

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

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

Larissa Fernanda Simielli Fonseca², Fernando Sebastian Baldi Rey³, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante⁴, Fábio Ricardo Pablos de Souza⁵, Sarah Figueiredo Martins Bonilha⁶, 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

³Professor Assistente Doutor FCAV-UNESP, e-mail: fbaldi@fcav.unesp.br

⁴Pesquisador EEZS, IZ/APTA/SAA. e-mail: mercadante@iz.sp.gov.br

⁵Professor adjunto da Universidade Federal de Pelotas e-mail: fabiopablos@hotmail.com

⁶Pesquisador EEZS, IZ/APTA/SAA. e-mail: sbonulha@iz.sp.gov.br

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

Resumo: Através da técnica da PCR quantitativa em tempo real foram analisadas a expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular de dois grupos de bovinos Nelore com valores contrastantes de CAR, com o objetivo de avaliar as relações destes genes com consumo alimentar residual. Em tecido muscular, o gene TFAM expressou-se mais em animais CAR positivo. Neste tecido, os genes PGC1 α , UCP2 e UCP3 não tiveram expressão significativamente diferente entre os dois grupos. Esses resultados indicam que ainda são necessários mais estudos para que se possa chegar a uma conclusão final quanto ao uso do gene diferencialmente expresso TFAM 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 muscle tissue of Nelore cattle contrasting for residual feed intake

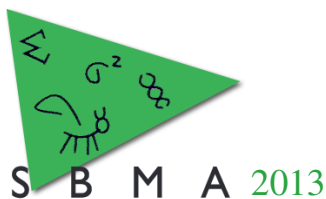
Abstract: Through real-time quantitative PCR technique the expression of PGC1 α , TFAM, UCP2 and UCP3 genes in muscle tissue from two groups of Nelore with contrasting values of CAR were analysed in order to evaluate the relationship of these genes with residual feed intake. In muscle tissue, the TFAM gene was more expressed in positive RFI animals compared to negative RFI animals. The PGC1 α , UCP2 and UCP3 gene expressions were not significantly different between the two groups. These results indicate that more studies are still needed for we can reach a final conclusion regarding about the use the gene TFAM in breeding programs aimed at increasing feed efficiency.

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

Introdução

A criação de animais mais eficientes torna a bovinocultura mais rentável, logo, a possibilidade de identificar e selecionar animais de menor consumo, mas com mesmo desempenho, ou seja, mais eficientes, torna-se atrativa do ponto de vista econômico. Visando melhorar a eficiência alimentar, torna-se cada vez mais constante o uso do consumo alimentar residual (CAR), calculado como a diferença entre o consumo observado e o consumo estimado, considerando-se a velocidade de ganho de peso e o peso vivo médio. No entanto, medir o consumo alimentar residual de cada animal requer infraestrutura e demanda tempo, o que encarece o processo. Desta forma, o uso de marcadores para identificar animais com maior eficiência alimentar torna-se uma alternativa para a seleção destas características. A função mitocondrial tem sido apontada como sendo um fator de grande influência no CAR e os genes ligados a esta função poderiam ser utilizados para o melhoramento da mesma.

O PGC1 funciona como uma engrenagem mitocondrial que trabalha para atender às necessidades metabólicas específicas dos tecidos e exerce papel crucial no controle da função mitocondrial (KNUTTI et al., 2001). O TFAM, também está envolvido na biogênese mitocondrial, pois estimula a transcrição do DNA mitocondrial (GASPARI et al., 2004). Além disso, as UCPs 2 e 3 têm



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

função de controlar a produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e regular a síntese de ATP (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2001).

Os objetivos do presente trabalho foram descrever o perfil de expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular de animais da raça Nelore extremos para CAR, através da técnica PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e verificar a associação entre a expressão desses genes ligados à função mitocondrial com o consumo alimentar residual.

Material e Métodos

Foram utilizados animais do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, SP (IZ). Estes animais, pertencentes a um grupo de contemporâneos (n=60), foram submetidos a uma prova de ganho em peso, através da qual, foram selecionados 24 animais com base nos valores de CAR a fim de compor uma amostra representativa dos animais extremos para a característica CAR (animais mais eficientes - CAR negativo, e menos eficientes - CAR positivo).

Os 24 animais extremos foram abatidos no Centro de Tecnologia da Carne (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), na cidade de Campinas, SP. Após o abate, foram coletadas amostras de tecido muscular e armazenadas em RNA *holder* para conservação do RNA total (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil). A extração do RNA total das amostras coletadas foi realizada com o *kit* para extração de RNA *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada através da técnica qRT-PCR por meio do método do Ct comparativo. Para a análise estatística, utilizou-se o procedimento *mixed* do programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002). 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:

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

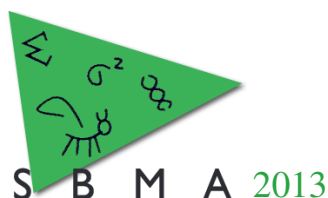
onde, Y_{gikr} é o Ct obtido pelo *software* do termociclador para o $g^{\text{ésimo}}$ gene (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), no $r^{\text{ésimo}}$ poço da placa (referente à replicação técnica), correspondente ao $k^{\text{ésimo}}$ animal e ao $i^{\text{ésimo}}$ grupo do animal (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 $k^{\text{ésimo}}$ 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

Somente os níveis de expressão do gene TFAM foram significativamente diferentes entre os grupos (CAR positivo e negativo – Tabela 1). A expressão do gene TFAM, foi 1,72 vezes maior em animais CAR positivo quando comparado a animais CAR negativo (Figura 1).

