

MARIA IVAMARA SOARES MACEDO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO
MUSCULAR E DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM GRUPOS
GENÉTICOS DE SUÍNOS DIVERGENTES**

TERESINA-PI
MARÇO, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO
MUSCULAR E DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM GRUPOS
GENÉTICOS DE SUÍNOS DIVERGENTES**

MARIA IVAMARA SOARES MACEDO

TERESINA-PI
MARÇO, 2017

MARIA IVAMARA SOARES MACEDO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO
MUSCULAR E DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM GRUPOS
GENÉTICOS DE SUÍNOS DIVERGENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: PhD. Fábio Mendonça Diniz

TERESINA-PI
MARÇO, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M141e Macedo, Maria Ivamara Soares

Expressão diferencial de genes associados ao metabolismo muscular e de deposição de gordura intramuscular em grupos genéticos de suínos divergentes / Maria Ivamara Soares Macedo - 2017.

90 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: PhD. Fábio Mendonça Diniz

1. Desenvolvimento muscular 2. RT-qPCR 3. Genes diferencialmente expresso I.Título

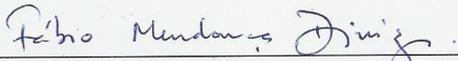
CDD 636.098 673

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ASSOCIADOS AO METABOLISMO MUSCULAR E DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM GRUPOS GENÉTICOS DE SUÍNOS DIVERGENTES

MARIA IVAMARA SOARES MACEDO

Tese Aprovada em: 27/03/2017

Banca Examinadora:



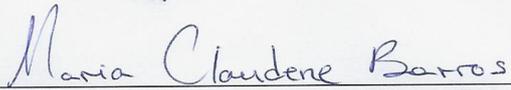
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz (Presidente) / EMBRAPA



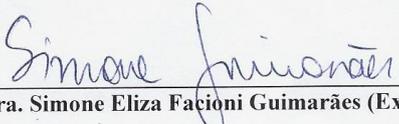
Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo (Interno) / DZO/CCA/UFPI



Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento (Interno) / DZO/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Externa) / UEMA



Profa. Dra. Simone Eliza Facioni Guimarães (Externa) / UFV

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força espiritual, discernimento e positividade em todas as vivências.

Aos meus pais José Ribamar Soares Macedo e Maria do Socorro Soares Macedo, pela educação e amor incondicional, essenciais durante a jornada de Doutorado. Agradeço por cada gesto de amor e confiança. Todo o meu esforço foi sustentado pelo amor de vocês!

Aos meus irmãos José Reismar e José Imar, pela torcida e carinho verdadeiro. Ao sobrinho José Rian, o “Pequenod’ tia” que chegou à família durante o Doutorado nos proporcionando amor puro e alegria. À querida cunhada Gedelane Costa pelo apoio.

Ao orientador Fábio Mendonça Diniz, um dos melhores exemplos de ser humano e profissional que pude conhecer desde o curso de Mestrado. Toda minha gratidão pelo apoio fundamental e disponibilidade em somar durante o curso de Doutorado. Obrigada por tanto!

À Coorientadora Simone Elisa Facioni Guimarães pela oportunidade que me foi dada ao proporcionar que realizasse parte do curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa – UFV, bem como a execução do experimento da pesquisa no Laboratório de Biotecnologia – LABTEC. Grata pela receptividade, ensinamentos técnicos e exemplo de profissionalismo. Muito obrigada, Professora Simone!

À Universidade Federal do Piauí – UFPI e à Coordenação e Docentes do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela realização do curso de Doutorado em Ciência Animal, em especial ao Secretário Luiz pela assistência. À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV, que tornou possível a execução da pesquisa no Laboratório de Biotecnologia – LABTEC, pela oportunidade de cursar disciplinas, cursos e treinamentos, vivências que muito contribuíram para meu amadurecimento profissional.

Aos Professores José Elivalto e Lindenberg Sarmiento, referências na linha de pesquisa Melhoramento Animal da UFPI, pelo apoio, colaboração acadêmica e amizade. Ao amigo Max Brandão pelo apoio e colaboração nas análises estatísticas.

Aos colegas da UFV em especial à amiga Débora Paixão pela amizade e apoio. Aos colegas do LABTEC em especial ao André Mauric, pela parceria científica, Walmir Silva, Margareth Botelho, Cláudia Villaça, Alessandra Silva, Renata Veroneze, Lucas Verardo, Karine Assis, Darlene Duarte e Márcio Duarte. Aos amigos do Melhoramento Animal da UFPI pela amizade e parceria, em especial à Jeane Oliveira, Tatiana Saraiva, Diego Helcias, Aurino Rego, Daniel Biagiotti, Pollyana Oliveira, Luciano Silva, Laylson Borges, Expedito Ulisses, Vanessa Neri, Bruna Lima e Débora Carvalho. Aos amigos de Mestrado, Melina e Tibério Neto.

Aos familiares e aos amigos da cidade natal São Félix do Piauí, pelo carinho e torcida!

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
1 Introdução Geral	111
Capítulo I.....	133
Aspectos genéticos e metabólicos associado ao desenvolvimento muscular e à deposição de gordura intramuscular em suínos	143
Resumo	144
Abstract.....	144
1 Introdução	155
2. Desenvolvimento do músculo esquelético de suínos	166
2.1 <i>Expressão diferencial de genes associados ao metabolismo energético muscular e à deposição de gordura intramuscular em suínos.....</i>	177
3 Análises moleculares relacionadas ao desenvolvimento muscular de suínos.....	198
3.1 <i>Análise de expressão gênica associadas ao desenvolvimento muscular de suínos.....</i>	199
3.2 <i>Métodos de quantificação em análise de expressão gênica</i>	20
4 Controle molecular do metabolismo energético muscular e de gordura intramuscular.....	22
5 Considerações Finais	244
6 Referências	254
Capítulo II.....	29
Perfil da expressão de genes associados à atividade mitocondrial do músculo <i>Longissimus dorsi</i> no período pós-natal de suínos divergentes.....	29
Resumo	30
Abstract	321
1 Introdução	332
2 Metodologia.....	343
3 Resultados	39
4 Discussão	443
5 Conclusão	486
6 Referências	486
Capítulo III.....	520
Perfil da expressão de genes e fator de transcrição associados à deposição de gordura intramuscular no período pós-natal de suínos divergentes	
Resumo	521
Abstract	542
1 Introdução	553
2 Metodologia.....	564
3 Resultados	610
4 Discussão	65
5 Conclusão	68
6 Discussão geral dos resultados.....	69
7 Considerações Finais	731
8 Agradecimentos	742
9 Referências	742
Material Suplementar	76

RESUMO

MACEDO, Maria Ivamara Soares, D. Sc., Universidade Federal do Piauí, Março de 2017. **Expressão diferencial de genes associados ao metabolismo muscular e de deposição de gordura intramuscular em grupos genéticos de suínos divergentes.** Orientador: Fábio Mendonça Diniz.

Com este estudo, objetivou-se analisar a expressão diferencial de genes relacionados com desenvolvimento muscular (ATP6, SDHD, LDHA e LDHB) e deposição de gordura intramuscular (FABP4, PPAR γ e fator de transcrição GATA-2) no músculo de suínos de genéticas divergentes. Para isso foram analisadas amostras de músculo *Longissimus dorsi* por meio do RNA extraído de 32 animais de dois grupos genéticos, sendo 16 suínos naturalizados Piau e 16 suínos da Linhagem Comercial em 4 idades pós-natal: ao nascer, 56, 112 e 156 dias. Foram selecionados dois genes que atuam na vias oxidativa (SDHD e ATP6), dois genes da via glicolítica (LDHA e LDHB) que atuam na função mitocondrial do músculo esquelético, dois genes (FABP4 e PPAR γ) e um fator de transcrição (GATA-2) que atua na função de deposição de gordura intramuscular e diferenciação de adipócitos e um gene referência (GAPDH), analisadas por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) cujos dados foram gerados na forma de valor de Ct (*Cycle threshold*) da amostra. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS®. Observou-se interações entre grupos genéticos e idades para os genes ATP6, SDHD e LDHA. A expressão de ATP6 foi significativamente diferente entre o nascimento e 112 dias em suínos Piau ($P = 0,0022$) e Comercial ($P = 0,0004$), principalmente em suínos comercial, com uma redução aproximada de 380 vezes no nível de expressão. Observou-se variação no nível de expressão do gene ATP6 aos 56 e 156 dias nos suínos Piau quando comparados com os animais comerciais, sendo a expressão do ATP6 100 vezes maior aos 56 dias nos suínos Piau, o que explica a predominância de fibras oxidativas nestes animais. A expressão de SDHD foi significativamente maior entre 56 e 112 dias em comparação ao nascer para os dois grupos genéticos ($P < 0,001$). O gene LDHA foi diferencialmente expresso em todas as idades entre suínos Piau e comerciais, sendo 106 vezes mais expressos do em animais comerciais, o que possivelmente explica a predominância de fibras glicolíticas em nesses animais. Em síntese, houve alterações nos níveis de expressão de mRNA dos genes ATP6 e LDHA, envolvidos na atividade mitocondrial do metabolismo energético muscular entre as diferentes idades e entre os grupos genéticos de suínos e o perfil de expressão do gene SDHD indica alterações no período pós-natal mas não aponta diferenças genéticas entre os suínos divergentes. As

diferenças dos níveis de expressão quantificados pelos níveis de mRNA dos genes ATP6, e LDHA em diferentes idades pós-natal indicam respostas biológicas diferentes com implicações diretas no desenvolvimento muscular de suínos. O gene FABP4 apresentou diferenças significativas de expressão, sendo a variação de expressão entre o nascimento ($P=0,014$) e 56 dias ($P=0,0023$), respectivamente 43 e 66 vezes mais expressos, em suínos Piau do que em animais Comercial. Houve efeito de interação entre grupo genético e idades analisadas ($P=0,0023$) com um aumento no nível de expressão no contrastes 56 e 112 dias sendo 46 vezes mais expresso. Foi observado entre as idades variação no nível de expressão do gene PPAR γ nos contrastes idades ao nascer e 56 dias ($P = 0,0217$), idade ao nascer e 112 dias ($P=0,0483$) e 156 dias ($P=0,0063$) sendo 12 vezes a maior diferença de expressão entre idade ao nascer e 112 dias de idade ($P=0,0483$). O fator de transcrição GATA-2 apresentou-se diferencialmente expresso entre os grupos genéticos aos 112 dias de idade ($P=0,044$) em suínos Piau com expressão de oito vezes mais do que em suínos Comercial. Houve efeito de interação entre grupo genético e idade dos suínos ($P<,0001$) demonstrando variação na proporção de expressão do gene GATA-2 cada idade de abate em suínos Piau e comercial. Já nos suínos comercial ($P<,0001$) houve aumento no nível de expressão muito mais evidente entre os 56 e 112 dias 414 vezes mais expresso do que em suínos Piau. As diferenças dos níveis de expressão quantificados pelos níveis de mRNA dos genes FABP4, PPAR γ e fator de transcrição GATA-2 em diferentes idades pós-natal indicam respostas biológicas diferentes com implicações associadas ao acúmulo de gordura intramuscular em suínos, um dos fatores envolvidos na qualidade de carne suína.

Palavras – chaves: Desenvolvimento muscular; RT-qPCR; Genes diferencialmente expressos.

ABSTRACT

MACEDO, Maria Ivamara Soares, D. Sc., Universidade Federal do Piauí, Março de 2017. **Differential expression of genes associated with muscle metabolism and intramuscular fat deposition in genetic groups of divergent pigs.** Orientador: Fábio Mendonça Diniz.

The aim of this study was to analyze the differential expression of genes related to muscle development (ATP6, SDHD, LDHA and LDHB) and deposition of intramuscular fat (FABP4, PPAR γ and GATA-2 transcription factor) in the *Longissimus* muscle of divergent pigs. Samples of *Longissimus dorsi* muscle were analyzed by RNA extracted from 32 animals divided into two genetic groups. From each group 16 animals were slaughtered at 4 postnatal ages: at birth, 56, 112, and 156 days. We selected: two genes which act on oxidative pathways (SDHD and ATP6); two genes of the glycolytic pathway (LDHA and LDHB) which act on skeletal muscle mitochondrial function; two genes (FABP4 and PPAR γ), and a transcription factor (GATA-2) which act on deposition of intramuscular fat and adipocyte differentiation; and a reference gene (GAPDH). These genes and transcription factor were analyzed by means of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), so that data were generated as sample Ct value. Subsequently, such data were analyzed by using the SAS[®] macro %QPCR_MIXED. Interactions between genetic groups and ages were observed for ATP6, SDHD, and LDHA genes. Expression of ATP6 was significantly different between birth and 112 days of age in Piau (P = 0.0022), and Commercial (P = 0.0004) pigs. The expression level decreased 380 fold for Commercial pigs. Variation in expression level of ATP6 gene at 56 and 156 days of age was observed in Piau pigs when comparing to commercial animals. Expression of ATP6 was 100 fold higher at 56 days in Piau pigs, so that this explains the predominance of oxidative fibers in these animals. When comparing to birth, the expression of SDHD was significantly higher between 56 and 112 days of age for the two genetic groups (P <0.001). LDHA gene was differentially expressed between Piau and commercial pigs at all ages in study, so that this gene was 106 fold more expressed in commercial pigs. This result probably explains the predominance of glycolytic fibers in these animals. In summary, alterations occurred in mRNA expression levels of ATP6, SDHD, and LDHA genes, which are involved in muscle energetic metabolism mitochondrial activity at different ages and in different genetic groups of pigs. Differences in expression levels quantified by mRNA levels of ATP6, SDHD, and LDHA genes at different postnatal ages indicate different biological responses with direct implications on muscle development of

pigs. Significant expression differences were observed for FABP4 gene, so that the expression variation between birth ($P = 0.014$) and 56 days of age ($P = 0.0023$) was 43 and 66 fold more expressed in Piau pigs than in Commercial pigs, respectively. Interaction effect between genetic groups and within the analyzed ages was observed ($P = 0.0023$). An increase in expression level in the contrast 56 and 112 days of age was 46 fold more expressed. Variation was observed in the expression level of PPAR γ in the contrasts age at birth and 56 days ($P = 0.0217$), 112 days ($P = 0.0483$), and 156 days ($P = 0.0063$). The highest expression difference (12 fold) was observed between age at birth and 112 days of age ($P = 0.0483$). GATA-2 transcription factor was differentially expressed between genetic groups at 112 days of age ($P = 0.044$) in Piau pigs, with expression eight fold higher than in Commercial pigs. Interaction effect was observed between genetic group and age of pigs ($P < 0.0001$), showing variation in proportion of GATA-2 gene expression at each slaughter age in Piau and Commercial pigs. Between 56 and 112 days of age, the increase in expression level was much more expressive (414 fold) in Commercial pigs than in Piau pigs. Differences in expression levels quantified by mRNA levels of FABP4, PPAR γ genes, and transcription factor GATA-2 at different postnatal ages indicate different biological responses with implications associated with intramuscular fat accumulation in pigs, which is one factor involved in pork quality.

Keywords: differentially expressed genes; muscle development; RT-qPCR.

1 Introdução Geral

O crescimento e o desenvolvimento do músculo esquelético afetam diretamente a quantidade e a qualidade da produção de suínos (ZHAO *et al.*, 2015). Associado a isso, o teor de gordura intramuscular é importante para muitos parâmetros de qualidade da carne (LIU *et al.*, 2009). Assim, a dinâmica do crescimento muscular, bem como o potencial de deposição de gordura intramuscular são características de grande interesse para a produção de suínos, pois alteram a quantidade e a qualidade de carne.

Nesse sentido, destacam-se que os fatores genéticos, em particular as raças ou linhagens suínas, estão entre os fatores que influenciam o desenvolvimento muscular e deposição de gordura, as quais são características influenciadas diretamente por genes. Com base nisso, considera-se que a dinâmica do crescimento muscular e de deposição de gordura intramuscular apresentam diferenças fisiológicas que podem ser verificadas pelo perfil de expressão gênica, uma vez que diferenças de expressão de genes associados a essas características podem indicar alterações fisiológicas envolvidas no crescimento muscular e em mecanismos de acúmulo de gordura em suínos, os quais são analisados nesse estudo suínos da Raça Local Piau e suínos da Linhagem Comercial.

Convém ressaltar, que suínos de Linhagem Comercial ao longo das últimas décadas, têm sido intensamente selecionados para crescimento rápido do músculo, o que pode ter ocasionado queda da qualidade organoléptica da carne. Em contraste aos suínos da Linhagem Comercial, os suínos da Raça local brasileira Piau apresentam grande diversidade genética e caracterizam-se por lenta taxa de crescimento, maior deposição de gordura e carne com maior qualidade organoléptica (SOLLERO *et al.*, 2009; SERÃO *et al.*, 2011).

Diante dessas considerações, acredita-se que o estudo de expressão gênica utilizando genes atuantes na capacidade oxidativa-glicolítica do metabolismo energético muscular e de genes envolvidos com a deposição de gordura intramuscular possam preencher lacunas na compreensão de funções biológicas sobre a utilização de ATP em músculo *pos* mortem, mecanismos que levam ao acúmulo de gordura intramuscular e poderá indicar alterações no metabolismos glicolítico e oxidativo em suínos divergentes.

Tendo em vista a relação entre a fisiologia e o metabolismo do desenvolvimento muscular com teor de gordura no músculo esquelético e pelo fato de essas características estarem sob controle genético, faz-se necessário conhecer melhor o padrão de expressão de genes envolvidos no metabolismo energético muscular e no potencial de deposição de gordura

intramuscular, dada a capacidade de diferenciação na expressão de mRNA (RNA mensageiro) direcionar alterações nas funções fisiológicas do animal.

Para comparação dos níveis de mRNA e confirmação de padrões de expressão gênica, ferramentas de genética molecular têm contribuído para o entendimento de variações de expressão gênica para características de interesse econômico. Dessas ferramentas, menciona-se o método de transcrição reversa baseado na técnica RT-qPCR (Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real) que possibilita analisar genes diferencialmente expressos com alta confiabilidade (WANG *et al.*, 2010).

Assim como este trabalho, estudos voltados para tecido muscular em suínos vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, os quais já descreveram expressão de nove genes com diferentes funções no músculo suíno que foram correlacionados com gordura intramuscular (SERÃO *et al.*, 2010), e polimorfismo de base única associados no gene da leptina associado a características econômicas e deposição de gordura (PEIXOTO *et al.*, 2009).

Recentemente, um estudo em via de publicação analisou a relação do padrão da expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina de diferentes grupos genéticos e idades de abate de suínos com tipos de fibras musculares e qualidade final da carne. No entanto, para relação entre funções biológicas da atividade mitocondrial e capacidade de deposição de gordura ainda não há estudos de expressão gênica associados a suínos da raça local Piau com suínos geneticamente divergentes. Por essas razões, objetivou-se analisar a expressão diferencial de genes relacionados ao desenvolvimento muscular (ATP6, SDHD, LDHA e LDHB) e à deposição de gordura intramuscular (FABP4, PPAR γ e fator de transcrição GATA-2) no músculo *Longissimus* de suíno de grupos genéticos divergentes.

Este estudo está organizado em três capítulos, que apresentam relação entre a dinâmica do crescimento muscular com deposição de gordura intramuscular, a fim de compreender vias biológicas e suas variações relacionadas à fisiologia do acúmulo de gordura intramuscular e ao crescimento muscular. O primeiro capítulo consiste em uma revisão de literatura acerca dos aspectos genéticos e metabólicos associados ao desenvolvimento muscular e à deposição de gordura intramuscular. O segundo capítulo trata da expressão diferencial de genes associados à atividade mitocondrial do metabolismo energético muscular e o terceiro capítulo consiste na análise do perfil de expressão de genes envolvidos na dinâmica da deposição de gordura intramuscular de suínos de grupos genéticos divergentes.

Capítulo I

Aspectos genéticos e metabólicos associados ao desenvolvimento muscular e à deposição de gordura intramuscular em suínos

Aspectos genéticos e metabólicos associados ao desenvolvimento muscular e à deposição de gordura intramuscular em suínos

Genetic and metabolic aspects associated with muscle development and intramuscular fat deposition in pigs

Maria Ivamara Soares Macedo; André Mauric Frossard Ribeiro; Fábio Mendonça Diniz; Simone Eliza Facioni Guimarães.

Resumo

A dinâmica de crescimento muscular de suínos é relevante, uma vez que geralmente está associado a características que podem ser influenciadas diretamente por genes. Para esse tipo de estudo, as ferramentas moleculares tem contribuído substancialmente para o entendimento da dinâmica dos processos metabólicos ligados à conversão do músculo em carne além da relação com o potencial de deposição e gordura intramuscular. Ressalta-se a necessidade de combinar informações de estudos de expressão gênica em suínos, bem como abordar atividades de grande importância que caracterizem geneticamente os mecanismos biológicos relacionados com a fisiologia muscular e a capacidade de deposição de gordura intramuscular. Assim, objetiva-se com essa revisão descrever alguns aspectos genéticos e metabólicos associados aos mecanismos responsáveis pela qualidade final de carne, bem como enfatizar a dinâmica do desenvolvimento muscular e capacidade de deposição de gordura intramuscular com base nas descrições de análises moleculares comparativas em suínos.

Palavras-chave: Genética Molecular; Expressão Gênica; Metabolismo Muscular; Gordura.

Abstract

The dynamics of pig muscle growth is relevant, since it is usually associated with features that can be influenced directly by genes. For this type of study, the tools of molecular genetics has contributed substantially to the understanding of the dynamics of the metabolic processes linked to conversion in muscle meat in addition to the relationship with the potential and intramuscular fat deposition. Stresses the need to combine information from gene expression studies in pigs, as well as address activities of great importance that characterized genetically the biological mechanisms related to muscle Physiology and the ability of intramuscular fat deposition. So, the goal is with this review to describe genetic and metabolic aspects associated with the mechanisms responsible for the final quality of meat, as well as emphasize

the dynamics of muscular development and intramuscular fat deposition capacity on the basis of descriptions of comparative molecular analysis in pigs.

Keywords: Genetics; Muscle Metabolism; Fat.

