriction, as well they promote an increase
51 in serum glucose. These findings become important in dairy cows, wich in the transition period
52 suffer an intensive lipid mobilization at the same time that needs glucosis to milk sinthesis, and

53 is also important to human patients suffering from liver diseases because they may decrease the
54 triglycerides in liver help in the recovery of liver tissue.

55 **INTRODUÇÃO**

56 A obesidade tornou-se uma epidemia mundial [37], sendo diretamente associadas a
57 esteatose hepática e ao diabetes tipo II [17,14,18], doenças estas que se associam a chamada
58 síndrome metabólica [18].

59 O desenvolvimento de diabetes e outras doenças associadas, em humanos, têm sido
60 relacionado a uma deficiência de fósforo [20], e distúrbios no metabolismo do fosfato podem
61 ser fatores chave para o desenvolvimento de obesidade e da síndrome metabólica [25].

62 O fósforo desempenha papel essencial em processos biológicos, sendo importante no
63 metabolismo dos carboidratos, onde a taxa de gliconeogênese e glicólise são reguladas pela
64 disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) [3]. É importante no processo de sinalização celular
65 [14], e tem sido relacionado a processos de reparação de tecido hepático, prevenção de esteatose
66 hepática e desenvolvimento de resistência à insulina [35,14,19].

67 Fonte de fósforo orgânico, o butafosfan tem apresentado benefício nas reações
68 metabólicas, otimizando o metabolismo gerador de energia [9,11]. Trabalhos realizados com
69 Catosal® (Bayer saúde animal, Brasil), uma associação entre butafosfan e cianocobalamina,
70 demonstraram haver aumento nas concentrações de glicose séricas e um decréscimo
71 significativo nas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e produção de
72 corpos cetônicos [11], assim como um aumento nas concentrações de aspartato amino
73 transferase (AST), enzima diretamente relacionada com a funcionalidade hepática [15].

74 O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos que o butafosfan promove sobre o
75 metabolismo hepático de glicose e de ácidos graxos, buscando identificar impactos na rota do
76 mecanismo de resistência hepática à insulina.

MATERIAL E MÉTODOS

77

78 Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética
79 e experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas sob registro número 6936.

80 *Animais e instalações*

81 Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram alojados no Biotério Central da
82 Universidade Federal de Pelotas, durante dez semanas, 42 camundongos machos, da linhagem
83 C57BL/6, com 90 dias de idade, nascidos e criados no próprio biotério. Durante todo
84 experimento, os camundongos permaneceram alojados dentro de caixas de polipropileno com
85 41x34x16 cm, próprias para a criação de camundongos (Insight, Brasil), sob um regime de 12
86 horas luz/12 horas escuro. A temperatura do ambiente foi controlada e mantida em 22°C, em
87 média.

88 *Dieta*

89 As dietas fornecidas aos animais foram ração comercial Nuvilab® (Nuvital, Brasil), e
90 ração hipercalórica formulada com os seguintes ingredientes: 68% de ração Nuvilab® (Nuvital,
91 Brasil), 26% de leite condensado, 1% de amido de milho, 5% de óleo vegetal e 2,5% de água.
92 A ração hipercalórica foi modelada em formato de “pellets”, e posteriormente seca em forno a
93 50°C, durante um período de 4 horas. As rações foram formuladas a cada dois dias afim de as
94 mesmas sempre estarem frescas, impedindo assim o aparecimento de bolores. Alíquotas de
95 todas as amostras ofertadas aos animais foram armazenadas em *freezer* -20°C para que fossem,
96 posteriormente, encaminhadas ao laboratório para análise da composição bromatológica.

97 *Dose de butafosfan, via e intervalos de aplicação*

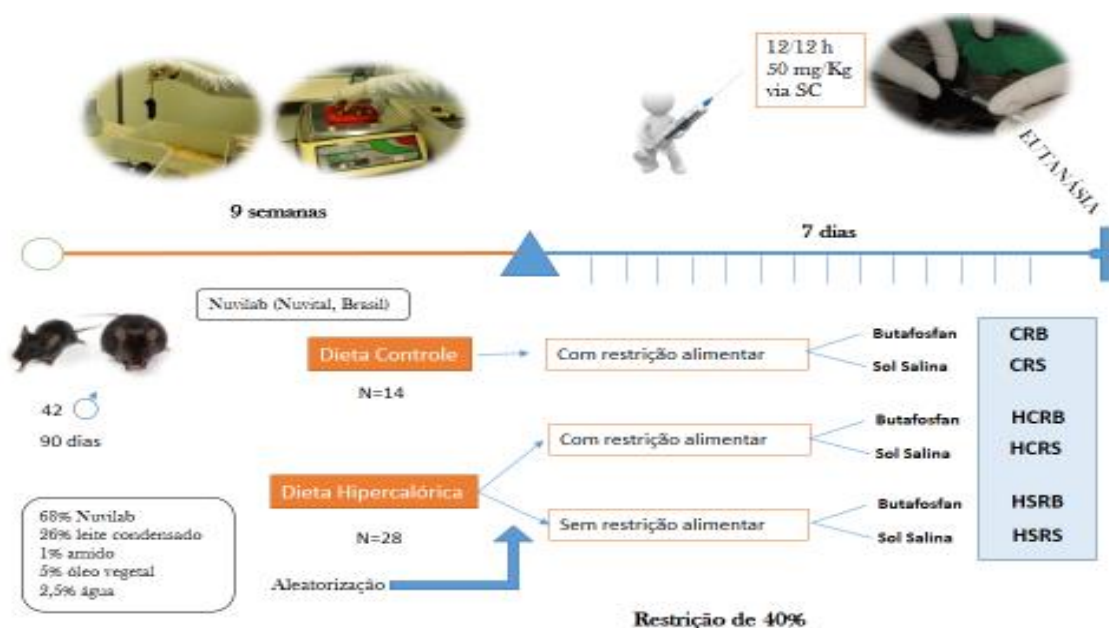
98 A dose de butafosfan aplicada nos animais foi de 50mg/kg. Para isso, preparou-se uma
99 solução com concentração de 2,5mg/mL, sendo o diluente a solução salina. A via de aplicação
100 escolhida foi a via subcutânea, sendo o intervalo entre aplicações de 12 horas.

101 *Desenho experimental*

102 Os 42 animais permaneceram alojados no biotério durante 10 semanas, sendo
103 distribuídos em caixas (grupos) com sete animais cada. Assim, haviam ao total 6 caixas. Nas
104 primeiras nove semanas, dois grupos com 7 animais receberam a ração comercial, e os outros
105 4 grupos restantes passaram a receber a dieta hipercalórica, *ad libitum*. Durante este período,
106 os animais eram pesados a cada semana, assim como a oferta e as sobras de ração eram
107 controladas a fim de se avaliar o consumo médio de cada grupo.

108 Encerradas as primeiras 9 semanas, os grupos de animais foram aleatorizados até a
109 completa formação dos tratamentos, os quais variavam de acordo com a dieta (comercial ou
110 hipercalórica), quanto a aplicação do tratamento (butafosfan ou solução salina) e quanto a
111 restrição alimentar (com ou sem restrição alimentar), resultando assim na formação dos
112 seguintes grupos experimentais: CRB- dieta comercial, com restrição alimentar e aplicação de
113 butafosfan; CRS- dieta comercial, com restrição alimentar e aplicação de solução salina;
114 HCRB- dieta hipercalórica, com restrição alimentar e aplicação de butafosfan; HCRS- dieta
115 hipercalórica, com restrição alimentar e aplicação de solução salina; HSRB- dieta hipercalórica,
116 sem restrição alimentar e com aplicação de butafosfan; HSRS- dieta hipercalórica, sem restrição
117 alimentar e com aplicação de solução salina.

