

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Expressão dos genes *COX3* e *CYTb* em *Longissimus dorsi* de suínos submetidos à diferentes níveis de fósforo dietético¹

Mayara Morena Dél Cambre Amaral Weller², Leandro Alebrante³, Bruno Alexandre Nunes Silva⁴,
Alysson Saraiva⁵, Paulo Sávio Lopes⁵, Simone Eliza F. Guimarães⁵

¹Parte da tese de mestrado do primeiro autor, financiada pelo CNPQ, FAPEMIG e CAPES

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento – UFV, Viçosa. Bolsista do CNPq. e-mail: mayaramorena@gmail.com

³Doutor em Zootecnista, gerente técnico – Vitamix nutrição animal LTDA, Santa Catarina

⁴Professor do Departamento de Zootecnia – UFMG, Montes Claro

⁵Professor do Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa

Resumo: Nutrigenômica e genômica nutricional são ciências que estudam os efeitos da nutrição sobre a expressão gênica. O músculo *Longissimus dorsi* (LD) é um tecido de grande importância econômica. Entre os nutrientes, o fósforo é de particular interesse, devido à sua importância para diversos processos metabólicos, tais como o metabolismo de energia e síntese protéica. Com objetivo de melhor compreender os efeitos dos diferentes níveis de fósforo dietético sobre metabolismo energético do músculo LD, foram avaliados a expressão dos genes *COX3* e *CYTb* codificantes para proteínas da cadeia transportadora de elétrons em suínos na fase de 15-30 kg. Foram utilizados 4 animais por tratamentos, que consistiam em 3 diferentes níveis de fósforo dietético: 0,107%, 0,321% e 0,535%. O perfil de expressão gênica foi analisado por meio do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os animais alimentados com 0,321% tiveram maior GMD e conversão alimentar ($P < 0,05$) do que aqueles alimentados a 0,107% ou 0,535%. Os genes *COX3* e *CYTb* foram mais expressos ($P < 0,05$) nos suínos alimentados com 0,321% em relação aqueles que alimentados com 0,535%. Os resultados revelaram uma forte evidência de que o nutriente fósforo é um dos fatores que regulam a fosforilação oxidativa.

Palavras-chave: fosforilação oxidativa, nutrigenômica, produção de suínos

Expression of *COX3* and *CYTb* genes in *Longissimus dorsi* of pigs submitted to different levels of dietary phosphorus

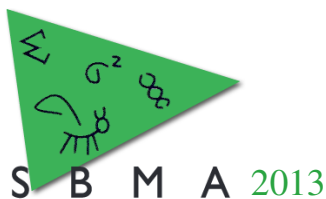
Abstract: Nutrigenomics and nutritional genomics are sciences that examine the effects of nutrition on gene expression. The *Longissimus dorsi* (LD) is a tissue of great economic importance. Among nutrients, phosphorus (P) is particular interest, due of its importance for various metabolic processes such as energy metabolism and protein synthesis. In order to better understand the effects of different dietary phosphorus levels on energy metabolism of LD, the expression of *COX3* e *CYTb* coding for proteins of the electron transport chain was assessed in pigs during 15-30 kg. It was used 4 animals per treatment which consist of 3 different dietary phosphorus levels: 0,107%, 0,321% e 0,535%. Gene expression profile was analyzed by quantitative real time PCR (qRT-PCR). Pigs fed the 0,321% Pd had greater ADG and feed conversion ($P < 0,05$) than those fed the 0,107% or 0,535% Pd. the expression of *COX3*, *CYTb* genes were higher in pigs fed 0,321% compared to those receiving 0,107% or 0,535% Pd. These data revealed strong evidence that phosphorus and thermal environments are key factors to regulate oxidative phosphorylation.

Keywords: nutrigenomics, oxidative phosphorylation, pig production

Introdução

Manipulações dietéticas e estratégias nutricionais são ferramentas-chave que influenciam a produção de suínos. Nutrigenômica e genômica nutricional são ciências que estudam os efeitos da nutrição sobre a expressão gênica (Swanson et al., 2003).

Nos animais de produção de carne, o músculo *Longissimus dorsi* (LD), é um tecido de grande importância econômica, portanto faz-se necessário uma maior compreensão de como os nutrientes ou de seus diferentes níveis na dieta afetam metabolismo energético deste músculo. Entre os nutrientes, fósforo é particular interesse, devido à sua ligação com o metabolismo energético e importância para o crescimento de tecido muscular.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

No entanto, há pouco conhecimento sobre os efeitos dos diferentes níveis de fósforo sobre a expressão de genes relacionados a fosforilação oxidativa. Portanto, este estudo foi realizado para avaliar a expressão dos genes *COX3* e *CYTb* no músculo *Longissimus dorsi* de suínos na fase de crescimento 15-30 kg submetidos à diferentes níveis de fósforo dietético.

Material e Métodos

Foram utilizados 12 suínos, machos castrados de linhagem comercial, com peso inicial de $15 \pm 0,41$ kg. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com 4 repetições por tratamento. Peso corporal (PC) e de parentesco dos animais foram utilizados como critérios na formação de blocos.

A extração do RNA total a partir de 40 mg do músculo LD foi realizada tecido utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria e sua integridade verificada com Agilent RNA 6000 Nano Kit using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc). A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o kit ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis (New England BioLabs Inc. Beverly, MA).