1 Introdução

A seleção para a eficiência da produção de carne e qualidade da carne são duas características de grande importância na cadeia produtiva de suínos. A compreensão do mecanismo de desenvolvimento muscular entre raças selecionadas e não selecionadas, que apresentem grandes diferenças nas características de qualidade de carne pode ser útil para elucidar processos biológicos subjacentes ao desenvolvimento da qualidade da carne (DAMON *et al.*, 2012).

Nessa perspectiva, muitas pesquisas têm enfatizado aspectos genéticos e metabólicos voltados para a melhoria da eficiência da produção animal ampliando o entendimento de processos biológicos e vias moleculares associadas com crescimento e desenvolvimento muscular e deposição de gordura intramuscular em suínos (WU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; ROS-FREIXEDES *et al.*, 2016).

Diante dessa realidade, a dinâmica de crescimento muscular de suínos é relevante, uma vez que geralmente está associado a características que podem ser influenciadas diretamente por genes. Para esse tipo de estudo, ferramentas moleculares têm contribuído para melhor entendimento da dinâmica dos processos biológicos ligados ao desenvolvimento muscular e à deposição de gordura intramuscular, como por exemplo, estudo de expressão gênica que permite analisar alterações no padrão de expressão gênica direcionam a composição do mRNA (LIU *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2015).

Por esses aspectos, ressalta-se a necessidade de combinar informações de estudos de expressão gênica em suínos, bem como abordar funções e mecanismos biológicos entre genética e fisiologia muscular. Assim, objetiva-se com esta revisão descrever alguns aspectos genéticos e biológicos associados à atividade metabólica muscular e deposição de gordura intramuscular de suínos, bem como enfatizar a dinâmica do desenvolvimento muscular e sua relação com a produção de gordura em suínos.

2 Desenvolvimento do músculo esquelético de suínos

Nas últimas décadas, o objetivo principal da criação de suínos tem sido melhorar a taxa de crescimento e musculosidade dos suínos (KANIS *et al.*, 2005). O crescimento pós-natal do músculo esquelético é realizado principalmente através de aumentos no comprimento e perímetro das fibras musculares, mas não por aumentos no número de fibras musculares.

Genericamente, o músculo esquelético é composto, em grande parte, por fibras musculares estriadas que diferem entre si e assumem funções específicas. A classificação das fibras musculares passa então pelas suas propriedades contrácteis e metabólicas, variando seu diâmetro entre 10 e 100 μm e o volume de fibra muscular que ocupam varia entre 75 % e 90 % (LEFAUCHEUR, 2010). Apesar do controle molecular do desenvolvimento muscular ser complexo, é possível observar diferenças no crescimento do tecido muscular esquelético dependendo da genética do animal (ZHAO *et al.*, 2011). Por conseguinte, a comparação entre grupos genéticos divergentes pode fornecer informações relevantes sobre os fatores genéticos envolvidos na regulação da dinâmica muscular de suínos.

Em suínos, o tipo metabólico das fibras é o principal fator determinante para o conteúdo dos seus músculos em fosfolipídios e colesterol (LESEIGNEUR-MEYNIER; GANDEMER, 1991). Estes aparecem numa proporção mais elevada nas fibras oxidativas devido à maior quantidade de mitocôndrias presente nestas (RAES, DE SMET; DEMEYER, 2004), assim como pela maior quantidade de fosfolipídios constituintes das membranas celulares (CHIZZOLINI *et al.*, 1999).

As fibras musculares são divididas em diferentes tipos, dependendo da isoforma da miosina de cadeia pesada MHC (*myosin heavy chain*), que nelas se expressam. Não somente a MHC, mas também as isoformas MYL (*myosin, light chain*), troponina (TNNT) e tropomiosina (TPM) podem influenciar as características de fibras musculares e, consequentemente, a qualidade da carne (CHOI *et al.*, 2008). Diversos estudos têm se concentrado na caracterização de diferenças de expressão entre os tipos de fibras musculares vermelhas e brancas em suínos (BAI *et al.*, 2003; DA COSTA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2010). Estes tipos de fibras musculares diferem no número de fibras glicolíticas e oxidantes. Músculos de fibra vermelha ou altamente oxidativas são mais ricos em fibras oxidativas de contração lenta e têm maior concentração lipídica, que é constantemente associada com carne mais macia (CHANG, 2007).

De modo geral, em ambas as fibras musculares, há expressão de genes envolvidos em processos de geração de ATP com as funções oxidativas e glicolíticas particularmente ativadas em músculos de fibras vermelhas e brancas (PENA *et al.*, 2014). Diferenças de concentrações de miRNAs entre fibras oxidativas (predominantemente vermelhas) e fibras glicolíticas (predominantemente brancas) foram descritas por Liu *et al.* (2013). Após sequenciamento, um total de 80 e 256 miRNA foram especificamente expressos no músculo branco e nos músculos de fibras vermelhas, respectivamente.

2.1 Expressão diferencial de genes associadas ao metabolismo energético muscular e à deposição de gordura intramuscular em suínos

Fatores genéticos desempenham importante papel nas diferenças de expressão gênica entre tipos divergentes de suínos, e um desses fatores podem ser mutações, tanto na codificação ou regiões reguladoras (CHALUPOVÁ *et al.*, 2014). Divergências genéticas entre músculos de suínos comerciais e naturalizados brasileiros têm sido descritas por meio da avaliação do perfil transcricional e conseqüentemente a expressão gênica (SOLLERO *et al.*, 2011; VERARDO *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012; WELLER *et al.*, 2013). Há diferenças genéticas e fenotípicas entre a raça Piau e suínos de linhagem Comercial (VERARDO *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012; SOLLERO *et al.*, 2011; GUIMARÃES; LOPES, 2001).

Nesse sentido, o estudo simultâneo de parâmetros genéticos/moleculares destes dois grupos de suínos permite uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos tanto no metabolismo do tecido muscular esquelético como no metabolismo de gordura intramuscular. Suínos localmente adaptados no Brasil apresentam um patrimônio genético com uma diversidade muitas vezes superior às raças comerciais (SOLLERO *et al.*, 2009). Suínos da raça Piau, por exemplo, nunca participaram de um programa de melhoramento animal e, por isso, espera-se que animais desta raça apresentem um alto nível de gordura do que animais da linha comercial (SERAO *et al.*, 2011), que apresentam maior quantidade de músculo.

Diferenças genéticas entre suínos também foram reportadas no estudo de Wu *et al.* (2008). Os autores relataram expressão diferencial da ENO3 (*Enolase*) no músculo

esquelético de suínos *Yorkshire* x *Meishan* e encontraram um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associado a diferentes características de carcaça e qualidade de carne.

De acordo com Zhao *et al.* (2011), compreender a dinâmica do transcriptoma muscular durante o desenvolvimento e a diferença entre raças no crescimento muscular é necessário para desvendar o complexo mecanismo associado ao desenvolvimento muscular. Os autores constataram diferenças de desenvolvimento muscular ao estudar as raças de suínos Lantang e Landrace em 10 diferentes idades de desenvolvimento muscular (pré e pós-natal). Os autores observaram por meio de diferenças de expressão entre genes associados à miogênese em duas raças, que estes foram mais expressos em Lantang em comparação ao Landrace. Contudo, a expressão mais tardia em Landrace, em relação Lantang, poderia estar relacionada ao maior número de fibras musculares em suínos Lantang em relação aos suínos Landrace.

Em estudo comparativo entre a raça local Piau e suínos comerciais Duroc e Landrace foi demonstrado alta expressão de EST envolvidas no metabolismo energético e na fosforilação oxidativa (NADH-desidrogenase, cytochrome oxidase e citocromo c redutase) no músculo esquelético de Piau comparado com as raças comerciais (Duroc e Landrace) (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Em termos de desenvolvimento muscular, essas diferenças de expressão podem explicar o contraste fenotípico entre essas raças, visto que a raça comercial Landrace é caracterizada principalmente por alta porcentagem de carne magra e rápido crescimento muscular (ZHAO *et al.*, 2011), enquanto que a raça local Piau caracteriza-se por lenta taxa de crescimento e grande deposição de gordura (SOLLERO *et al.*, 2009; SOLLERO *et al.*, 2011).

De acordo com Ryu *et al.* (2008), há diferenças na composição das fibras musculares e na qualidade da carne de suínos conforme a raça. Aumentar a gordura intramuscular ou de marmoreio em animais comerciais é uma estratégia para melhorar a qualidade da carne em suínos. No entanto, os mecanismos que levam ao acúmulo diferencial de lipídios nos depósitos de gordura visceral, subcutânea, intermuscular e intramuscular permanecem obscuros (DODSON *et al.*, 2010). Destaca-se ainda que, o número e o tipo de fibras do músculo estão relacionados com características de qualidade da carne e genéticas com mais fibras musculares apresentam menor taxa de gordura intramuscular, carne mais clara e menor capacidade de retenção de água (BOROSKY *et al.*, 2011).

3 Análises moleculares relacionadas ao desenvolvimento muscular de suínos

Para fins de produção animal e auxílios em programas de melhoramento genético, o maior interesse da genética molecular é a identificação de sequências codificadoras, responsáveis por uma função particular, ou um fenótipo específico, ou unidades de transcrição do DNA que sejam associada a características expressas em um órgão ou tecido. Assim, o maior desafio é a compreensão de quais genes são transcritos e traduzidos em produtos proteicos e como esses mecanismos são regulados. Algumas proteínas são expressas ou no tecido muscular ou no tecido adiposo, dispendo de comprovada influência em características de interesse para o consumidor (HOUDEBINE, 2002).

Nesse contexto, genes funcionais mostram diferenças molecular e mecanismos de desenvolvimento do músculo entre suínos comerciais *Tongcheng* e *Yorkshire* em análise de perfis dinâmicos do transcriptoma do tecido muscular. Suínos *Tongcheng* apresentam crescimento muscular e regulação genética mais lenta e mais complexa que suínos *Yorkshire* (ZHAO *et al.*, 2015). Várias pesquisas do transcriptoma de diferentes tecidos têm sido realizadas em seres humanos e em espécies modelo (MORTAZAVI *et al.*, 2008; TOUNG *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2008; WELLER *et al.*, 2013) e vêm crescendo entre as espécies de interesse econômico e social. O conhecimento acerca dos padrões de expressão dos genes deve fornecer um melhor entendimento dos complexos sistemas regulatórios e permite a identificação de genes relevantes para novos processos biológicos (ALMEIDA *et al.*, 2010).

3.1 Análise de expressão gênica associadas ao desenvolvimento muscular de suínos

Nos suínos, o músculo esquelético é um dos tecidos-alvo para o isolamento de genes que possuem efeitos em importantes características de desempenho e qualidade de carne (DAVOLI *et al.*, 2002; FONTANESI *et al.*, 2003). Este fato se justifica, por exemplo, pela relação entre genes expressos, miogênese e características da fibra muscular (HOUBA e TE PAS, 2004). Simultaneamente, o conhecimento dos transcritos de RNA obtidos a partir da musculatura dos suínos, ajuda a explicar as variações frequentemente encontradas em características de qualidade de carne avaliadas *post-mortem* (HOUBA e TE PAS, 2004).

Avanços tecnológicos que permitem caracterização detalhada, quantitativa e rápida dos transcriptomas de células e tecidos é um passo crítico em direção ao entendimento das propriedades funcionais dos RNAs (BLENCOWE *et al.*, 2009). A complexidade genética implícita ao desenvolvimento muscular de suínos permanece apenas parcialmente compreendida. Do ponto de vista da produção animal, transcriptomas musculares têm sido investigados em relação ao crescimento muscular, características de carcaça e qualidade de carne (PENA *et al.*, 2014).

Genes diferencialmente expressos mostram diferenças de expressão específicas da raça e esse tipo de estudo fornece uma melhor compreensão das diferenças de desenvolvimento do músculo esquelético e informações valiosas para melhorar a qualidade da carne suína (ZHAO *et al.*, 2015). Comparativamente, análises de expressão gênica e identificação de Genes Diferencialmente Expressos (DEG) entre três raças de suínos (*Duroc*, *Large White* e raça local Piau) foram aplicadas com uso de bibliotecas de etiquetas de sequências expressas – EST (*Expressed Sequence Tags*) e identificados 34 genes diferencialmente expressos, dos quais 21 são agrupados em uma rede gênica relacionada ao desenvolvimento muscular de suínos (VERARDO *et al.*, 2012). O estudo seguiu com análises em qPCR (*quantitative PCR*) durante as fases de pré e pós-natal (21, 40, 70 e 90 e 107, 121 e 171 dias pós-parto) de suínos de linhagem comercial e raça local Piau. O perfil de expressão aferido de 13 genes revelou expressão elevada na geração pré-natal. Além disso, foram listados possíveis novos genes (TP53 - *Tumor Protein p53* e DCTN1 - *Dynactin subunit 1*) associados ao desenvolvimento muscular de suínos. Assim, estudos dessa natureza contribuem para elucidar mecanismos das funções biológicas de genes, e possibilita identificar fatores fisiológicos associados ao desenvolvimento muscular no período pós-natal de suínos.

Ao analisar genes diferentemente expressos (DEG) em *Longissimus dorsi* de suínos cruzados *Yorkshire –Landrace* (YL) e suíno Piau nas idades pré natais (dpc) 40 e 70, Sollero *et al.* (2011) verificaram que os perfis de transcrição associados ao desenvolvimento muscular entre os animais Piau e YL foram na sua maioria semelhantes, embora tenham identificado um padrão raça-específica para alguns genes. Além disso, os autores encontraram uma abundância relativa de transcritos com base na intensidade de fluorescência que tendeu a ser maior para suíno Piau a 70 dpc, o que sugere que a expressão desses transcritos no *Longissimus dorsi* de YL poderia ser mais tardia do que em suínos Piau.

Por esses aspectos, destaca-se a importância da visão global que análises de expressão gênica fornece acerca da compreensão de mudanças temporais e espaciais na atividade gênica durante o desenvolvimento celular e diferenciação, contribuindo substancialmente para a identificação de genes específicos ou de expressão diferenciada (COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010).

3.2 Métodos de quantificação em análise de expressão gênica

Para quantificação dos níveis de transcritos de mRNA, o método RT-qPCR quantitativo em tempo real é eficiente devido à sua acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade (NYGARD *et al.*, 2007). A clareza de uso da técnica da transcrição reversa, seguida pela reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) somada à eficácia desta técnica na amplificação e quantificação de baixos níveis de ácidos nucleicos tem impulsionado inúmeras aplicações (BUSTIN, 2010).

O método de transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é uma das metodologias mais utilizadas para investigação da expressão gênica em laboratórios de biotecnologia (ALVARES, 2001). Esta técnica consiste na síntese de um DNA complementar (cDNA) a partir de um RNA-molde, por meio da enzima *Transcriptase Reversa*. Para isso, o cDNA sintetizado é então amplificado exponencialmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e pode ser facilmente detectado. A detecção de qualquer marcador tecido específico por RT-PCR requer a determinação de sua sequência gênica, sendo o método mais sensível para detecção de mRNA (ou RNA total) em pequena quantidade, a partir de amostras limitadas de tecido (VALASEK e REPA, 2005).

Na qPCR as curvas de amplificação são mostradas graficamente em tempo real pelo *software*, para auxiliar na determinação do ciclo no qual a fluorescência alcança o “limiar” (*Threshold cycle* ou CT). Durante a amplificação, quanto mais rápido o sinal fluorescente alcança o CT na fase exponencial da reação, maior é a quantidade da sequência-alvo na amostra original, permitindo, deste modo, a quantificação (VALASEK e REPA, 2005). O valor do CT é inversamente proporcional à quantidade de sequências específicas de ácidos nucleicos contidas na amostra inicial. Tanto a quantificação relativa quanto a absoluta da expressão gênica utilizam o valor do CT para quantificar o cDNA e, conseqüentemente para determinar a expressão gênica.

4 Controle molecular do metabolismo energético muscular e de gordura intramuscular

O metabolismo energético *post mortem* desempenha um papel crucial na transformação do tecido vivo, músculo, carne em uma fonte de alimento de melhor qualidade. A proporção e a extensão de glicólise *post mortem* têm um profundo efeito sobre o metabolismo da qualidade final da carne (FERGUSON; GERRARD, 2014). Há relatos demonstrando relação entre propriedades do metabolismo oxidativo com teor de gordura intramuscular, sugerindo que músculos esqueléticos com maior teor de gordura também são mais oxidativos (HOCQUETTE *et al.*, 1998; CHARTRIN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008).

A via glicolítica é uma importante rota da conversão da glicose em lipídios, que junto com a lipogênese têm sido uma importante via para análise de conteúdo de gordura em suínos (MOUROT *et al.*, 1999). Em suínos, observa-se que animais com alta deposição de gordura apresentaram menor número de fibras musculares, mais gordura na carcaça e crescem com menor eficiência quando comparados com animais de peso normal e magros. Com base nisso, a deposição de gordura parece estar inversamente correlacionada com o número total de fibras musculares. Nesse contexto, foram encontradas diferenças de teor de enzimas glicolíticas no nível de proteína por Liu *et al* (2009), evidenciando-se que a via glicolítica é importante nas primeiras rotas de conversão de glicose em lipídios.

Na literatura ainda se encontram análises comparativas entre populações de suínos comercial de diferentes fenótipos musculares para análise da deposição de gordura intramuscular em *longissimus dorsi* desenvolvidos por Liu *et al.* (2009), Canovas *et al.* (2010) e Hamil *et al.* (2012), em que destacam o papel proeminente das enzimas glicolíticas na deposição de gordura intramuscular. Nos três estudos foram revelados uma tendência geral dessas enzimas em promover a lipogênese pela redução da lipólise em suínos com maior deposição de gordura intramuscular.

Alguns genes disponíveis no *GenBank* para características de produção em suínos atuam na atividade metabólica muscular e deposição de gordura intramuscular em suínos, dentre eles os genes ATP6 (ATP sintase), SDHD (complexo succinato desidrogenase, subunidade D) envolvidos na via oxidativa da atividade mitocondrial do tecido muscular; os genes LDHA (Lactato Desidrogenase A) e LDHB (Lactato Desidrogenase B) que atuam na via glicolítica do metabolismo mitocondrial, e os genes associados a produção de gordura intramuscular PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*), FABP4 (*Adipose Fatty*

Acids Binding Protein) e o fator de transcrição GATA-2 (Fator de transcrição GATA 2), que atua como regulador do metabolismo lipídico e com produção de proteínas envolvidas no crescimento muscular..

A ATP sintase é uma enzima envolvida na fosforilação oxidativa de células eucarióticas. Em mamíferos a ATP sintase é essencial e compreende pelo menos 16 subunidades, a partir do qual o ATP6 é codificador mitocondrial, (DI ROCCO *et al.*, 2009). O gene SDHD é considerado um gene candidato em potencial para as características de produção e está envolvido com características produtivas de suínos devido ao importante papel no complexo SDHD no processo de respiração aeróbia (GUIMARÃES *et al.*, 2007). Ainda em relação à função mitocondrial, enzimas de LDH são abundantes em fibras glicolíticas no músculo esquelético branco e reduzem piruvato em lactato (DRAOUI; FERON, 2011). A lactato desidrogenase A (LDHA) é uma das enzimas metabólicas essenciais para a glicólise no músculo esquelético (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). O gene LDHB também atua em fibras glicolíticas no músculo esquelético branco, como referem Draoui e Feron (2011).

Dentre os efeitos biológicos, o gene PPAR γ que atua como principal regulador do metabolismo lipídico, tem a importante função de permitir a liberação dos ácidos graxos das proteínas transportadoras e promover sua captação celular. Além da captação, o PPAR γ promove a armazenagem lipídica no tecido adiposo, onde regula a diferenciação dos adipócitos e síntese de ácidos graxos através do controle da expressão de enzimas lipogênicas, tais como SCD1 (WAY *et al.*, 2001; RISERUS *et al.*, 2005), a esterificação de ácidos graxos nos triglicerídeos, pela regulação direta da glicerol quinase.

Proteínas de ligação de ácido graxo (FABP4) são pequenos polipeptídeos intracelulares encontrados em muitos tecidos, estão envolvidos na transferência e metabolismo de ácidos graxos e são codificados por vários genes, a família multigênica FABP (Gomez *et al.*, 2007). O gene FABP4 é expresso na maioria das espécies de mamíferos, inclusive em suínos (LI; ZERBY; LEE, 2007; STEJSKAL; KARPISIK, 2006). Este gene tem sido amplamente utilizado como marcador no tecido adiposo e de adipócitos em estudos sobre o desenvolvimento de adipócitos em animais destinados à produção, como suínos (CHAVEY *et al.*, 2001; LI; SHIN; LEE, 2009).

O perfil comparativo entre grupos genéticos bem como a função das enzimas ATP sintase (ATP6), *Succinato Desidrogenase* (SDHD) e Proteína de Ligação de ácidos Graxos (FABP4) são associados a mecanismos bioquímicos entre os quais estão substancialmente

envolvidos na dinâmica do metabolismo energético e capacidade de deposição de gordura. Esse processo ocorre pela ativação da proteína desacopladora (UCP-1) localizada na membrana mitocondrial interna que, pela dissipação do gradiente de próton da membrana interna da mitocôndria desacopla a fosforilação oxidativa da síntese de ATP, produzindo apenas calor durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs desviando os prótons do complexo F1F0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, dissipando-se em calor toda a energia estocada na mitocôndria (CANNON; HEDERGAARD, 2004).

Os autores ainda destacam que a enzima ATP-sintase promove o retorno dos H^+ à matriz e usa a energia liberada do potencial protônico para fosforilar o ADP. As UCPs constituem um subgrupo das proteínas carreadoras mitocondriais que estão localizadas na membrana mitocondrial interna. Por meio da dissipação do gradiente de próton, elas desacoplam a fosforilação oxidativa e convertem combustível em calor (DEPIERI *et al.*, 2004). As proteínas ligantes de ácidos graxos se unem aos triglicerídeos, no citosol e, similarmente ao adipócito branco, o adipócito marrom possui a forma de proteína ligante de ácidos graxos, codificada pelo gene FABP4, em altos níveis em ambiente mitocondrial, os ácidos graxos funcionam como substrato para a termogênese e regulam o funcionamento da UCP-1 (DEPIERI *et al.*, 2004).