118 A restrição alimentar que os animais sofreram nesta última semana foi de 40%, ou seja,
119 foi fornecido 60% da média do consumo diário prévio de ração, concomitante com a aplicação
120 a cada 12h do butafosfan (CRB e HCRB) ou solução salina (CRS e HCRS). Já, os grupos que
121 não sofreram restrição (HSRB e HSRS) continuaram com a oferta de ração *ad libitum*,
122 recebendo na última semana também as aplicações de butafosfan (HSRB) ou solução salina
123 (HSRS). Após as 10 semanas de tratamento, realizou-se eutanásia de todos os animais. A figura
124 1 traz uma representação esquemática do desenho experimental.



125
126 **Figura 1.** Desenho Experimental.

127 *Eutanásia e coleta de materiais*

128 Para realização da eutanásia, os animais foram previamente anestesiados com anestesia
129 inalatória Halotano (Cristália, Brasil), seguida de decapitação. Realizou-se coleta de sangue
130 diretamente da região cervical em tubos *ependorff* sem anticoagulante, mantidos em gelo até
131 a centrifugação. O fígado foi coletado, pesado e armazenado em criotubos imersos em
132 nitrogênio líquido, até serem transferidos ao *freezer* -80°C para posterior análise de expressão
133 gênica.

134 *Análises bioquímicas séricas*

135 Realizou-se análise bioquímica de AGNE, glicose, insulina e fósforo. Todas as amostras
136 foram centrifugadas a 3000xg por 15 minutos, em uma temperatura de 4°C, e os soros
137 armazenados a -80°C até realização das análises. As concentrações de AGNE foram realizadas
138 por análise calorimétrica utilizando kit comercial Wako NEFA HR (Wako, USA) conforme
139 técnica padronizada por Ballou et al. [1], e a leitura realizada em leitor de microplaca (Thermo
140 Plate Reader, Brasil). Para determinação da Insulina, utilizou-se kit comercial de ELISA

141 Rat/Mouse Insulin ELISA kit (EMD Millipore Corporation, Alemanha), conforme instruções
142 do fabricante. As concentrações de glicose e fósforo foram mensuradas utilizando-se kit
143 comercial Glicose Liquiform e Fósforo UV Liquiform (Labtest diagnóstica, Brasil), em um
144 analisador colorimétrico automático Labmax Pleno (Labtest diagnóstica, Brasil).

145 A partir dos resultados obtidos de glicose e insulina nos grupos, calculou-se o Índice
146 HOMA [21], índice este que estima graus de sensibilidade à insulina através da fórmula:

147
$$\text{HOMA} = \frac{\text{insulina} \left(\mu\frac{\text{U}}{\text{L}}\right) \times \text{glicose} \left(\mu\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right)}{22,5}$$
, onde valores elevados do índice indicam maior
148 sensibilidade à insulina.

149 *Coleta de tecidos, isolamento de RNA e qRT PCR*

150 Para a realização da expressão gênica do tecido hepático, extraiu-se o RNA total do
151 tecido utilizando TRIzol reagente (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante.
152 O RNA extraído foi purificado utilizando-se colunas MiRNEasy mini Kit (Qiagen, Alemanha),
153 sendo as amostras tratadas com RNase Free DNase Set (Qiagen, Alemanha), conforme as
154 indicações do fabricante. A concentração do RNA foi obtida utilizando-se espectrofotômetro
155 Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific Inc., USA). A relação A260/A280 foi utilizada como
156 indicativo da qualidade da amostra e a integridade do RNA extraído foi observada através de
157 eletroforese em gel de agarose (80V, durante 1,5 horas).

158 A partir do RNA extraído, procedeu-se com a construção do DNA complementar
159 utilizando *i-script* cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA). A reação foi realizada em
160 termociclador MyCycle TM Thermo Cycler (Bio Rad, USA) utilizando-se as seguintes
161 temperaturas: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA foi
162 então diluído a 5ng/μL. Reação em cadeia da polimerase quantitativo (qRT PCR) utilizando
163 *SYBR green* foi utilizada para avaliar a expressão dos genes relacionados a sinalização de

164 insulina, a via glicolítica e gliconeogênica, e via dos ácidos graxos, utilizando *primers*
 165 previamente testados, conforme tabela 1. Como gene de controle interno, utilizou-se a β actina.

166 **Tabela 1.** Lista de genes com seus respectivos nomes oficiais e sequencia dos *primers*
 167 utilizados para a análise de expressão gênica através de RT PCR.

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Foxo1- Forkhead box o1	GCTTTTGTACACGATGGAGGT	CGCACAGAGCACTCCATAAA
Irs1- Insulin receptor substrate 1	ATGGCGAGAGCCCTCCGGATACC	CTCATAATACTCCAGGCGCGC
Irs2- Insulin receptor substrate 2	GCCCGAACCTCAATAACAAC	CTTGTGGCCGTGCTTCTG
Pck1- Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	GACAGCCTGCCCCAGGCAGTGA	CTGGCCACATCTCGAGGGTCAG
G6pc- Glucose-6-phosphatase	TGCTGCTCACTTTCCCCACCAG	TCTCCAAAGTCCACAGGAGGT
Fbp1 - Fructose bisphosphatase 1	GACCCTGCCATCAATGAGTA	GTTGGCGGGGTATAAAAAGA
Pik3c2a Phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha polypeptide	TAGCTGCATTGGAGCTCCTT	TACGAACTGTGGGAGCAGAT
Gck- Glucokinase	GAGATGGATGTGGTGGCAAT	ACCAGCTCCACATTCTGCAT
Akt2 Thymoma viral proto- oncogene 2	GAGGACCTTCCATGTAGACT	CTCAGATGTGGAAGAGTGAC
Pparg Peroxisome proliferator activated receptor gamma	CCCAATGGTTGCTGATTACA	TGAGGCCTGTTGTAGAGCTG
Srebf1- Sterol regulatory element binding transcription factor 1	CGGAAGCTGTCGGGGTAG	GTTGTTGATGAGCTGGAGCA
Ppargc1a- Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	GTCAACAGCAAAAGCCACAA	TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA
Acaca- Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	GGACAGACTGATCGCAGAGAAAAG	GCTGTTCTCAGGCTCACAT
Cpt1a- Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	CTTCCATGACTCGGCTCTTC	AGCTTGAACCTCTGCTCTGC
Acox1- Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	GTGCAGCTCAGAGTCTGTCCAA	TACTGCTGCGTCTGAAAATCCA
B actina	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

168 Para a reação de PCR, utilizou-se 4 μ L do cDNA previamente diluído (5ng/ μ L), 5 μ L de
 169 SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,4 μ L de cada primer *forward* e
 170 *reverse*, e 0,2 μ L de água livre de DNase e RNase (Merck Millipore corporation, Alemanha)
 171 que foram colocados em microplacas de 48 poços (Bio-rad, USA), em duplicata, com um
 172 controle negativo em cada placa. As reações foram realizadas no termociclador ECO Real-Time

173 PCR System (Illumina®, USA) utilizando o seguinte protocolo: período de incubação de 2
174 minutos a 50°C, ativação da polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de
175 PCR de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, seguido por um estágio de *melting* (15s a
176 95°C, 15s a 55°C e 15s a 95°C).

177 Os resultados obtidos no RT PCR foram analisados em *software* LinReg PCR (Ruijter
178 et al., 2009), através do qual calculou-se a eficiência da PCR para cada placa. A abundância
179 relativa de cada gene foi calculada em *software* Excel 2013, através da seguinte fórmula:

180 $Abundância = \frac{1}{eficiência^{\Delta cq}}$, onde $\Delta cq = cq$ do gene da amostra diminuído do valor de cq do
181 gene controle [24].

