



Perfil de expressão gênica global no músculo esquelético de ovinos por meio de *microarrays*¹

Ana Maria Bezerra Oliveira Lôbo², Simone Eliza Facioni Guimarães³, Raimundo Nonato Braga Lôbo⁴, Samuel Rezende Paiva⁵, Fernando Flores Cardoso⁶, Fabyano Fonseca e Silva⁷

¹Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela Embrapa Caprinos e Ovinos/Cenargen/UFV

²Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos. e-mail: analobo@cnpq.embrapa.br

³Professora, Departamento de Zootecnia - UFV/Viçosa, MG

⁴Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, CE

⁵Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília, DF

⁶Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul – Bagé, RS

⁷Professor, Departamento de Estatística - UFV/Viçosa, MG

Resumo: O perfil de expressão gênica global no músculo esquelético de cordeiros de quatro grupos genéticos de ovinos foi comparado por meio de *microarrays* de oligonucleotídeos. As análises indicaram 262 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos genéticos. Um total de 23 transcritos de funções conhecidas foram diferencialmente expressos, sendo dez deles apenas na comparação Morada Nova x Somalis Brasileira. Dentre os genes diferencialmente expressos, aqueles envolvidos com características de importância para a produção de carne, destacaram-se: MyoD e IGFBP4 (desenvolvimento muscular), PGDS e SCD (biosíntese de ácidos graxos), e C/EBP δ (adipogênese) e PYGL, GLUT-3, GGTA1 e ATP5G1 (metabolismo energético). Os resultados da técnica de *microarray* foram validados por meio de qPCR. Estes transcritos podem ser considerados marcadores expressos úteis para a seleção de cordeiros nas condições estudadas. A seleção para polimorfismos nestes genes pode conferir maior marmoreio e deposição de massa muscular, que são características ligadas diretamente a quantidade, a qualidade e a aceitação da carne.

Palavras-chave: cordeiros, MyoD, marmoreio, qPCR, transcritos

Global gene expression profile in skeletal muscle of sheep by microarray

Abstract: The global gene expression profile in muscle of four genetic groups of hair sheep were compared by oligonucleotide microarray. The analyses showed that 262 transcripts were differentially expressed among the four genetic groups. A total of 23 genes of known function were differentially expressed, with 10 transcripts differentially expressed only in the comparison between Morada Nova x Brazilian Somali. Among the differentially expressed genes, those involved with important features for the production of meat, stood out: IGFBP4 and MyoD (muscle growth), and PGDS (SCD biosynthesis of fatty acids), C/EBP δ and PPAR γ (adipogenesis) and PYGL, GLUT-3, and GGTA1 ATP5G1 (energy metabolism). The results of the microarray were validated by qPCR. These transcripts can be considered useful markers expressed in the selection of lambs under the conditions studied here. Screening for polymorphisms in these genes may confer greater marbling deposition and muscle mass, which are features directly linked to quantity, quality and acceptability of meat.

Keywords: lambs, MyoD, marbling, qPCR, transcripts

Introdução

O crescimento pós-natal do músculo esquelético é um dos principais determinantes da massa muscular ou rendimento de carne. O crescimento muscular na vida pós-natal é alcançado principalmente pelo aumento de tamanho de miofibras existentes. O aumento da massa muscular total é o resultado de um equilíbrio entre a proliferação celular, a morte programada e o crescimento da fibra/célula (Bass et al., 2000). Poucos são os trabalhos que buscam compreender a coordenação do crescimento muscular, particularmente em ovinos deslanados. Sabe-se que o crescimento como um todo, bem como o crescimento muscular em ovinos é altamente hereditário e, portanto, está sob controle genético (Notter, 1999).



Embora, em ovinos, a tecnologia de microarray tenha sido amplamente aplicada para analisar a expressão gênica e gerado conjuntos de dados em nível genômico para resposta imune à parasitos gastrointestinais, resposta hepática a processos infecciosos, caracterização do fenótipo callipyge e a composição do leite, a relação entre o crescimento muscular esquelético pós-natal e a expressão gênica através da análise do transcriptoma não tem sido investigada. Portanto, neste estudo, buscou-se comparar os perfis de expressão gênica global no músculo *Longissimus dorsi* de quatro grupos genéticos de ovinos em crescimento pós-natal.