Vários genes que controlam as fases iniciais da adipogênese permanecem em grande parte desconhecida, como por exemplo, a atuação do fator de transcrição GATA-2, que apresenta expressão constitutiva e suprimida pela diferenciação de adipócitos e células aprisionadas na fase de pré adipócitos e está associado com processos biológicos do crescimento muscular. Destaca-se que o efeito da diferenciação de adipócitos é mediado, pelo menos em parte, através da supressão direta de PPAR γ e o gene GATA 2 atua na regulação da diferenciação de adipócitos através do controle molecular da transição de pré adipócitos-adipócito (TONG *et al.*, 2000).

5 Considerações finais

A análise de expressão gênica em músculos de suínos é investigada a fim de se obter melhor entendimento das características bioquímicas do tecido muscular esquelético, que influenciam a produção de carne. Diante das alterações na expressão gênica pode-se indicar possíveis alterações fisiológicas, que devem ser somadas ao entendimento das consequências

metabólicas de alterações na síntese de mRNA e proteínas. Diante disso, é fundamental a aplicação dos estudos impulsionados por técnicas moleculares, bem como a integração dos conhecimentos disponíveis de metabolismos, expressão gênica, genômica e nutrigenômica, com o propósito de aplicar informações de genótipos para determinação fenotípica de características de importância econômica e definir áreas de pesquisa cruciais para a evolução e melhoramento genético animal.

6 Referências

- ALMEIDA, A. P. *et al.* Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2010.
- ALVARES, L. E. Aplicação da RT-PCR nos estudos de expressão gênica. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.) **Biologia molecular – Aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.
- BLENCOWE, B. J.; AHMAD, S.; LEE, L. J. L. Current-generation high-throughput sequencing deepening insights into mammalian transcriptomes. **Genes Dev.**, v. 23, p. 1379-1386, 2009.
- BOROSKY, J. C. *et al.* Fibra muscular, desempenho e a qualidade da carcaça de quatro grupos genéticos de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 427-434, 2011.
- BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?—the case for MIQE. **Methods**, 50(4), 217-226, 2010.
- CANNON, B.; NEDERGARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, Vol. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.
- CHALUPOVÁ, P. *et al.* Polymorphism, linkage mapping, and association analysis with carcass traits of four porcine candidate genes selected from gene-expression profiles of Czech Large White and Wild Boar muscles Czech. **Journal of Animal Science**, v.59, n.3, p.116-127, 2014.
- CHANG, K.C. Key signalling factors and pathways in the molecular determination of skeletal muscle phenotype. **Animal**, v.1, p.681-698, 2007.
- CHAVEY, C. *et al.* Regulation of secreted protein acidic and rich in cysteine during adipose conversion and adipose tissue hyperplasia. **Obesity, Silver Spring**, v. 14, n. 11, p. 1890-1897, Nov. 2006.
- CHIZZOLINI, R. *et al.* Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, 10(4), 119-128, 1999.

CHOI, Y.; KIM, B.C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**, [v.122, n.2-3](#), p.105-118, 2009.

DA COSTA, N. *et al.* Restriction of dietary energy and protein induces molecular changes in young porcine skeletal muscles. **The Journal of Nutrition**, 134, 2191–9, 2004.

DAVOLI, R. *et al.* Mapping of 14 expressed sequence tags (ESTs) from porcine skeletal muscle by somatic cell hybrid analysis. **Animal Genetics**, v. 31, p. 400-403, 2000.

DAMON, M. *et al.* Comparison of muscle transcriptome between pigs with divergent meat quality phenotypes identifies genes related to muscle metabolism and structure. **PloS One**, 7(3) e33763, 2012.

DEPIERI, T. *et al.* UCP-3: Regulação da expressão gênica no músculo esquelético e possível relação com o controle do peso corporal. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, Vol.48, n.3, p. 337-344, 2004.

DI ROCCO, F. *et al.* Identification of camelid specific residues in mitochondrial ATP synthase subunits. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 41, n. 3, p. 223-228, 2009.

DRAOUI, N.; FERON, O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. **Disease models & mechanisms**, Vol. 4, n. 6, p. 727-732, 2011.

FERGUSON, D.M.; GERRARD, D. E. Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. **Animal Production Science**, Vol. 54, n.4, p.464-481, 2014.

GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, p. 27-28, 2001.

HOCQUETTE, J.F. *et al.* Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. **Livestock Production Science**, Vol. 56, p.115-143, 1998.

HOUBA, P. H. J.; TE PAS; M. F. W. The muscle regulatory factors gene family in relation to meat production. In: te PAS, M. F. W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. (Ed.) *Muscle development of livestock animals – Physiology, genetics and meat quality*. Wallingford, UK: **CABI Publishing**, p. 201-223, 2004.

KIM, N.K.; LIM, J.H.; SONG, M.J. Comparisons of longissimus muscle metabolic enzymes and muscle fibre types in Korean and western pig breeds. **Meat Science**, v.78, p.455-460, 2008.

LIU, J. *et al.* Differentially-expressed genes in pig Longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3808-3817, 2009.

LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing–Relation to meat quality. **Meat Science**, V. 84. p. 257-270, 2010.

LESEIGNEUR-MEYNIER, A. E GANDEMER, G. Lipid composition of pork muscle in relation to the metabolic type of fibres. **Meat Science**, 29, 229-241, 1991.

LI, B.; SHIN, J.; LEE, K. Interferon-stimulated gene ISG12b1 inhibits adipogenic differentiation and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 150, n. 3, p. 1217-1224, 2009.

LI Y. *et al.* Differential transcriptional analysis between red and white skeletal muscle of Chinese Meishan pigs. **International Journal of Biological Sciences**, Vol. 6, p. 350–60, 2010.

LIU Y. *et al.* Identification of differences in microRNA transcriptomes between porcine oxidative and glycolytic skeletal muscles. **BMC Molecular Biology** 14, 7, 2013.

LIU, J. *et al.* Differentially-expressed genes in pig Longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 57, n (9), p. 3808-3817, 2009.

MORTAZAVI, A. *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **National methods**, V. 5 (7): p. 621-628, 2008.

MOUROT, J., KOUBA, M. Development of intra-and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. **Reproduction Nutrition Development**, Vol. 39, n. 1, p. 125-132, 1999.

NASCIMENTO, C.S. *et al.* Transcript profiling of expressed sequence tags from semimembranosus muscle of commercial and naturalized pig breeds. **Genetic Molecular Research**, Vol. 11, n (3), p. 3315-3328, 2012.

NYGARD, A; JØRGENSEN, C. B.; CIRERA, S.; FREDHOLM, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBER Green qPCR. **BMC Molecular Biology**, Vol. 8, p. 67, 2007.

PAIXÃO, D. M. *et al.* Mapping of QTL on chromosomes 1, 2, 3, 12, 14, 15 and X in pigs: characteristics carcass and quality of meat. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Vol 64(4), p. 974-982, 2012.

PAN, Q. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nat Genet**, Vol. 40, p. 1413–1415, 2008.

PEIXOTO, J. DE O. *et al.* Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and carcass traits in pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38(2), 271-276, 2009.

PINTO, A. P. G. *et al.* Detection of quantitative trait loci on chromosomes 9, 10 and 11 of swines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 39(10), p. 2174-2181, 2010.

- PENA, R. N. *et al.* Application of the microarray technology to the transcriptional analysis of muscle phenotypes in pigs. **Animal Genetics**, Vol. 45, n (3), p. 311-321, 2014.
- RISÉRUS, U. *et al.* Rosiglitazone increases indexes of stearyl-CoA desaturase activity in humans link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Diabetes**, V. 54(5), 1379-1384, 2005.
- RYU, Y.C; KIM, B.C. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig Longissimus dorsi muscle. **Meat Science**, Vol. 71, p. 351- 357, 2005.
- SCHEFFLER, T. L. *et al.* Fiber hypertrophy and increased oxidative capacity can occur simultaneously in pig glycolytic skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 306(4), C354-C363, 2014.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiology. Rev**, Vol. 91, p. 1447–1531, 2011.
- SERÃO, N. V. L. *et al.* Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, V. 128(1), p. 28-34, 2011.
- SOLLERO, BP. *et al.* Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, Vol. 123, p. 8-15, 2009.
- SOLLERO, B. P. *et al.* Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. **Animal Genetics**, Vol. 42, p. 600-612, 2011.
- STEIBEL J.P. *et al.* Assessment of the swine protein-annotated oligonucleotide microarray. **Animal Genetics**, Vol. 40, p. 883–93, 2009.
- TE PAS M.F. *et al.* Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. **Journal of Muscle Research and Cell Motility** 26, 157–65, 2005.
- TONG, Q. *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, Vol. 290, n (5489), p. 134-138, 2000.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151-159, 2005.
- VERARDO L.L. *et al.* Identification and validation of differentially expressed genes from pig skeletal muscle. **J. Anim. Breed. Genet**, v. 130(5), p. 372-381, 2012.
- WELLER, M. M. *et al.* Effect of heat stress and feeding phosphorus levels on pig electron transport chain gene expression. **Animal**, v. 7 (12), p. 1985-1999, 2013.
- WANG, L. *et al.* DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. **Bioinformatics**, v. 26(1), p.136-138, 2010.
- WU J. *et al.* Characterization of porcine ENO3: genomic and cDNA structure, polymorphism and expression. **Genet. Sel. Evol.** V. 40: 563-579, 2008.

ZHAO, X. *et al.* Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. **PLoS One**, v. 6, p. e19774, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs. **BMC genomics**, v.16, n.1, p.377, 2015.

Capítulo II

Perfil da expressão de genes associados à atividade mitocondrial do músculo *Longísimos dorsi* de suínos divergentes

RESUMO

Com este estudo, objetivou-se analisar diferenças de expressão de genes associados à atividade mitocondrial envolvidos no metabolismo energético muscular em suínos distintos geneticamente em diferentes idades do período pós-natal. Para tanto, investigou-se a expressão diferencial de genes que atuam na vias oxidativa (SDHD e ATP6) e de genes da via glicolítica (LDHA e LDHB) envolvidos na função mitocondrial do músculo esquelético e um gene referência (GAPDH). Foram utilizadas amostras de músculo *Longissimus dorsi* por meio do RNA extraído de 32 animais de dois grupos genéticos, sendo 16 suínos naturalizados Piau e 16 suínos da Linhagem Comercial em 4 idades pós-natal: ao nascer, 56, 112 e 156 dias. A expressão diferencial foi analisada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), cujos dados foram gerados na forma de valor de Ct da amostra. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS®. Foram observadas interações entre grupos genéticos e idades para o gene ATP6, SDHD e LDHA. A expressão de ATP6 foi significativamente diferente entre o nascimento e 112 dias em suínos Piau ($P = 0,0022$) e Comercial ($P = 0,0004$), principalmente em suínos Comercial, com uma redução aproximada de 380 vezes no nível de expressão. Observou-se variação no nível de expressão do gene ATP6 aos 56 e 156 dias nos suínos Piau quando comparados com os animais comerciais, sendo a expressão do ATP6 100 vezes maior aos 56 dias nos suínos Piau, o que explica a predominância de fibras oxidativas nestes animais. A expressão de SDHD foi significativamente maior entre 56 e 112 dias em comparação ao nascer para os dois grupos genéticos ($P < 0,001$). O gene LDHA foi diferencialmente expresso em todas as idades entre suínos Piau e comerciais, sendo 106 vezes mais expressos em animais comerciais, o que possivelmente explica a predominância de fibras glicolíticas nesses animais. Em síntese, houve alterações nos níveis de expressão de mRNA dos genes ATP6, SDHD e LDHA, envolvidos na atividade mitocondrial do metabolismo energético muscular entre as diferentes idades e entre os grupos genéticos estudados. As diferenças dos níveis de expressão quantificados pelos níveis de mRNA dos genes e fatores de transcrição ATP6, SDHD e LDHA em diferentes idades pós-natal indicam respostas biológicas diferentes com implicações diretas no desenvolvimento muscular de suínos.

Palavras – chaves: Função mitocondrial; RT-qPCR; Genes diferencialmente expressos.

ABSTRACT

In this study, we aimed to analyze expression differences, in *Longissimus dorsi* muscle, of genes associated with mitochondrial activity involved in muscle energetic metabolism in genetically distinct pigs at different ages of the postnatal period. Samples of *Longissimus dorsi* muscle were analyzed by RNA extracted from 32 animals divided into two genetic groups. From each group 16 animals were slaughtered at 4 postnatal ages: at birth, 56, 112, and 156 days. We selected: two genes which act on oxidative pathways (SDHD and ATP6); two genes of the glycolytic pathway (LDHA and LDHB) which act on skeletal muscle mitochondrial function; and a reference gene (GAPDH), analyzed by means of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), so that data were generated as sample Ct value. Subsequently, such data were analyzed by using the SAS[®] macro % QPCR_MIXED. Interactions between genetic groups and ages were observed for ATP6, SDHD, and LDHA genes. Expression of ATP6 was significantly different between birth and 112 days of age in Piau (P = 0.0022), and Commercial (P = 0.0004) pigs. The expression level decreased 380 fold for Commercial pigs. Variation in expression level of ATP6 gene at 56 and 156 days of age was observed in Piau pigs when comparing to commercial animals. Expression of ATP6 was 100 fold higher at 56 days in Piau pigs, so that this explains the predominance of oxidative fibers in these animals. When comparing to birth, the expression of SDHD was significantly higher between 56 and 112 days of age for the two genetic groups (P < 0.001). LDHA gene was differentially expressed between Piau and commercial pigs at all ages in study, so that this gene was 106 fold more expressed in commercial pigs. This result probably explains the predominance of glycolytic fibers in these animals. In summary, alterations occurred in mRNA expression levels of ATP6, SDHD, and LDHA genes, which are involved in muscle energetic metabolism mitochondrial activity at different ages and in different genetic groups of pigs. Differences in expression levels quantified by mRNA levels of ATP6, SDHD, and LDHA genes at different postnatal ages indicate different biological responses with direct implications on muscle development of pigs.

Keywords: differentially expressed genes; mitochondrial function; RT-qPCR.

1 Introdução

A compreensão da dinâmica do transcriptoma durante o desenvolvimento muscular e as diferenças entre raças no crescimento muscular é fundamental para desvendar mecanismos associados ao desenvolvimento muscular de suínos (ZHAO *et al.*, 2011). Nessa perspectiva, torna-se importante compreender melhor os processos biológicos e vias moleculares associadas a alterações fisiológicas do crescimento e desenvolvimento muscular.

É importante considerar que em animais produtores de carne, o músculo esquelético *Longissimus dorsi* (LD) é um dos tecidos de maior importância econômica. Destaca-se também o fato de a seleção artificial a longo prazo e os programas de melhoramento intensivo resultarem em uma considerável diversidade fenotípica do músculo esquelético em suínos domésticos (YANG *et al.*, 2017).

Das funções biológicas associadas ao músculo esquelético, algumas alterações fisiológicas relacionadas ao metabolismo energético muscular ocorrem por meio da atividade das mitocôndrias, que fornecem maior parte da energia metabólica em forma de ATP. Diante disso, faz-se necessário utilizar estratégias adicionais a fim de compreender a dinâmica da função mitocondrial e uma das formas de elucidar a integração entre genética e alterações fisiológicas é por meio da análise de genes envolvidos na transcrição e regulação da capacidade mitocondrial do tecido muscular esquelético.

Destaca-se ainda, o fato de que os padrões de expressão gênica auxiliam o entendimento dos complexos sistemas regulatórios e podem levar à identificação de genes relevantes para novos processos biológicos (ALMEIDA *et al.*, 2010). Das razões biológicas, a complexidade do processamento das moléculas de mRNA e suas alterações levam à diversificação aleatória do transcriptoma de determinada espécie, como por exemplo, de suínos (ZHAO *et al.*, 2015). Dessa forma, para uma melhor compreensão dos aspectos genéticos e metabólicos e vias biológicas de genes envolvidos na fisiologia do músculo esquelético por meio da expressão diferencial poderá contribuir para o entendimento da complexidade transcricional do músculo esquelético de suínos.

Com base nesses aspectos, torna-se relevante estudos voltados à dinâmica do desenvolvimento muscular com reforço de análises que permita inferir o quanto esses fatores são alterados ao longo do crescimento do animal. Dentre essas análises, a de expressão de genes por meio da quantificação de níveis de mRNA poderá elucidar funções biológicas do complexo mitocondrial com implicações diretas no desenvolvimento muscular de suínos.

Por essas razões, buscou-se analisar diferenças de expressão, por meio dos níveis quantificados de mRNA do músculo *Longissimus dorsi*, de genes associados à atividade mitocondrial do metabolismo energético muscular, bem como compreender mecanismos biológicos de genes associados à atividade mitocondrial do metabolismo energético muscular entre suínos distintos geneticamente, raça naturalizada Piau e linhagem Comercial, em diferentes idades do período pós-natal.

2 Metodologia

2.1 Aspectos éticos e local da pesquisa

Neste estudo, todos os métodos de manejo e procedimentos do experimento foram realizados de acordo com os princípios da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP – UFV), processo n° 86/2014 (Anexo).

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos e no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, a uma altitude aproximada de 650 m, latitude 20° 45' 14" S e a longitude 42° 52' 53" W.

2.2 Delineamento experimental e obtenção de amostras de suínos

Foram utilizados 32 machos castrados pertencentes a 2 grupos genéticos: raça naturalizada Piau e linhagem Comercial (*Landrace* x *Large White* x *Pietrain*). Os 32 animais foram divididos em dois grupos genéticos, sendo 16 animais de cada grupo genético abatidos em 4 idades pós-natal: ao nascer, 56, 112 e 156 dias. Assim, os animais dos dois grupos genéticos foram divididos de acordo com a idade pós-natal e para cada combinação grupo genético e idade de abate houve 4 animais como repetição. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, sendo 2 grupos genéticos, 4 idades pós-natal com 4 repetições por tratamento, totalizando 8 tratamentos.

Durante o experimento os suínos foram alimentados com mesma dieta de acordo com Rostagno *et al.* (2011) e acesso livre à água. Os animais foram pesados e abatidos através de atordoamento elétrico e secção da veia jugular. Imediatamente após o abate cerca de 500 mg de músculo do *Longissimus dorsi* (LD) no local P2 (entre 12° e 13° costela) foram tomadas, seccionada em 1-2 mm, imediatamente imersos em *RNAlater* (*Ambion, Austin, TX, EUA*) e armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA.

2.3 Extração de RNA

O RNA total foi isolado a partir do músculo esquelético LD individual utilizando *TRIzol Reagent* (*Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha*) de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, amostras do músculo foram maceradas e homogeneizadas com 750 µl de *TRIzol* usando *Polytron*. Para assegurar uma dissociação completa de complexos nucleoproteicos, as amostras foram deixadas em repouso durante 5 min. A mistura foi agitada e deixada à temperatura ambiente durante 5 min e centrifugou-se a 12000 rpm durante 15 min a 4 ° C. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo de centrífuga e o RNA foi precipitado com 0,6 ml de isopropanol. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras a 10556 rpm durante 10 min a 4° C para sedimentar o RNA, lavou-se subsequentemente em 75% (v/v) de etanol. A centrifugação foi então realizada e os sedimentos de RNA foram ressuspensos em 40 µl de *UltraPure™ DNase / RNase-Free*.

A fim de remover contaminação de DNA genômico, o RNA extraído de todas as amostras foram tratadas com 5 µl de tampão de 5 unidades de DNase e 40 unidades de inibidor de RNase, num volume de reação de 40 µL. A concentração do RNA total foi estimada no espectrofotômetro *NanoVue* (*GE Healthcare, Munique, Alemanha*), enquanto a qualidade e integridade foram determinadas com *Agilent 2100 Bioanalyzer©* (*Agilent Technologies Inc., Ontario, Canada*), a 256 e 280 nm. A pureza de RNA foi estimada no UV pela razão A256/A280 em relação aos contaminantes que absorvem.

2.4 Transcrição reversa e síntese de cDNA

A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1 %. Na sequência as amostras foram tratadas com *DNase* e reversamente transcritas em cDNA utilizando o Kit *GoScript Reverse Transcription* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), seguindo recomendação do fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 2µg de RNA total foram tratados com *DNAse I Amplification Grade* (Invitrogen™) e posteriormente foram submetidos a transcrição reversa com o kit *GoScript Reverse Transcriptase* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), conforme instruções do fabricante. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme a programação: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 minuto a 60 °C. Após a síntese as concentrações de cDNA foi estimada pelo espectrofotômetro *Nanovue* (GE Healthcare, Munique, Alemanha) e o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na qPCR. As amostras de cDNA foram armazenadas a - 20 °C até o uso na reação de PCR quantitativo em tempo real.

A RT-qPCR, possui como molde inicial a molécula de RNA, como previamente citado e gera cDNA, a partir de desoxirribonucleotídeos trifostatados. A reação inicial de transcrição reversa foi submetida ao protocolo de ciclos conforme o programa: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 min a 56 °C. Após a obtenção do cDNA uma alíquota desta amostra de cDNA foi utilizada para a reação de amplificação por PCR. As concentrações de uso de cada par de *primer* foram otimizadas e as amplificações dos genes alvo e do gene referência para cada amostra foram realizadas em duplicatas.