182 *Análises estatísticas*

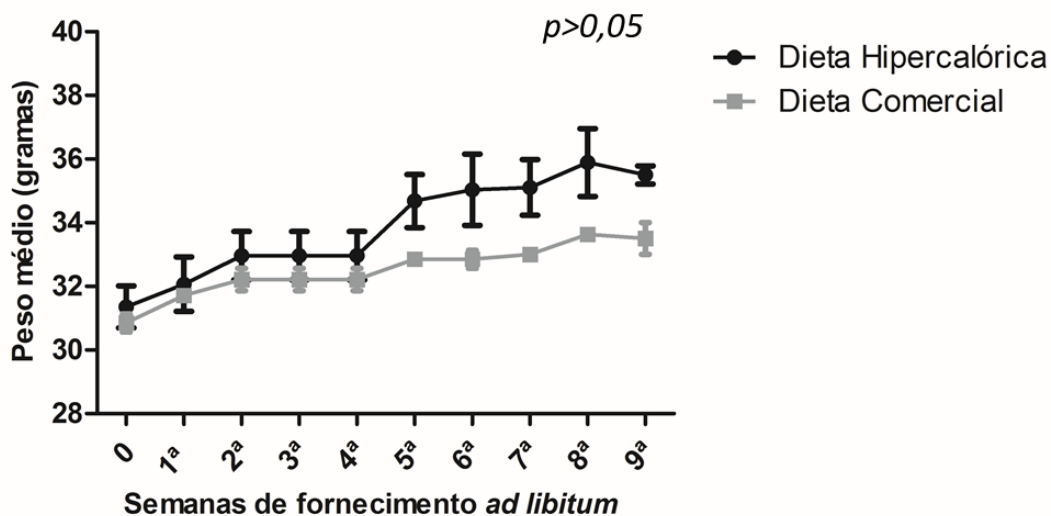
183 As análises estatísticas foram realizadas em software Prism 5 (Graphpad Software Inc.,
184 USA). Realizou-se o “teste t” para comparação entre médias dos grupos: CRS vs.CRB, HCRS
185 vs. HCRB e HCRS vs.HCRB. As amostras foram primeiramente submetidas a teste de
186 distribuição normal e, quando não havia distribuição normal dos dados, os mesmos eram
187 transformados para log₁₀. Ainda, realizou-se teste de correlação de Pearson entre o peso vivo
188 dos animais e o peso do tecido hepático obtidos à necropsia. Todos os gráficos foram
189 confeccionados a partir do Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). Foram considerados
190 significativos os valores de $p < 0,05$.

191 **RESULTADOS**

192 *Consumo de ração e ganho de peso*

193 Durante as primeiras 9 semanas de alojamento, não houve diferença ($P=0,30$) no
194 consumo de ração entre os grupos recebendo dieta controle ($33,46 \pm 1,67$ g/dia) e hipercalórica
195 ($36,45 \pm 0,77$ g/dia). Observamos uma diferença ($P=0,03$) no peso médio dos animais, na nona

196 semana, entre os grupos alimentados com dieta comercial ($33,64 \pm 0,07$ g) e grupo hipercalórica
 197 ($35,89 \pm 1,06$ g). O peso médio no decorrer das semanas pode ser observado na Figura 2.



198
 199 **Figura 2.** Peso médio dos camundongos alimentados com dieta comercial e dieta hipercalórica
 200 nas primeiras 9 semanas de alojamento.

201 *Peso de tecido hepático e análise de correlação*

202 Foi realizada análise de correlação entre pesos corporal e peso do fígado. Os resultados
 203 demonstram que não houve correlação entre estes dois tecidos nos grupos HCRB ($r=0,590$,
 204 $P=0,16$), HCRS ($r=0,721$, $P=0,17$), CRS ($r=0,028$, $P=0,96$) e HSRB ($r= -0,023$, $P=0,96$). Já,
 205 o grupo HSRS apresentou correlação positiva ($r=0,773$, $P=0,04$), assim como o grupo CRB
 206 ($r=0,935$, $P=0,002$), o qual apresentou maior correlação.

207 *Glicose, Insulina, AGNE e Pi*

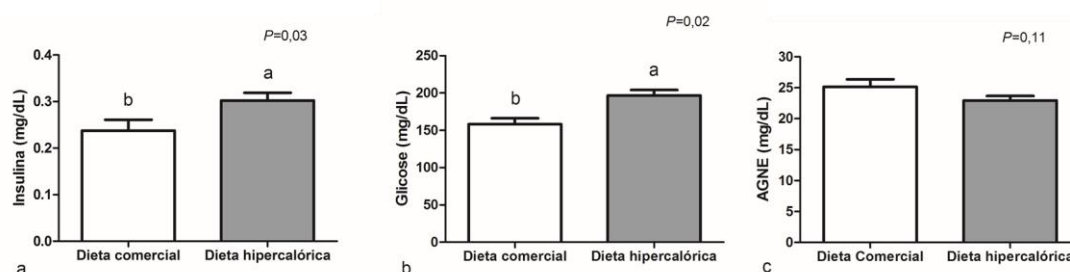
208 A concentração de glicose foi maior nos grupos que receberam aplicação de Butafosfan,
 209 havendo diferença ($P<0,001$) entre os grupos HCRB vs. HCRS ($204,5 \pm 4,9$ vs. $135,2 \pm 14,4$) e
 210 uma tendência ($P=0,06$) entre os grupos CRB vs. CRS ($182,6 \pm 8,6$ vs. $153,9 \pm 11,18$). Não houve
 211 diferença ($P>0,05$) nas concentrações de AGNE, Insulina, e para o fósforo, houve tendência
 212 ($P=0,07$) entre os grupos CRB vs CRS, sendo as concentrações maiores no grupo butafosfan.
 213 (Tabela 2).

214 **Tabela 2** Marcadores bioquímicos sanguíneos nos diferentes grupos experimentais.

	CRB	CRS	SEM	P	HCRB	HCRS	SEM	P	HSRB	HSRS	SEM	P
Glicose (mg/dL)	162.6	153.9	11.18	0.6	204.5	135.2	14.4	<0.001	227.1	202.6	6.8	0.01
AGNE (mg/dL)	24.05	26.22	2.09	0.4	24.34	24.56	5.99	0.96	22.74	24.17	1.43	0.99
Insulina (ng/mL)	0.25	0.22	0.04	0.22	0.25	0.27	0.05	0.37	0.29	0.31	0.01	0.44
Fósforo (mg/dL)	11.06	9.56	0.52	0.08	9.28	9.94	1.19	0.51	8.98	10.14	0.55	0.1

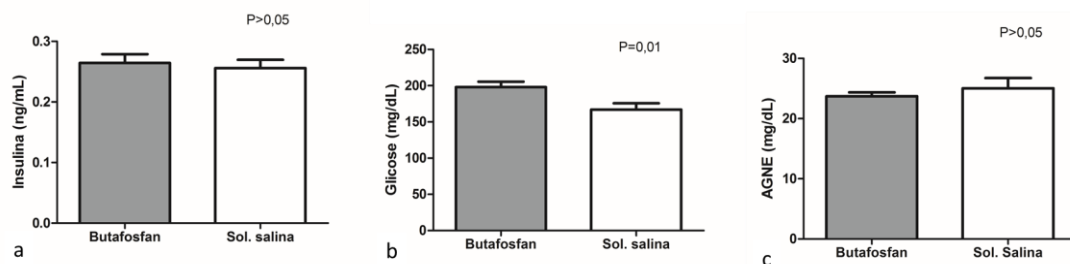
215 *Valores representados pela média±desvio padrão da média.
216

217 Contrastando os animais que receberam a dieta hipercalórica com os animais que
218 receberam a dieta comercial, percebemos que os níveis de insulina foram maiores no primeiro
219 (0.302±0.016ng/mL vs. 0.237±0.023ng/mL, $P=0,03$), as concentrações de glicose maiores no
220 grupo hipercalórica (196.7±7.277mg/dL vs. 158.2±7.967mg/dL; $P=0,002$), e para os AGNE,
221 não houve diferença ($P=0,11$). Da mesma maneira, quando comparamos os grupos que
222 receberam a aplicação de butafosfan e contrastamos com o grupo de animais que receberam
223 solução salina, observamos maiores concentração de glicose ($P=0,01$) nos grupos butafosfan
224 comparados aos grupos que receberam injeções de solução salina (198±7,44 mg/dL vs.
225 166,9±8,80mg/dL, respectivamente). Figuras 3 e 4.



