

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Expressão de genes relacionados à função mitocondrial em tecido hepático de bovinos Nelore extremos para consumo alimentar residual¹

Larissa Fernanda Simielli Fonseca², Daniele Fernanda Jovino Gimenez³, Fabieli Loise Braga Feitosa⁴, Sarah Figueiredo Martins Bonilha⁵, Jesus Aparecido Ferro⁶, Lucia Galvão de Albuquerque⁷

¹Trabalho financiado pela FAPESP, processo nº 2009/16118-5

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal - FCAV-UNESP. Bolsista FAPESP, processo nº 2010/13502-6 e-mail: la_simielli@yahoo.com.br

³Pós-Doutorado em Genética e Melhoramento Animal – UNESP, Jaboticabal. e-mail: dani.jovino@yahoo.com.br

⁴Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV-UNESP. e-mail: bifeitosa@hotmail.com

⁵Pesquisadora EEZS, IZ/APTA/SAA. e-mail: sbonulha@iz.sp.gov.br

⁶Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: jesus@fcav.unesp.br

⁷Professora Titular FCAV-UNESP, Pesquisadora do CNPq e do INCT-CA e-mail: lgalb@fcav.unesp.br

Resumo: Nesse trabalho foram analisadas a expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real, em tecido hepático, de dois grupos de bovinos Nelore, com valores contrastantes de CAR, visando avaliar as relações destes genes com consumo alimentar residual. Os genes TFAM e UCP2 foram mais expressos em animais CAR negativo. A expressão do gene PGC1 α não foi significativamente diferente nos dois grupos, enquanto o gene UCP3 não expressou-se no tecido hepático. Esses resultados indicam que ainda são necessários mais estudos para que se possa chegar a uma conclusão final quanto ao uso dos genes diferencialmente expressos TFAM e UCP2 em programas de melhoramento visando o aumento da eficiência alimentar.

Palavras-chave: PCR quantitativa em Tempo Real, Quantificação Relativa, PGC1 α , TFAM, UCP2, UCP3

Expression of genes related to mitochondrial function in liver tissue of Nelore cattle contrasting for residual feed intake

Abstract: In this study the expression of genes PGC1 α , TFAM, UCP2 and UCP3 measured by real-time quantitative PCR in liver tissue in two groups of Nelore cattle with contrasting values of residual feed intake (RFI) were analyzed, to evaluate the relationships of these genes with residual feed intake. In liver tissue, the TFAM and UCP2 genes were more expressed in negative RFI animals compared to positive RFI animals. The PGC1 α gene expression had no significant difference between the groups, while the UCP3 gene was not expressed in liver tissue. These results indicate that more studies are still needed for we can reach a final conclusion regarding about the use the genes TFAM e UCP2 in breeding programs aimed at increasing feed efficiency.

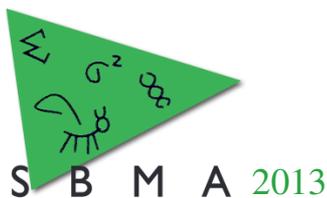
Keywords: Quantitative Real Time PCR, Relative Quantitation, PGC1 α , TFAM, UCP2, UCP3

Introdução

Com o intuito de aumentar a eficiência da bovinocultura de corte, muitas medidas de eficiência alimentar vêm sendo propostas, e o consumo alimentar residual (CAR) é uma delas. O CAR é estimado considerando-se a diferença entre o consumo real e a quantidade de alimento que o animal deveria ingerir baseado no seu peso vivo médio, o que permite identificar e selecionar animais mais eficientes, sem que haja seleção para maior peso à idade adulta. A função mitocondrial tem sido apontada como sendo um fator de grande influência no CAR. Com isso, analisar genes envolvidos na função mitocondrial torna-se uma alternativa para identificar marcadores moleculares associados à maior eficiência alimentar.

Segundo Scarpulla, (2008), os membros da família PGC1 são mediadores da biogênese mitocondrial devido à sua habilidade de ativar genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais. Outro gene que atua na biogênese mitocondrial, de acordo com Ekstrand et al., (2004), é o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que está envolvido no processo de transcrição do DNA mitocondrial. Do mesmo modo, as proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3, encontradas na membrana mitocondrial interna, são de grande interesse, pois sua ativação ocasiona maior oxidação de substratos energéticos (Harrold et al., 2000).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram descrever o perfil de expressão dos genes



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido hepático de animais da raça Nelore extremos para CAR, pela técnica PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e verificar a associação entre a expressão desses genes ligados à função mitocondrial e o consumo alimentar residual.

Material e Métodos

Os animais utilizados neste trabalho foram disponibilizados pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, SP (IZ) e pertencem a um grupo de contemporâneos (n=60) que foi submetido a uma prova de ganho em peso no período de 4 de maio a 19 de outubro de 2010. Após a prova de ganho em peso, foram selecionados 24 animais com base nos valores de CAR a fim de compor uma amostra representativa de animais mais (CAR negativo) e menos eficientes (CAR positivo).