2.5 Seleção dos genes e desenho de primers

Foram selecionados 2 (dois) genes que atuam na via oxidativa (SDHD e ATP6) e 2 (dois) genes da via glicolítica (LDHA e LDHB) que atuam na função mitocondrial do músculo esquelético. Para a normalização dos níveis de expressão de genes e distinção entre a variação real biológica e os desvios resultantes de processos de mensuração, foram selecionados 3 (três) genes (GAPDH, ACT- β e HPRT1) para testes, utilizados como genes de referência ou controle endógeno (Quadro 1). Todos os *primers* foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados NCBI (Centro Internacional de Informação Biotecnológica dos EUA - www.ncbi.nlm.nih.gov), de suínos (*Sus scrofa*). Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes estão apresentados na Tabela

Tabela 1 – Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para as reações de qPCR

Gene	Cromossomo	Nº de Acesso (GenBank)	Sequências de Nucleotídeos 5' – 3'	Tm (°C)	Função Biológica
GAPDH* (Endógeno)	5	NC_010447.4 (Edwards; Denhardt, 1985; Winer <i>et al.</i> , 1999)	F:CAAAGTGGACATTGTGCGCATCA R:AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGT	60 °C	Enzima catalizadora da glicólise; Regulação transcricional
ACT- β * (Endógeno)	4	XM_0031242803 (Pohjanvirta <i>et al.</i> , 2006)	F:CTTCTAGGCGGACTGTTAGTG R:AGCCATGCCAATCTCATCTC	60 °C	Proteína estrutural do citoesqueleto; Estrutura e integridade celular
HPRT1* (Endógeno)	10	NM_001032376.2 (Förster; Stranzinger; Hellkuhl, 1980)	F:CCAGTCAACGGGCGATATAA R:GACCAAGGAAAGCAAGGTTG	60 °C	Homeostase celular em grande variedade de tecidos
ATP6*	MT*-não nuclear	NC_000845.1 (Lin <i>et al.</i> , 1999)	F:TACCACACTCATTACACCCA R:CGGAATCCTGTGAATACGCTT	60 °C	Síntese de ATP; Transporte de íons de hidrogênio
SDHD*	9	NC_010451.3 (Sun <i>et al.</i> , 2005)	F:TCAGCATTCTCCAGGACCGT R:AGTCCATCGCAGAGCAAGGA	60 °C	Enzima catalizadora; Transporte de elétrons - membrana mitocondrial
LDHA*	2	NM_001172363.2 (Ryttman <i>et al.</i> , 1986)	F: GAGACTCTAGTGTGCCTGTA R: AACCGCTTCCAGTGTTC	60 °C	Metabolismo enzimático da glicólise – músculo esquelético
LDHB*	2	NC_010444.3 (Ryttman <i>et al.</i> , 1986)	F: CTCCCAGAGTAAGATCACCA R: AACAAGGGCAAGCTCATC	60 °C	Metabolismo enzimático da glicólise – músculo esquelético

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; Actin β - ACT- β ; Hypoxanthine Phosphoribosyl 1 – HPTR1; ATP6: ATP Synthase, subunidade 6; SDHD: Complexo Succinato Desidrogenase, subunidade D; LDHA: Lactate Dehidrogenase A; LDHB: Lactate Dehidrogenase B; MT: Mitocondrial. Tm (°C): Temperatura de Anelamento.

As sequências de nucleotídeos foram utilizadas para desenhar os *primers* na plataforma *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com>) segundo as diretrizes do software *Primer Quest* (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>).

Foi desenhado um par de *primer* para cada possível gene endógeno (gene referência): β -ACT (Actin β), GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosy 1). A estabilidade dos genes endógenos foi analisada segundo as metodologias *BestKeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004), *NormFinder* (ANDERSEN *et al.*, 2004), *Genorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) e Método comparativo do *delta-Ct* (SILVER *et al.*, 2006) simultaneamente, todas disponíveis na plataforma *on line Leonxie database* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Entre os genes de referência testados, o gene *GAPDH* foi o que apresentou-se mais estável e, portanto, utilizado nas análises de expressão gênica desse estudo.

2.4 PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicata técnica utilizando o termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA*), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o fluoróforo *SYBR® Green* do kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (*Promega corporation, Madison, EUA*), conforme instruções do fabricante.

A eficiência da amplificação de cada gene alvo foi calculada de acordo com a curvas padrão para análise da melhor combinação de concentração de cDNA (1, 10, 20 e 40 ng) e de *primer* (100, 200 e 400 nM). Foram utilizados os valores do *Ct* para calcular e traçar uma linha de regressão linear, representando o logaritmo do modelo concentração (eixo X) contra o (eixo Y) no ciclo limiar correspondente. A inclinação da linha foi usada para determinar a eficiência da amplificação do alvo (E) utilizando a equação $E = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$ (PFAFFL, 2001).

Foi utilizado o método de quantificação relativa o qual se emprega o uso da curva padrão onde se leva em consideração o valor *Ct* do gene alvo, no qual cada amostra tem sua cópia. A PCR quantitativo em tempo real apresenta amplificação exponencial por realizar a avaliação do número de moléculas ciclo a ciclo, em que cada par de *primer* teve suas concentrações de uso otimizada e as amplificações dos genes alvo e do controle endógeno para cada amostra foram realizadas em duplicatas (LIVAK; SCHMITTIGEN, 2001).

A reação de PCR quantitativo em tempo real foi analisada com base no valor de C_t ou linha de corte, definido após a reação, sendo este ponto correspondente ao momento da reação, onde a amplificação refere-se ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência atinja um limiar de detecção, que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo em relação ao gene constitutivo. Os valores de C_t superiores a 35 ciclos foram considerados como expressão não detectável pela técnica RT-qPCR.

2.5 Análise Estatística

Os dados de expressão dos genes alvo e endógeno foram gerados na forma de valor limiar do ciclo de amplificação (*Cycle threshold* - C_t) da amostra. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS® (www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html) segundo a metodologia proposta por Steibel *et al.* (2009), que consiste na análise de valores de C_t para os genes alvos e endógenos usando um modelo linear misto. Esta ferramenta gerou linhas de comando posteriormente utilizadas diretamente no procedimento MIXED do Software SAS® 9.3. Estes dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{gijk} = G_i + I_j + (G * I)_{ij} + P_{ij} + D_{ijk} + \varepsilon_{ijk} ;$$

Onde Y_{gijk} corresponde ao valor C_t obtido a partir do software do termociclador para o g -ésimo gene (genes alvo ou referência) a partir do r -ésimo poço, que corresponde ao k -ésimo animal submetido ao i -ésimo tratamento (combinação de grupos genéticos e idade pós-natal); G_{ig} , efeito do i th grupo genético no g th gene; I_{jg} , efeito da j th idade pós-natal no g th gene; $(G * I)_{gij}$ efeito da interação entre o i th nível de G e o j th nível de I no g th gene; P_{gij} ; efeito aleatório do k th animal avaliado para o g th gene; D_{gijk} , $\sim N(0,2)$, o efeito aleatório específico da amostra (comuns aos genes alvo e referência) da idade pós-natal j th, do grupo genético i th, no g th gene e ε_{gijk} , o efeito residual.

Foi considerado a probabilidade de 5% de erro para a comparação entre as médias. Para comparação entre os grupos genéticos utilizou-se os valores de *Fold Change* (FC) estimados a partir dos valores de $\Delta\Delta CT$ e aplicados na seguinte equação: $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. (LIVAK; SCHMITTIGEN, 2001). Foram calculados intervalos de confiança assimétricos (95%) para cada valor FC utilizando o erro-padrão da diferença estimada em intervalo de

confiança de 95%. Para análise do padrão de expressão de cada gene ao longo das idades pós-natal nos grupos genéticos foi feito com base na expressão relativa média de cada gene, $2^{-\Delta Ct}$.

3 Resultados

Os resultados apresentam diferentes perfis de expressão de genes associados à via metabólica oxidativa do metabolismo energético muscular em grupos divergentes de suínos. As interações entre grupos genéticos e idades de abate dos genes ATP6, SDHD, LDHA e LDHB relativas à transcrição quantitativa estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 P valor da análise de variância dos grupos genético, idade e interação grupo genético x idade dos ATP6: ATP Synthase, subunidade 6; SDHD: Complexo Succinato Desidrogenase, subunidade D; LDHA: Lactate Dehidrogenase A; LDHB: Lactate Dehidrogenase B; ANOVA (P valor). *P<0,05; **P<0,01.

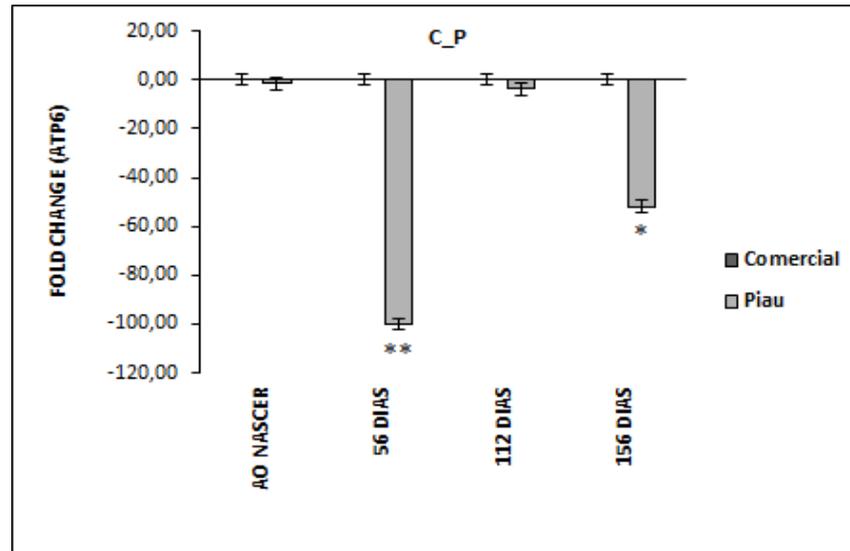
Genes	Grupo Genético	Idade	Grupo Genético x Idade
ATP6	0,0019*	<.0001**	<.0001**
SDHD	0,8329	0,0275*	0,0813
LDHA	<.0001**	0,5663	0,0028**
LDHB	0,8206	0,2221	0,1620

3.1 Perfil de expressão de genes da via metabólica oxidativa

Os genes envolvidos na atividade mitocondrial muscular analisados nesse estudo foram o gene ATP6 (*ATP Synthase*, subunidade 6) e SDHD (*Succinato Desidrogenase*, subunidade D). Quanto ao gene ATP6, que participa da fosforilação oxidativa como codificador mitocondrial da enzima ATP sintase, houve interação significativa (P<0,001) entre grupo genético (suínos Piau e linhagem Comercial) e idade.

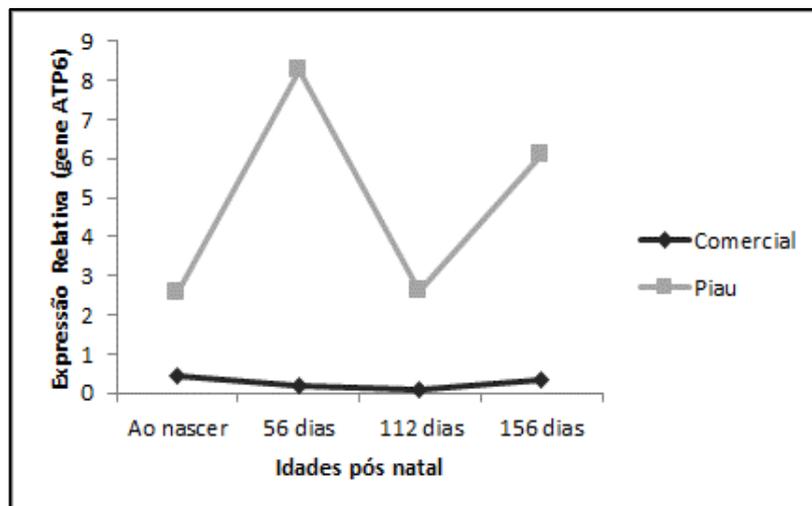
O gene ATP6 apresentou diferenças de expressão aos 56 dias (P=0,0053) e 156 dias (P=0,0163) em suínos Piau, sendo estes animais 100 vezes mais expresso aos 56 dias do que nos suínos Comercial. A variação no nível de expressão do gene ATP6 entre os grupos genéticos para cada idade pós-natal são apresentados na Figura 1.

Figura 1 Diferença de expressão (*Fold Change*) de mRNA do gene ATP6 em músculo *longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial utilizando RT-qPCR. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. (Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste (Comercial-C); barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste (Piau-P)).



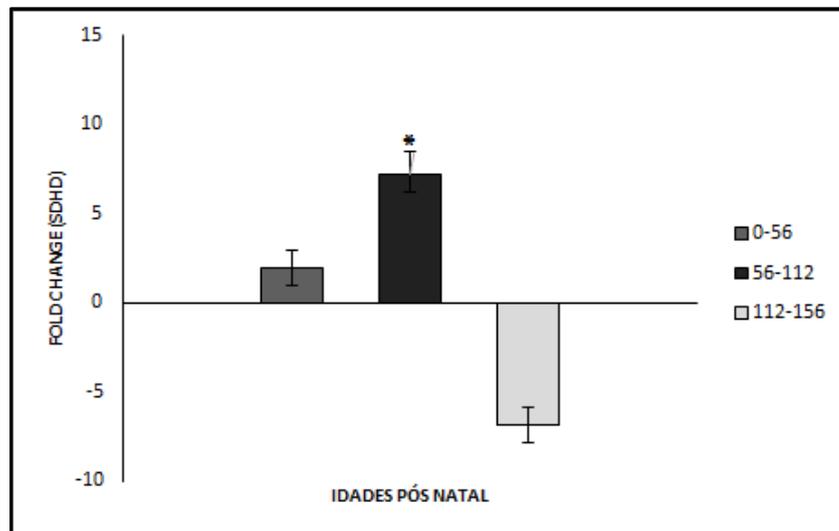
A variação da expressão do gene ATP6 foi apresentada por meio da expressão relativa média do gene ATP6 nas diferentes idades pós-natal (Figura 2).

Figura 2 Expressão relativa do gene ATP6 em músculo *longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial ao longo de diferentes idades pós-natal utilizando RT-qPCR.



O gene SDHD atua na via oxidativa do metabolismo das fibras musculares e é altamente associado com o crescimento e características de qualidade de carne. Neste estudo, não houve diferenças de expressão do gene SDHD entre os suínos Piau e Comercial. O perfil de expressão deste gene apresentou diferença significativa entre idades do período pós-natal. As diferenças de expressão do gene SDHD foram entre os contrastes de 56 e 112 dias ($P=0,0315$) e entre 112 e 156 dias ($P=0,0364$), apresentando uma maior expressão significativamente maior entre 56 e 112 dias em comparação ao nascer $P < 0,001$, ($Fold\ Change = 4,11$) como está representado na Figura 3.

Figura 3 Diferença de expressão ($Fold\ Change$) de mRNA do gene SDHD de contrastes de idades em músculo *longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial utilizando RT-qPCR. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. O gene SDHD apresentou significância para o fator Idade pelo teste F a 0,01% de probabilidade, sem interação significativa para Raça*Idade (ANOVA). Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste; barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste.

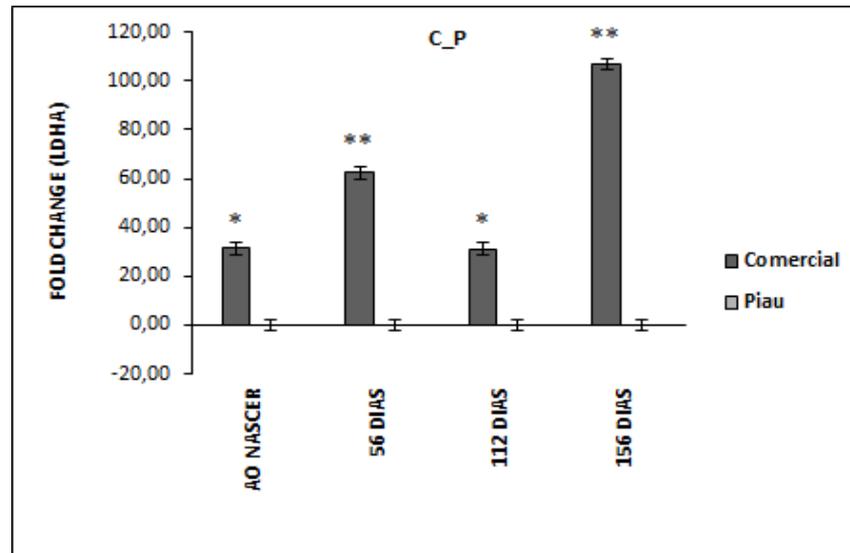


3.2 Perfil de expressão de genes da via metabólica glicolítica

Para compreender melhor a via metabólica glicolítica do músculo esquelético de suínos foram analisados os genes LDHA (*Lactato Dehidrogenase A*) e LDHB (*Lactato Dehidrogenase B*). Houve diferença significativa entre os grupos genéticos para LDHA, sendo expresso em todas as idades. Apresentou maior nível de mRNA aos 156 dias ($P=0,0074$), 106 vezes mais expressos do que os suínos Piau (Figura 4). Neste estudo não

houve diferenças significativas de expressão do gene LDHB entre grupos genéticos e idades pós-natal analisadas.

Figura 4 Diferença de expressão (*Fold Change*) de mRNA do gene LDHA em músculo *longissimus* de suínos da raça naturalizada Piau e linhagem Comercial utilizando RT-qPCR. *P<0,05; **P<0,01. O gene LDHA apresentou significância para o fator Genética pelo teste F a 0,01% de probabilidade (Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste (Comercial-C); barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste (Piau-P)).



4 Discussão

Foram analisados os genes ATP6 (Enzima ATP Sintase, subunidade 6) e SDHD (Complexo Succinato Desidrogenase, subunidade D), dado o envolvimento desses genes na atividade mitocondrial com potencial para elucidar alterações da atividade mitocondrial por meio da variabilidade de fibras musculares no músculo esquelético de suínos. Os resultados mostram genes diferencialmente expressos que indicam padrões de expressão específicos da raça ao longo do desenvolvimento do músculo esquelético, corroborando os estudos de Verardo *et al.* (2012); Nascimento *et al.* (2012); Sollero *et al.* (2011) e Zhao *et al.* (2011).

Os dados obtidos nesse estudo demonstram interação entre idade e genética na expressão diferencial do gene ATP6. Observou-se diferenças de expressão entre os grupos genéticos para o gene ATP6, demonstrando que há diferenças biológicas do metabolismo oxidativo entre os grupos genéticos, em que os maiores níveis de transcrição do gene foram nos animais Piau (Figura 1). Por essa análise, destaca-se o estudo de Scheffler *et al.* (2014), que apontam o papel importante do conteúdo mitocondrial do músculo e, consubstancia a ideia de que a capacidade oxidativa protege contra defeitos energéticos sendo um fator

determinante da saúde muscular e metabólica do corpo inteiro. Ainda, os resultados nesta pesquisa corroboram a abordagem do trabalho de Pena *et al.* (2014), em que relatam sobre a capacidade oxidativa elevada das fibras vermelhas, enfatizando que essas fibras são caracterizadas por conter proteínas contráteis e aumento do volume mitocondrial.

O padrão de expressão do gene ATP6 em suínos Piau apresentou-se 100 vezes mais expressos que os suínos Comercial, aos 56 dias de idade (Figura 1). Esse resultado possivelmente explica a predominância de fibras oxidativas em suínos Piau, e ainda o maior nível de expressão de ATP6 aos 56 dias em suínos Piau pode estar relacionado ao teor de fibras oxidativas predominante nesses animais levando a um aumento na deposição de gordura. Em via contrária, a tendência do metabolismo de suínos Comercial é que a capacidade de deposição de gordura intramuscular seja reduzida, considerando que a seleção desses animais ocorre visando o crescimento rápido.

Pelos resultados expostos, pode-se sugerir que os suínos Piau, com predominância de fibras oxidativas até aos 56 dias de idade, apresentam lenta diferenciação de fibras oxidativas em fibras glicolíticas, o que leva a considerar que esses suínos são mais precoces quanto à deposição de gordura e, metabolicamente apresentam maior potencial oxidativo em suas fibras musculares quando comparado aos suínos Comercial. Esses resultados são consistentes com o estudo de Serão *et al.* (2011) quando referem que há precocidade para a deposição de gordura intramuscular em suínos Piau. Esta relação também está coerente com o estudo de Hocquette *et al.* (1998) quando afirmam que músculos esqueléticos com maior teor de gordura também são mais oxidativos.

De acordo com Liu *et al.* (2016), as vias oxidativas são influenciadas por características hereditárias e a comparação entre as atividades destas vias pode contribuir para melhor entendimento sobre o metabolismo muscular de suínos, bem como influenciar diretamente na produção de carne. A diferença de expressão do gene ATP6 observada neste estudo permite compreender melhor a via metabólica oxidativa do metabolismo energético muscular dos suínos divergentes analisados nesse estudo. A alteração de expressão do gene ATP6 nos grupos genéticos nas diferentes idades sugere que há rápida mudança de fibras oxidativas modulando-se em fibras glicolíticas e estas permanecem até aos 156 dias (Figura 2), fase de crescimento do animal.

A expressão diferencial nas diferentes idades para o gene ATP6 em suínos Piau sugere que possivelmente há relação direta entre a atividade mitocondrial e a capacidade de deposição de gordura intramuscular, uma vez que os suínos Piau são caracterizados por

apresentarem alto nível de gordura, quando comparados aos animais da Linhagem Comercial, caracterizados como suínos de crescimento rápido. Essa característica dos suínos Piau possivelmente está relacionada ao fato dos mesmos nunca terem participado de um programa de melhoramento animal, como refere o estudo de Serão *et al.* (2011). Assim como nesse estudo, Ryu *et al.* (2008) relata que há diferenças na composição das fibras musculares, e consequentemente alterações na função mitocondrial, em suínos conforme a raça.

No presente estudo também foram analisados os níveis de expressão do gene SDHD, envolvido na via oxidativa da função mitocondrial do tecido muscular esquelético. Os resultados demonstram que não houve diferença de expressão do gene SDHD entre os grupos genéticos. Pelo resultado da expressão diferencial, a ação biológica do gene SDHD não indica diferenças fisiológicas entre os suínos distintos geneticamente. O perfil de expressão deste gene apresentou diferença significativa entre idades do período pós-natal dos animais. Verificou-se que o gene SDHD apresentou maior diferença de expressão nos níveis de mRNA entre 56 e 112 dias (Figura 3).

Por esse resultado, a alteração nos níveis de expressão de mRNA do gene SDHD no músculo LD de suínos possivelmente pode-se relacionar o fator idade ao período de crescimento desses animais, em conformidade com o trabalho de GUIMARÃES *et al.* (2007), em que o gene SDHD foi associado com características produtivas em suínos e que há correlação entre valores de expressão de SDHD com o crescimento de suínos. Além disso, a maior expressão do gene SDHD na fase entre 56 e 112 dias de idade provavelmente esteja relacionado ao fato de nesse período haver mudanças na atividade mitocondrial, bem como uma redução do metabolismo oxidativo e aumento do metabolismo glicolítico estejam acontecendo, uma vez que as fibras glicolíticas apresentam maior volume e, consequentemente redução na produção de energia.