226 **Figura 3.** Concentrações sérica de insulina (a), glicose (b) e AGNE (c) contrastados entre as
227 dietas comercial e hipercalórica.
228

229

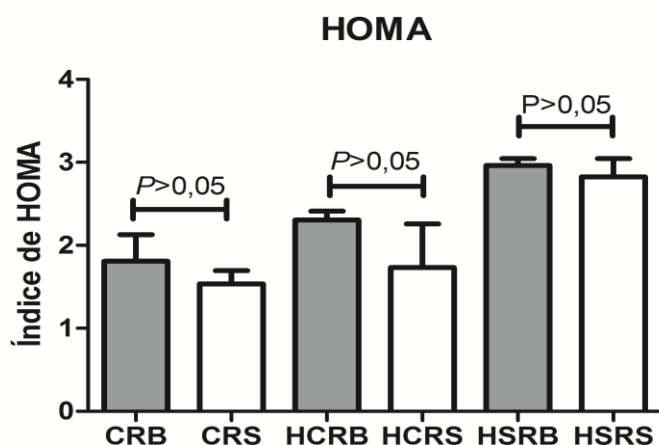


230

231 **Figura 4** Concentrações séricas de insulina (a), glicose (b) e AGNE (c) contrastados entre os
232 grupos que receberam aplicação de butafosfan ou solução salina.

233 *Sensibilidade à Insulina*

234 O índice HOMA é um índice que mede a sensibilidade hepática à insulina, onde valores
 235 mais baixos demonstram alta sensibilidade dos tecidos frente ao hormônio. Não houve
 236 diferença estatística entre os índices de HOMA calculados quando se comparou os grupos CRB
 237 vs. CRS ($P=0.46$); HCRB vs. HCRS ($P=0.31$) e HSRB vs. HSRS ($P=0.57$) (Figura 5), nem
 238 quando contrastou-se os grupos de animais que receberam butafosfan com os que receberam
 239 solução salina. Os maiores índices foram obtidos nos grupos recebendo dieta hipercalórica e
 240 que não sofreram restrição alimentar, havendo diferença ($P=0,05$) entre os contrastes HSRS vs.
 241 HCRS (2.824 ± 0.2195 vs. 1.732 ± 0.5254).



242 **Figura 5.** Valores médios de Índice de HOMA obtidos nos diferentes grupos tratamento.
 243
 244

245 *Expressão gênica*

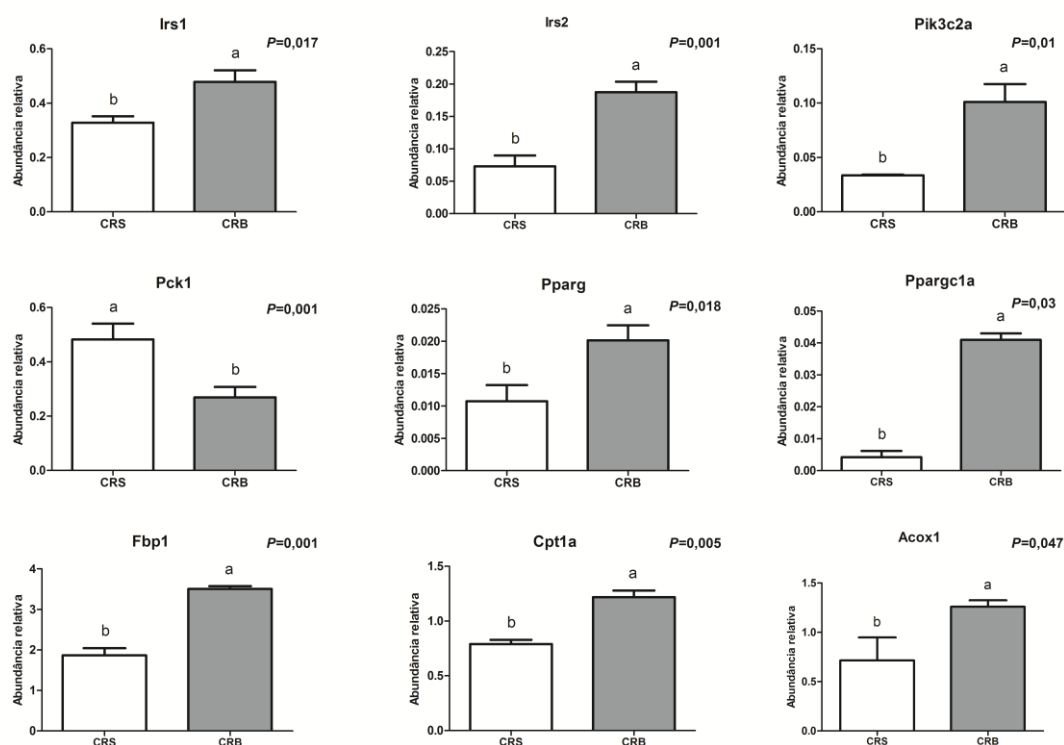
246 Avaliou-se a expressão gênica hepática de 15 genes relacionados ao processo de
 247 sinalização de insulina, metabolismo de lipídeos/processo metabólico, genes reguladores de
 248 transcrição e genes relacionados a gliconeogênese. A tabela 3 apresenta um resumo das
 249 diferenças estatísticas encontradas nas comparações entre os grupos CRS vs. CRB, HCRS vs.
 250 HCRB e HSRS vs. HSRB nos genes avaliados.

251 **Tabela 3.** Resumo dos valores de *P* obtidos entre a comparação entre a média da abundância
 252 relativa dos genes a partir de teste t.

	CRS X CRB	HCRS X HCRB	HSRS x HSRB
Irs1	0.017	0.019	NS
Irs2	0.001	NS	0.019
Pik3c2a	0.010	NS	NS
Akt2	NS	NS	NS
Foxo1	NS	NS	NS
Gck	NS	0.016	NS
Pck1	0,018	NS	NS
G6pc	NS	NS	NS
Cpt1a	0.005	NS	NS
Srebf1	NS	NS	NS
Acaca	NS	NS	NS
Pparg	0.018	NS	NS
Ppargc1a	0.030	NS	NS
Acox1	0.047	NS	0.014
Fbp1	0.001	NS	NS

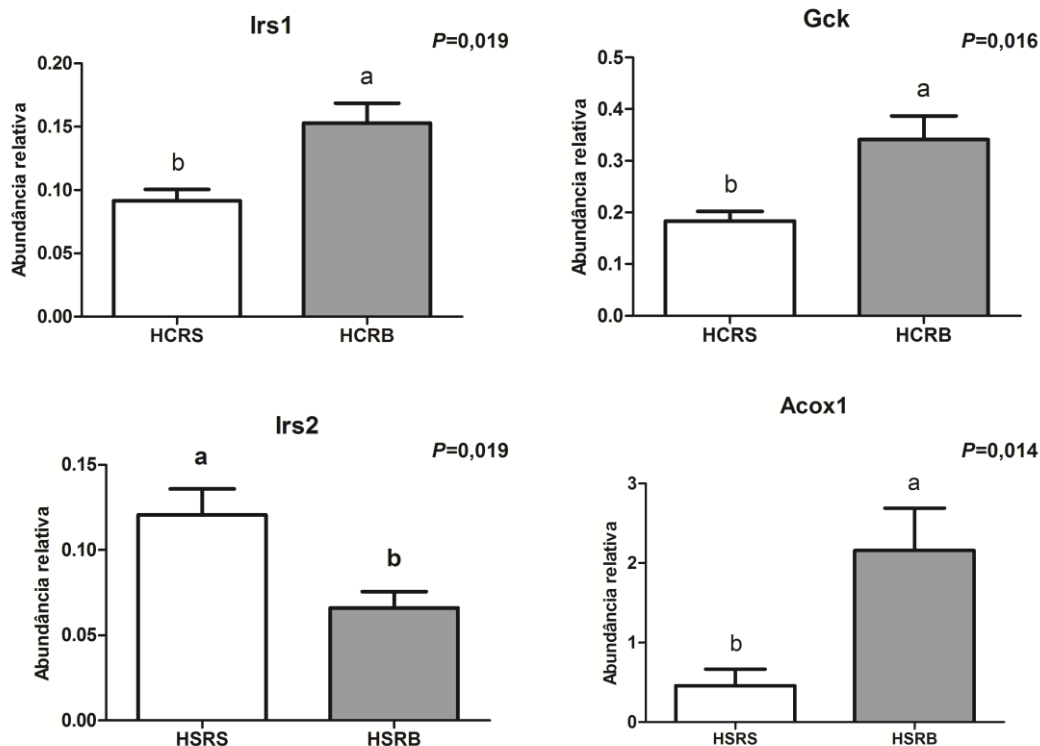
253 *NS significa que não houve diferença estatística entre as médias.