Material e Métodos

O experimento de campo foi realizado na Fazenda Três Lagoas da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Para obtenção de cordeiros contemporâneos, foi conduzida estação de monta controlada para os nascimentos ocorrerem no mesmo período. Após o desmame, os cordeiros foram dispostos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos (grupos genéticos Morada Nova - MO, Somalis Brasileiro - SO, Santa Inês - SI, e ½ Dorper x ½ Morada Nova -F1), respeitando os princípios da casualização, repetição e uniformidade de animais e manejo. Os cordeiros foram alojados em piquetes de capim Tanzânia (pastagem irrigada) com livre acesso a água e sal mineral e, era fornecido concentrado na proporção de 1,5% do peso vivo. Ao final, vinte e quatro cordeiros machos, não aparentados, sendo seis de cada grupo genético, nascidos na mesma estação, de parto simples e desmamados (com 84 dias de idade), foram usados.

Os cordeiros foram abatidos, em média, com $200,18 \pm 7,54$ dias de idade e $20,62 \pm 3,46$ kg de peso vivo. Tecidos do músculo *Longissimus dorsi* (LD) foram coletados após o abate e conservados em solução de estabilização de RNA. RNA foi obtido, purificado e estocado a -80°C . 50 ng de RNA total foi transcrito reversamente e marcado com Cianina 3. O delineamento para a hibridização das amostras nas lâminas foi em blocos completos inteiramente casualizados. Isto proveu seis diferentes comparações: F1-MO, F1-SI, F1-SO, MO-SI, MO-SO, SI-SO. Portanto, foram usadas seis lâminas de 8x15k (cada lâmina contém 8 arrays com 15.744 sequências), no qual cada array foi considerado um bloco (48 arrays no total) e, assim, cada lâmina continha todos os grupos genéticos. Seis réplicas biológicas e duas réplicas técnicas foram usadas de cada grupo genético. O teste t foi usado para estimar a significância ($P < 0,05$) da diferença de cada transcrito em cada comparação. A estatística F_s , baseada na estimativa da variância do erro foi usada. A taxa de falsas descobertas foi considerada por ajuste de múltiplos testes (FDR). As análises foram realizadas usando o pacote estatístico R (Bioconduction R/MAANOVA). Os resultados foram validados por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Resultados e Discussão

O perfilamento da expressão gênica global para as comparações, F1-MO, F1-SI, F1-SO, MO-SI, MO-SO, SI-SO, revelaram 262 genes diferencialmente expressos no LD. As listas das sequências e todos os transcritos significativos não apresentados aqui podem ser encontradas em Lobo, 2010).

Diversos transcritos envolvidos com o desenvolvimento do tecido muscular esquelético e adipogênese intramuscular foram encontrados em todas as raças. Foi observada forte expressão de fatores de transcrição (MyoD e IGFBP4), genes envolvidos na biosíntese de ácidos graxos (PGDS e SCD), adipogênese (C/EBP β e PPAR γ) e metabolismo energético (PYGL, GLUT -3, GGTA1 e ATP5G1). C/EBP δ foi 2,2 vezes mais expresso no músculo de cordeiros MO do que naqueles SO.

O gene C/EBP α é um fator de transcrição envolvido no processo de diferenciação dos pré-adipócitos. Este gene é ativo no início da adipogênese e é requerido para subsequente ativação do gene PPAR γ , cuja expressão ocorre durante o acúmulo de gordura. Transcritos PPAR α foram mais expressos em animais F1 do que nos demais grupos genéticos. Isto sugere que cordeiros F1 estavam depositando mais gordura de marmoreio do que os cordeiros SI e SO, enquanto os cordeiros MO estão, provavelmente, ainda iniciando a deposição.