Neste estudo, analisou-se por meio do nível de transcrição dos genes Lactato Desidrogenas B (LDHB) e Lactato Desidrogenase A (LDHA), que atuam na via glicolítica da função mitocondrial dada a participação fundamental da enzimas de Lactato Desidrogenase (LDH) na fase final do processo de da atividade glicolítica. Não foram observadas diferenças significativas de expressão para o gene LDHB (Tabela 1). Com este resultado, sugere-se que a atividade do gene LDHB não possibilita distinguir diferenças na capacidade metabólica glicolítica de fibras musculares de suínos Piau e Comercial. Assim como nessa pesquisa, o estudo de Liu *et al.* (2016), voltado para a capacidade metabólica das fibras musculares de

suínos Pietrain, também não verificaram diferenças de expressão do gene LDHB em relação à atividade metabólica muscular.

Analisou-se também o gene LDHA, que codifica uma das enzimas metabólicas essenciais para a glicólise no músculo esquelético (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Encontrou-se diferença de expressão significativa entre os grupos genéticos em relação a este gene e, em todas as idades, maior expressão nos suínos Comercial do que nos animais Piau. O gene LDHA apresentou maior nível de expressão em suínos Comercial aos 156 dias de idade (Figura 4).

Considerando a atuação do gene LDHA na via glicolítica da atividade mitocondrial, o alto nível de expressão do gene LDHA aos 156 dias, indicam que há aumento da capacidade glicolítica das fibras musculares, corroborando o estudo de Wu *et al.* (2015) ao relatarem que a o número de fibras glicolíticas aumenta durante o período de crescimento.

Como se observa pela diferença do nível de expressão do gene LDHA em contraste Comercial-Piau, sustenta-se a hipótese de que ao aumentar o potencial glicolítico das fibras musculares espera-se que a deposição de tecido magro seja maior, em confirmação ao potencial de crescimento muscular representativo desses animais. Dessa forma, considerando que a seleção de suínos Comercial ocorre visando o aumento da deposição de músculo, esperava-se um aumento na frequência de células glicolíticas no músculo.

Embora nesse estudo não tenha sido observadas diferenças significativas na expressão do gene LDHA em suínos Piau, demonstrando que não há variação de expressão de LDHA nesses suínos, menciona-se o estudo de Fantin *et al.* (2006), ao referirem que a reduzida atividade LDHA estimula a atividade mitocondrial. Com base nisso, paralelamente aos níveis de expressão do gene LDHA têm-se registrado o padrão de expressão do gene ATP6, que possivelmente indica que a reduzida atividade de LDHA em suínos Piau seja em decorrência da função mitocondrial, verificada pela diferença de expressão de ATP6 em suínos Piau (Figura 1).

Possivelmente, a menor expressão de LDHA em suínos juntamente com a maior expressão do gene ATP6 em relação aos animais comerciais influencia na atividade mitocondrial deste grupo genético, uma vez que o potencial glicolítico das fibras, analisado pelo padrão de expressão do gene LDHA ocorre inversamente ao teor de fibras oxidativas, verificado pela expressão do gene ATP6, e reforça a ligação existente entre a glicólise e fisiologia mitocondrial, corroborando o estudo de Fantin *et al.* (2006).

Tomados em conjunto, por análises em diferentes idades de abate de suínos Piau e comerciais, as variações de expressão dos genes que atuam na atividade mitocondrial (ATP6, SDHD e LDHA) verificadas nesse estudo indicam como alterações metabólicas específicas podem influenciar e direcionar o desenvolvimento de fibras musculares e fisiologia da função mitocondrial do músculo esquelético de suínos distintos geneticamente, fornecendo informações para um melhor entendimento sobre o perfil de desenvolvimento muscular pós-natal em suínos.

5 Conclusão

A expressão diferencial do gene ATP6 (ATP sintase) envolvido na fosforilação oxidativa de células eucarióticas e LDHA (Lactado desidrogenase A) envolvido na glicólise do músculo esquelético indicam diferenças fisiológicas associadas à atividade mitocondrial. O padrão de expressão dos genes ATP6 e LDHA auxilia na compreensão de mecanismos biológicos das enzimas ATP6 e LDHA do metabolismo energético muscular com implicações diretas no desenvolvimento muscular de diferentes grupos genéticos de suínos e o perfil de expressão do gene SDHD indica alterações no período pós-natal mas não aponta diferenças genéticas entre os suínos divergentes.

6 Referências

- ALMEIDA, A. P. *et al.* Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2010.
- EDWARDS, D. R.; DENHARDT, D. T. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. **Experimental cell research**, Vol. 157, p. 127-143, 1985.
- FERGUSON, D.M.; GERRARD, D.E. Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. **Animal Production Science**, Vol. 54, n.4, p.464-481, 2014.
- FANTIN V. R, ST-PIERRE J., LEDER. P. Attenuation of LDH-a expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**, Vol. 9, p. 425–434, 2006.

- FÖRSTER, M.; STRANZINGER, G.; HELLKUHL, B. X-chromosome gene assignment of swine and cattle. **Naturwissenschaften**, v. 67, n. 1, p. 48-49, 1980.
- HAMILL, R. M. *et al.* Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. **Meat Science**, Vol. 92, n (4), p. 440-450, 2012.
- GUIMARÃES, S. E. F. *et al.* SNP discovery, expression and association analysis for the SDHD gene in pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 124(4), 246-253, 2007.
- GRINDFLEK, E. *et al.* Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors $\gamma 1$ and $\gamma 2$: detection of breed and age differences in gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 249, n. 3, p. 713-718, 1998.
- HOCQUETTE, J.F. *et al.* Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. **Livestock Production Science**, Vol. 56, p.115-143, 1998.
- KARLSSON, A. *et al.* Muscle Histochemical And Biological Properties In relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs. **Journal of Animal Science**, Vol. 71, p. 930-938, 1993.
- LEVIS, D. G. Production Management: Managing post-pubertal boars for optimum fertility. **Swine Med**, p. 17-23, The Compendium January 1997.
- LIN, C. S. *et al.* Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. **Gene**, Vol. 236(1), p. 107-114, 1999.
- LIU, X. *et al.* Molecular changes in mitochondrial respiratory activity and metabolic enzyme activity in muscle of four pig breeds with distinct metabolic types. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Vol. 48, n (1), p. 55-65, 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- NASCIMENTO, C.S. *et al.* Transcript profiling of expressed sequence tags from semimembranosus muscle of commercial and naturalized pig breeds. **Genetic Molecular Research**. V. 11 (3), p. 3315-3328, 2012.
- PENA, R. N., *et al.* Application of the microarray technology to the transcriptional analysis of muscle phenotypes in pigs. **Animal Genetics**, Vol. 45, n (3), p. 311-321, 2014.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, V. 29(9), p. 2002–2007, 2001.
- PFAFFL, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, V. 26, p. 509- 515, 2004.

- ROSTAGNO, H.S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** UFV. Departamento de Zootecnia. Viçosa, MG. 186 pp, 2005.
- RYU, Y.C; KIM, B.C. Comparison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by postmortem metabolic rate and pork quality. **Journal Animal Science**, Vol. 84, p. 894–901, 2008.
- RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Histochemical properties of fibre types in muscles of wild and domestic pigs and the effect of growth rate on muscle fibre properties. **Meat Science**, Vol. 67, p. 533-539, 2004.
- SERÃO, N. V. L. *et al.* Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Vol. 128, n. 1, p. 28-34, 2011.
- SCHEFFLER, T.L. *et al.* Fiber hypertrophy and increased oxidative capacity can occur simultaneously in pig glycolytic skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Vol. 306, n.4, p.C354-C363, 2014.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiology reviews**, Vol. 91, p. 1447–1531, 2011.
- SILVER N. *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, Vol 7, p. 33, 2006.
- SOLLERO, B. P. *et al.* Transcriptional profiling during fetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace crossbred pigs. **Animal Genetics**, Vol. 42, p. 600-612, 2011.
- STEIBEL, J. P. *et al.* A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, 94(2), 146–52, 2009.
- SUN, F. *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. **Cell**, Vol. 121 (7), p. 1043-1057, 2005.
- TONG, Q. *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, Vol. 290, n (5489), p. 134-138, 2000.
- VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biololy**, Vol 3, p. 11- 34, 2002.
- VERARDO, L. L. *et al.* Identification and expression levels of pig miRNAs in skeletal muscle. **Livestock Science**, Vol.154, n.1, p. 45-54, 2012.
- WERNER, C. *et al.* Mitochondrial respiratory activity in porcine longissimus muscle fibers of different pig genetics in relation to their meat quality. **Meat Science**, Vol. 85, n (1), p. 127-133, 2010.
- WINER, J. *et al.* Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Analytic Biochemical**, Vol. 270, p. 41-49, 1999

WU, F. *et al.* Effect of skeletal muscle fibers on porcine meat quality at different stages of growth. **Genetics and Molecular Research**, Vol. 14, p. 7873-7882, 2015.

YANG, Y. *et al.* Comparative analysis of DNA methylome and transcriptome of skeletal muscle in lean-, obese-, and mini-type pigs. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

ZHAO, X. *et al.* Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. **PLoS One**, v. 6, p. e19774, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs. **BMC Genomics**, Vol. 16, n (1), p. 1, 2015.

Capítulo III

Perfil da expressão de genes e fator de transcrição associados à deposição de gordura intramuscular no período pós-natal de suínos divergentes

RESUMO

Neste estudo, objetivou-se analisar o perfil de expressão de genes envolvidos na dinâmica dos transcritos relacionados à deposição de gordura intramuscular em suínos divergentes. Para isso foram analisadas amostras de músculo *Longissimus dorsi* por meio do RNA extraído de 32 animais de dois grupos genéticos de 16 animais, suínos naturalizado Piau e de Linhagem Comercial em 4 idades pós-natal: ao nascer, 56, 112 e 156 dias. Foram selecionados dois genes (FABP4 e PPAR γ) e um fator de transcrição (GATA-2) que atuam na função de deposição de gordura intramuscular e diferenciação de adipócitos e um gene referência (GAPDH), analisadas por RT-qPCR quantitativo em tempo real, cujos dados foram gerados na forma de valor de Ct da amostra. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS®. O gene FABP4 apresentou diferenças significativas de expressão, sendo a variação de expressão entre o nascimento (P=0,014) e 56 dias (P=0,0023), respectivamente 43 e 66 vezes mais expressos, em suínos Piau do que em animais Comercial. Houve efeito de interação entre grupo genético e dentro das idade analisadas (P=0,0023) com um aumento no nível de expressão no contrastes 56 e 112 dias sendo 46 vezes mais expresso. Foi observado entre os idades variação no nível de expressão do gene PPAR γ nos contrastes s idades ao nascer e 56 dias (P = 0,0217), idade ao nascer e 112 dias (P=0,0483) e 156 dias (P=0,0063) sendo 12 vezes a maior diferença de expressão entre idade ao nascer e 112 dias de idade (P=0,0483). O gene GATA-2 apresentou-se diferencialmente expresso entre os grupos genéticos aos 112 dias de idade (P=0,044) em suínos Piau com expressão de oito vezes mais do que em suínos Comercial. Houve efeito de interação entre grupo genético e idade dos suínos (P<,0001) demonstrando variação na proporção de expressão do gene GATA-2 cada idade de abate em suínos Piau e Comercial, já nos suínos Comercial (P<,0001) houve um aumento no nível de expressão muito mais expressiva entre os 56 e 112 dias 414 vezes mais expresso do que em suínos Piau. As diferenças dos níveis de expressão quantificados pelos níveis de mRNA dos genes FAPB4, PPAR γ e fator de transcrição GATA-2 em diferentes idades pós-natal indicam respostas biológicas diferentes com implicações associadas ao acúmulo de gordura intramuscular em suínos, um dos fatores envolvidos na qualidade de carne suína.

Palavras – chaves: Conteúdo de gordura intramuscular; RT-qPCR; Genes diferencialmente expressos.

ABSTRACT

In this study we aimed to analyze the expression profile of genes involved in dynamics of transcripts related to intramuscular fat deposition in divergent pigs. Samples of *Longissimus dorsi* muscle were analyzed by RNA extracted from 32 animals divided into two genetic groups. From each group 16 animals were slaughtered at 4 postnatal ages: at birth, 56, 112, and 156 days. We selected two genes (FABP4 and PPAR γ), and a transcription factor (GATA-2) which act on deposition of intramuscular fat and adipocyte differentiation. These genes and transcription factor were analyzed by means of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), so that data were generated as sample Ct value. Subsequently, such data were analyzed by using the SAS[®] macro %QPCR_MIXED. Significant expression differences were observed for FABP4 gene, so that the expression variation between birth (P = 0.014) and 56 days of age (P = 0.0023) was 43 and 66 fold more expressed in Piau pigs than in Commercial pigs, respectively. Interaction effect between genetic groups and within the analyzed ages was observed (P = 0.0023). An increase in expression level in the contrast 56 and 112 days of age was 46 fold more expressed. Variation was observed in the expression level of PPAR γ in the contrasts age at birth and 56 days (P = 0.0217), 112 days (P = 0.0483), and 156 days (P = 0.0063). The highest expression difference (12 fold) was observed between age at birth and 112 days of age (P = 0.0483). GATA-2 gene was differentially expressed between genetic groups at 112 days of age (P = 0.044) in Piau pigs, with expression eight fold higher than in Commercial pigs. Interaction effect was observed between genetic group and age of pigs (P <0.0001), showing variation in proportion of GATA-2 gene expression at each slaughter age in Piau and Commercial pigs. Between 56 and 112 days of age, the increase in expression level was much more expressive (414 fold) in Commercial pigs than in Piau pigs. Differences in expression levels quantified by mRNA levels of FABP4, PPAR γ genes, and transcription factor GATA-2 at different postnatal ages indicate different biological responses with implications associated with intramuscular fat accumulation in pigs, which is one factor involved in pork quality.

Keyword: differentially expressed genes; intramuscular fat content; RT-qPCR.

1 Introdução

O teor de gordura intramuscular e a composição de ácidos graxos afetam a qualidade organoléptica e o valor nutricional da carne suína (ROS-FREIXEDES *et al.*, 2016). Sabe-se também, que a qualidade da carne suína é influenciada por vários fatores *in vivo* e *pós mortem*, tais como espécies/raças, genótipos, fatores nutricionais e ambientais.

Nesse sentido, fatores *pós mortem* que influenciam a estrutura e a composição do músculo esquelético podem ter implicações diretas entre as propriedades biológicas intramusculares e características de qualidade da carne (LISTRAT *et al.*, 2016). Ressalta-se também, a relação entre o tecido adiposo e o tecido muscular, que constitui a motivação de pesquisas contemporâneas e futuras que visam harmonizar os aspectos quantitativos, carcaças com mais carne magra, e qualitativos desejados da carne, com presença de gordura dentro de níveis que garantam bom marmoreio e benefícios sensoriais.

Por esses aspectos, as fibras musculares, o tecido conjuntivo intramuscular e a gordura intramuscular desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade da carne (LISTRAT *et al.*, 2016). De fato, a variabilidade dos tipos de fibras musculares está associada com diferenças no teor de gordura e no perfil de ácidos graxos, que influencia o sabor e propriedades dietéticas da carne. No entanto, os mecanismos biológicos que levam ao acúmulo diferencial de lipídios nos depósitos de gordura intramuscular permanecem obscuros (DODSON *et al.*, 2010).

Associado a essa problemática, faz-se necessário também a elucidação da relação biológica entre tecido muscular esquelético e potencial de acúmulo de gordura intramuscular. A priori, defende-se a hipótese de que os genes FABP4, PPAR γ e o fator de transcrição GATA-2 possam ser associados com potenciais respostas metabólicas envolvidas na deposição de gordura do músculo *Longissimus dorsi* de suínos a fim de compreender as implicações entre mecanismos biológicos da dinâmica do metabolismo energético muscular, via atividade mitocondrial, e de deposição de gordura intramuscular. Em complemento, acredita-se que será possível complementar informações moleculares acerca de mecanismos que influenciam a relação entre o desenvolvimento muscular pós-natal com potencial de deposição de gordura intramuscular, em suínos distintos geneticamente.

Assim, com esse estudo objetiva-se analisar o perfil de expressão de genes envolvidos na dinâmica dos transcritos relacionados à deposição de gordura intramuscular em suínos de diferentes genéticas, ao longo de diferentes idades pós-natal, a fim de identificar genes e

compreender vias biológicas da fisiologia do acúmulo de gordura intramuscular associado com alterações fisiológicas do desenvolvimento muscular de suínos.

2 Metodologia

2.1 Aspectos éticos e local da pesquisa

Neste estudo, todos os métodos de manejo e procedimentos do experimento foram realizados de acordo com os princípios da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP – UFV), processo n° 86/2014 (Anexo).

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos e no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, a uma altitude aproximada de 650 m, latitude 20° 45' 14" S e a longitude 42° 52' 53" W.

2.2 Delineamento experimental e obtenção de amostras de suínos

Foram utilizados 32 machos castrados pertencentes a 2 grupos genéticos: raça naturalizada Piau e linhagem Comercial (*Landrace* x *Large White* x *Pietrain*). Os 32 animais foram divididos em dois grupos genéticos, sendo 16 animais de cada grupo genético abatidos em 4 idades pós-natal: ao nascer, 56, 112 e 156 dias. Assim, os animais dos dois grupos genéticos foram divididos de acordo com a idade pós-natal e para cada combinação grupo genético e idade de abate houve 4 animais como repetição. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, sendo 2 grupos genéticos, 4 idades pós-natal com 4 repetições por tratamento, totalizando 8 tratamentos.

Durante o experimento os suínos foram alimentados com mesma dieta de acordo com Rostagno *et al.* (2011) e acesso livre à água. Os animais foram pesados e abatidos através de atordoamento elétrico e secção da veia jugular. Imediatamente após o abate cerca de 500 mg de músculo do *Longissimus dorsi* (LD) no local P2 (entre 12° e 13° costela) foram tomadas,

seccionada em 1-2 mm, imediatamente imersos em *RNAlater* (*Ambion, Austin, TX, EUA*) e armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA.

2.3 Extração de RNA

O RNA total foi isolado a partir do músculo esquelético LD individual utilizando *TRIzol Reagent* (*Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha*) de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, amostras do músculo foram maceradas e homogeneizadas com 750 µl de *TRIzol* usando *Polytron*. Para assegurar uma dissociação completa de complexos nucleoprotéicos, as amostras foram deixadas em repouso durante 5 min. A mistura foi agitada e deixada à temperatura ambiente durante 5 min e centrifugou-se a 12000 rpm durante 15 min a 4 ° C. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo de centrífuga e o RNA foi precipitado com 0,6 ml de isopropanol. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras a 10556 rpm durante 10 min a 4° C para sedimentar o RNA, lavou-se subsequentemente em 75% (v/v) de etanol. A centrifugação foi então realizada e os sedimentos de RNA foram ressuspensos em 40 µl de *UltraPure™ DNase / RNase-Free*.

A fim de remover contaminação de DNA genômico, o RNA extraído de todas as amostras foram tratadas com 5 µl de tampão de 5 unidades de DNase e 40 unidades de inibidor de RNase, num volume de reação de 40 µL. A concentração do RNA total foi estimada no espectrofotômetro *NanoVue* (*GE Healthcare, Munique, Alemanha*), enquanto a qualidade e integridade foram determinadas com *Agilent 2100 Bioanalyzer©* (*Agilent Technologies Inc., Ontario, Canada*), a 256 e 280 nm. A pureza de RNA foi estimada no UV pela razão A256/A280 em relação aos contaminantes que absorvem.

2.4 Transcrição reversa e síntese de cDNA

A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1 %. Na sequência as amostras foram tratadas com *DNase* e reversamente transcritas em cDNA utilizando o Kit *GoScript Reverse Transcription* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), seguindo recomendação do fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 2µg de RNA total foram tratados com *DNase I Amplification Grade* (*Invitrogen™*) e posteriormente foram submetidos a transcrição reversa com o kit *GoScript Reverse Transcriptase* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), conforme instruções do fabricante. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos

conforme a programação: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 minuto a 60 °C. Após a síntese as concentrações de cDNA foi estimada pelo espectrofotômetro *Nanovue* (GE *Healthcare*, Munique, Alemanha) e o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na qPCR. As amostras de cDNA foram armazenadas a - 20 °C até o uso na reação de PCR quantitativo em tempo real.

A RT-qPCR, possui como molde inicial a molécula de RNA, como previamente citado e gera cDNA, a partir de desoxirribonucleotídeos trifostatados. A reação inicial de transcrição reversa foi submetida ao protocolo de ciclos conforme o programa: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 1 min a 56 °C. Após a obtenção do cDNA uma alíquota desta amostra de cDNA foi utilizada para a reação de amplificação por PCR. As concentrações de uso de cada par de *primer* foram otimizadas e as amplificações dos genes alvo e do gene referência para cada amostra foram realizadas em duplicatas.

2.5 Seleção dos genes e desenho de primers

Foram selecionados 2 (dois) genes que atuam na via oxidativa (SDHD e ATP6) e 2 (dois) genes da via glicolítica (LDHA e LDHB) que atuam na função mitocondrial do músculo esquelético. Para a normalização dos níveis de expressão de genes e distinção entre a variação real biológica e os desvios resultantes de processos de mensuração, foram selecionados 3 (três) genes (GAPDH, ACT- β e HPRT1) para testes, utilizados como genes de referência ou controle endógeno (Quadro 1). Todos os *primers* foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados NCBI (Centro Internacional de Informação Biotecnológica dos EUA - www.ncbi.nlm.nih.gov), de suínos (*Sus scrofa*). Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes estão apresentados na Tabela

1.

Tabela 1 – Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para as reações de qPCR

Gene	Cromossomo	Nº Acesso (GenBank)	Sequências de Nucleotídeos 5' - 3'	T _m (°C)	Função Biológica
GAPDH* (Endógeno)	5	NC_010447.4 (Edwards e Denhardt, 1985; Winer <i>et al.</i> , 1999)	F:CAAAGTGGACATTGTCGCATCA R:AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGT	60°	Enzima catalizadora da glicólise; Regulação transcricional
ACT- β * (Endógeno)	4	XM_0031242803 (Pohjanvirta <i>et al.</i> , 2006)	F:CTTCTAGGCGGACTGTTAGTG R:AGCCATGCCAATCTCATCTC	60°	Proteína estrutural do citoesqueleto; Estrutura e integridade celular
HPRT1* (Endógeno)	10	NM_001032376.2 (Förster; Stranzinger; Hellkuhl, 1980)	F:CCAGTCAACGGGCGATATAA R:GACCAAGGAAAGCAAGGTTG	60°	Homeostase celular em grande variedade de tecidos
PPAR γ *	13	NM_214379.1 (Grindflek <i>et al.</i> , 1998)	F: GAGTATGCCAAGAACATCCC R: GGCCAGCATGGTGTAAT	60°	Regulação da diferenciação dos adipócitos e síntese de ácidos graxos
FABP4*	4	NC_010446.1 (Gerbens <i>et al.</i> , 1998)	F:AGATTGCCTTCAAATTGGGCCG R:TCTTCCATCCCCTTCTGCAT	60°	Metabolismo de ácidos graxos; Gordura intramuscular – músculo esquelético
GATA-2*	13	NC_010455.4 (Tong <i>et al.</i> , 2000)	F: CAAGATGAACGGGCAGAA R: CCATAAGGTGGTGGTTGTC	60°	Regulação negativa da proliferação de células de gordura

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; Actin β - ACT- β ; Hypoxanthine Phosphoribosyl 1 – HPRT1; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ ; FABP4: Proteína de Ligação de Ácido Graxo; GATA-2: Transcription Factor GATA-2. T_m (°C): Temperatura de anelamento

As sequências de nucleotídeos foram utilizadas para desenhar os *primers* na plataforma *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com>) segundo as diretrizes do software *Primer Quest* (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>).

Foi desenhado um par de *primer* para cada possível gene endógeno (gene referência): β -ACT (Actin β), GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosy 1). A estabilidade dos genes endógenos foi analisada segundo as metodologias *BestKeeper* (PFAFFL *et al.*, 2004), *NormFinder* (ANDERSEN *et al.*, 2004), *Genorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) e Método comparativo do *delta-Ct* (SILVER *et. al.*, 2006) simultaneamente, todas disponíveis na plataforma *on line Leonxie database* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Entre os genes de referência testados, o gene *GAPDH* foi o que apresentou-se mais estável e, portanto, utilizado nas análises de expressão gênica desse estudo. As concentrações de uso de cada par de *primer* foram otimizadas e as amplificações dos genes alvo e do gene referência para cada amostra foram realizadas em duplicatas.

2.4 PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicata técnica utilizando o termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA*), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o fluoróforo *SYBR® Green* do kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (*Promega corporation, Madison, EUA*), conforme instruções do fabricante.

A eficiência da amplificação de cada gene alvo foi calculada de acordo com a curvas padrão para análise da melhor combinação de concentração de cDNA (1, 10, 20 e 40 ng) e de *primer* (100, 200 e 400 nM). Foram utilizados os valores do *Ct* para calcular e traçar uma linha de regressão linear, representando o logaritmo do modelo concentração (eixo X) contra o (eixo Y) no ciclo limiar correspondente. A inclinação da linha foi usada para determinar a eficiência da amplificação do alvo (E) utilizando a equação $E = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$ (PFAFFL, 2001).

Foi utilizado o método de quantificação relativa o qual se emprega o uso da curva padrão onde se leva em consideração o valor *Ct* do gene alvo, no qual cada amostra tem sua cópia. A PCR quantitativo em tempo real apresenta amplificação exponencial por realizar a

avaliação do número de moléculas ciclo a ciclo, em que cada par de *primer* teve suas concentrações de uso otimizada e as amplificações dos genes alvo e do controle endógeno para cada amostra foram realizadas em duplicatas (LIVAK; SCHMITTIGEN, 2001).

A reação de PCR quantitativo em tempo real foi analisada com base no valor de *Ct* ou linha de corte, definido após a reação, sendo este ponto correspondente ao momento da reação, onde a amplificação refere-se ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência atinja um limiar de detecção, que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo em relação ao gene constitutivo. Os valores de *Ct* superiores a 35 ciclos foram considerados como expressão não detectável pela técnica RT-qPCR.

2.5 Análise Estatística

Os dados de expressão dos genes alvo e endógeno foram gerados na forma de valor limiar do ciclo de amplificação (*Cycle threshold* - *Ct*) da amostra. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS® (www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html) segundo a metodologia proposta por Steibel *et al.* (2009), que consiste na análise de valores de *Ct* para os genes alvos e endógenos usando um modelo linear misto. Esta ferramenta gerou linhas de comando posteriormente utilizadas diretamente no procedimento MIXED do Software SAS® 9.3. Estes dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{gijk} = G_i + I_j + (G * I)_{ij} + P_{ij} + D_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde Y_{gijk} corresponde ao valor *Ct* obtido a partir do software do termociclador para o g -ésimo gene (genes alvo ou referência) a partir do r -ésimo poço, que corresponde ao k -ésimo animal submetido ao i -ésimo tratamento (combinação de grupos genéticos e idade pós-natal); G_{ig} , efeito do i th grupo genético no g th gene; I_{jg} , efeito da j th idade pós-natal no g th gene; $(G * I)_{gij}$ efeito da interação entre o i th nível de G e o j th nível de I no g th gene; P_{gij} ; efeito aleatório do k th animal avaliado para o g th gene; D_{gijk} , $\sim N(0,2)$, o efeito aleatório específico da amostra (comuns aos genes alvo e referência) da idade pós-natal j th, do grupo genético i th, no g th gene e ε_{gijk} , o efeito residual.

Foi considerado a probabilidade de 5% de erro para a comparação entre as médias. Para comparação entre os grupos genéticos utilizou-se os valores de *Fold Change* (FC)

estimados a partir dos valores de $\Delta\Delta CT$ e aplicados na seguinte equação: $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. (LIVAK; SCHMITTIGEN, 2001). Foram calculados intervalos de confiança assimétricos (95%) para cada valor FC utilizando o erro-padrão da diferença estimada em intervalo de confiança de 95%. Para análise do padrão de expressão de cada gene ao longo das idades pós-natal nos grupos genéticos foi feito com base na expressão relativa média de cada gene, $2^{-\Delta Ct}$.

3 Resultados

A fim de relacionar o metabolismo energético muscular com a capacidade de armazenamento de gordura intramuscular de suínos foram analisados o gene FABP4 (Proteína de ligação de ácido graxo), associado ao armazenamento de gordura entre as fibras musculares, o gene PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama), e o fator de transcrição GATA-2 envolvido na regulação da diferenciação de adipócitos. As interações entre grupos genéticos e idades de abate dos genes FABP4, PPAR γ e GATA-2 relativas à transcrição quantitativa estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 P valor da análise de variância dos grupos genético, idade e interação grupo genético x idade dos genes FABP4 (Proteína de Ligação de Ácido Graxo) PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferação de Peroxissoma Gama γ); GATA-2 (Fator de Transcrição GATA-2). ANOVA (P valor). *P<0,05; **P<0,01.

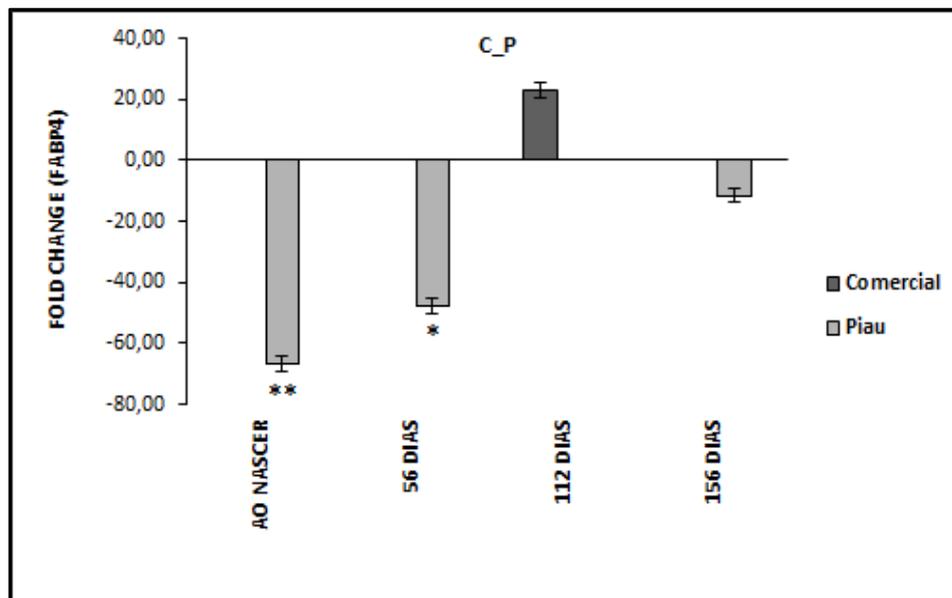
Genes	Grupo Genético	Idade	Grupo Genético x Idade
FABP4	0,0303*	0.0813	0,0023**
PPAR γ	0,62	0,0328*	0,0995
GATA-2	0,6575	<.0001**	<.0001**

3.1 Perfil de expressão de genes associados à deposição de gordura intramuscular

Em relação ao gene FABP4 foram observadas diferenças de expressão entre os grupos genéticos e entre as idades analisadas. O gene FABP4 apresentou-se diferencialmente

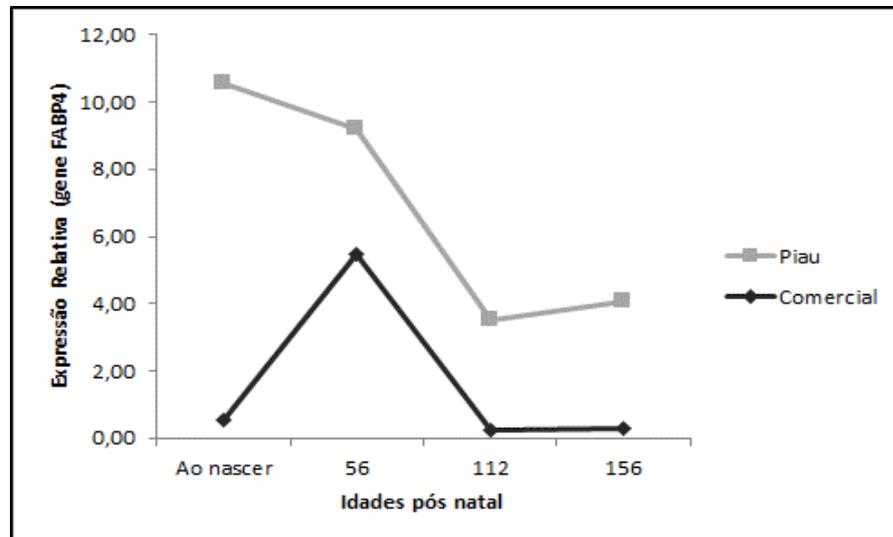
expresso nos suínos Piau na idade ao nascer ($P < 0,01$) e 56 dias de idade ($P < 0,05$), respectivamente 66 e 43 vezes mais expressos do que em suínos Comercial (Figura 6).

Figura 6 Diferença de expressão (*Fold Change*) de mRNA do gene FABP4 em músculo *Longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial utilizando RT-qPCR. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. O gene FABP4 apresentou interação significativa para Raça*Idade (ANOVA). Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste (Comercial-C); barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste (Piau-P).



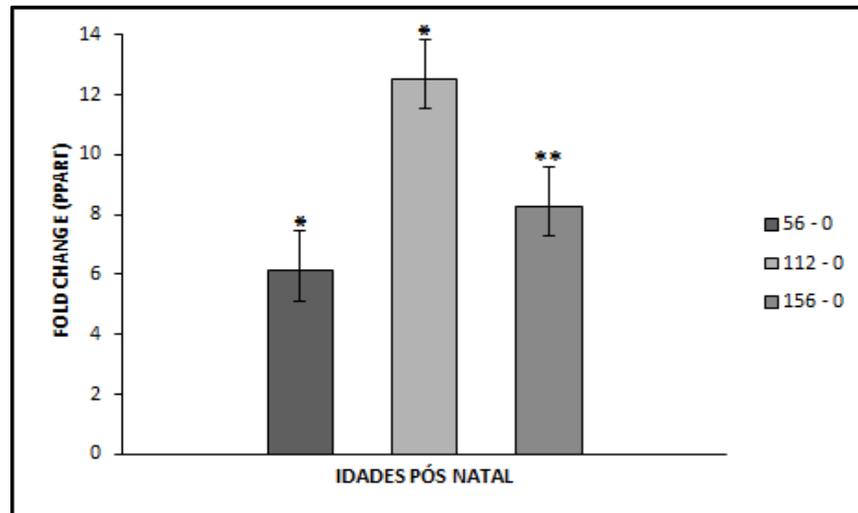
O gene FABP4 também indicou interação entre grupo genético e idade analisadas ($P = 0,0023$) com variação da expressão entre as idades pós-natal analisadas. Houve diferença de expressão aos 112 dias em 20 vezes mais expresso do que aos 156 dias em suínos Comercial e 46 vezes mais expresso aos 56 dias do que aos 112 dias em suínos Piau, ilustrado na Figura 7. A expressão relativa média do gene FABP4 nas diferentes idades pós-natal está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 Expressão relativa do gene FABP4 em músculo *Longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial ao longo de diferentes idades pós-natal utilizando RT-qPCR.



Ao se analisar o perfil de expressão do gene $PPAR\gamma$, que atua como principal regulador do metabolismo lipídico observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos genéticos, mas apresentou diferença significativa entre as diferentes idades. Para os contrastes das idades ao nascer e 56 dias ($P=0,0217$), idade ao nascer e 112 dias ($P=0,0483$) e entre a idade ao nascer e 156 dias ($P=0,0063$). A maior diferença de expressão foi entre o contraste idade ao nascer e 112 dias de idade em 12 vezes mais expresso aos 112 dias do que na idade ao nascer (Figura 9).

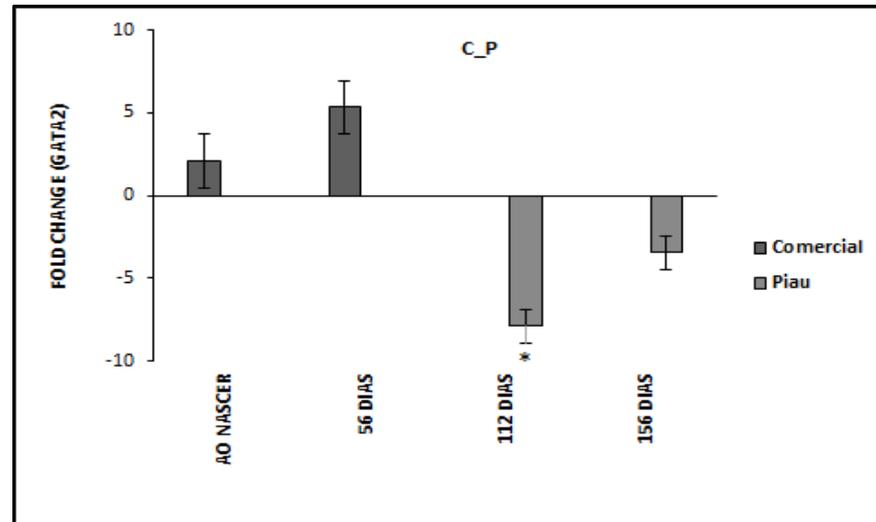
Figura 9 Diferença de expressão (*Fold Change*) de mRNA do gene PPAR γ nos contrastes de idades em músculo *longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial utilizando RT-qPCR. *P<0,05; **P<0,01. Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste; barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste.



3.2 Perfil de expressão de fator de transcrição para regulação da transcrição de características metabólicas associadas à deposição de gordura intramuscular

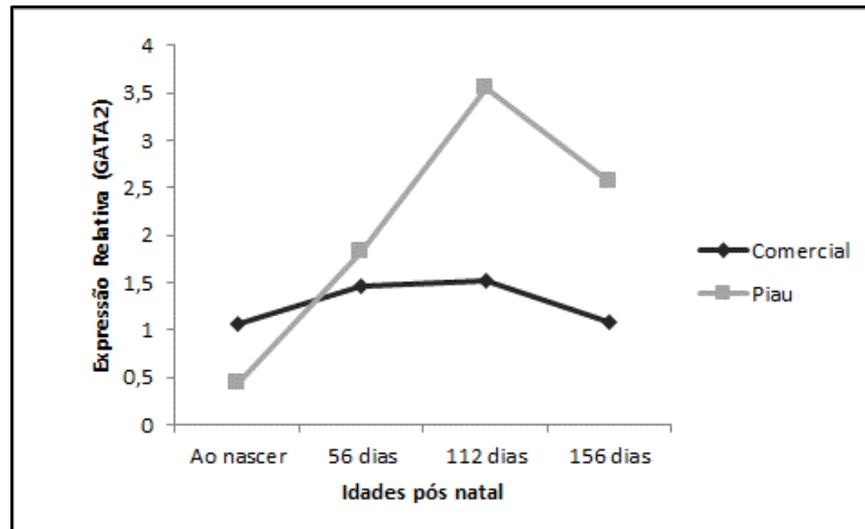
No presente estudo o fator de transcrição GATA-2 foi utilizado como alternativa para ajudar a elucidar mecanismos metabólicos do tecido muscular esquelético de suínos, uma vez que os fatores de transcrição são candidatos importantes para a regulação gênica das características metabólicas de diferentes tipos de fibras musculares. O gene GATA-2 apresentou-se diferencialmente expresso aos 112 dias de idade ($P = 0,044$) oito vezes mais expresso nos suínos Piau do que em suínos Comercial (Figura 10).

Figura 10 Diferença de expressão (*Fold Change*) de mRNA do fator de transcrição GATA-2 em músculo *Longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial ao longo de diferentes idades utilizando RT-qPCR. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. O gene GATA-2 apresentou interação significativa para Raça*Idade (ANOVA). Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste (Comercial-C); barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator do contraste (Piau-P).



Verificou-se variação na proporção de expressão do gene GATA-2 entre idade tanto para os suínos Piau e Comercial. Apresentando destaque, o nível de expressão do GATA-2 em 414 vezes mais expresso aos 56 dias em relação aos 112 dias de idade nos suínos Comercial (Figura 10). Já no contraste idade ao nascer e 56 dias, os suínos Comercial apresentaram-se 85 vezes mais expressos na idade ao nascer do que aos 56 dias de idade. Em suínos Piau, houve diferença de expressão no contraste idade ao nascer e 56 dias de idade e 56 dias e 112 dias de idade, sendo 33 vezes mais expresso ao nascer do que aos 56 dias de idade e nove vezes mais expresso aos 56 dias do que aos 112 dias de idade, respectivamente (Figura 11). A expressão relativa média do fator de transcrição GATA-2 nas diferentes idades pós-natal está ilustrada na Figura 12.

Figura 12 Expressão relativa do fator de transcrição GATA-2 em músculo *Longissimus* de suínos da raça local Piau e linhagem Comercial ao longo de diferentes idades pós-natal utilizando RT-qPCR.



4 Discussão

Esse estudo analisou os níveis de expressão dos genes FABP4 (Proteínas de ligação de ácido graxo), PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama) e um fator de transcrição GATA-2, relacionados a mecanismos que levam ao acúmulo de gordura intramuscular, produção de proteínas do crescimento muscular e na regulação da diferenciação de adipócitos em suínos. Os resultados da análise de variância dos dados de expressão dos genes FABP4, PPAR γ e GATA-2 no músculo *Longissimus dorsi* de suínos divergentes foram agrupados nas idades de abate ao nascer, 56, 112 e 156 dias. Houve interação significativa a 5% de probabilidade para idade e genética sobre a expressão do gene FABP4. Apesar da ausência do efeito entre grupos genéticos sobre a expressão do gene PPAR γ , foi verificado efeito de idade ($P < 0,05$). Sobre a expressão do gene GATA-2 houve interação significativa, a 1% de probabilidade, entre genética e idade (Tabela 2).

Foram observadas diferenças de expressão do gene FABP4 entre os grupos genéticos e entre as idades pós-natal dos animais. Observou-se diferenças de expressão do gene FABP4 em suínos Piau na idade ao nascer e aos 56 dias em relação aos suínos Comercial, sendo maior a expressão nos suínos Piau (Figura 5). Esse resultado permite relacionar o nível de

expressão do gene FABP4 ao metabolismo energético do músculo em suínos Piau. Tal relação indica uma associação entre FABP4 e à atividade metabólica muscular, visto que a via biológica desse gene consiste em direcionar ácidos graxos de cadeia longa para a oxidação ou esterificação nas mitocôndrias e nos peroxissomos, contribuindo, desta forma, para o armazenamento de gordura entre as fibras musculares (BRANDSTETTER *et al.*, 2002; GERBENS, 2004).

Os níveis de expressão do gene FABP4 foram maiores em suínos Piau com diferenças de expressão ao nascer e aos 56 dias. Com base nesse resultado, a hipótese levantada é que o acúmulo de gordura intramuscular em suínos Piau seja em decorrência da predominância de fibras oxidativas (dados não publicados), e nesse estudo os resultados indicam que a função do gene FABP4 pode explicar a variação do conteúdo de gordura intramuscular mais em suínos Piau do que em suínos Comercial, corroborando o estudo de Chen *et al.* (2013), ao verificarem correlação positiva entre o nível de expressão de FABP4 no músculo LD e conteúdo de gordura intramuscular em suínos divergentes. Assim, a variação do conteúdo de gordura intramuscular entre suínos Piau e Comercial, demonstrada pela expressão diferencial do gene FABP4, pode auxiliar em estruturação genética e seleção de suínos com alto potencial de marmoreio, umas das principais características de qualidade de carne.