254 A maioria das diferenças entre a abundância dos genes pôde ser observada na
 255 comparação entre os grupos CRS vs. CRB, sendo que o grupo tratado com butafosfan
 256 apresentou maior expressão de *Irs1* ($P= 0.017$), *Irs2* ($P= 0.001$), *Pik3c2a* ($P= 0.010$), *Pparg*
 257 ($P= 0.018$), *Ppargc1a* ($P= 0.030$), *Fbp1* ($P= 0.001$), *Cpt1a* ($P= 0.005$) e *Acox1* ($P=0.047$). O
 258 grupo CRS em contraste com CRB só apresentou maior expressão para o gene *Pck1* ($P= 0.020$).
 259 (Figura 6).



260
 261 **Figura 6.** Abundância relativa de diferentes genes quando comparados os grupos CRS e CRB.
 262 Os valores são apresentados pela média±erro padrão da média.

263 Ainda, entre os grupos HCRS e HCRB, encontramos diferenças na expressão de genes
 264 *Irs1* ($P=0,019$) e *Gck* ($P=0,016$), sendo que ambos tiveram maior expressão no grupo que
 265 recebeu o butafosfan. Já, contrastando os grupos HSRS e HSRB, encontramos maior expressão
 266 de *Irs2* ($P=0,019$) para o grupo butafosfan, e o grupo tratado com solução salina apresentou
 267 maior expressão ($P=0,014$) de *Acox1* (Figura 7).



268
 269 **Figura 7.** Abundância relativa de diferentes genes entre grupos HCRSxHCRB, e entre
 270 HSRSxHSRB. Os valores são apresentados pela média±erro padrão da média.

271 DISCUSSÃO

272 Pesquisas têm relacionado o fósforo ao metabolismo de ácidos graxos e
 273 desenvolvimento de lipidose hepática, assim como ao desenvolvimento de resistência à insulina
 274 [35, 13]. Nossos resultados indicam uma ação potencial do butafosfan na redução do acúmulo
 275 de ácidos graxos no tecido hepático de animais que passaram por uma restrição alimentar, uma
 276 vez que animais tratados com o butafosfan apresentaram maior expressão de genes relacionados
 277 à metabolização de ácidos graxos como Acox1 e Cpt1a.

278 A expressão de Acox1 está diretamente relacionada a expressão de Cpt1a, pois é a
 279 enzima que catalisa o primeiro passo da β oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, e qualquer
 280 defeito na expressão desta enzima leva ao desenvolvimento de esteatohepatite [36]. Estudo,
 281 demonstrou que camundongos alimentados com dieta rica em lipídeos e que apresentavam
 282 maior expressão de Cpt1a e conseqüentemente maior β oxidação, não desenvolviam resistência
 283 hepática a insulina nem desenvolviam esteatose hepática [27]. Em outro estudo, observou-se

284 que uma restrição de Pi aumentou de maneira significativa o acúmulo de lipídeos no fígado de
285 ratos alimentados com uma dieta contendo 2% de colesterol [35]. Os autores demonstraram que
286 a restrição de fósforo reduziu a expressão hepática de genes envolvidos no metabolismo do
287 colesterol e biossíntese de ácidos graxos. Em vacas leiteiras, através de marcadores bioquímicos
288 sanguíneos, pesquisadores observaram que o butafosfan associado a cianocobalamina altera o
289 metabolismo lipídico de vacas leiteiras, aumentando a capacidade do fígado metabolizar AGNE
290 e reduzir a formação de BHBA, conseqüentemente diminuindo a esteatose hepática [28].

291 Os resultados obtidos na correlação entre peso de tecido hepático e peso vivo
292 corroboram os resultados de expressão gênica, o qual também demonstra que o butafosfan pode
293 estar envolvido na redução do desenvolvimento de esteatose hepática, uma vez que, exceto para
294 o grupo CRB quando comparado ao CRS, todos os grupos tratados com butafosfan
295 apresentaram menor correlação. Cabe destacar aqui que o grupo CRB era o grupo com menor
296 peso médio entre os animais, e isso pode ter levado a uma maior correlação quando comparado
297 ao CRS.

298 Estudos realizados com camundongos também relacionaram a maior expressão de
299 *Srebf1* a um aumento na resistência à insulina e esteatose hepática [22], sendo esta enzima
300 considerada um fator chave na regulação da lipogênese hepática em roedores [12]. Em nosso
301 estudo, não observamos diferença na expressão deste gene entre os grupos tratados com
302 butafosfan ou solução salina, assim como também não houve diferença no índice que mede a
303 sensibilidade dos tecidos à insulina (HOMA), sugerindo que o processo de sinalização à
304 insulina hepática não foi inibido.

305 Sabe-se que a insulina age no fígado através de receptores de superfície, promovendo
306 supressão da gliconeogênese e promovendo lipogênese [5]. Para que ocorra de maneira
307 adequada, o processo de sinalização celular estimulado pela insulina requer uma ação conjunta
308 de sinais que envolvem processos de fosforilação e de-fosforilação [29], e conseqüentemente a

309 participação do fósforo. Os resultados observados na expressão de genes relacionados a via de
310 sinalização hepática da insulina como *Irs1*, *Irs2*, *Pik3c2a* sugerem que o butafosfan não alterou
311 o processo de sinalização celular, ou seja, animais tratados com butafosfan não apresentaram
312 maior resistência hepática à insulina, vindo ao encontro dos resultados obtidos para HOMA.

313 As análises bioquímicas séricas demonstram que houve maiores concentrações de
314 glicose naqueles grupos tratados com butafosfan, não havendo contudo diferenças nas
315 concentrações de insulina e fósforo.

316 O fósforo apresenta papel importante no metabolismo hepático de carboidratos, uma
317 vez que na via gliconeogênica muitos intermediários precisam ser fosforilados [3]. A rota
318 gliconeogênica e glicolítica é, assim, regulada pela disponibilidade de fósforo, o que pode
319 explicar a influência do butafosfan sobre o metabolismo da glicose, aumentando as
320 concentrações nos animais tratados com butafosfan. O mesmo foi encontrado em estudo
321 realizado em vacas leiteiras, onde animais tratados com butafosfan associado a
322 cianocobalamina apresentaram maiores concentrações de glicose quando comparados ao
323 controle [16]. Já, outro estudo não observou diferença nas concentrações de glicose entre grupos
324 controle e tratamento, porém observou diferença na produção de leite, onde animais tratados
325 com butafosfan apresentaram maior produção [28]. Pesquisadores comentam que pós parto,
326 devido a alta necessidade de direcionamento da glicose para a glândula mamária e produção de
327 leite, pode não ser observado aumento de glicose sérica [2,40].

328 Os resultados de maior concentração de glicose séricas nos grupos butafosfan são
329 complementados com a maior expressão de *Fbp1*, gene que codifica a expressão de frutose 1,6
330 bifosfatase, enzima gliconeogênica que converte a frutose 1,6 bifosfato até frutose 6 fosfato.
331 Sua deficiência está correlacionada com hipoglicemia, pois prejudica a formação de glicose a
332 partir de lactato, glicerol e aminoácidos gliconeogênicos [32].