TFAM é uma proteína reguladora da transcrição mitocondrial e é ativada na tentativa de contornar problemas na fosforilação oxidativa através do estímulo do co-ativador PGC1, que controla as proteínas transativadoras NRF1 e NRF2, e por sua vez, regulam a expressão das proteínas TFAM (GLEYZER et al., 2005). Neste trabalho, em tecido muscular, houve uma expressão significativamente maior do TFAM em animais CAR positivo (menos eficientes). Estes resultados discordam do observado por Kelly et al. (2011), que não encontraram diferenças significativas na expressão desse gene em músculo *Longissimus dorsi*, em animais com alto e baixo CAR (*Limousin x Friesian*).

No presente trabalho, não foram observadas diferenças na expressão dos genes UCPs 2 e 3, entre os animais CAR positivo ou negativo. Estes resultados concordam com os descritos por Kolath (2006) que, trabalhando com músculo *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Angus, não encontrou expressão diferencial entre CAR positivo e negativo, para os genes UCP2 e UCP3. Da mesma forma, Kelly et al. (2011), estudando tecido muscular (*Longissimus dorsi*) de novilhas *Limousin X Friesian*, não encontraram efeito do CAR na expressão do gene UCP2. No entanto, estes autores, observaram uma tendência do nível de expressão do gene UCP3 ser maior em animais CAR positivo (ineficientes). No mesmo trabalho, Kelly et al. (2011), estudando o gene PGC1 α , diferentemente do encontrado neste



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

trabalho, observaram diferenças significativas na expressão do gene *PGC1 α* em tecido muscular (*Longissimus dorsi*) de bovinos de origem europeia. O resultado obtido no presente estudo para o gene *PGC1 α* foi consistente com o observado para as UCPs, pois o *PGC1 α* ajusta a expressão das UCPs, que também não apresentaram expressão diferencial entre os grupos estudados.

Tabela 1: Expressão dos genes *PGC1 α* , *TFAM*, *UCP2* e *UCP3* em tecido muscular de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo.

	CAR	CT MÉDIO	ERRO PADRÃO	P-VALUE (GxC) ¹
<i>PGC1α</i>	NEGATIVO	24,08	0,26	0,2846 ^{ns}
	POSITIVO	24,35	0,26	
<i>TFAM</i>	NEGATIVO	32,44	0,21	0,0018*
	POSITIVO	31,66	0,21	
<i>UCP2</i>	NEGATIVO	25,41	0,14	0,4124 ^{ns}
	POSITIVO	25,54	0,14	
<i>UCP3</i>	NEGATIVO	25,93	0,35	0,1170 ^{ns}
	POSITIVO	25,32	0,35	

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

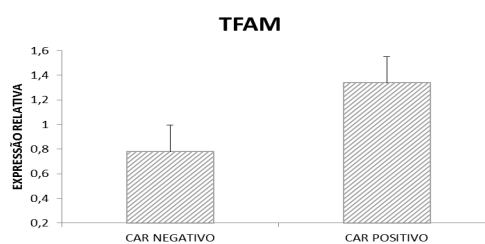


Figura 1: Expressão relativa do gene alvo *TFAM* em tecido muscular de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo.

Conclusões

O gene *TFAM* apresenta expressão diferencial em tecido muscular no grupo de animais da raça Nelore estudado. Outros estudos são necessários para verificar a possibilidade de uso deste gene em programas de melhoramento visando o aumento da eficiência alimentar.

Literatura citada

- GASPARI, M.; LARSSON, N.G.; GUSTAFSSON, C.M. The transcription machinery in mammalian mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1659, p. 148–152, 2004.
- GLEYZER, N.; VERCAUTEREN, K.; SCAPULLA, R.C. Control of mitochondria transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by molecular respiratory factor (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 1354-1366, 2005.
- 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.
- KNUTTI, D.; KRALLI, A. PGC-1, a versatile coactivator. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, n. 8, v.12, 2001.
- KOLATH, W. H.; KERLEY, M. S.; GOLDEN, J. W.; SHAHID, S. A.; Johnson, G. S. The relationships among mitochondrial uncoupling protein 2 and 3 expression, mitochondrial deoxyribonucleic acid single nucleotide polymorphisms, and residual feed intake in Angus steers. **Journal of Animal Science**, n. 84, p. 1761-1766, 2006.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O. Mitochondrial uncoupling proteins 3 (*UCP3*) in skeletal muscle. **Frontiers in Bioscience**, n.1, v.6, p.570-574, 2001.