A análises de expressão dos genes *COX3*- Citocromo oxidase subunidade 3, *CYTb* - Citocromo b, do complexo Ubiquinona: citocromo c reductase, foram feitas por meio da metodologia de PCR quantitativo em Tempo Real usando o sistema de detecção SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os pares de *primers*, para os genes alvos e o controle endógeno, utilizados para avaliar a expressão gênica foram desenhados usando o programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, CA) a partir de seqüências suínas obtidas do banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Como controle endógeno foi utilizado o gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Cada reação continha o PCR Master Mix, o cDNA usado como molde, o par de primer, totalizando um volume final de 25 μ L. A reação de amplificação foi realizada no *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e consistiu nos seguintes passos: 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos, com 40 ciclos. Ao final da amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, para verificar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. Depois de estabelecidas as condições ótimas de amplificação a validação do experimento foi efetuada por meio da determinação da eficiência de amplificação do alvo e do controle. Para isso, diluições de cDNA foram amplificadas em duplicatas, para a obtenção da curva padrão e cálculo da eficiência para o par de *primer* por meio da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$, onde E é a eficiência da reação.

A análise estatística dos dados de Ct foram feitas usando %QPCR_MIXED macro SAS® [<https://www.msu.edu/~steibelj/JParquivos/QPCR.html>] desenvolvido para gerar comandos no SAS PROC MIXED adequados para analisar os dados de qRT-PCR. Para cada gene alvo, a comparação dos valores de expressão relativa entre tratamentos foi realizada por declaração CONTRAST do procedimento GLM (SAS software) através do teste de Student ao nível de 5%. Os valores de fold change (expressão relativa) foram obtidos pela transformação das estimativas (C_t), normalizados para gene controle, detectada após análise estatística do programa pela fórmula: $\text{fold change} = 2^{-\Delta C_t}$. O ΔC_t são estimativas das comparações dos valores de C_t entre os tratamentos.

Resultados e Discussão

As expressões dos genes *COX3* e *CYTb* foram maiores nos suínos que receberam 0,321% de fósforo dietético em comparação com aqueles que receberam 0,535% (Figura 1). Observou-se também que as expressões desses genes foram maiores nos suínos alimentados com 0,107% de fósforo dietético em relação aqueles alimentados com 0,535%, pode ser indicativo de que rações com níveis sub-ótimos de fósforo, possam ser menos prejudiciais à expressão dos genes estudados em relação a uma ração com excesso de fósforo. O *CYTb* é uma subunidade essencial do centro funcional do ubiquinol-citocromo c reductase complexo e o *COX3* é uma subunidade essencial do centro funcional, ambos responsáveis pela transferência de elétrons e bombeamento de prótons, sendo altamente relevantes para a eficiência mitocondrial, ou seja, produção de ATP (Scheffler, 1999).

O fósforo na forma de fosfato (Pi) foi demonstrado influenciar diretamente desidrogenases e outras enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa (Rodrigues-Zavala et al., 2000). Além disso, Bose et al. (2003) estudaram os efeitos da Pi em vários passos da fosforilação oxidativa em mitocôndrias cardíacas de suínos e mostrou que o Pi regulava a fosforilação oxidativa em vários níveis, incluindo a geração de NADH, a formação do gradiente electroquímico de prótons e directamente como um substrato para a formação de ATP pela F1FO-ATPase. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os diferentes níveis de fósforo na ração alteraram a expressão dos genes mitocondriais.

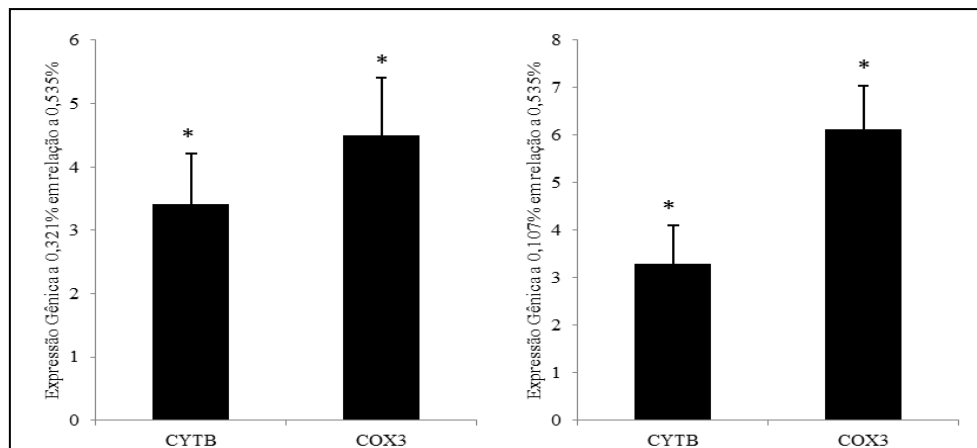


Figura 1. Expressão relativa (fold change) dos genes COX3 e CYTB entre 0,321% e 0,535% de fósforo dietético e entre 0,107% e 0,535%. Barras acima da origem significa maior expressão do primeiro nível em relação relativamente ao segundo. *P<0,05.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que diferentes quantidades de fósforo na dieta alteram a expressão dos genes mitocondriais *COX3* e *CYT B*. Os resultados revelaram uma forte evidência de que o nutriente fósforo é um dos fatores que regulam a fosforilação oxidativa.

Literatura citada

- BOSE, S.; FRENCH, S.; EVANS, F.J. et al. Metabolic network control of oxidative phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.39155-39165, 2003.
- RODRIGUES-ZAVALA, J.S.; PARDO, J.P.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by inorganic phosphate, Mg²⁺, and other effectors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.379, p.78-84, 2000.
- SCHEFFLER, I. **Mitochondria**. 2. ed. Wiley-Liss Inc., New York, NY, 2003. 441p.
- SWANSON, K.S.; SCHOOK, L.B.; FAHEY, G.C. Nutritional genomics: Implications for companion animals. **Journal of Nutrition**, v.133, p.3003-3040, 2003.
- YU, A.C.; TIAN, H.; ZHANG, L. et al. Structural basis of multifunctional bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.31, p.191-199, 1999.