333 Assim como a Fbp1, a Pck1, a qual converte o oxaloacetato a fosfoenolpiruvato a partir
334 de piruvato, lactato e alanina, também está relacionada a gliconeogênese, sendo considerada o
335 primeiro ponto de regulação da via [21], direcionando intermediários da via do ácido
336 tricarbóxico para síntese de glicose [33]. Observou-se em nosso estudo uma menor expressão
337 de Pck1 nos animais tratados com butafosfan. Estudo realizado em camundongos demonstrou
338 importantes mecanismos regulatórios na gliconeogênese hepática, mesmo sem haver alterações
339 na expressão de Pck1 [7], assim como alterações na expressão desta não levaram a alterações
340 na produção de glicose [38]. A regulação desta via gliconeogênica por uma única enzima (Pck1)
341 é improvável [7]. Sozinha a Pck1 pouco influencia na gliconeogênese, e sua expressão é
342 controlada paralelamente à produção de energia pelo fígado, sendo que estes dois fatores juntos
343 determinam a taxa de gliconeogênese [7]. A existência de outras vias reguladoras da
344 gliconeogênese pode ser um dos motivos que levou a menor expressão de Pck1 nos animais do
345 grupo butafosfan.

346 Mesmo sendo o butafosfan uma fonte de fósforo orgânico, não observamos diferença
347 nas concentrações séricas de fósforo entre os grupos tratados. Estudos realizados com ratos
348 transplantados também demonstrou que fontes alternativas de fósforo não levaram a uma maior
349 concentração sérica do mineral, pois o fígado, para se regenerar, consome energia (ATP), e
350 desta forma o fósforo seria necessário, o que acarretaria uma diminuição de suas concentrações
351 [8]. O mesmo foi demonstrado em outro estudo [39], onde através de ressonância magnética,
352 pode-se observar significativa redução de ATP e ADP pós transplante. Em vacas leiteiras,
353 estudos também não encontraram diferenças nas concentrações de fósforo quando fornecido
354 butafosfan associado a cianocobalamina [10, 30, 28].

355 Desta forma, este estudo demonstra que o butafosfan pode apresentar efeitos benéficos
356 ao metabolismo hepático de animais que sofreram restrição alimentar, pois o aumento na
357 expressão de enzimas relacionadas a lipólise foi concomitante com uma maior eficiência nos

358 processos de β -oxidação (Cpt1a, Acox1, Pparg, Ppargc1a e Fbp1), e conseqüentemente pode
 359 diminuir o risco de lipidose e desenvolvimento de resistência hepática a insulina.

360 MANUFACTURERS

361 ¹Bayer Saúde Animal. São Paulo/SP.

362 **Acknowledgments** This experiment was approved (protocol number: 6936-2014) by the
 363 Animal Experimental Ethics Committe (CEEAA) of the Universidade Federal de Pelotas:

364 Referências

- 365 1. **Ballou, M. A., Gomes, R. C., Juchem, S. O., & DePeters, E. J. 2009.** Effects of dietary
 366 supplemental fish oil during the peripartum period on blood metabolites and hepatic
 367 fatty acid compositions and total triacylglycerol concentrations of multiparous Holstein
 368 cows. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 657-669.
- 369 2. **Bell AW & Bauman DE, 1997.** Adaptations of glucose metabolism during pregnancy
 370 and lactation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2:265-278.
- 371 3. **Berg JM, Tymoczko JL e Stryer L 2006.** Glycolysis and gluconeogenesis. In
 372 *Biochemistry*, 6th edition., 433–474.
- 373 4. **Bionaz, M.;Thering, BJ.; Loor, JJ. 2012.** Fine metabolic regulation in ruminants via
 374 nutrient–gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes
 375 involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation.
 376 *British Journal of Nutrition*, 107 (2), p. 179.
- 377 5. **Birkenfeld AL; Shulman, GI. 2014.** Non alcoholic fatty liver disease, hepatic insulin
 378 resistance and type 2 diabetes. *Hepatology*, 59:713–723.
- 379 6. **Boutinaud, M., Chedly, M. B., Delamaire, E., & Guinard-Flament, J. 2008.** Milking
 380 and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk.
 381 *Journal of dairy science*, 91(3), 988-998.
- 382 7. **Burgess SC, Leone TC, Wende AR, Croce MA, Chen Z, Sherry AD, Malloy CR,**
 383 **Finck BN. 2006.** Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid
 384 cycle flux in peroxisome proliferatoractivated receptor gamma coactivator-1alpha
 385 (PGC-1alpha)-deficient mice. *Journal of Biology Chemistry*. (281): 19000–19008.
- 386 8. **Chung PY, Sitrin MD, Te HS. 2003.** Serum phosphorus levels predict clinical outcome
 387 in fulminant hepatic failure. *Liver transplantation*. (9): 248-253.

- 388 9. **Cuteri V, Nisoli L, Attili AR, Romero Tejada A, Preziuso S, Fruganti A. 2008.**
389 Clinical Field evaluation of a butafosfan + vitamin B12 compound in the treatment of
390 subclinical ketosis in dairy cows. Oral and Poster Presentations. Proc XXVth World
391 Buiatrics Congress. (Budapest). Hungary.
- 392 10. **Delpont, P C, Schmidt B e Fourie L. 2006.** Efficacy and safety of Catosal (synonym
393 Coforta) as a supportive treatment of parturiente paresis in cows. Poster no. PS4–120 in
394 Proc. of the 24th World Buiatrics Congress, Nice, France.
- 395 11. **Deniz, A, Westphal, B, e Illing, C. 2008.** Effects of prepartum metaphylactic treatment
396 with Catosal on postpartum metabolic functions in cows. In the 25th World Buiatrics
397 Congress Budapest. (51).
- 398 12. **Desvergne B e Wahli W. 1999.** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear
399 control of metabolismo. *Endocrine Reviews*. (20):649–688.
- 400 13. **Elhalabi, M Mohammad A. 2014.** The role of phosphorus in the development and
401 progression of high fat diet induced NAFLD in rats. Tese de Doutorado American
402 University of Beirut. Department of Nutrition and Food Science.
- 403 14. **Farese RV, Zechner R, Newgard CB, e Walther TC. 2012.** The problem of
404 establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell*
405 *metabolism*. (15):570-573.
- 406 15. **Flasshoff, F. H. 1974.** Clinical and chemical blood serum investigations in cattle and
407 treatment studies with ornithine-aspartate-product HMV 20 and with Catosal for the
408 reduction of fertility and health disorders. Tese de Pos doutorado. Tierärztliche
409 Hochschule, Hannover, Germany
- 410 16. **Fürll M, Deniz A, Westphal B, Illing C e Constable PD. 2010.** Effect of multiple
411 intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolismo of
412 periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. (93):4155–4164.
- 413 17. **Gruben N, Shiri-Sverdlov R, Koonen DP e Hofker MH. 2014.** Nonalcoholic fatty
414 liver disease: a main driver of insulin resistance or a dangerous liaison. *Biochimica et*
415 *Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. (1842): 2329-2343.
- 416 18. **Guo, S. 2014.** Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from
417 mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*. (220): T1-T23.
- 418 19. **Haap, M, Heller, E, Thamer, C, Tschritter, O, Stefan, N., Fritsche, A. 2006.**
419 Association of serum phosphate levels with glucose tolerance, insulin sensitivity and
420 insulin secretion in non-diabetic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. (60):
421 734-739.