A expressão diferencial do gene FABP4 entre os contrastes de idade foi maior aos 112 dias, 20 vezes mais expresso do que aos 156 dias, e 46 vezes mais expresso aos 56 dias do que aos 112 dias em suínos Piau (Figura 6). A maior diferença de expressão de FABP4 em suínos Piau aos 112 dias do que aos 156 dias de idade, supostamente seja pelo fato de que nessa idade os suínos Piau apresentarem maior conteúdo de gordura intramuscular, corroborando o estudo de Serão *et al.* (2011). Com o avançar da idade, há aumento na proporção de fibras glicolíticas, com conseqüente diminuição na proporção das fibras oxidativas do tipo I e IIA (RUUSUNEN e PUOLANNE, 2004), o que possibilita o aumento do metabolismo oxidativo no músculo e conseqüente redução do conteúdo de gordura intramuscular devido à diminuição na concentração de FABP4 (GLATZ *et al.*, 2003).

Analisou-se também nesse estudo o gene PPAR γ , elencado como gene candidato para características de gordura, por se tratar de um ativador do subconjunto de genes de fosforilação oxidativa que controla o transporte e oxidação de lipídios. O estudo de Chen *et al.* (2011) verificaram que há associação entre polimorfismo do gene PPAR γ com várias medidas de deposição de gordura. Pelo resultado da expressão diferencial, a ação biológica do gene PPAR γ não indica diferenças fisiológicas entre os suínos distintos geneticamente. Nesse

estudo, verificou-se diferenças nos níveis de expressão do gene PPAR γ apenas entre as idades do período pós-natal com maior expressão aos 112 dias (12 vezes), um menor nível de expressão aos 56 dias (seis vezes) de idade e logo depois aos 156 dias (oito vezes) (Figura 7).

Diante desses resultados, sugere-se que os efeitos do nível de expressão do gene PPAR γ ao longo das idades dias (56 a 156 dias) possam estar associados à capacidade de diferenciação de adipoblastos em adipócitos (maduros) em que pode-se associar os mecanismos de deposição de gordura à fase de 112 dias nos suínos pela maior expressão de PPAR γ aos 112 dias de idade. Diante desse resultados, reforça-se a hipótese de que ao contrário das fibras musculares, as células adiposas não são previamente estabelecidas, sendo continuamente formadas durante o crescimento do animal, corroborando o estudo de Mersmann (2002).

A fim de ampliar o entendimento de novos aspectos genéticos e de mecanismos moleculares do crescimento do músculo esquelético no período pós-natal, paralelamente ao potencial de deposição de gordura intramuscular de suínos divergentes, analisou-se nesse estudo o fator de transcrição GATA-2, dada sua relação com a diferenciação de adipócitos e com a produção de proteínas envolvidas com crescimento muscular. O fator de transcrição GATA-2 está envolvido com a regulação da diferenciação de adipócitos através do controle molecular da transição de pré-adipócitos-adipócito (TONG *et al.*, 2000).

Os resultados deste estudo indicam relação entre os níveis de mRNA transcritos ao longo das idades pós-natal em músculo LD de suínos Comercial com a atividade de diferenciação de adipócitos. Observou-se maior expressão do gene GATA-2 em suínos Piau do que nos suínos Comercial aos 112 dias de idade. Esperava-se essa maior expressão do gene GATA-2 nos suínos Comercial, visto que ao longo das idades pós-natal o desenvolvimento muscular desses animais, principalmente de suínos Comercial, é caracterizada pelo aumento do teor de fibras glicolíticas (dados não publicados). Assim como aborda o estudo de Pena *et al.* (2014), em que apontam as fibras glicolíticas como sendo as principais contribuintes do crescimento muscular, além de serem caracterizadas por baixas quantidades de mioglobina e mitocôndrias, alta capacidade glicolítica e baixo teor de lipídios, este último sendo representativo de suínos Comercial.

Com base no padrão de expressão do gene GATA-2 neste estudo, há indícios da relação desse fator de transcrição com mecanismos biológicos para produção de proteínas envolvidas no crescimento muscular e não com a diferenciação de adipócitos, em suínos Piau e Comercial. Possivelmente, a expressão diferencial do fator de transcrição GATA-2 pode

estar associado com processos biológicos e com a variabilidade de desenvolvimento muscular dos suínos divergentes. Essa hipótese está consistente ao que refere o estudo de Paul; Rosenthal (2002), em que destacam a acumulação extranuclear do GATA-2 em músculos hipertróficos como sendo uma distribuição subcelular incomum para um fator de transcrição, que pode refletir um papel diferente para esta proteína em fases posteriores do desenvolvimento do músculo esquelético.

5 Conclusão

Os perfil de expressão do gene FABP4 (Proteína de Ligação de Ácidos Graxos) e do fator de transcrição GATA-2 estão envolvidos nos processos biológicos que levam ao armazenamento de gordura intramuscular em suínos distintos geneticamente. O perfil de expressão do gene PPAR γ indica diferenças no período pós-natal mas não aponta diferenças genéticas entre os suínos divergentes. Além disso, a ação biológica dos genes envolvidos na fisiologia do crescimento muscular possivelmente estão associados com processos biológicos do metabolismo de deposição de gordura intramuscular no período pós-natal de suínos.

6 Discussão Geral dos Resultados

O resultado da análise estatística pra cada contraste entre os tratamentos estão apresentados nas Tabelas suplementares 1 e 2 (apêndice). Os resultados enfatizam a importância do perfil de transcrição de genes relacionados às atividade enzimáticas da via oxidativa e glicolítica fundamentais para a capacidade metabólica das fibras musculares, bem como a análise comparativa do perfil de expressão de genes envolvidos com potencial de deposição de gordura intramuscular. Tomados em conjuntos, foram analisadas a proporção de mRNA dos genes envolvidos na função mitocondrial (ATP6, SDHD, LDHA e LDHB) e no metabolismo de gordura intramuscular (FABP4, PPAR γ e fator de transcrição GATA-2). Os dados de expressão dos genes que mostraram interação entre os grupos genéticos e as idades de abate (Tabelas 1 e 2) foram utilizados apenas para calcular a proporção relativa de cada gene.

Em análise conjunta, o padrão de expressão dos genes PPAR γ e FABP4 obtidas nesse estudo pode contribuir para elucidar substancialmente a relação entre a atividade do tecido adiposo e o metabolismo energético muscular em suínos via atividade mitocondrial, corroborando os níveis de expressão dos genes ATP6 e SDHD analisados no capítulo II. Essa relação justifica-se pelos eventos bioquímicos que possivelmente sustentam os resultados encontrados, dentre eles o fato de o tecido adiposo ser o principal reservatório energético do organismo e sua participação no metabolismo energético total é relevante em mamíferos, uma vez que em temperaturas ambientais normais, aproximadamente metade do metabolismo energético pode ser relacionada à atividade do tecido adiposo marrom e, em condições de baixas temperaturas a energia é predominantemente gasta neste tecido, segundo Fonseca - Alaniz *et al.* (2006).

Outra análise conjunta que pode-se fazer, é que verificou-se maior expressão do genes FABP4 no início da fase pós-natal (ao nascer) em suínos Piau (Figura 5) e maior nível de expressão do gene PPAR γ entre as idades, independente da genética, com o avançar das idades pós-natal. Esses resultados estão consistentes com a abordagem do estudo de Kajimura *et al.* (2010) ao evidenciarem que, apesar das diferenças nas origens de desenvolvimento e funções fisiológicas de tecido adiposo marrom (FABP4) e branco (PPAR γ), ambos os tipos de células compartilham uma cascata de transcrição muito semelhante que controla o processo de diferenciação de gordura.

Pode-se relacionar também, o perfil de expressão de PPAR γ com padrão de expressão do gene LDHA, mais expressos nos suínos Comercial em todas as idades do que nos animais Piau (dados não publicados). Possivelmente isso indica que em músculos com predominância de fibras glicolíticas há uma diminuição na expressão do PPAR γ e da produção de lipídios, conforme revisado por Pena *et al.* (2014). Por esses resultados, possivelmente os genes PPAR γ e LDHA são ativados inversamente na dinâmica do metabolismo muscular e na atividade de deposição de gordura intramuscular de suínos.

Pelos resultados da expressão diferencial de genes em suínos divergentes, é possível outra comparação quanto aos níveis de expressão obtidos nesse estudo, agora num paralelo entre os o padrão de expressão dos genes ATP6, LDHA, PPAR γ e FABP4, para fins de associação entre funções dos genes da atividade mitocondrial e de genes relacionados à deposição de gordura intramuscular. Em suínos Piau, houve maior expressão do genes ATP6 e FABP4 nas fases iniciais, entre o nascimento e 56 dias, período em que o metabolismo mitocondrial é oxidativo e simultaneamente o metabolismo energético desses animais está

voltado parcialmente para a atividade do tecido adiposo marrom em temperaturas ambientes normais e totalmente, em condições de baixas temperaturas. A cerca disso, encontra-se ilustrado e revisado por Pena *et al* (2014), que genes ativados nos músculos ricos em fibras oxidativas promove um volume de carcaça mais rápido que resulta em acúmulo de gordura intramuscular.

Ainda sobre a atividade mitocondrial, os resultados desse estudo nos permite uma abordagem comparativa quanto ao tipo das fibras musculares com implicações no crescimento muscular, dessa vez em relação ao padrão de expressão dos genes ATP6 e LDHA atuantes nas vias glicolítica e oxidativa do metabolismo energético muscular, respectivamente. Os níveis de mRNA do gene LDHA entre as idades de suínos não altera, como pode-se notar na descrição da (Tabela 2).

Portanto, possivelmente o metabolismo glicolítico não sofre alterações e, a hipótese que se sustenta é que seja em razão da alteração do metabolismo oxidativo, frente aos resultados da diferença de expressão do gene ATP6. Dessa forma, é provável que o metabolismo muscular de suínos apresente mudanças proeminentes quanto ao teor de fibras oxidativas com o avançar das idades pós-natal, diferentemente do teor de fibras glicolíticas. Já entre as raças, há diferenças nos níveis de expressão do gene LDHA e ATP6. Em suínos Comercial prevaleceu uma alta expressão do gene LDHA em todas as idades, sendo maior ainda aos 156 dias de idade, provavelmente devido ao fato de ser um período de maturidade sexual dos suínos, como relatado anteriormente, e simultaneamente esses animais estão fase de crescimento com predominância de fibras glicolíticas.

Por esses aspectos, em paralelo aos níveis de expressão do gene LDHA, têm-se os níveis de mRNA transcritos pelo gene ATP6, em idades iniciais de suínos Piau, com maior nível de expressão desse gene na fase entre o nascimento e 56 dias de idade, dessa vez com metabolismo predominante em fibras oxidativas em que, metabolicamente esses suínos apresentam maior conteúdo mitocondrial e consequente produção de ácidos graxos responsáveis pela precoce deposição de gordura dos suínos Piau.

Ainda em relação à deposição de gordura intramuscular, tem-se o gene PPAR γ como regulador mestre da adipogênese, este tendo apresentado maior expressão aos 112 de idade em relação a idade ao nascer, fase em que os animais independente da raça, apresentam pouco conteúdo mitocondrial. Em consistência, informações similares são referidas por Virtanen *et al.* (2009), ao caracterizarem o tecido adiposo marrom pela expressão de quantidades substanciais de proteínas UCP1 e mitocôndria, em contraste com tecido adiposo branco, que

relativamente possuem menos mitocôndrias. Considera-se também, o fato de o tecido adiposo marrom possuir altos níveis de proteínas de ligação de ácidos graxos, codificadas pelo gene FABP4, em fase iniciais de mamíferos, além de quantidades de proteínas UCP1 que são ativadas na presença de enzimas transportadoras de elétrons da membrana interna da mitocôndria, como a ATP sintase e Succinato Desidrogenase, codificadas pelos genes ATP6 e SDHD, respectivamente.

7 Considerações Finais

A análise de expressão gênica realizada nesse estudo permitiu a abordagem de características de interesse econômico sob uma perspectiva na qual a genética e a fisiologia estão integradas. Em ambos os conjuntos de dados, confirmou-se que os genes analisados nesse estudo são importantes em relação à dinâmica do crescimento e desenvolvimento muscular dos diferentes grupos de suínos.

De acordo com os níveis de mRNA quantificados dos seis genes analisados foi possível demonstrar que há alteração no padrão de expressão dos genes relacionados aos mecanismos biológicos do metabolismo energético da atividade mitocondrial de deposição de gordura intramuscular em suínos de diferentes grupos genéticos. Além do mais, prover maiores informações acerca da genética molecular envolvida em vias metabólicas importantes das fibras musculares, geram informações adicionais aos programas de melhoramento genético animal.

As diferenças dos níveis de expressão quantificados pelos níveis de mRNA dos genes e fatores de transcrição ATP6, LDHA, FABP4, PPAR γ e o fator de transcrição GATA-2 em diferentes idades pós-natal indicam respostas biológicas diferentes com implicações diretas na hipertrofia muscular e acúmulo de gordura em suínos, fatores responsáveis pela qualidade de carne suína. O perfil de expressão dos SDHD e PPAR γ apontam que suas ações biológicas estão associadas com o crescimento pós-natal e não indica diferenças genéticas entre os suínos divergentes.

Para ampliar o entendimento dos complexos moleculares de processos metabólicos musculares são necessárias análises de proteínas importantes envolvidas no processo de desenvolvimento muscular com implicações relevantes na deposição de gordura intramuscular dos grupos de suínos analisados nesse estudo, como por exemplo a técnica *Western Blotting*. Outras análises de expressão de genes associados ao sistema endócrino e nervoso desses

suínos poderá complementar e elucidar o entendimento dos efeitos de ativação ou inibição de genes analisados nesse estudo, como por exemplo os genes PPAR γ e GATA-2.

Por último, considera-se que este estudo contribuiu para elucidar alterações biológicas envolvidas no desenvolvimento muscular e acúmulo de gordura intramuscular com efeitos da genética e da idade em suínos da raça local Piau e Linhagem Comercial com potencial importância para produção de suínos.

8 Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela cessão do material genético, disponibilidade de equipamentos e infraestrutura para a execução desta pesquisa.



9 Referências

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, V. 64, p. 5245-5250, 2004.

CHEN Q. M. *et al.* Developmental changes and effect on intramuscular fat content of H-FABP and A-FABP mRNA expression in pigs. **Journal of Applied Genetics**, Ed Feb, Vol. 54(1), p. 119-23, 2013.

DEPIERI, T. *et al.* UCP-3: Regulação da expressão gênica no músculo esquelético e possível relação com o controle do peso corporal. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, Vol.48, n.3, p. 337-344, 2004.

DRAOUI, N.; FERON, O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. **Disease models & mechanisms**, Vol. 4, n. 6, p. 727-732, 2011.

- EDWARDS, D. R.; DENHARDT, D. T. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, Vol. 157, p. 127-143, 1985.
- FERGUSON, D.M.; GERRARD, D.E. Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. **Animal Production Science**, Vol. 54, n.4, p.464-481, 2014.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* O tecido adiposo marrom como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, Vol. 50, n.2, p. 216-227, 2006.
- FANTIN V. R. *et al.* Attenuation of LDH-a expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**, Vol. 9, p. 425–434, 2006.
- FÖRSTER, M.; STRANZINGER, G.; HELLKUHL, B. X-chromosome gene assignment of swine and cattle. **Naturwissenschaften**, v. 67, n. 1, p. 48-49, 1980.
- HAMILL, R. M. *et al.* Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. **Meat Science**, Vol. 92, n (4), p. 440-450, 2012.
- GLATZ, J. F. C. *et al.* Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, Issue 4, p. 367-371, 2003.
- GRINDFLEK, E. *et al.* Characterisation of porcine peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and gamma 2: detection of breed and age differences in gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol 249 (3), p. 713-718, 1998.
- KAJIMURA, S.; SEALE, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional control of brown fat development. **Cell Metabolism**, Vol. 11, n. 4, p. 257-262, 2010.
- KARLSSON, A. *et al.* Muscle Histochemical And Biological Properties In relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs. **Journal of Animal Science**, Vol. 71, p. 930-938, 1993.
- KIM, N.K.; LIM, J.H.; SONG, M.J. Comparisons of longissimus muscle metabolic enzymes and muscle fibre types in Korean and western pig breeds. **Meat Science**, v.78, p.455-460, 2008.
- LEVIS, D. G. Production Management: Managing post-pubertal boars for optimum fertility. **Swine Med**, p. 17-23, The Compendium January 1997.
- LIN, C. S. *et al.* Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. **Gene**, Vol. 236(1), p. 107-114, 1999.
- LIU, J. *et al.* Differentially-expressed genes in pig Longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 57, n (9), p. 3808-3817, 2009.

- LIU, X. *et al.* Molecular changes in mitochondrial respiratory activity and metabolic enzyme activity in muscle of four pig breeds with distinct metabolic types. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Vol. 48, n (1), p. 55-65, 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- PAUL, A. C.; ROSENTHAL, N. Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. **The Journal of cell biology**, Vol. 156, n. 4, p. 751-760, 2002.
- PENA, R. N. *et al.* Application of the microarray technology to the transcriptional analysis of muscle phenotypes in pigs. **Animal Genetics**, Vol. 45, n (3), p. 311-321, 2014.
- PFÄFFL, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol. Lett**, V. 26, p. 509- 515, 2004.
- RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Histochemical properties of fibre types in muscles of wild and domestic pigs and the effect of growth rate on muscle fibre properties. **Meat Science**, Vol. 67, p. 533-539, 2004.
- SERÃO, N. V. L. *et al.* Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Vol. 128, n. 1, p. 28-34, 2011.
- SCHEFFLER, T.L. *et al.* Fiber hypertrophy and increased oxidative capacity can occur simultaneously in pig glycolytic skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Vol. 306, n.4, p.C354-C363, 2014.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiology. Rev**, Vol. 91, p. 1447–1531, 2011.
- SILVER N. *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, Vol 7, p. 33, 2006.
- SOLLERO, B. P. *et al.* Transcriptional profiling during fetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace crossbred pigs. **Animal Genetics**, Vol. 42, p. 600-612, 2011.
- STEIBEL, J. P. *et al.* A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, 94(2), 146–52, 2009.
- SUN, F. *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. **Cell**, Vol. 121 (7), p. 1043-1057, 2005.
- TONG, Q. *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, Vol. 290, n (5489), p. 134-138, 2000.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, Vol 3, p. 11- 34, 2002.

WINER, J. *et al.* Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Analytical Biochemical**, Vol. 270, p. 41-49, 1999.

WU, F. *et al.* Effect of skeletal muscle fibers on porcine meat quality at different stages of growth. **Genetics and Molecular Research**, Vol. 14, p. 7873-7882, 2015.

ZHAO, Y. *et al.* Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs. **BMC Genomics**, Vol. 16, n (1), p. 1, 2015.

ZHANG, S. H. *et al.* Breed, sex and anatomical location-specific gene expression profiling of the porcine skeletal muscles. **BMC Genetics**, Vol. 14:53, p. 1-9, 2013.

ZHAO, Y. *et al.* Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs. **BMC genomics**, Vol. 16, n. 1, p. 1, 2015.

Material Suplementar

Anexo I – Parecer CEUA-UFV

Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa-
CEUA-UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900 - Telefone: (31) 3599.3275 - e-mail: ceua@ufv.br - site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 06/10/14

CERTIFICADO

A comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa certifica que o processo n° 86/2014, intitulado “**Expressão gênica das isoformas da cadeia pesada da miosina em suínos de diferentes grupos genéticos e idades**”, coordenado pelo prof(a). **Simone Eliza Facioni Guimarães**, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 06/Out/2014.

CERTIFICATE

The ethic commission in use of production animals of universidade federal de viçosa certifies that the process number 86/2014, named “**Gene expression of myosin heavy chain isoforms in pigs of different genetic groups and ages**”, coordinated by prof(a). **Simone Eliza Facioni Guimarães**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and with actual Brazilian legislation, and was approved by this commission on Oct, 06th, 2014.

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV

Apêndice

Eficiência de amplificação do gene referência - GAPDH

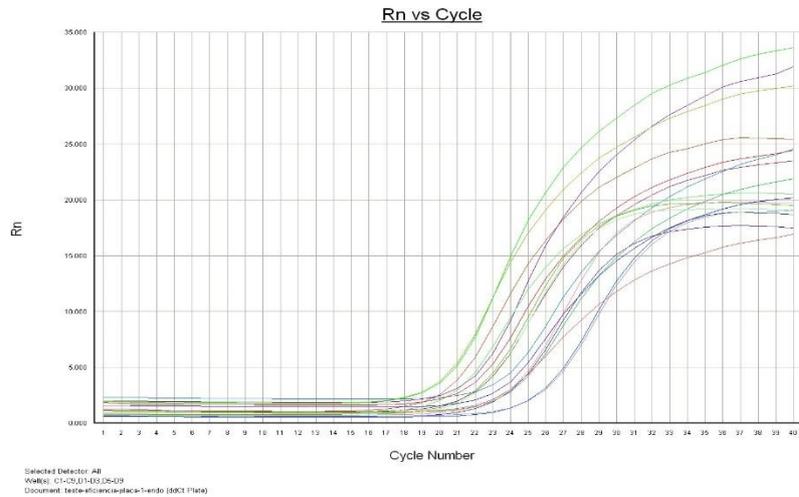
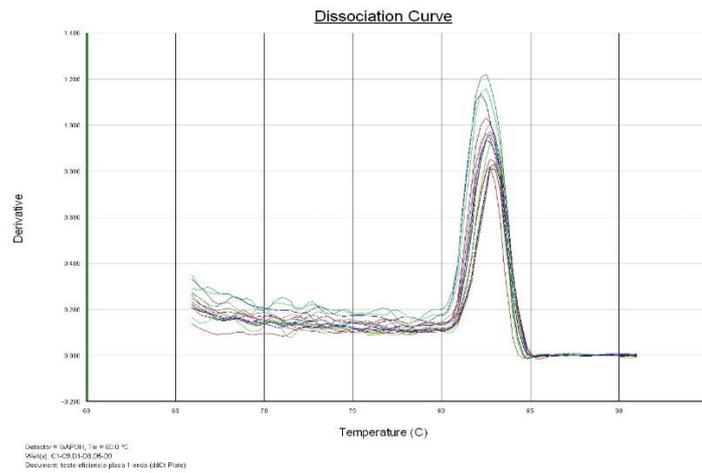
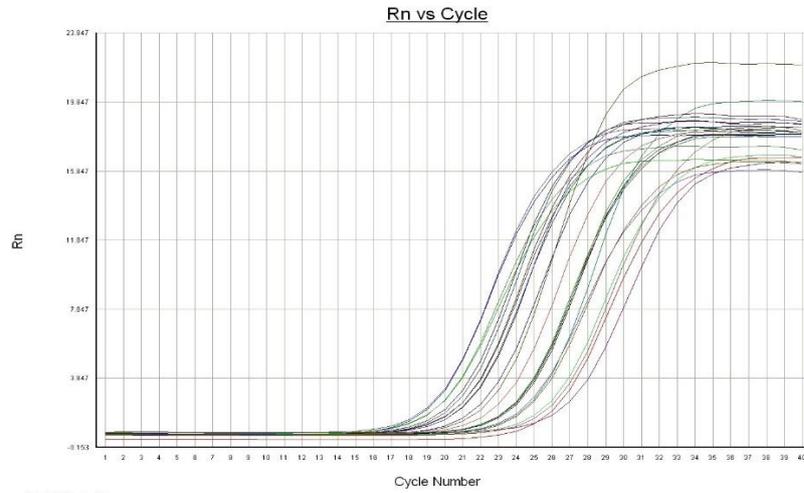


Tabela Suplementar 1 – *Fold Change* (FC) dos genes para cada contraste entre grupos genéticos dentro de cada idades de abate de suínos.

Gene	Grupo genético	Contraste	FC	Erro Padrão	P valor
ATP6	C	0 – 56	176,42	2,33	0,0018
		0 – 112	380,67	2,33	0,0004
		0 – 156	106,97	2,33	0,0047
		56 – 112	2,15	2,33	0,6356
		56 – 156	-1,64	2,33	0,7578
		112 – 156	-3,55	2,33	0,4345
	P	0 – 56	2,68	2,33	0,5422
		0 – 112	159,22	2,33	0,0022
		0 – 156	3,15	2,33	0,4792
		56 – 112	59,18	2,33	0,0131
		56 – 156	1,17	2,33	0,9217
		112 – 156	50,46	2,33	0,017
LDHA	C	0 – 56	1,30	2,46	0,8779
		0 – 112	-2,49	2,46	0,5948
		0 – 156	0,25	2,46	0,4264
		56 – 112	-3,24	2,46	0,4933
		56 – 156	-5,09	2,46	0,3433
		112 – 156	0,63	2,46	0,7915
	P	0 – 56	2,59	2,46	0,5786
		0 – 112	0,40	2,46	0,5933
		0 – 156	0,87	2,46	0,9355
		56 – 112	-6,48	2,46	0,2769
		56 – 156	-2,97	2,46	0,5247
		112 – 156	2,17	2,46	0,6504

FC = *Fold Change*; valores de FC negativos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na primeira idade; valores de FC positivos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na segunda idade da comparação (C = Suínos da Linhagem Comercial; P = suínos da Raça local Piau).

Tabela Suplementar 1 (Cont) – *Fold Change* (FC) dos genes para cada contraste entre grupos genéticos dentro de cada idades de abate de suínos.

Gene	Grupo genético	Contraste	FC	Erro Padrão	P valor		
FABP4	C	0 – 56	7,48	2,42	0,2333		
		0 – 112	-3,13	2,42	0,4977		
		0 – 156	6,67	2,42	0,2565		
		56 – 112	-23,43	2,42	0,0628		
		56 – 156	-1,12	2,42	0,9450		
		112 – 156	20,90	2,42	0,0237		
	P	0 – 56	10,48	2,42	0,1641		
		0 – 112	492,88	2,42	0,0003		
		0 – 156	38,92	2,42	0,0312		
		56 – 112	46,98	2,42	0,0237		
		56 – 156	3,71	2,42	0,4363		
		112 – 156	-12,66	2,42	0,1332		
		GATA-2	C	0 – 56	-85,59	1,46	<,0001
				0 – 112	4,84	1,46	0,1302
0 – 156	5,12			1,46	0,1172		
56 – 112	414,57			1,46	<,0001		
56 – 156	-438,52			1,46	<,0001		
112 – 156	1,05			1,46	0,9561		
P	0 – 56		-33,22	1,46	0,0008		
	0 – 112		-3,37	1,46	0,2341		
	0 – 156		-1,38	1,46	0,7467		
	56 – 112		9,83	1,46	0,0265		
	56 – 156		23,90	1,46	0,0023		
	112 – 156		-2,42	1,46	0,3847		

FC = *Fold Change*; valores de FC negativos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na primeira idade; valores de FC positivos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na segunda idade da comparação (C = Suínos da Linhagem Comercial; P = suínos da Raça local Piau).

Tabela Suplementar 2 – *Fold Change* dos níveis de expressão para cada contraste entre grupos genéticos dentro de cada idades de abate de suínos.

Gene	Idade	Comparação	FC	Erro Padrão	P valor
ATP6	0	C-P	-1,53	2,33	0,7941
	56	C-P	-100,16	2,33	0,0053
	112	C-P	-3,65	2,33	0,4253
	156	C-P	-51,79	2,33	0,0163
LDHA	0	C-P	31,27	2,46	0,0466
	56	C-P	62,32	2,46	0,0173
	112	C-P	31,16	2,46	0,0468
	156	C-P	106,67	2,46	0,0074
FABP4	0	C-P	-66,85	2,42	0,014
	56	C-P	-47,67	2,42	0,023
	112	C-P	23,09	2,42	0,064
	156	C-P	-11,46	2,42	0,149
GATA-2	0	C-P	2,07	1,46	0,484
	56	C-P	5,33	1,46	0,098
	112	C-P	-7,91	1,46	0,044
	156	C-P	-3,44	1,46	0,227

FC = *Fold Change*; valores de FC negativos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na primeira idade; valores de FC positivos indicam o número de vezes que o gene foi mais expresso na segunda idade da comparação (C = Suínos da Linhagem Comercial; P = suínos da Raça local Piau).

Output SAS: análise de expressão do gene ATP6

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneATP6	3,7051	1,1675	112	3,17	0,0019
IDADE:D0-D120 gene ATP6	-7,9436	1,6511	112	-4,81	<,0001
IDADE:D0-D160 gene ATP6	-4,1994	1,6511	112	-2,54	0,0123
IDADE:D0-D60 gene ATP6	-4,4453	1,6511	112	-2,69	0,0082
IDADE:D120-D160 geneATP6	3,7442	1,6511	112	2,27	0,0253
IDADE:D120-D60 gene ATP6	3,4984	1,6511	112	2,12	0,0363
IDADE:D160-D60 gene ATP6	-0,2459	1,6511	112	-0,15	0,8819
GENET:C-P IDADE=D0 gene:ATP6	0,611	2,3349	112	0,26	0,7941
GENET:C-P IDADE=D120 gene:ATP6	1,8685	2,3349	112	0,8	0,4253
GENET:C-P IDADE=D160 gene:ATP6	5,6945	2,3349	112	2,44	0,0163
GENET:C-P IDADE=D60 gene:ATP6	6,6462	2,3349	112	2,85	0,0053
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:ATP6	-8,5724	2,3349	112	-3,67	0,0004
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:ATP6	-6,7411	2,3349	112	-2,89	0,0047
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:ATP6	-7,4629	2,3349	112	-3,2	0,0018
IDADE:D120-D160 GENET=C gene:ATP6	1,8313	2,3349	112	0,78	0,4345
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:ATP6	1,1095	2,3349	112	0,48	0,6356
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:ATP6	-0,7218	2,3349	112	-0,31	0,7578
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:ATP6	-7,3149	2,3349	112	-3,13	0,0022
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:ATP6	-1,6576	2,3349	112	-0,71	0,4792
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:ATP6	-1,4276	2,3349	112	-0,61	0,5422
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:ATP6	5,6572	2,3349	112	2,42	0,017
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:ATP6	5,8872	2,3349	112	2,52	0,0131
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:ATP6	0,23	2,3349	112	0,1	0,9217

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GENET geneATP6	1	112	10,07	0,0019
IDADE geneATP6	3	112	7,75	<,0001
GENET*IDADE geneATP6	7	112	5,43	<,0001

Output SAS: análise de expressão do gene SDHD

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneSDHD	-0,1956	0,9246	112	-0,21	0,8329
IDADE:D0-D120 gene SDHD	-3,8191	1,3076	112	-2,92	0,0042
IDADE:D0-D160 gene SDHD	-1,0503	1,3076	112	-0,8	0,4236
IDADE:D0-D60 gene SDHD	-0,9711	1,3076	112	-0,74	0,4593
IDADE:D120-D160 geneSDHD	2,7689	1,3076	112	2,12	0,0364
IDADE:D120-D60 gene SDHD	2,8481	1,3076	112	2,18	0,0315
IDADE:D160-D60 gene SDHD	0,07919	1,3076	112	0,06	0,9518
GENET:C-P IDADE=D0 gene:SDHD	-1,9811	1,8493	112	-1,07	0,2863
GENET:C-P IDADE=D120 gene:SDHD	1,3746	1,8493	112	0,74	0,4588
GENET:C-P IDADE=D160 gene:SDHD	-1,8886	1,8493	112	-1,02	0,3093
GENET:C-P IDADE=D60 gene:SDHD	1,7127	1,8493	112	0,93	0,3563
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:SDHD	-5,497	1,8493	112	-2,97	0,0036
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:SDHD	-1,0965	1,8493	112	-0,59	0,5544
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:SDHD	-2,818	1,8493	112	-1,52	0,1304
IDADE:D120-D160 GENET=C gene:SDHD	4,4005	1,8493	112	2,38	0,019
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:SDHD	2,679	1,8493	112	1,45	0,1502
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:SDHD	-1,7215	1,8493	112	-0,93	0,3539
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:SDHD	-2,1412	1,8493	112	-1,16	0,2494
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:SDHD	-1,004	1,8493	112	-0,54	0,5883
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:SDHD	0,8759	1,8493	112	0,47	0,6367
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:SDHD	1,1372	1,8493	112	0,61	0,5398
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:SDHD	3,0171	1,8493	112	1,63	0,1056
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:SDHD	1,8799	1,8493	112	1,02	0,3116

Contrasts

Label	DF	F Value	Pr >
GENET geneSDHD	1	0,04	0,8329
IDADE geneSDHD	3	3,16	0,0275
GENET*IDADE geneSDHD	7	1,87	0,0813

Output SAS: análise de expressão do gene LDHA

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneLDHA	-5,6567	1,234	112	-4,58	<,0001
IDADE:D0-D60 gene LDHA	-0,8774	1,7452	112	-0,5	0,6161
IDADE:D120-D160 geneLDHA	-0,2339	1,7452	112	-0,13	0,8936
IDADE:D120-D60 gene LDHA	-2,1966	1,7452	112	-1,26	0,2108
IDADE:D160-D60 gene LDHA	-1,9627	1,7452	112	-1,12	0,2632
GENET:C-P IDADE=D0 gene:LDHA	-4,9668	2,4681	112	-2,01	0,0466
GENET:C-P IDADE=D120 gene:LDHA	-4,9615	2,4681	112	-2,01	0,0468
GENET:C-P IDADE=D160 gene:LDHA	-6,737	2,4681	112	-2,73	0,0074
GENET:C-P IDADE=D60 gene:LDHA	-5,9616	2,4681	112	-2,42	0,0173
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:LDHA	1,3165	2,4681	112	0,53	0,5948
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:LDHA	1,9704	2,4681	112	0,8	0,4264
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:LDHA	-0,38	2,4681	112	-0,15	0,8779
IDADE:D120-D160 GENET=C gene:LDH	0,6539	2,4681	112	0,26	0,7915
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:LDHA	-1,6965	2,4681	112	-0,69	0,4933
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:LDHA	-2,3504	2,4681	112	-0,95	0,343
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:LDHA	1,3218	2,4681	112	0,54	0,5933
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:LDHA	0,2001	2,4681	112	0,08	0,9355
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:LDHA	-1,3749	2,4681	112	-0,56	0,5786
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:LDH	-1,1216	2,4681	112	-0,45	0,6504
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:LDHA	-2,6966	2,4681	112	-1,09	0,2769
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:LDHA	-1,575	2,4681	112	-0,64	0,5247

Contrasts

Label	DF	DF	F Value	Pr > F
GENET geneLDHA	1	112	21,01	<,0001
IDADE geneLDHA	3	112	0,68	0,5663
GENET*IDADE geneLDHA	7	112	3,35	0,0028

Output SAS: análise de expressão do gene LDHB

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneLDHB	-0,292	1,2845	112	-0,23	0,8206
IDADE:D0-D120 gene LDHB	-3,3703	1,8166	112	-1,86	0,0662
IDADE:D0-D160 gene LDHB	-3,2099	1,8166	112	-1,77	0,08
IDADE:D0-D60 gene LDHB	-2,6088	1,8166	112	-1,44	0,1538
IDADE:D120-D160 geneLDHB	0,1604	1,8166	112	0,09	0,9298
IDADE:D120-D60 gene LDHB	0,7615	1,8166	112	0,42	0,6759
IDADE:D160-D60 gene LDHB	0,6011	1,8166	112	0,33	0,7413
GENET:C-P IDADE=D0 gene:LDHB	-4,1566	2,5691	112	-1,62	0,1085
GENET:C-P IDADE=D120 gene:LDHB	4,4721	2,5691	112	1,74	0,0845
GENET:C-P IDADE=D160 gene:LDHB	0,5224	2,5691	112	0,2	0,8392
GENET:C-P IDADE=D60 gene:LDHB	-2,0059	2,5691	112	-0,78	0,4366
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:LDHB	-7,6846	2,5691	112	-2,99	0,0034
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:LDHB	-5,5494	2,5691	112	-2,16	0,0329
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:LDHB	-3,6841	2,5691	112	-1,43	0,1544
IDADE:D120-D160 GENET=C gene:LDH	2,1352	2,5691	112	0,83	0,4077
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:LDHB	4,0005	2,5691	112	1,56	0,1223
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:LDHB	1,8653	2,5691	112	0,73	0,4693
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:LDHB	0,9441	2,5691	112	0,37	0,7139
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:LDHB	-0,8704	2,5691	112	-0,34	0,7354
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:LDHB	-1,5334	2,5691	112	-0,6	0,5518
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:LDHB	-1,8145	2,5691	112	-0,71	0,4815
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:LDHB	-2,4775	2,5691	112	-0,96	0,3369
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:LDHB	-0,663	2,5691	112	-0,26	0,7968

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GENET geneLDHB	1	112	0,05	0,8206
IDADE geneLDHB	3	112	1,49	0,2221
GENET*IDADE geneLDHB	7	112	1,54	0,162

Output SAS: análise de expressão do gene FABP4

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneFABP4	2,6568	1,2106	112	2,19	0,0303
IDADE:D0-D120 gene FABP4	-3,649	1,7121	112	-2,13	0,0352
IDADE:D0-D160 gene FABP4	-4,0104	1,7121	112	-2,34	0,0209
IDADE:D0-D60 gene FABP4	-3,1472	1,7121	112	-1,84	0,0687
IDADE:D120-D160 geneFABP4	-0,3614	1,7121	112	-0,21	0,8332
IDADE:D120-D60 gene FABP4	0,5018	1,7121	112	0,29	0,77
IDADE:D160-D60 gene FABP4	0,8632	1,7121	112	0,5	0,6151
GENET:C-P IDADE=D0 gene:FABP4	6,0628	2,4213	112	2,5	0,0137
GENET:C-P IDADE=D120 gene:FABP4	-4,5295	2,4213	112	-1,87	0,064
GENET:C-P IDADE=D160 gene:FABP4	3,5186	2,4213	112	1,45	0,149
GENET:C-P IDADE=D60 gene:FABP4	5,5751	2,4213	112	2,3	0,0231
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:FABP4	1,6471	2,4213	112	0,68	0,4977
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:FABP4	-2,7384	2,4213	112	-1,13	0,2605
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:FABP4	-2,9034	2,4213	112	-1,2	0,233
IDADE:D120D160 GENET=C gene:FABP4	-4,3855	2,4213	112	-1,81	0,0728
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:FABP4	-4,5505	2,4213	112	-1,88	0,0628
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:FABP4	-0,165	2,4213	112	-0,07	0,9458
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:FABP4	-8,9451	2,4213	112	-3,69	0,0003
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:FABP4	-5,2825	2,4213	112	-2,18	0,0312
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:FABP4	-3,391	2,4213	112	-1,4	0,1641
IDADE:D120D160 GENET=P gene:FABP4	3,6626	2,4213	112	1,51	0,1332
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:FABP4	5,5541	2,4213	112	2,29	0,0237
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:FABP4	1,8915	2,4213	112	0,78	0,4363

Contrasts

Label	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
GENET geneFABP4	1	112	4,82	0,0303
IDADE geneFABP4	3	112	2,3	0,0813
GENET*IDADE geneFABP4	7	112	3,44	0,0023

Output SAS: análise de expressão do gene PPARG

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P genePPARG	-0,4604	0,9259	112	-0,5	0,62
IDADE:D0-D120 gene PPARG	-2,6142	1,3095	112	-2	0,0483
IDADE:D0-D160 gene PPARG	-3,6482	1,3095	112	-2,79	0,0063
IDADE:D0-D60 gene PPARG	-3,049	1,3095	112	-2,33	0,0217
IDADE:D120-D160 genePPARG	-1,034	1,3095	112	-0,79	0,4314
IDADE:D120-D60 gene PPARG	-0,4348	1,3095	112	-0,33	0,7405
IDADE:D160-D60 gene PPARG	0,5992	1,3095	112	0,46	0,6481
GENET:C-P IDADE=D0 gene:PPARG	-0,9145	1,8518	112	-0,49	0,6224
GENET:C-P IDADE=D120 gene:PPARG	2,1428	1,8518	112	1,16	0,2497
GENET:C-P IDADE=D160 gene:PPARG	-0,705	1,8518	112	-0,38	0,7041
GENET:C-P IDADE=D60 gene:PPARG	-2,3648	1,8518	112	-1,28	0,2043
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:PPARG	-4,1429	1,8518	112	-2,24	0,0273
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:PPARG	-3,753	1,8518	112	-2,03	0,0451
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:PPARG	-2,3239	1,8518	112	-1,25	0,2121
IDADE:D120D160 GENET=C gene:PPARG	0,3899	1,8518	112	0,21	0,8336
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:PPARG	1,819	1,8518	112	0,98	0,3281
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:PPARG	1,4291	1,8518	112	0,77	0,4419
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:PPARG	-1,0856	1,8518	112	-0,59	0,5589
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:PPARG	-3,5435	1,8518	112	-1,91	0,0582
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:PPARG	-3,7741	1,8518	112	-2,04	0,0439
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:PPAR	-2,4579	1,8518	112	-1,33	0,1871
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:PPARG	-2,6885	1,8518	112	-1,45	0,1494
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:PPARG	-0,2306	1,8518	112	-0,12	0,9011

Contrasts

Num

Label	DF	F Value	Pr > F
GENET genePPARG	1	0,25	0,62
IDADE genePPARG	3	3,02	0,0328
GENET*IDADE genePPARG	7	1,77	0,0995

Output SAS: análise de expressão do gene GATA-2

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
GENET:C-P geneGATA-2	0,3264	0,7343	112	0,44	0,6575
IDADE:D0-D120 gene GATA-2	-0,2604	1,0467	112	-0,25	0,804
IDADE:D0-D160 gene GATA-2	-0,9411	1,0467	112	-0,9	0,3705
IDADE:D0-D60 gene GATA-2	5,7367	1,0395	112	5,52	<,0001
IDADE:D120-D160 geneGATA-2	-0,6807	1,0375	112	-0,66	0,5131
IDADE:D120-D60 gene GATA-2	5,9971	1,0302	112	5,82	<,0001
IDADE:D160-D60 gene GATA-2	6,6778	1,0302	112	6,48	<,0001
GENET:C-P IDADE=D0 gene:GATA-2	-1,0482	1,4931	112	-0,7	0,4841
GENET:C-P IDADE=D120 gene:GATA-2	2,9834	1,4672	112	2,03	0,0444
GENET:C-P IDADE=D160 gene:GATA-2	1,7840	1,4672	112	1,22	0,2266
GENET:C-P IDADE=D60 gene:GATA-2	-2,4135	1,4467	112	-1,67	0,098
IDADE:D0-D120 GENET=C gene:GATA-2	-2,2762	1,0467	112	-1,52	0,1302
IDADE:D0-D160 GENET=C gene:GATA-2	-2,3572	1,4931	112	-1,58	0,1172
IDADE:D0-D60 GENET=C gene:GATA-2	6,4194	1,4931	112	4,36	<,0001
IDADE:D120-D160 GENET=C gene:GATA-2	-0,081	1,4672	112	-0,06	0,9561
IDADE:D120-D60 GENET=C gene:GATA-2	8,6955	1,4467	112	6,01	<,0001
IDADE:D160-D60 GENET=C gene:GATA-2	8,7765	1,4467	112	6,07	<,0001
IDADE:D0-D120 GENET=P gene:GATA-2	1,7554	1,4672	112	1,2	0,2341
IDADE:D0-D160 GENET=P gene:GATA-2	0,475	1,4672	112	0,32	0,7467
IDADE:D0-D60 GENET=P gene:GATA-2	5,0540	1,4672	112	3,44	0,0008
IDADE:D120-D160 GENET=P gene:GATA-2	-1,2804	1,4672	112	-0,87	0,3847
IDADE:D120-D60 GENET=P gene:GATA-2	3,2986	1,4672	112	2,25	0,0265
IDADE:D160-D60 GENET=P gene:GATA-2	4,5790	1,4672	112	3,12	0,0023

Contrasts

Label	DF	DF	F	F Value	Pr > F
GENET geneGATA-2		1	112	0.20	0.6575
IDADE geneGATA-2		3	112	18.13	<.0001
GENET*IDADE geneGATA-2		7	112	9.14	<.0001