Os animais selecionados foram abatidos no Centro de Tecnologia da Carne (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), na cidade de Campinas, SP. Imediatamente após o abate, foram coletadas amostras de tecido hepático e armazenadas em 5 mL de RNA *holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil). A extração do RNA total das amostras coletadas foi realizada utilizando o *kit* para extração de RNA *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

A quantificação da expressão gênica foi realizada através da técnica qRT-PCR por meio do método do Ct comparativo. Para a análise estatística, primeiramente foi feita a média geométrica dos dados de Ct gerados para os genes de referência Beta Actina e GAPDH, utilizados na normalização da quantidade inicialmente adicionada de molécula alvo nas reações, para cada amostra, para cada tecido e para cada gene alvo, e então ajustou-se um modelo linear misto, utilizando o procedimento *mixed* do programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002):

$$Y_{gikr} = T_{ig} + G_k + D_{ik} + e_{gikr},$$

onde, Y_{gikr} é o Ct obtido pelo *software* do termociclador para o $g^{ésimo}$ gene (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), no $i^{ésimo}$ poço da placa (referente à replica técnica), correspondente ao $k^{ésimo}$ animal e ao $i^{ésimo}$ grupo do animal (CAR positivo ou negativo). T_{ig} é o efeito do grupo do animal i na expressão do gene g . G_k é o efeito de grupos de abate para o $k^{ésimo}$ animal, D_{ik} é um efeito específico de amostragem aleatória que capta as diferenças entre as amostras que são comuns a ambos os genes, particularmente os que afetam a concentração de RNA, tal como extração diferencial ou eficiências de amplificação entre as amostras. O termo e_{gikr} refere-se ao resíduo.

Resultados e Discussão

Os níveis de expressão dos genes estudados podem ser observados na Tabela 1. Somente os níveis de expressão dos genes TFAM e UCP2 foram significativamente diferentes entre os grupos (CAR positivo e negativo).

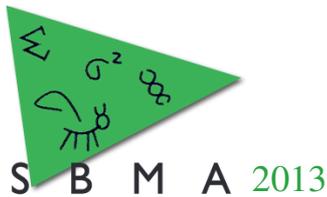
O gene UCP3 não foi expresso no tecido estudado. Esse resultado era esperado, já que segundo Silvestri et al. (2006), a UCP3 normalmente não é expressa em tecido hepático.

O gene PGC1 α não apresentou diferença na expressão entre os dois grupos estudados. Estes resultados discordam dos resultados encontrados por Bottje e Carstens (2009), que estudando a expressão dessa proteína através da técnica *Western blot*, em fígado de aves, encontraram maior quantidade da mesma no fígado de frangos de baixa eficiência.

Tabela 1: Expressão dos genes PGC1 α , TFAM e UCP2 em tecido hepático de animais com consumo residual alimentar positivo e negativo.

GENE	CAR	CT MÉDIO	ERRO PADRÃO	P-VALUE (GxC) ¹
PGC1 α	NEGATIVO	27,88	0,17	0,6448 ^{ns}
	POSITIVO	27,80	0,17	
TFAM	NEGATIVO	32,30	0,15	<0,0001*
	POSITIVO	33,23	0,16	
UCP2	NEGATIVO	25,74	0,17	<0,0001*
	POSITIVO	26,55	0,17	

¹GxC: interação gene x CAR, ns: não significativo ao nível de 5%, *: significativo ao nível de 5%.



A expressão do gene TFAM foi 1,9 vezes maior em animais CAR negativo (mais eficientes) quando comparada a expressão em animais CAR positivo (Figura 1). O gene UCP2 teve expressão 1,74 vezes maior em animais CAR negativo em relação animais CAR positivo (Figura 1).



Figura 1: Expressão relativa dos genes alvo TFAM e UCP2 em tecido hepático de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo (*: significativo ao nível de 5%).

Houve uma maior expressão do gene UCP2 em animais CAR negativo (mais eficientes). Esse resultado não seria esperado, pois dentre as funções da UCP2, está a diminuição da produção da ATP, o que leva a um aumento no requerimento energético, produção de calor e diminuição do peso corporal (Harrold et al., 2000).

O gene TFAM expressou-se mais em animais CAR negativo (mais eficientes). Estes resultados discordam do observado por Kelly et al. (2011), que não encontraram diferenças significativas na expressão desse gene em tecido muscular de animais com alto e baixo CAR (*Limousin x Friesian*), no entanto, deve-se salientar que estes autores utilizaram músculo *Longissimus dorsi* em suas análises, diferentemente deste trabalho, que utilizou tecido hepático.

Conclusões

Os genes UCP2 e TFAM apresentam expressão diferencial em tecido hepático nos grupos de animais da raça Nelore extremos para consumo alimentar residual, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar estes resultados e avaliar a possibilidade de seu uso em programas de melhoramento visando o aumento da eficiência alimentar.

Literatura citada

- BOTTJE, W.; CARSTENS, G. E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**, n. 87, 2009.
- EKSTRAND, M.I.; FALKENBERG1, M.; RANTANEN, A.; PARK, C. B.; GASPARI, M.; HULTENBY, K.; RUSTIN, P.; GUSTAFSSON1, C, M.; LARSSON, N.; Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. **Human Molecular Genetics**, n.9, v. 13, p. 935-944, 2004.
- HARROLD, J.A.; WIDDOWSON, P.S.; CLAPHAM, J.C.; WILLIAMS, G. Individual severity of obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. **American Journal of Physiology**, v.279, n.2, p.340-347, 2000.
- KELLY, A. K.; WATERS, S. M.; MCGEE, M.; FONSECA, R. G.; CARBERRY, C.; KENNY, D. A. mRNA expression of genes regulating oxidative phosphorylation in the muscle of beef cattle divergently ranked on residual feed intake. **Physiological Genomics**, v. 43, p.12–23, 2011.
- SCARPULLA, R. S. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. **The American Physiological Society**, n. 88, p.611-638, 2008.
- SILVESTRI, E.; DE LANGE, P.; MORENO, M.; LOMBARDI, A.; RAGNI, M.; FEOLA, A.; SCHIAVO, L.; GOGLIA, F.; LANNI, A. Fenofibrate activates the biochemical pathways and the de novo expression of genes related to lipid handling and uncoupling protein-3 functions in liver of normal rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 486-495, 2006.