- 422 20. **Haglin L. 2001.** Hypophosphatemia: cause of disturbed metabolism in the metabolic
423 syndrome. *Med Hypotheses*. (56):657–663.
- 424 21. **Hanson RW; Reshef L. 1997.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase
425 (GTP) gene expression. *Annual review of biochemistry*. (66):581-611.
- 426 22. **Knebel B, Haas J, Hartwig S, Jacob S, Köllmer C, Nitzgen U. 2012.** Liver-specific
427 expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and
428 increased visceral fat mass. *PloS one*. (7):e31812
- 429 23. **Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S. 2012.** Insulin
430 regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nature*
431 *medicine*. (18): 388-395.
- 432 24. **Menon, V., Zhi, X., Hossain, T., Bartke, A., Spong, A., Gesing, A., & Masternak,**
433 **M. M. 2014.** The contribution of visceral fat to improved insulin signaling in Ames
434 dwarf mice. *Aging cell*. 13(3): 497-506.
- 435 25. **Obeid OA. 2013.** Low phosphorus status might contribute to the onset of obesity.
436 *Obesity Reviews*. (14): 659-664.
- 437 26. **Otero YF., Stafford JM., e McGuinness OP. 2014.** Pathway-selective insulin
438 resistance and metabolic disease: the importance of nutrient flux. *Journal of Biological*
439 *Chemistry*. (289): 20462-20469.
- 440 27. **Orellana-Gavaldà, J. M., Herrero, L., Malandrino, M. I., Paneda, A., Sol**
441 **Rodríguez-Peña, M., Petry, H.& Serra, D. 2011.** Molecular therapy for obesity and
442 diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology*,
443 53(3), 821-832.
- 444 28. **Pereira, RA 2010.** Efeitos da administração de Butafosfan e Cianocobalamina após o
445 parto, sobre parâmetros metabólicos e produtivos de vacas leiteiras. Dissertação.
446 Universidade Federal de Pelotas.
- 447 29. **Perry RJ, Samuel VT, Petersen, KF, e Shulman, GL. 2014.** The role of hepatic lipids
448 in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. (510): 84-91.
- 449 30. **Rollin E, Berghaus RD, Rapnicki P, Godden SM e Overton MW. 2010.** The effect
450 of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum β -
451 hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *Journal of*
452 *Dairy Science*. (93):978–987.
- 453 31. **Saltiel, AR & Kahn, CR. 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and
454 lipid metabolism. *Nature*. (414):799-806.

- 455 32. **Sperling, Mark A. 2015.** Endocrinologia Pediátrica, 4ª Ed., Rio de Janeiro, Elsevier,
456 1080 p.
- 457 33. **Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J. S., & Friedman, J.**
458 **E. 2002.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates
459 insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *Journal of Biological*
460 *Chemistry*, 277(26): 23301-23307.
- 461 34. **Tabeleão, V. 2014.** Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras saudáveis
462 ou com mastite clínica. Tese, Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de
463 Pelotas, Pelotas/RS, 82p
- 464 35. **Tanaka S, Yamamoto H, Nakahashi O, Kagawa T, Ishiguro M, Masuda M. 2013.**
465 Dietary phosphate restriction induces hepatic lipid accumulation through dysregulation
466 of cholesterol metabolism in mice. *Nutrition Research*. (33): 586-593.
- 467 36. **Vluggens, A., Andreoletti, P., Viswakarma, N., Jia, Y., Matsumoto, K., Kulik, W.**
468 **& Sarkar, J. 2010.** Functional significance of the two ACOX1 isoforms and their
469 crosstalks with PPAR α and RXR α . *Laboratory investigation*. 90(5), 696-708.
- 470 37. WHO- World Health Organization, Obesity and Overweight, Fact sheet. 2015, 311.
- 471 38. **Xu J, Gowen L, Raphalides C, Hoyer KK, Weinger JG, Renard M. 2006.** Decreased
472 hepatic futile cycling compensates for increased glucose disposal in the pten
473 heterodeficient mouse. *Diabetes*. (55):3372–3380.
- 474 39. **Yang, M, Shimada H, Kobayashi T, Niimoto S e Nakagawara G. 1995.** Predicting
475 the viability of grafted livers in rats through a rapid and sensitive metabolic indicator
476 assessed by 31P-NMR spectroscopy. *Surgery today*. (25):711-716.
- 477 40. **Zachut M, Honig H., Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S e Moallem U. 2013.**
478 Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific
479 insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *Journal of dairy Science*.
480 (96):5656-5669.

481

5 Considerações Finais

O presente estudo demonstra que o butafosfan pode alterar o metabolismo hepático de ácidos graxos de camundongos, uma vez que a rota de β oxidação hepática demonstrou-se mais ativa em resposta a um aumento na taxa de mobilização de ácidos graxos. Ainda, o butafosfan aumenta as concentrações de glicose séricas. Estes resultados tornam-se importantes, por exemplo, em vacas leiteiras que, no período de transição, passam por uma intensa mobilização lipídica ao mesmo tempo que necessitam de energia para a produção de leite.

Especula-se ainda que o butafosfan possa diminuir o acúmulo de triglicerídeos no fígado, ou ainda auxiliar na recuperação do tecido hepático quando este sofre injúrias, sendo estes de grande relevância em pacientes humanos que sofrem de doença hepática.

Por fim, há necessidade de estudos complementares para melhor esclarecer quais os mecanismo de ação desta fonte de fósforo orgânico e comprovar se ele realmente tem influência nas vias de oxidação e desenvolvimento de lipidose.

Referências

ANVISA **Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos** - 2º Versão / Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Universidade de Brasília – Brasília : Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília. 44p. 2005.

BASTARD, J. P., et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v.17, n.1, p.4-12, 2006.

BELL, A.W., BAUMAN, D.E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v2, n.3, p. 265-278, 1997.

BERG JM, TYMOCZKO JL e STRYER L. Glycolysis and gluconeogenesis. **Biochemistry**, 6th edition, p. 433–474, 2006.

BOSSAERT, P., LEROY, J.L.M.R., DE VliegHER, S. e OPSOMER, G. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.9, p.3363-3371, 2008.

BORGES, N J B G. **Efeitos da suplementação da colina e de frutooligossacarídeos na esteatose hepática em ratos wistar**. 2008, 132 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CHUNG, P. Y., SITRIN, M. D., e TE, H. S. Serum phosphorus levels predict clinical outcome in fulminant hepatic failure. **Liver transplantation**, v.9, n.3, p. 248-253. 2003.

COHN, J. S., WAT, E., KAMILI, A., e TANDY, S. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. **Current opinion in lipidology**, 19(3), 257-262, 2008.

CUTERI V., NISOLI L., ATTILI AR. et al. Clinical Field evaluation of a butafosfan + vitamin B12 compound in the treatment of subclinical ketosis in dairy cows. Oral and Poster Presentations. Proc **XXVth World Buiatrics Congress**. (Budapest). Hungary; 2008

De KOSTER, J D.; OPSOMER, G. Insulin resistance in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 299-322, 2013.

DENIZ, A., WESTPHAL, B. e ILLING, C. Effects of prepartum metaphylactic treatment with Catosal on postpartum metabolic functions in cows. **In the 25th World Buiatrics Congress** Budapest. V.51. 2008.

ELHALABI, Mariam Mohammad Ali. **The role of phosphorus in the development and progression of high fat diet induced NAFLD in rats**. Tese de Doutorado American University of Beirut. Department of Nutrition and Food Science. 2014

FABBRINI, E. e MAGKOS, F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. **Nutrients**, v.7, n.6, p.4995-5019, 2015.

FARESE, R. V., ZECHNER, R., NEWGARD, C. B., & WALTHER, T. C. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Cell metabolism**, v.15, n.5, p.570-573. 2012.

FURLL M, DENIZ A, WESTPHAL B, ILLING C e CONSTABLE PD. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolismo of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science** 93, 4155–4164. 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C.; **Introdução à Bioquímica Veterinária**; Editora da UFRGS; 2ª Edição; p.55, 229-230, 2006.

GRAVENA, C., MATHIAS, P.C., e ASHCROFT, S.J. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. **Journal of Endocrinology**, v.173, n.1, p.73-80. 2002.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n.2, p.T1-T23. 2014.

GUYTON, A.C, HALL J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11th ed. Philadelphia, Elsevier Inc., 2006.

HARVEY, RICHARD A., AND DENISE R. FERRIER. **Bioquímica ilustrada**. 5ª edição, Artmed Editora, 533p., 2015.

LABRECQUE, D R., ABBAS, Z., ANANIA, F. et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v.48, n.6, p. 467-473, 2014.