MyoD foi 2,2 vezes mais expresso em cordeiros SO do que naqueles MO, que sugere atividade proliferativa das células satélites, as quais são fontes de novos mionúcleos ou miofibras unidas a miofibras existentes. A expressão do gene IGFBP4 foi de maior magnitude no músculo de cordeiros SI comparados aos MO. A sequência de expressão F1>SI>MO para este transcrito é consistente com o potencial de crescimento destas raças.



Trancritos de genes que codificam enzimas do metabolismo energético: PYGL, GLUT-3 e GGTA1 sugerem um metabolismo mais glicolítico em todos os grupos genéticos, o qual indica maior utilização de carboidratos do que de lipídios como substratos energéticos no tecido. A sequência de expressão para PYGL: (SI<MO>SO<F1>SI) indica o grupo genético MO e o F1 com maior expressão que aqueles SI e SO. Já para o transcrito GLUT-3: (SO<MO<SI>SO>F1<SI) o grupo genético F1 teve menor expressão do que aqueles SI e SO. Interessantemente, para GGTA1: (MO<SO>SI<F1>MO), os cordeiros dos grupos genéticos SO e F1 apresentaram maior expressão para este transcrito do que cordeiros MO e SI.. Pesquisas têm apontado que a presença de PYGL é um indicador de alto conteúdo de glicogênio no músculo (Lin & Hsu 2005; Ashmore, 1974). Fibras do tipo glicolíticas, geralmente, contêm menos gordura intramuscular e são implicadas com a maturação, rendimento e sabor da carne (Hocquette et al., 1998). Os resultados da mensuração da expressão por qPCR foram, de maneira geral, consistentes com aqueles mensurados pela técnica de microarray. Nosso estudo é o primeiro que reporta o perfil de expressão gênica global do músculo esquelético de ovinos deslançados.

Conclusões

Os transcritos diferencialmente expressos podem ser considerados marcadores expressos úteis para a seleção de cordeiros em condições comerciais de produção (pastagem cultivada). A seleção para polimorfismos nestes genes poderão conferir maiores marmoreio e deposição de massa muscular, que são características ligadas diretamente a quantidade, a qualidade e a aceitação da carne.

O perfilamento de genes expressos é uma ferramenta para descobrir genes que contribuem para a variação quantitativa entre raças. Portanto, os genes diferencialmente expressos podem ser responsáveis diretamente pelas diferenças observadas nas raças aqui estudadas.

Os resultados provenientes da técnica de qPCR confirmaram os resultados do *array* para quase todos os genes selecionados, demonstrando que a técnica de microarray usada neste estudo é acurada e reproduzível. Outros trabalhos são requeridos analisando diversas fases da vida pós-natal, bem como outros sistemas de produção.

Literatura citada

- Ashmore, C.R. (1974). Phenotypic expression of muscle fiber types and some implications to meat quality. *Journal of Animal Science*, 38, 1158-1164.
- Bass, J.J, Sharma, M., Oldham, J. & Kambadur, R. (2000). Muscle growth and genetic regulation. In: Cronje, P. (Ed.) **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, growth and Reproduction**. Pretoria: South Africa, 2000. p.227-236.
- Lin, C.S., Hsu, C.W. (2005). Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan pigs. *Journal of Animal Science*, 83, 2075-2086.
- Lobo, A.M.B.O. **Fatty acid and global gene expression profiles in Brazilian hair sheep**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 93p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- Hocquette, J. F., Ortigues-Marty, I., Pethick, D. W., Herpin, P., Fernandez, X. (1998). Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science*, 56, 115–143.
- Notter, D.R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science* 77, 61-69.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa e a Universidade Federal de Viçosa- UFV pelo suporte financeiro. A primeira autora agradece ao CNPq e a UFV pela Bolsa de Estudo e a Regina Maki Sasahara (Especialista em produtos, GE Healthcare) pelo seu apoio técnico e suporte científico para a elaboração do experimento de microarray. Obrigada a todos os pesquisadores e estudantes do Laboratório de Genômica Pediátrica (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP) pela generosa hospitalidade durante minha estadia no laboratório e enorme contribuição para realização do experimento de microarray e, a todos do Laboratório de Biotecnologia Animal – UFV pelo apoio.