LAW, K.; BRUNT, E M. Nonalcoholic fatty liver disease. **Clinics in liver disease**, v. 14, n. 4, p. 591-604, 2010.

LU, M., WAN, M., LEAVENS, K F., et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. **Nature medicine**, v.18, n.3, p.388-395. 2012.

MALLETTE, M F.; ALTHOUSE, P M.; CLAGETT, C.O.; **Biochemistry of Plants and Animals**; John Wiley & Sons, Inc; p.387-388; 1960.

MATTMILLER, S.A., CORL, C.M., GANDY, J.C., LOOR, J.J., e SORDILLO, L.M. Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition dairy cattle. **Journal of dairy science**, v.94, n.6, p. 2912-2922. 2011.

NUBER, U., DORLAND, H.A., e BRUCKMAIER, R.M. Effects of butafosfan with or without cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. **Journal of animal physiology and animal nutrition**. v.100, p.146-155.2015.

OIKAWA, S., E OETZEL, G. R. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipodosis. **Journal of dairy science**, v.89, n.8, p.2999-3005. 2006.

OTERO, Y.F., STAFFORD, J.M., e MCGUINNESS, O.P. Pathway-selective insulin resistance and metabolic disease: the importance of nutrient flux. **Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.30, p. 20462-20469. 2014.

PERRY, R. J., SAMUEL, V. T., PETERSEN, K. F., & SHULMAN, G. I. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.510, n.7503, p.84-91. 2014.

PIRES, J. A. A., SOUZA, A. H., E GRUMMER, R. R. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. **Journal of dairy science**, v.90, n.6, p.2735-2744. 2007.

- RAINA, R., GARG, G., SETHI, S. K., SCHREIBER, M. J., & SIMON, J. F. Phosphorus Metabolism. **Journal Nephrology and Therapeutics**, v.3, p.2161-0959. 2012.
- RODRÍGUEZ-ITURBE, B., e GARCÍA, G. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure. **Nephron Clinical Practice**, v.116, n.2, p.c81-c88. 2010.
- SALTIEL, A. R., & KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806. 2001.
- TABELEÃO, V. Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras saudáveis ou com mastite clínica. **Tese**, Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 82p, 2014.
- TANAKA, S., YAMAMOTO, H., NAKAHASHI, O., KAGAWA, T., ISHIGURO, M., MASUDA, M., ... e TAKEDA, E. Dietary phosphate restriction induces hepatic lipid accumulation through dysregulation of cholesterol metabolism in mice. **Nutrition Research**, v.33, n.77, p.586-593. 2013.
- VAN DER STAAY, F. J., DE GROOT, J., VAN REENEN, C. G., HOVING-BOLINK, A. H., SCHUURMAN, T., & SCHMIDT, B. H.. Effects of Butafosfan on salivary cortisol and behavioral response to social stress in piglets¹. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 30(5), 410-416. 2007.
- WHITE, M. F. Insulin signaling in health and disease. **Science**, v.302, n.5651, p.1710-1711. 2003.
- XU, C., SHU, S., XIA, C., WANG, B., & ZHANG, H. Y. Investigation on the Relationship of Insulin Resistance and Ketosis in Dairy Cows. **Journal Veterinary Science and Technology**, v.5, n.162, p.2. 2014.
- YANG, M., SHIMADA, H., KOBAYASHI, T., NIIMOTO, S., & NAKAGAWARA, G. Predicting the viability of grafted livers in rats through a rapid and sensitive metabolic indicator assessed by ³¹P-NMR spectroscopy. **Surgery today**, v.25, n.8, p.Za711-716. 1995.
- YILMAZ, Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, 36(9), 815-823, 2012.

ZACHUT, M., HONIG, H., STRIEM, S., ZICK, Y., BOURA-HALFON, S., e MOALLEM, U. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. **Journal of dairy science**, v.96, n.9, p.5656-5669. 2013.

Anexos

Anexo 1. Resultados da composição bromatológica das rações comercial e hipercalórica utilizadas no experimento.

Descrição	Ração Comercial***	Ração Hipercalórica***
PB	28.11	27.84
FDN	16.35	13.64
FDA	8.66	9.17
Lipídeos (EE)	5.85	13.9
Cinzas	8.41	8.36
Cálcio	1.00	0.98
Fósforo	0.86	0.88
Potássio	1.20	1.21
Magnésio	0.33	0.31
Enxofre	0.30	0.25
CNF	48.99	68.57
Energia bruta (Kcal/Kg)*	3610.50	4681.7

*Cálculo baseado no manual da ANVISA (2005). PB (proteína bruta), FDN (fibra em detergente neutro), FDA (fibra em detergente ácido), EE (extrato etéreo), CNF (carboidratos não fibrosos). ***Os resultados obtidos na análise bromatológica foram corrigidos para 100% de matéria seca.

Anexo 2. Laudo técnico com os resultados da análise bromatológica das rações que foram encaminhadas para laboratório.



Rua Desembargador Paulo Mota, 47
salas 201/202 - Bairro Ouro Preto
Belo Horizonte CEP 31310-340
Email: contato@3rlab.com.br

Relatório de análise de alimento

NUPEEC/UFPEL-MARIA AMELIA 06-1220
AV. ELISEU MACIEL
CAPÃO DO LEÃO, RS 96160-000
5532753176

Técnico
MARIA AMELIA



2 RAÇÃO COMERCIAL 2					
Lab	6-015-131	Amostrado em	30/10/2015	Recebido em	30/10/2015
Fazenda	NUPEEC				
Umidade	24,43%	Matéria Seca	75,57%	%MS	Este alimento
Descrição (%MS)					média (N=2)
					Matéria natural
Proteína Bruta				21,04	23,57
FDN				10,31	12,75
FDA				6,93	7,49
Lipídeos (EE)				10,51	7,97
Cinzas				6,32	7,06
Cálcio				0,74	0,83
Fósforo				0,67	0,74
Potássio				0,92	1,02
Magnésio				0,24	0,28
Enxofre				0,19	0,24
Cálculos					
NDT manutenção (FDA)				78,08	
ELI (FDA) Mcal/kg				1,795	
ELg (FDA) Mcal/kg				1,393	
ELm (FDA) Mcal/kg				2,054	
CNF				51,82	

USA último
60 dias 4 ano



Rua Desembargador Paulo Mota, 47
salas 201/202 - Bairro Ouro Preto
Belo Horizonte CEP 31310-340
Email: contato@3rlab.com.br

Relatório de análise de alimento

NUPEEC/UFPEL-MARIA AMELIA 06-1220
AV. ELISEU MACIEL
CAPÃO DO LEÃO, RS 96160-000
5532753176

Técnico
MARIA AMELIA



1 RAÇÃO COMERCIAL 1					
Lab	6-015-130	Amostrado em	30/10/2015	Recebido em	30/10/2015
Fazenda	NUPEEC				
Umidade	7,17%	Matéria Seca	92,83%	%MS	Este alimento
Descrição (%MS)					média (N=2)
					Matéria natural
Proteína Bruta				26,10	23,57
FDN				15,18	12,75
FDA				8,04	7,49
Lipídeos (EE)				5,43	7,97
Cinzas				7,81	7,06
Cálcio				0,93	0,83
Fósforo				0,80	0,74
Potássio				1,12	1,02
Magnésio				0,31	0,28
Enxofre				0,28	0,24
Cálculos					
NDT manutenção (FDA)				77,55	
ELI (FDA) Mcal/kg				1,782	
ELg (FDA) Mcal/kg				1,376	
ELm (FDA) Mcal/kg				2,034	
CNF				45,48	

USA último
60 dias 4 ano

Comentários

Minerals by ICP
Analyzed by wet chemical methods.

Anexo 3. Comprovante de aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética e experimentação animal.



Pelotas, 29 de setembro de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor Marcio Nunes Corrêa
Departamento de Clínicas Veterinárias da Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Efeito do butafosfan no metabolismo celular, qualidade oocitária e desenvolvimento embrionária**”, processo nº23110.006936/2014-14, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 6936-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2014

Assinatura do Professor Responsável:
