

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À FUNÇÃO
MITOCONDRIAL EM BOVINOS NELORE EXTREMOS PARA
CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL**

Larissa Fernanda Simielli Fonseca

Zootecnista

Jaboticabal - SP - Brasil

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À FUNÇÃO
MITOCONDRIAL EM BOVINOS NELORE EXTREMOS PARA
CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL**

Larissa Fernanda Simielli Fonseca

Orientador: **Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque**

Co-Orientadores: **Profa. Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante**

Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Genética e Melhoramento Animal

Jaboticabal - SP - Brasil

2013

F676e Fonseca, Larissa Fernanda Simielli
Expressão de genes relacionados à função mitocondrial em
bovinos Nelore extremos para consumo alimentar residual / Larissa
Fernanda Simielli Fonseca. -- Jaboticabal, 2013
xii, 49 p.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Lúcia Galvão de Albuquerque
Banca examinadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro, Poliana
Fernanda Giachetto
Bibliografia

1. Consumo alimentar residual. 2. PCR quantitativa em Tempo Real.
3. PGC1. 4. TFAM. 5. UCPS. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação -
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM BOVINOS NELORE EXTREMOS PARA CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

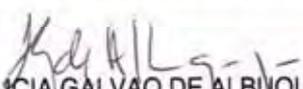
AUTORA: LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

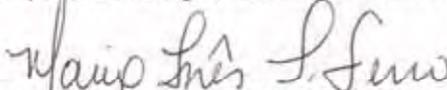
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA EUGENIA ZERLOTTI MERCADANTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. POLIANA FERNANDA GIACHETTO

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Campinas/SP

Data da realização: 22 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA - nascida em 22 de novembro de 1985, na cidade de Jaboticabal – SP, filha de Hélio Roberto Cafagni Fonseca e Nanci Simielli Cafagni Fonseca. Iniciou em março de 2006 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, obtendo o título de Zootecnista em dezembro de 2010. Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na mesma faculdade em que se graduou também como bolsista FAPESP, obtendo o grau de mestre em 22 de fevereiro de 2013, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Lucia Galvão de Albuquerque.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Ofereço

Aos meus Pais,

Hélio Roberto Cafagni Fonseca e Nanci Simielli Cafagni Fonseca pelo amor, dedicação e esforços sem limites dedicados a mim.

Ao meu Amor,

Rafael Henrique de Freitas Noronha por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todas as horas, mesmo quando estava longe.

A minha Família,

Pelo companheirismo, amizade, amor e todos os momentos felizes proporcionados.

A todos aqueles que passaram pela minha vida
e de alguma forma contribuíram para minha
formação pessoal e profissional.

Dedico

Agradecimentos

À Deus, por estar presente em todos os lugares em todos os momentos.

Aos meus pais, pela educação, amor, oportunidades e exemplo de vida e caráter.

Ao meu grande amor Rafael, pelo amor, paciência, amizade, companheirismo e pelo carinho que recebo da sua família.

Ao meu irmão Wellington, aos meus Avós e aos meus Primos pelas alegrias compartilhadas.

Ao meu afilhado Matheus e meu sobrinho Eduardo que tornaram nossas vidas mais felizes e divertidas.

À Unesp e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, pela oportunidade de crescimento científico que me proporcionaram.

À minha orientadora, Dra. Lucia Galvão de Albuquerque, pelas valiosas sugestões, orientação e exemplo de profissionalismo.

A Dra. Daniele Fernanda Jovino Gimenez, pela incansável ajuda e principalmente pela amizade que construímos.

Aos meus co-orientadores Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Fábio Ricardo Pablos de Souza pela disponibilidade.

Ao Professor Jesus Aparecido Ferro e a Professora Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade dispensados a mim.

Aos componentes da banca examinadora, Professora Maria Inês Tiraboschi Ferro e a **Dra. Poliana Fernanda Giachetto** pelas valiosas sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

À Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho e ao **Professor Jesus Aparecido Ferro** pelas correções e sugestões prestadas no exame de qualificação

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, SP pela concessão das informações e amostras utilizadas neste trabalho.

Aos todos os meus professores, que compartilharam comigo seus conhecimentos, tornando possível a minha formação.

Aos todos os meus amigos do Departamento de Genética e Melhoramento Animal, principalmente Ana Fabrícia, Fabieli, Inaê, Luciana Takada, Natália Irano, Spigolan e Tonussi pelo companheirismo.

Aos todos os amigos do Departamento de Tecnologia, principalmente a Agda, Ana, Claudenia, Elaine, Flávia, Juliana Cavalini, Juliana Vantini, Lucília, Mariza, Mayara, Renata e Tereza pelo carinho, imensa ajuda e amizade.

A todos aqueles que estiveram presentes nesta inesquecível fase da minha vida, compartilhando todos os momentos, bons ou ruins, mas que foram essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

À vocês todos, meu carinho e gratidão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1. Consumo Alimentar Residual.....	2
2. Consumo Alimentar Residual e Função Mitocondrial	4
3. Co-ativador 1 do PPAR γ – receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PGC1).....	5
4. Fator de transcrição mitocondrial (TFAM).....	6
5. Proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs).....	7
6. Expressão Gênica - PCR Quantitativa em Tempo Real	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
1. Coleta das amostras	11
2. Extração do RNA Total	15
3. Concentração e integridade do RNA Total extraído.....	16
4. Síntese da primeira fita de cDNA.....	17
5. PCR Quantitativa em Tempo Real.....	18
5.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	18
5.2. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores	19
5.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR.....	20
5.4. Escolha do Gene de Referência.....	22
5.5. Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct).....	22
5.6. Análises estatísticas dos dados.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
1. Concentração e integridade do RNA Total extraído.....	24

2. PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	26
2.1. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores	26
2.2. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR.....	28
2.3. Escolha dos Genes de Referência	32
2.4. Análise estatística da expressão de genes ligados a Função Mitocondrial em animais selecionados para Consumo Alimentar Residual	33
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Lista de Figuras

Figura 1: Local da coleta da amostra do tecido muscular (músculo masseter).	14
Figura 2: Amostra de tecido muscular coletada.	14
Figura 3: Coleta de amostra de tecido hepático.	14
Figura 4: Amostra de tecido hepático coletada.	14
Figura 5: Amostra de músculo masseter armazenada em tubo cônico de centrífuga de 15 mL contendo RNA <i>holder</i>	14
Figura 6: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas de tecido hepático.....	25
Figura 7: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas de tecido muscular.....	25
Figura 8: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de referência GAPDH e Beta Actina e para os genes alvo PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores diretos e reversos (F/R).	27
Figura 9: Curva Padrão, inclinação da reta (<i>slope</i>), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para o gene de referência GAPDH, Beta Actina, PGC1 α , TFAM e UCP2 em tecido hepático.	29
Figura 10: Curva Padrão, inclinação da reta (<i>slope</i>), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para o gene de referência GAPDH, Beta Actina, PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular.....	31
Figura 11: 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%)......	34
Figura 12: Expressão relativa do gene alvo TFAM em tecido muscular de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo (*: significativo ao nível de 5%).	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de animais (N), médias, desvios-padrão, mínimos e máximos de consumo alimentar residual (CAR).	12
Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT - PCR.....	19
Tabela 3: Variações das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.	20
Tabela 4: Estabilidade dos genes de referência testados através dos programas <i>GeNorm</i> (valores de M) e <i>Expression Suite</i> (escores).	33
Tabela 5: Expressão dos genes PGC1 α , TFAM e UCP2 em tecido hepático de animais com consumo residual alimentar positivo e negativo.....	33
Tabela 6: Expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular de animais com consumo residual alimentar positivo e negativo.	35

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM BOVINOS NELORE EXTREMOS PARA CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

RESUMO - A pecuária de corte é uma atividade de grande importância social e econômica no Brasil e criar animais mais produtivos e eficientes é fundamental para aumentar a rentabilidade do sistema. Um dos componentes de maior custo envolvido na produção animal é a alimentação. Por isso, muitos índices já foram propostos com o intuito de melhorar a eficiência alimentar. Uma das características que têm sido estudadas, com objetivo de selecionar animais, é o consumo alimentar residual (CAR), que 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 a 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. O co-ativador PGC1, pode induzir a biogênese mitocondrial, termogênese e respiração. A proteína TFAM (fator de transcrição mitocondrial A) está envolvida no processo de transcrição do DNA mitocondrial e é um fator-chave para a replicação do DNA mitocondrial. As proteínas desacopladoras (UCPs) localizam-se na membrana interna da mitocôndria, e dentre elas, estão a UCP2 e a UCP3, que atuam no controle da termogênese adaptativa e da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. 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 tecidos hepático e muscular de dois grupos de bovinos Nelore com valores contrastantes de CAR, visando avaliar as relações destes genes com consumo alimentar residual. Em tecido hepático, 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. 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. Estes resultados indicam que os genes TFAM e UCP2 são possíveis candidatos a serem utilizados como marcadores em programas de melhoramento visando o aumento da eficiência alimentar em bovinos Nelore.

Palavras-chave: Consumo alimentar residual, PCR quantitativa em Tempo Real, PGC1 α , TFAM, UCPs.

EXPRESSION OF GENES RELATED TO MITOCHONDRIAL FUNCTION IN CATTLE NELLORE EXTREME FOR RESIDUAL FEED INTAKE

ABSTRACT - The beef cattle industry is an activity of significant social and economic importance in Brazil and to raise more efficient animals is fundamental to increase the system profitability. One of the most expensive components involved in animal production is the cost of food. Therefore, many indexes have been proposed to improve feed efficiency. One of the traits that have been studied in order to select animals is the residual feed intake (RFI), which is estimated considering the difference between the real consumption and the amount of food the animal should eat based on its live weight, which allows to identify and select more efficient animals, without selecting for higher adult weight. Mitochondrial function has been identified as an influential factor on RFI. Thus, to analyze genes involved in mitochondrial function becomes an alternative to identify molecular markers associated with higher feed efficiency. The co-activator PGC1 can induce mitochondrial biogenesis, thermogenesis and breathing. The protein TFAM (mitochondrial transcription factor A) is involved in mitochondrial DNA transcription and is a key factor for the replication of mitochondrial DNA. The uncoupling proteins (UCPs) are located in the inner mitochondrial membrane, and among them, are UCP2 and UCP3, which act in the control of adaptive thermogenesis and of the production of reactive oxygen species in the mitochondria. In this study the expression of genes PGC1 α , TFAM, UCP2 and UCP3 by real-time quantitative PCR in liver and muscle tissues in two groups of Nelore cattle with contrasting values of 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 selected, while the UCP3 gene was not expressed in liver tissue. In muscle tissue, the TFAM gene was more expressed in positive RFI animals compared to negative RFI animals. The genes PGC1 α , UCP2 and UCP3 expressions were not significantly different between the two groups. These results indicate that the genes TFAM and UCP2 are possible candidates to be used as markers in breeding programs aimed at increasing feed efficiency in Nelore cattle.

Keywords: Residual Feed Intake, quantitative Real Time PCR, PGC1 α , TFAM, UCPs.

INTRODUÇÃO

Estima-se que o Brasil possua um rebanho de mais de 165 milhões de bovinos (ACNB, 2012). Estudar formas de aumentar a rentabilidade da pecuária de corte é fundamental para a economia do país. Uma estratégia para aumentar a lucratividade do sistema é a seleção de animais de maior eficiência alimentar, sem prejuízo do crescimento e reprodução, ou comprometimento da qualidade da carne. Além disso, o aumento da eficiência alimentar diminui o impacto ambiental, já que leva a redução da área de pastagens para a produção de bovinos e também diminui a produção de poluentes ambientais como o esterco e o metano, aumentando a sustentabilidade do sistema (BASARAB¹, 2003).

Com o intuito de aumentar a eficiência da bovinocultura, muitas medidas de eficiência alimentar vêm sendo propostas, e o consumo alimentar residual (CAR) é uma delas (BRANCO et al., 2009). CAR é definido como a diferença entre consumo de matéria seca predito, por equação de regressão em função do peso vivo metabólico médio e o consumo real observado (KOCH et al., 1963).

Trabalhos desenvolvidos por Bottje et al. (2002), em aves, indicam uma maior produção de oxigênio reativo em tecido muscular de animais de menor eficiência alimentar. Kolath et al. (2006¹), em estudos com bovinos, encontraram resultados semelhantes, o que sugere uma ligação entre respiração mitocondrial e eficiência alimentar.

A ineficiência mitocondrial pode ocorrer como consequência da perda de elétrons da cadeia, levando assim, à produção de calor ou fazendo com que 2 a 4% do oxigênio não seja reduzido à água, produzindo uma forma de oxigênio reativo. Esta molécula pode causar danos em ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, e também na própria mitocôndria, aumentando desta maneira a demanda de energia necessária para o animal produzir a mesma quantidade de ATP (ZULKIFLI et al., 2007).

Estudar a expressão de genes ligados à função mitocondrial pode ser uma alternativa para selecionar animais de melhor eficiência alimentar (THOMPSON, 2004). Neste sentido, os co-ativadores PGC1 têm importante função na integralização de vias de sinalização no controle do metabolismo celular sistêmico. 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 são de grande interesse devido a sua importância na regulação do gasto energético. As UCPs são encontradas na membrana mitocondrial interna e são capazes de desacoplar a oxidação de combustíveis através da cadeia de transportes de elétrons da síntese de ATP (THOMPSON, 2004), gerando apenas calor.

~~OBJETIVOS~~

Os objetivos deste trabalho foram:

- Descrever o perfil de expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular (músculo masseter) e hepático de animais da raça Nelore extremos para CAR, pelo método de qRT - PCR.
- Verificar a associação entre a expressão desses genes ligados à função mitocondrial com o consumo alimentar residual.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Consumo Alimentar Residual

A pecuária de corte é uma atividade de grande importância social e econômica no Brasil e elevar sua produtividade e qualidade, de forma sustentável, tem se mostrado um dos maiores desafios para a pesquisa.

A criação de animais mais eficientes torna a atividade mais rentável. Segundo Ribeiro (2010), um dos componentes de maior custo na produção animal é a alimentação, responsável por, aproximadamente, 60% do custo total, podendo chegar a 70% das despesas em caso de animais confinados. 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.

Com o intuito de melhorar a eficiência alimentar foram propostos mais de 40 índices (EUCLIDES FILHO et al., 2002). O mais utilizado é a conversão alimentar (Kg de consumo/Kg de ganho), no entanto, a seleção para melhorar a conversão alimentar leva ao aumento do tamanho dos animais adultos, comprometendo principalmente as funções reprodutivas em condições nutricionais limitantes (LANNA et al., 2003). Como alternativa, por volta do ano 2000, no Canadá e Austrália iniciou-se o estudo do consumo alimentar residual (CAR), técnica desenvolvida da década de 1960 nos Estados Unidos (REUNOL, 2010).

Por definição, CAR é a diferença entre o consumo real e a quantidade de alimento que o animal deveria comer, baseado na sua velocidade de ganho de peso e no seu peso vivo médio. Animais CAR negativo são mais eficientes, pois o consumo observado é menor que o estimado. Já os animais CAR positivo são menos eficientes, isto é, consomem mais que o predito. Assim, o consumo alimentar residual é uma característica que permite identificar animais mais eficientes, sem que haja seleção concomitante para maior ganho de peso e maior peso à idade adulta (KOCH et al., 1963).

Em *Bos taurus*, a avaliação das relações entre CAR e composição corporal, revelou que animais mais eficientes apresentam carcaça com menor quantidade de gordura de cobertura, intermuscular e interna. Da mesma forma, apresentam vísceras (fígado, abomaso e intestino) menores e um menor consumo de energia metabolizável, menor retenção de energia e produzem menos calor (BASARAB² et al., 2003).

CAR é uma característica que tem apresentado valores moderados de herdabilidade. DEL CLARO et al. (2012), em um trabalho de revisão utilizando meta-análise, reportaram estimativa média de herdabilidade para esta característica de 0,29, concluindo a existência de variabilidade genética que pode ser explorada na identificação e seleção de animais geneticamente superiores para a eficiência alimentar.

2. Consumo Alimentar Residual e Função Mitocondrial

A função mitocondrial tem sido apontada como sendo um fator de grande influência no consumo alimentar residual (ZULKIFLI et al., 2007). As mitocôndrias são o local de produção de energia na célula e produzem a maior parte do ATP celular. A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, também denominada de cadeia respiratória, é uma sequência de moléculas transportadoras de elétrons que sofrem redução e oxidação e que liberam energia que, em última análise, é utilizada para produzir ATP, no processo denominado de fosforilação oxidativa. Segundo ZULKIFLI et al. (2007), a maioria dos componentes da cadeia são proteínas que existem em complexos multi-numerados de I a IV. Durante o transporte de elétrons ao longo da cadeia, as proteínas transportadoras de elétrons alternam entre os estados reduzido e oxidado, para que possam aceitar e doar elétrons, respectivamente, os quais são finalmente aceitos pelo oxigênio molecular, com a consequente formação de água. Contudo, podem ocorrer perdas de elétrons da cadeia durante este processo, e assim, será produzida uma forma de oxigênio reativo.

Segundo Bottje et al. (2002), existe uma perda maior de elétrons em mitocôndrias de frangos de baixa eficiência alimentar em comparação com mitocôndrias de frangos de alta eficiência. Bottje et al. (2006), mostraram que mitocôndrias de frangos de baixa eficiência alimentar (CAR positivo) apresentam maior perda de elétrons durante o transporte e, conseqüentemente, liberam mais calor, possuem maior produção de oxigênio reativo e produzem menos ATP e, desse modo, consomem mais alimentos. Desta forma, encontrar marcadores para identificar animais com maior eficiência alimentar através do estudo da função mitocondrial pode ser uma forma viável de seleção para esta característica, já que analisar o consumo alimentar residual de cada animal requer infraestrutura e demanda tempo, o que encarece o processo. Genes como PGC1, TFAM, UCP2 e UCP3, envolvidos na função e biogênese mitocondrial, podem ser pesquisados como possíveis candidatos.

3. Co-ativador 1 do PPAR γ – receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PGC1)

A ativação ou repressão da expressão gênica pode ser realizada por fatores de transcrição que se ligam a sequências específicas de DNA. No entanto, para que isso ocorra, é necessário acessar a dupla fita de DNA que encontra-se condensada na forma de cromatina, e alguns destes fatores de transcrição não possuem a atividade enzimática necessária para isso. Para exercer estas funções existem os co-reguladores, que podem ativar (co-ativador) ou inibir (co-repressor) a transcrição gênica (SPIEGELMAN e HEINRICH, 2004).

Dentro do grupo de co-reguladores que funcionam como co-ativadores mitocondriais, está a família PGC1 (co-ativador 1 do PPAR γ – receptores ativados da proliferação de peroxissomos), que possui membros que podem induzir a biogênese mitocondrial, termogênese e respiração. O primeiro membro da família PGC1 foi identificado no tecido adiposo marrom como PGC1 α e, posteriormente, foi identificado o PGC1 β . Essas formas têm um potente domínio de ativação transcricional (PUIGSERVER et al., 1999). Em *Bos taurus*, o gene PGC1 encontra-se localizado no cromossomo 6 e contém 13 éxons (WEIKARD, 2005).

O RNA mensageiro do gene PGC1 é encontrado em tecidos que possuem grande demanda de energia e são ricos em mitocôndrias, como coração, músculo esquelético, gordura marrom, rim e fígado. Consistente com o perfil de expressão e indução, a expressão ectópica do PGC1 induz resposta celular que se relaciona com a fisiologia e o metabolismo energético mitocondrial. A superexpressão, ou seja, o aumento da função do gene, no tecido adiposo branco, músculo e coração, estimula a biogênese mitocondrial (KNUTTI et al., 2001).

A deficiência na síntese de ATP é gerada por disfunção na cadeia respiratória, e na tentativa de contornar problemas na fosforilação oxidativa, levando a ativação de genes nucleares de replicação e transcrição mitocondrial. Através deste estímulo, há a expressão do co-ativador PGC1, que controla as proteínas transativadoras NRF1 e NRF2 (fator respiratório nuclear 1 e 2, respectivamente), que por sua vez, regulam a expressão das proteínas

TFAM, TFBM1 e 2 (fator de transcrição mitocondrial A, B1 e B2 respectivamente) (GLEYZER et al., 2005).

Nos adipócitos, os PGC1 α e β induzem a membrana interna mitocondrial à produção da proteína desacopladora UCP1, que pode dissociar a oxidação do combustível da produção de ATP e gerar calor. No músculo, o PGC1 induz o desacoplamento da proteína UCP2 gerando calor. Estes resultados sugerem que 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).

4. Fator de transcrição mitocondrial (TFAM)

A proteína TFAM (fator de transcrição mitocondrial A) é membro de uma família de proteínas HMGB (*high mobility group box protein*) e foi o primeiro fator de transcrição mitocondrial a ser identificado em humanos (FISHER et al., 1988) sendo essencial para manutenção e biogênese do DNA mitocondrial (KANKI, et al., 2004). Esta proteína é codificada por um gene nuclear e importada para mitocôndria onde está envolvida no processo de transcrição e replicação do DNA mitocondrial em mamíferos (CLAYTON, 1991). Em *Bos taurus*, o gene TFAM encontra-se localizado no cromossomo 28, contém 7 éxons e 6 íntrons, (EKSTRAND et al., 2004).

A função exata do TFAM em mamíferos não é clara. Algumas evidências indicam que o DNA mitocondrial é revestido com TFAM (TAKAMATSU et al., 2002; ALAM et al., 2003; OHGAKI et al., 2007), e que uma molécula de DNA mitocondrial é envolvida por 900 moléculas de TFAM (ALAM et al., 2003). Além disso, estudos com embriões de ratos evidenciam que TFAM regula o número de cópias de DNA mitocondrial em mamíferos, já que este número é diretamente proporcional ao nível total de TFAM (EKSTRAND, 2004). Por fim, ela ainda estimula a transcrição do DNA mitocondrial (GASPARI et al., 2004).

Esta proteína atua em parceria com fatores secundários, TFBM1 e TFBM2, no processo de transcrição mitocondrial, e conjuntamente, se heterodimerizam com a RNA polimerase mitocondrial, e semelhantemente as histonas, se unem ao DNA mitocondrial (FALKENBERG et al., 2002). As

proteínas TFAM 1 e 2 ainda exercem atividade RNA metiltransferase, sendo a TFAM a maior responsável por regular a biogênese mitocondrial em mamíferos (FISHER et al., 1988).

5. Proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs)

No processo de síntese de trifosfato de adenosina (ATP), a cadeia respiratória utiliza a energia liberada pela passagem dos elétrons para transportar prótons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas, criando tanto um gradiente químico (ΔpH), quanto um gradiente elétrico ($\Delta \psi$). No retorno dos prótons para a matriz mitocondrial (força próton-motriz), as proteínas ATP-sintases, numa reação acoplada, utilizam a energia para fosforilar o ADP, a partir de fosfato inorgânico, para sintetizar o ATP (RICQUIER et al., 1991). No entanto, os prótons podem atravessar de volta para a matriz mitocondrial por um canal alternativo, formado pelas proteínas desacopladoras, as UCPs. A utilização da UCP faz com que a energia gerada, pela passagem dos elétrons na cadeia respiratória, seja convertida somente em calor. Com isso, há maior oxidação de substratos energéticos, o que diminui a eficiência da síntese de ATP, gerando implicações na regulação da temperatura, maior gasto energético e menor peso corporal (MILLET et al., 1997; HARROLD et al., 2000). O papel da UCP é desacoplar a fosforilação oxidativa da síntese da molécula de ADP (RICQUIER et al., 2000).

Fleury et al. (1997) e Boss et al. (1997) identificaram duas novas isoformas da UCP: UCP2 e UCP3, respectivamente. A UCP2 é expressa no tecido adiposo branco no período pós-prandial (NORDFORS et al., 1998). A UCP3 possui duas isoformas, uma com 275 aminoácidos e outra com 312 aminoácidos, e apresenta 73% de homologia com a UCP2 (RICQUIER et al., 2000). Em *Bos taurus*, as UCPs 2 e 3 estão localizadas no cromossomo 15 (STONE, 1999). As possíveis funções da UCP2 e UCP3 incluem controle da termogênese adaptativa em resposta à exposição ao frio e à dieta, controle da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, regulação da síntese de ATP e regulação da oxidação de ácidos graxos (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2001). As UCPs atuam de forma dependente da

disponibilidade de ácidos graxos presentes no interior das células (BOSCHINI et al., 2005).

A UCP2 tem função de prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio. Também é ativada durante a resposta termogênica a infecções e, por isso, está relacionada à função imune (NORDFORS et al., 1998). De acordo com Ricquier et al. (1991), sua função fisiológica tem relação com a regulação do metabolismo, com a liberação de calor pela célula induzida pela dieta, e diminuição do peso corporal.

A UCP3 está relacionada com o peso corporal e é regulada pela disponibilidade de energia proveniente da dieta, sendo que sua expressão aumenta na presença de glicose e lipídios (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2001), levando ao aumento do gasto energético (VIDAL-PUIG et al., 1997).

6. Expressão Gênica - PCR Quantitativa em Tempo Real

Os processos fisiológicos dependem da expressão de vários genes atuando de forma conjunta e analisar a regulação da expressão desses genes tem recebido considerável atenção nos últimos anos (CASSAR-MALEK et al. 2008). O aumento do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos genes ligados a características econômicas permite a complementação dos métodos quantitativos de melhoramento (LEDUR, 2001).

Existem várias técnicas que possibilitam o estudo da expressão dos genes (transcriptoma), e entre as mais difundidas estão o microarranjo, o RNAseq e a PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

O microarranjo permite a investigação de milhares de genes de maneira simultânea, através de sondas (fragmentos de DNA fita simples) depositadas em uma lâmina de forma ordenada e em áreas específicas (*spots*) que se hibridizam com o seu cDNA correspondente, sintetizado a partir do RNA mensageiro extraído das amostras a serem analisadas (GIACHETTO, 2010). Chen et al. (2011), estudando a expressão diferencial em tecido hepático de bovinos da raça Angus, utilizando a técnica de microarranjo, encontraram 163 genes diferencialmente expressos envolvidos em 7 diferentes funções celulares

e metabólicas, incluindo genes ligados a função mitocondrial. No entanto, este método tem acurácia limitada para a expressão de transcritos pouco abundantes (TANG et al., 2011) e necessita de validação através de outras técnicas (MEI et al., 2003; CLOSE et al., 2004).

O RNAseq permite o sequenciamento e a quantificação dos transcritos, independente do seu tamanho e de uma sequência genômica pré-existente (WANG *et al.*, 2008; OSHLACK *et al.*, 2010). Spencer et al. (2013) estudando a expressão gênica diferencial em frangos de corte extremos para CAR através do RNAseq, encontraram diferenças significativas de expressão entre os dois grupos.

Na técnica qRT – PCR, diferentemente da técnica de PCR tradicional (*endpoint*), em que é necessária a análise do produto de PCR através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida após o último ciclo de amplificação (PELT-VERKUIL et al., 2008), os produtos da PCR em tempo real podem ser mensurados a cada ciclo e este monitoramento é feito durante a fase exponencial de amplificação, e com isso, pode-se determinar a quantidade inicial do alvo com grande precisão (AHMED, 2002). Para isso, a técnica utiliza corantes (sistemas de detecção) que se associam à amplificação do gene alvo e emitem fluorescência. Esta fluorescência aumenta em proporção direta ao número de moléculas de produtos de PCR (*amplicons*) gerados (BUSTIN e NOLAN, 2004; WONG e MEDRANO, 2005).

Os sistemas de detecção mais utilizados são o *SYBR[®] Green* e o *TaqMan[®]*. O sistema *SYBR[®] Green*, possui capacidade de se ligar à fita dupla de DNA de forma covalente e emitir uma fluorescência que é medida e convertida numa quantidade de DNA (MACKAY et al., 2007), enquanto o sistema *TaqMan[®]* utiliza uma sonda fluorescente, que se liga à sequência alvo, a qual tem total complementaridade, e que permite a detecção de um produto específico, conforme este se acumula durante os ciclos da PCR (PELT-VERKUIL et al., 2008). A principal diferença entre os dois sistemas, é que com o *SYBR[®] Green* detecta-se todo o DNA fita dupla, inclusive produtos da reação inespecíficos, e por isso, é necessário que as reações sejam otimizadas para a obtenção de resultados precisos. Por outro lado, o sistema *TaqMan[®]* é altamente específico, pois possui, além do par de oligonucleotídeos iniciadores, mais uma sequência de nucleotídeos chamada de sonda. Desse modo, uma

molécula de DNA somente será contabilizada se os oligonucleotídeos e a sonda se ligarem a ela, e por isso, apresenta um custo muito maior em relação ao *SYBR[®] Green* (HEID, 1996).

A qRT -PCR pode ser realizada por meio de duas técnicas: quantificação absoluta ou quantificação relativa. O ensaio de quantificação absoluta descreve um experimento de qRT -PCR no qual amostras de quantidades conhecidas são diluídas em série e em seguida, amplificadas para gerar uma curva padrão. As amostras desconhecidas são então quantificadas por comparação com essa curva. Essa técnica permite que se saiba o número exato de cópias do RNA alvo em uma determinada amostra biológica (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

A quantificação relativa é subdividida em duas metodologias, e a escolha da metodologia a ser utilizada depende da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações, sendo que os resultados de expressão obtidos ao final do experimento devem ser iguais para os dois métodos. Quando a eficiência de amplificação dos iniciadores está dentro de um limiar aceitável, utiliza-se o método do Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), no entanto, se as eficiências não são satisfatórias, deve-se lançar mão do método da Curva Padrão para Quantificação Relativa (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Independente do método a ser seguido, em um experimento de quantificação relativa por qRT -PCR, a expressão de um gene de interesse em uma dada amostra é comparada com a expressão do mesmo gene em outra amostra (amostra calibradora). Os resultados são expressos como um aumento ou diminuição da expressão do tratado em relação ao controle. Posteriormente, os valores obtidos são comparados aos resultados das mesmas amostras quantificadas em genes de referência. Este procedimento é utilizado como um controle na variabilidade experimental neste tipo de quantificação (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

A escolha dos genes de referência deve ser feita de forma criteriosa. Eles não devem variar nos tecidos ou células sob investigação, ou em resposta ao tratamento experimental. Recomenda-se utilizar mais de um gene de referência, como forma de controlar possíveis valores discrepantes e grandes diferenças entre os genes (VANDESOMPELE, et al. 2002).

A qRT-PCR, tem se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Kolath et al. (2006²), estudando a relação das proteínas UCP2 e 3 em *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Angus selecionados para CAR, não encontraram diferenças na expressão desses genes entre os dois grupos. Kelly et al. (2011), estudando os efeitos do CAR na transcrição de 17 genes envolvidos na cadeia respiratória e na regulação da biogênese mitocondrial através da qRT-PCR em músculo *Longissimus dorsi* de bovinos cruzados *Limousin x Friesian* que receberam quantidades contrastantes de forragem na dieta, encontraram diferenças significativas na expressão dos genes UCP3, PGC1 α e PPAR γ .

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta das amostras

Os animais utilizados neste trabalho foram disponibilizados pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, SP (IZ) e são provenientes de um rebanho de bovinos Nelore estabilizado de 160 matrizes e 8 touros, que são selecionados dentro de rebanho (cerca de 8% dos machos e 60% das fêmeas) com base no desempenho individual do peso ao sobreano desde 1978. Durante esses anos, o rebanho esteve praticamente fechado, com pouca introdução de touros de outros rebanhos. Em 2007, a taxa estimada de mudança genética foi 2,13 kg no peso ao sobreano/ano, ou 0,72% da média da característica/ano (RAZOOK e MERCADANTE, 2007).

Os animais de todo o grupo de contemporâneos (n=60) foram submetidos a uma prova de ganho em peso no período de 4 de maio à 19 de outubro de 2010. Os mesmos receberam dieta formulada à base de feno de braquiária, milho moído, farelo de algodão e sal mineral. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às 8h e às 15h, com acesso *ad libitum* às dietas e à água. O consumo voluntário de cada animal foi calculado pela diferença entre o oferecido e as sobras, que foram coletadas diariamente, pesadas e amostradas e, posteriormente ajustadas, permitindo sobras entre 5 e 10 % do

total oferecido. Os animais foram pesados sem jejum prévio três vezes por semana em dias consecutivos.

Os valores estimados de CAR foram determinados segundo o modelo proposto por Koch et al. (1963), conforme a equação abaixo:

$$\text{CAR} = \text{intercepto} + \text{PV}^{0,75} * \beta_P + \text{GMD} * \beta_G + \text{erro},$$

onde $\text{PV}^{0,75}$ é o peso vivo metabólico - $\text{PV}^{0,75} = (\text{Peso inicial} + 34,5 * \text{GMD})^{0,75}$, sendo 34,5 a metade dos dias em teste de desempenho; GMD é o ganho médio diário estimado pela regressão de todos os pesos sobre os dias em teste.

Após a prova de ganho em peso, foram selecionados 24 animais com base nos valores de CAR (Tabela 1), a fim de compor uma amostra representativa de animais mais (CAR negativo) e menos eficientes (CAR positivo). Em fevereiro de 2011 os animais entraram em confinamento para terminação com dieta de relação volumoso/concentrado igual 20:80% e 82% de NDT, e foram abatidos quando atingiram 4 mm de espessura de gordura subcutânea no lombo avaliada por ultrassonografia.

Tabela 1: Número de animais (N), médias, desvios-padrão, mínimos e máximos de consumo alimentar residual (CAR).

	N	Médias	Desvios-Padrão	Mínimos	Máximos
CAR Positivo	12	0,39	0,19	0,05	0,77
CAR Negativo	12	-0,45	0,18	-0,75	-0,13

* Resultados expressos em quilograma de matéria seca por dia

Os abates foram realizados no Centro de Tecnologia da Carne (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), na cidade de Campinas, SP. O peso vivo médio dos animais era 398 kg. Foram realizados três abates experimentais nos meses de abril, maio e junho de 2011 e, em cada um deles, foram abatidos 8 animais. Imediatamente após o abate, foram coletadas amostras de tecido muscular facial (músculo masseter, Figuras 1 e 2) e de

tecido hepático (Figuras 3 e 4), e armazenados em tubo cônico de centrífuga de 15 mL (Figura 5) contendo 5 mL de RNA *holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e transportadas ao Laboratório de Genética “Prof. Dr. Marcos Antonio Gianoni” do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista do Câmpus de Jaboticabal. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80 °C para posterior extração do RNA total dos tecidos.

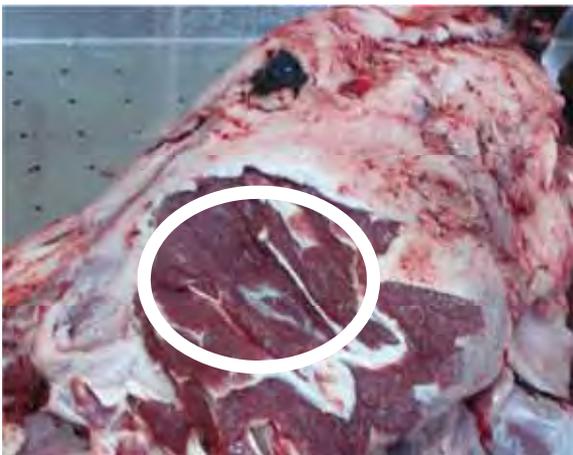


Figura 1: Local da coleta da amostra do tecido muscular (músculo masseter).



Figura 2: Amostra de tecido muscular coletada.

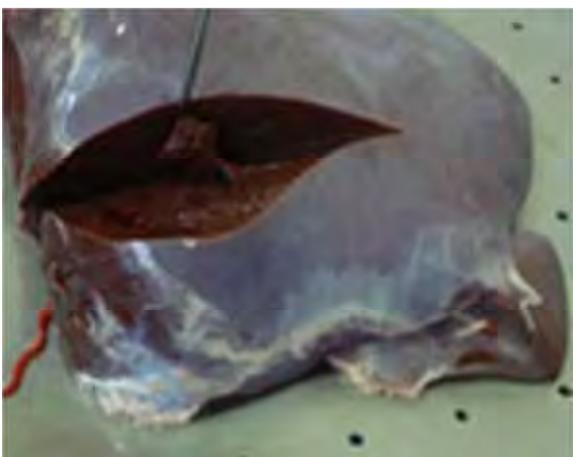


Figura 3: Coleta de amostra de tecido hepático.

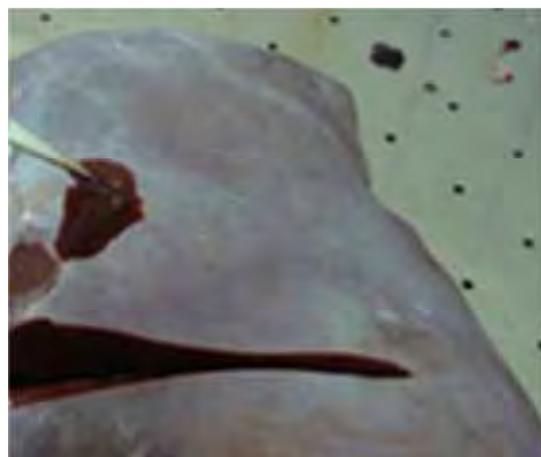


Figura 4: Amostra de tecido hepático coletada.



Figura 5: Amostra de músculo masseter armazenada em tubo cônico de centrifuga de 15 mL contendo RNA *holder*.

2. Extração do RNA Total

A extração do RNA total das amostras coletadas foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, SP. Para isso, foram utilizados, em média, 30 mg do tecido hepático e 50 mg de tecido muscular previamente estocados em *RNA holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e o *kit* para extração de RNA *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), como descrito abaixo.

As amostras foram retiradas do *freezer* -80 °C, acondicionadas em gelo, pesadas, e então foi realizada a ruptura e homogeneização do tecido com 1 mL da solução *Qiazol Lysis Reagent* no homogeneizador de tecidos *ultraturrax* T50 (IKA). Cada amostra foi homogeneizada três vezes durante 30 segundos e nos intervalos, também de 30 segundos, eram mantidas no gelo. Após esta etapa foi adicionado 200 µL de clorofórmio e as amostras foram incubadas durante 3 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C.

Formaram-se então três fases, sendo a superior, incolor e aquosa, na qual estava contido o RNA, que foi transferida para um novo microtubo de 2 mL. Adicionou-se o mesmo volume da amostras de etanol 70% (aproximadamente 600 µL) e homogeneizou-se as amostras em agitador de tubos tipo *vortex* AP56 (Phoenix). Depois, esta solução foi transferida a uma coluna com membrana de sílica, fornecida pelo *kit* de extração, e centrifugada a 8000 x g por 15 segundos para a eliminação dos resíduos. Nesse passo, foram adicionados à membrana de sílica, o *mix* contendo 10 µL de DNase I (1500 *kunitz units*) e 70 µL de tampão RDD, fornecidos pelo *Kit RNase-Free DNase set* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e incubaram-se as amostras a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado tampão RW1 e centrifugou-se novamente a 8000 x g por 15 segundos para eliminação de fenol e outros contaminantes. Então, a coluna foi lavada com o tampão RPE por duas vezes e o RNA ligado à coluna foi eluído em 50 µL de água livre de RNase por centrifugação a 8000 x g, durante um minuto. Após este último passo, as amostras foram armazenadas em *freezer* -80 °C.

As amostras que apresentaram contaminação por inibidores de PCR (determinado através de *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007, como descrito no item 3), foram purificadas com acetado de sódio 3 M através do seguinte protocolo: adicionou-se 2,5 volumes (em relação ao volume da amostra) de etanol e então as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo *vortex* AP56 (Phoenix) e incubadas por 16 horas no *freezer* (-20 °C). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 4 °C, a uma velocidade de 12000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado adicionando-se 500 µL de etanol 70% gelado. Então, centrifugaram-se as amostras novamente durante 5 minutos, a 4 °C, a uma velocidade de 7500 x g. O sobrenadante foi removido e todos vestígios de etanol foram evaporados através da centrifugação dos microtubos abertos a 12000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 10µL de água livre de RNase.

3. Concentração e integridade do RNA Total extraído

A determinação da concentração e contaminação do RNA foi realizada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. Foi utilizado o valor de absorbância a 260 nm para a determinação da concentração do RNA (ng/µL), as razões A260nm/A280nm para avaliar a contaminação por proteínas e A260nm/230nm para avaliar as contaminações por outros compostos, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol. Os valores de referência para estas razões são de 1,8 a 2 e maior ou igual a 2, respectivamente.

A qualidade do RNA total foi verificada através do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009), e do *kit Agilent RNA 6000 Nano Chips* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Assim, pode ser gerado um relatório através do programa *2100 Expert Software* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009), no qual, a integridade do RNA pode ser visualizada através de um

eletroferograma. Para que o RNA seja considerado íntegro, devem ser observados 2 picos bem definidos, referentes às subunidades de RNA ribossomal 28S e 18S, com uma razão 28S:18S de 2:1. Em caso de degradação, esses picos sofrem uma diminuição no sinal da fluorescência e outros picos correspondentes a outros fragmentos são detectados. Além disso, com o *Bioanalyzer* determina-se o índice RIN (*RNA integrity number*) que varia de 1 a 10, sendo 1 o pior resultado e 10 o melhor, que representa a qualidade do RNA. Resultados iguais ou superiores a 7 são considerados satisfatórios.

Além disso, a confirmação da ausência de contaminação por DNA genômico nas amostras foi realizada com o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010), e o *kit* de quantificação de DNA, *Qubit dsDNA Assay Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

4. Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando o *Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), como descrito abaixo.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, 2µL de *RT enzyme mix* contendo *SuperScript III RT* e *RNaseOut*, 10µL de *2X RT Reaction Mix*, contendo *primer oligo(dT)₂₀* (2,5 µM) mais *random hexamers* (2,5ng/ µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs e água ultra pura para completar o volume para 20 µL. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 minutos, 85 °C por 5 minutos e transferida para um recipiente com gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 1 µL (2 U) da enzima *E. coli RNase H* e a reação foi incubada a 37 °C por 20 minutos. O cDNA fita simples foi estocado a -20 °C até o uso na reação de qRT - PCR.

As reações foram feitas separadamente para cada amostra de RNA de cada tecido e de cada animal.

5. PCR Quantitativa em Tempo Real

5.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequências de nucleotídeos utilizadas para desenhar os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram obtidas no banco de dados *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para que não houvessem riscos dos iniciadores desenhados se anelarem em regiões intrônicas, as sequências utilizadas foram de RNA mensageiro.

Foram desenhados 4 pares de iniciadores referentes aos genes alvo (PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3), além de outros dois genes (Beta Actina e GAPDH), selecionados na literatura, que foram utilizados como genes de referência. A partir daí, utilizou-se o programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2004) para o desenho dos iniciadores (Tabela 2). Os iniciadores foram selecionados levando-se em consideração o seu tamanho, o tamanho do *amplicon*, a porcentagem de citosina e guanina, temperatura de desnaturação ou fusão (*Melting Temperature* – TM) e a ausência de dímeros e *hairpins*. Em seguida, as sequências dos iniciadores escolhidos foram alinhadas utilizando o algoritmo *BLAST* do *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) nos bancos de dados apropriados, para identificar regiões da sequência que poderiam apresentar alto grau de homologia com outras partes do genoma ou alta homologia dentro de uma família de genes. Desta maneira, iniciadores que apresentaram homologias inespecíficas foram descartados.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT - PCR

Gene	Número de Acesso (NCBI)	Sequência (5' – 3')	TM do Amplicon (° C) ¹	Tamanho do Amplicon (pb)
GAPDH F GAPDH R	NM_001034034	CCGTTTCGACAGATAGCCGTAA CGACCTTCACCATCTTGTCTCA	83	69
BETA ACTINA F BETA ACTINA R	NM_173979	CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG AAGGGTGTAAACGCAGCTAACAGT	83	85
PGC1 α F PGC1 α R	NM_177945	TGTGCGCGTCACGTTCA TGAGCCTTTCGTGCTGGTACT	84	81
UCP2 F UCP2 R	NM_001033611	CTGCCTATACCCGCCTGTTC TGGTTGGTAGACGAAATATCTAATGG	80	73
UCP3 F UCP3 R	NM_174210	ACCACCTGCTCACCGACAA GCACAGAAGCCAGCTCCAA	84	64
TFAM F TFAM R	NM_001034016	TAGCCGGGTTGCAGTTTCC GGTGGGCGGGACTACGA	85	63

¹ Temperatura de desnaturação do *amplicon*

5.2. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para que os experimentos de qRT - PCR, que utilizam o fluoróforo *SYBR[®] Green*, ocorram com alta eficiência, é necessário realizar uma série de padronizações, e a primeira delas é a titulação dos oligonucleotídeos iniciadores, ou seja, realiza-se uma série de reações em que se varia a concentração dos iniciadores, o que possibilita a escolha da concentração mais adequada. Para isso, foram feitas diluições dos iniciadores (Tabela 3), que variaram entre as concentrações de 100 a 600 nanomolar (nM). Como molde da reação, foram utilizados 50 ng de *pool* de amostras de cDNA de tecido hepático mais tecido muscular, para cada par de iniciadores. Todas as reações foram feitas em triplicatas, com controles negativos para cada combinação de iniciadores, em placas ópticas de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico (Life Technologies, Foster, CA, USA).

Tabela 3: Variações das concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.

Iniciadores Reversos (nM)	Iniciadores Diretos (nM)			
		100	300	600
100		100/100	100/300	100/600
300		300/100	300/300	300/600
600		600/100	600/300	600/600

Todas as reações de qRT - PCR do presente trabalho foram realizadas em equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2009), utilizando *kit SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Este *kit* contém todos os componentes (exceto oligonucleotídeos iniciadores, amostras e água), necessários para as reações de PCR: tampão 2X, dNTPs, MgCl₂, *SYBR Green I Dye*, *AmpliTaq Gold[®] DNA polimerase* e *ROX* como referência passiva. O volume final das reações era de 12,5 µL e continham *SYBR Green Master Mix* 1x, 50 ng de cDNA, iniciadores variando as concentrações de acordo com a Tabela 3 e água ultrapura.

Os passos do ciclo de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos. Em todas as reações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação para que a especificidade das reações fosse monitorada.

Os dados gerados foram analisados com o programa *7500 software v 2.0.6* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2011).

5.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR

Após verificar a melhor concentração dos iniciadores a ser utilizada no experimento, foi realizada a construção de uma curva padrão para verificação da eficiência de amplificação da reação. A inclinação (*slope*) de uma curva padrão é usada para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. A curva padrão é obtida pela regressão linear do log do valor Ct (*threshold cycle*), que representa o ciclo de PCR no qual foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal, sobre o log da quantidade

inicial do ácido nucléico. Um coeficiente angular da curva padrão de $-3,32$ indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Os ângulos mais negativos que $-3,32$ (p. ex. $-3,9$) indicam reações com menos de 100% de eficiência. Os coeficientes angulares mais positivos que $-3,32$ (p. ex. $-2,5$) podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

São consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência sejam aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A eficiência da reação foi determinada a partir do coeficiente angular da curva padrão (TOO, 2003), através da seguinte equação:

$$E = (10^{-1/\text{ângulo}} - 1) \times 100$$

Além disso, foram considerados, o coeficiente de correlação (r^2), que deveria ser maior ou igual a 0,99, garantindo assim, pequena variação entre as replicas técnicas, e a especificidade, que foi definida pela curva de desnaturação (RIRIE et al., 1997). Para isso, foram utilizados *pools* de cDNA de amostras de tecido hepático e muscular, separadamente, em diluições seriadas na proporção de 5:1. Foram empregadas 7 diluições para que houvesse uma margem de segurança, já que a curva de diluição seriada deve ser calculada com um número final mínimo de 5 pontos. As reações foram realizadas em triplicatas no mesmo aparelho e sob as mesmas condições descritas no item 5.2. Foram utilizadas as melhores concentrações de iniciadores obtidas através das titulações previamente descritas. Em todos os casos, os controles negativos foram incluídos e, após o término das reações, foi obtido um relatório com as curvas de amplificação e de dissociação geradas pelo programa de análise *7500 software v 2.0.6* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2011).

5.4. Escolha do Gene de Referência

Os candidatos a genes de referência, inicialmente, foram escolhidos a partir da literatura. Posteriormente, através das reações de qRT – PCR realizadas sob as condições citadas no item 5.2, foi possível avaliar a estabilidade destes genes através dos programas *Genorm* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) e *Expression Suite Software v1.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2012). Com o programa *Genorm*, determinou-se a estabilidade dos genes de referência testados através de um fator de normalização, dado por um valor M, que mede a variação da expressão duas a duas de todas as possíveis combinações gênicas. Os valores de M são inversamente proporcionais à variação de expressão do gene avaliado e são considerados satisfatórios quando são menores que 1,5. (VANDESOMPELE, et al. 2002). Através do programa *Expression Suite Software v1.0* mensurou-se a estabilidade através do cálculo de um escore, definido pela comparação das médias dos genes de referências testados. Quanto menor o escore, mais estável o gene em relação aos outros genes testados. No mínimo 2 genes são necessários para o cálculo e quando existem apenas dois, o escore é o mesmo para ambos (EXPRESSION SUITE SOFTWARE HELP, 2012).

5.5. Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct)

Para o método do Ct comparativo foram utilizadas placas de 96 poços. As amplificações dos genes alvo e de referência foram realizadas em diferentes poços na mesma placa. Todas as reações foram feitas em triplicatas, e o cDNA dos 24 animais foram quantificados em relação aos 4 genes alvo, 2 de referência e nos 2 tecidos. A concentração de cDNA utilizada foi de 100 ng, e foi definida através da curva de eficiência de amplificação. Além disso, usou-se um controle negativo para cada um dos genes (alvo e referência) e um controle positivo, que garantia que as reações estavam ocorrendo de forma correta, já que continham amostras previamente testadas (amostras utilizadas na titulação dos oligonucleotídeos iniciadores). O equipamento utilizado e as condições da reação foram as mesmas já citadas no item 5.2.

Os dados obtidos ao final da reação de qRT - PCR foram gerados na forma de valores de Ct (*threshold cycle*), que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado, que foram analisados no programa *Expression Suite Software v1.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2012).

5.6. Análises estatísticas dos dados

Após a obtenção dos valores de Ct gerados para cada animal nos tecidos muscular e hepático em triplicatas, os dados foram analisados com o programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002).

Primeiro, foi feita a média geométrica dos dados de Ct gerados para os genes de referência Beta Actina e GAPDH, para cada amostra, para cada tecido e para cada gene alvo, como sugerido por Vandesompele et al. (2002). Segundo estes autores, a média geométrica é mais acurada que a média aritmética, comumente utilizada, pois controla valores discrepantes (*outlying*) entre os diferentes genes usados como referência. Para análise da expressão dos genes alvo (PGC1 α , TFAM, UCP2 ou UCP3) e das médias geométricas dos genes de referência (Beta Actina e GAPDH) em cada tecido, ajustou-se um modelo linear misto, proposto por Steibel et al. (2009), 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 $g^{\text{ésimo}}$ gene (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), no $r^{\text{ésimo}}$ poço da placa (referente à replica técnica), correspondente ao $k^{\text{ésimo}}$ animal e ao $i^{\text{ésimo}}$ tratamento. T_{ig} é o efeito do tratamento 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.

O modelo linear misto foi proposto para este tipo de estudo pois, é potencialmente mais flexível do que as alternativas existentes (MARINO, et al., 2003). Adicionalmente, o modelo permite a contabilidade de todas as fontes de variação. A principal vantagem deste modelo é que o mesmo pode ser usado para computar *P-values* válidos com várias hipóteses de interesse (STEIBEL et al., 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Concentração e integridade do RNA Total extraído

Após as extrações de RNA total, através da leitura em *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, foram verificadas as concentrações (ng/ μ L) e as relações que determinam a pureza das amostras obtidas. As concentrações, para tecido hepático, variaram de 550 a 2000 ng/ μ L, enquanto que para o tecido muscular, foram de 150 a 1000 ng/ μ L de RNA total. As relações 260/280 e 260/230, que determinam a pureza do RNA, tiveram suas razões por volta de 2, sendo portanto, consideradas satisfatórias.

Praticamente não ocorreram contaminações por DNA genômico. As quantificações das contaminações foram realizadas em equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* e os resultados revelaram que nas amostras de RNA total extraídas de tecido hepático, a contaminação média foi de 0,04% (mínimo 0,01% e máximo 0,20%), enquanto que para tecido muscular, esta média foi de 0,07% (mínimo 0,02% e máximo 0,14%).

Quanto à integridade do RNA total, como esperado, os picos referentes ao RNA ribossomal 18S e 28S puderam ser observados no eletroferograma gerado com o *Bioanalyser*. Além disso, as médias dos RINs (*RNA integrity number*) obtidos nas amostras estudadas ficaram em torno de 8 (mínimo 7,5 e máximo 8,8) (Figuras 6 e 7). Assim, confirmou-se que as amostras não estavam degradadas (todos os valores de RIN acima de 7) e poderiam ser utilizadas na técnica de qRT - PCR.

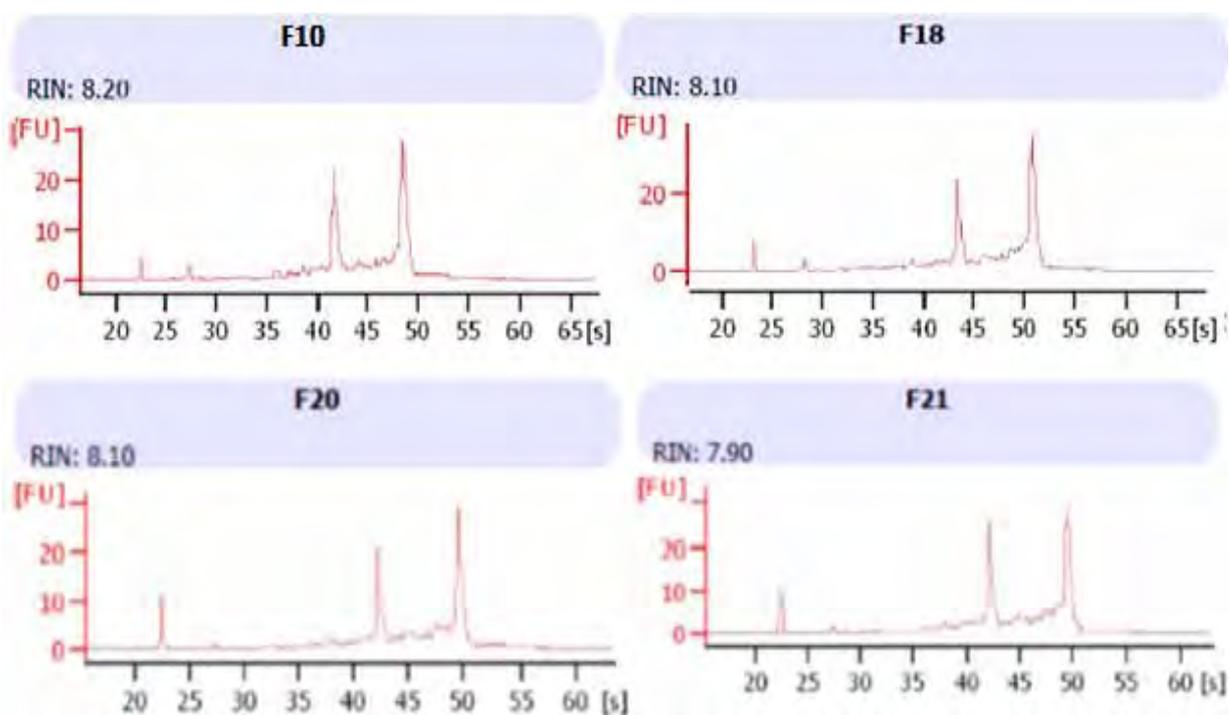


Figura 6: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas de tecido hepático.

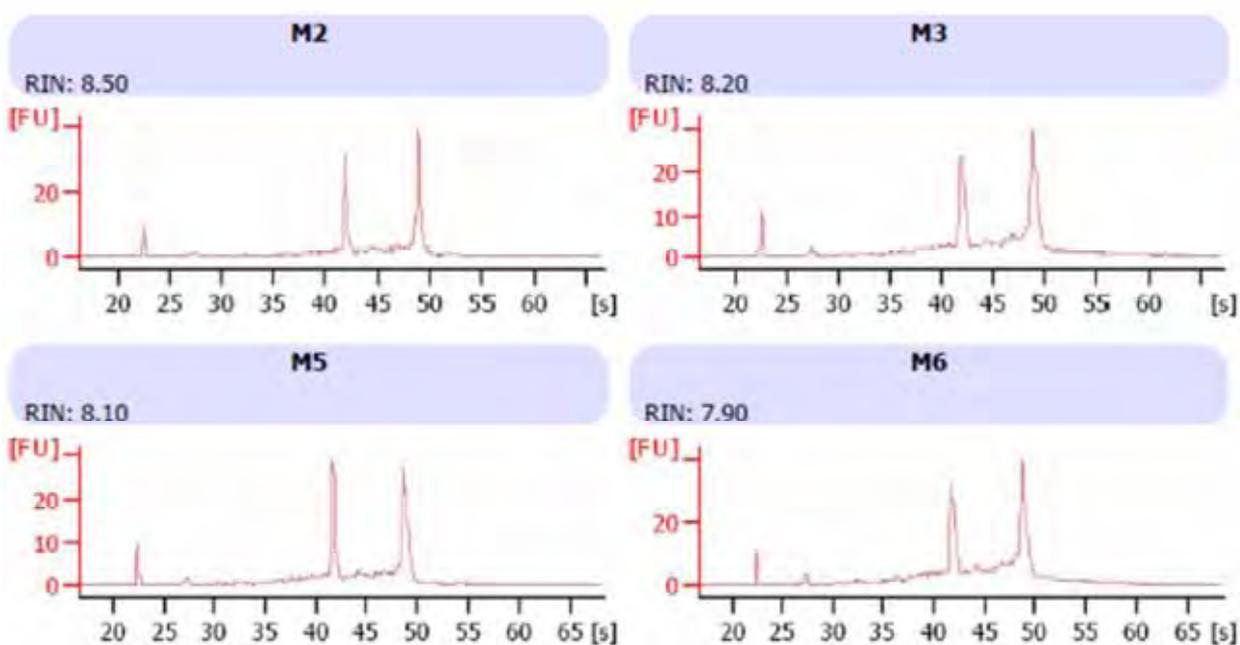


Figura 7: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas de tecido muscular.

2. PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

2.1. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Após as corridas das reações de titulação dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), os resultados foram verificados, e determinaram-se as concentrações dos iniciadores diretos (F) e reversos (R). Para os genes de referência, GAPDH e Beta Actina, e para os genes alvo, PGC1 α e UCP2, a concentração determinada foi de 100 nM para ambos os iniciadores (100/100). Para o TFAM, a melhor concentração, foi de 600 nM para os dois iniciadores (600/600), enquanto para o UCP3, a melhor escolha foi a concentração de 300 nM, também para ambos os iniciadores(300/300) (Figura 8).

Estas concentrações foram determinadas primeiramente, escolhendo as combinações de iniciadores de menor Ct. Então, foram analisadas as curvas de desnaturação (derivada negativa da taxa de fluorescência, $-Rn'$, em função da temperatura de desnaturação, °C). As curvas mostraram picos bem definidos referentes à amplificação dos genes estudados, próximo à temperatura de desnaturação estipulada no desenho dos iniciadores. A temperatura de desnaturação refere-se à temperatura em que 50% das moléculas encontram-se em fita simples e 50% em fita dupla. Verificou-se também ausência de dímeros e *hairpins*, ou seja, ocorreu apenas um pico bem definido referente ao gene alvo.

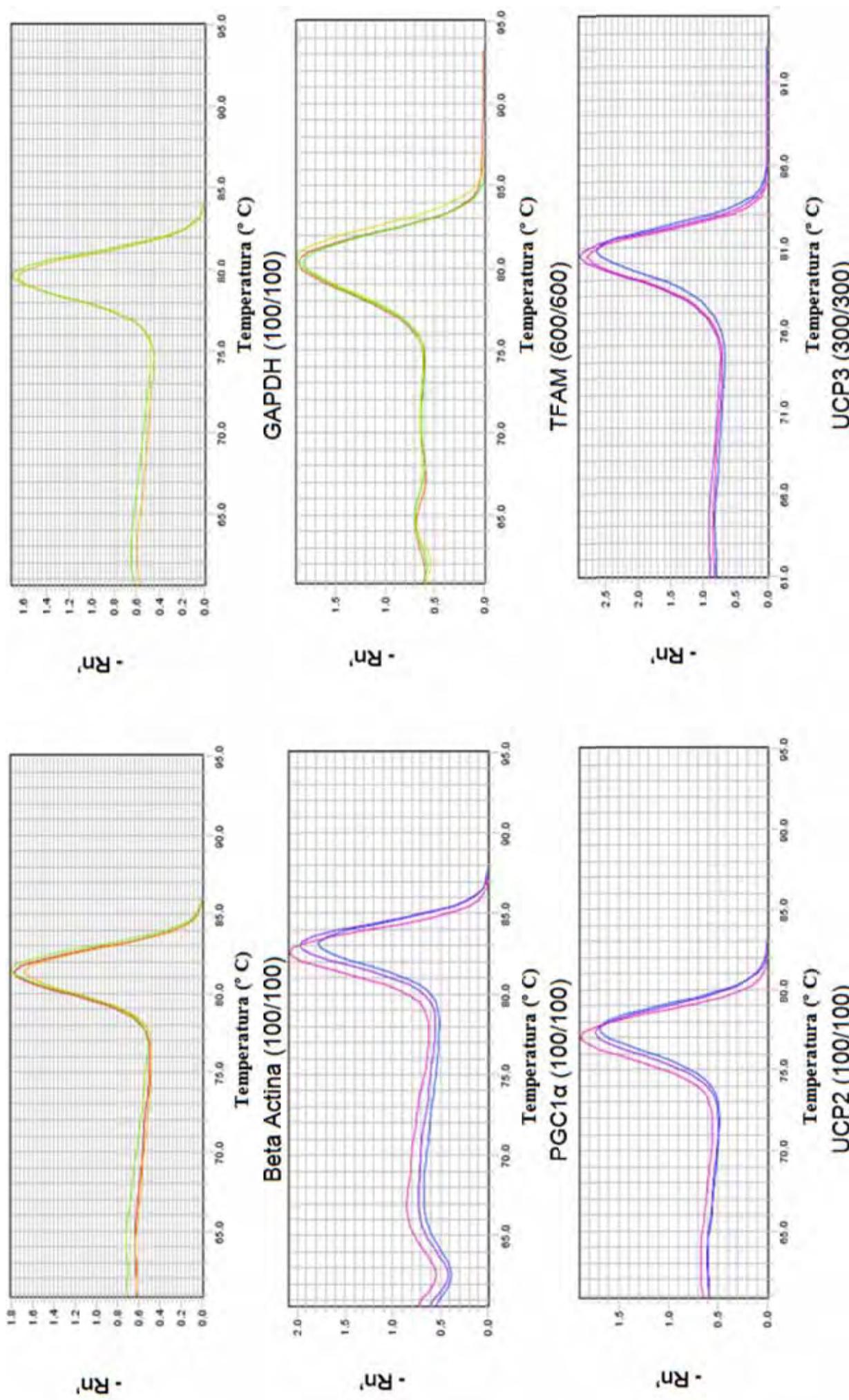


Figura 8: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de referência GAPDH e Beta Actina e para os genes alvo PGC1α, TFAM, UCP2 e UCP3. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores diretos e reversos (F/R).

2.2. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR

Para as amostras de tecido hepático, foram construídas as curvas padrão (Figura 9) para os genes de referência, GAPDH e Beta Actina, e para os genes alvo PGC1 α , TFAM e UCP2.

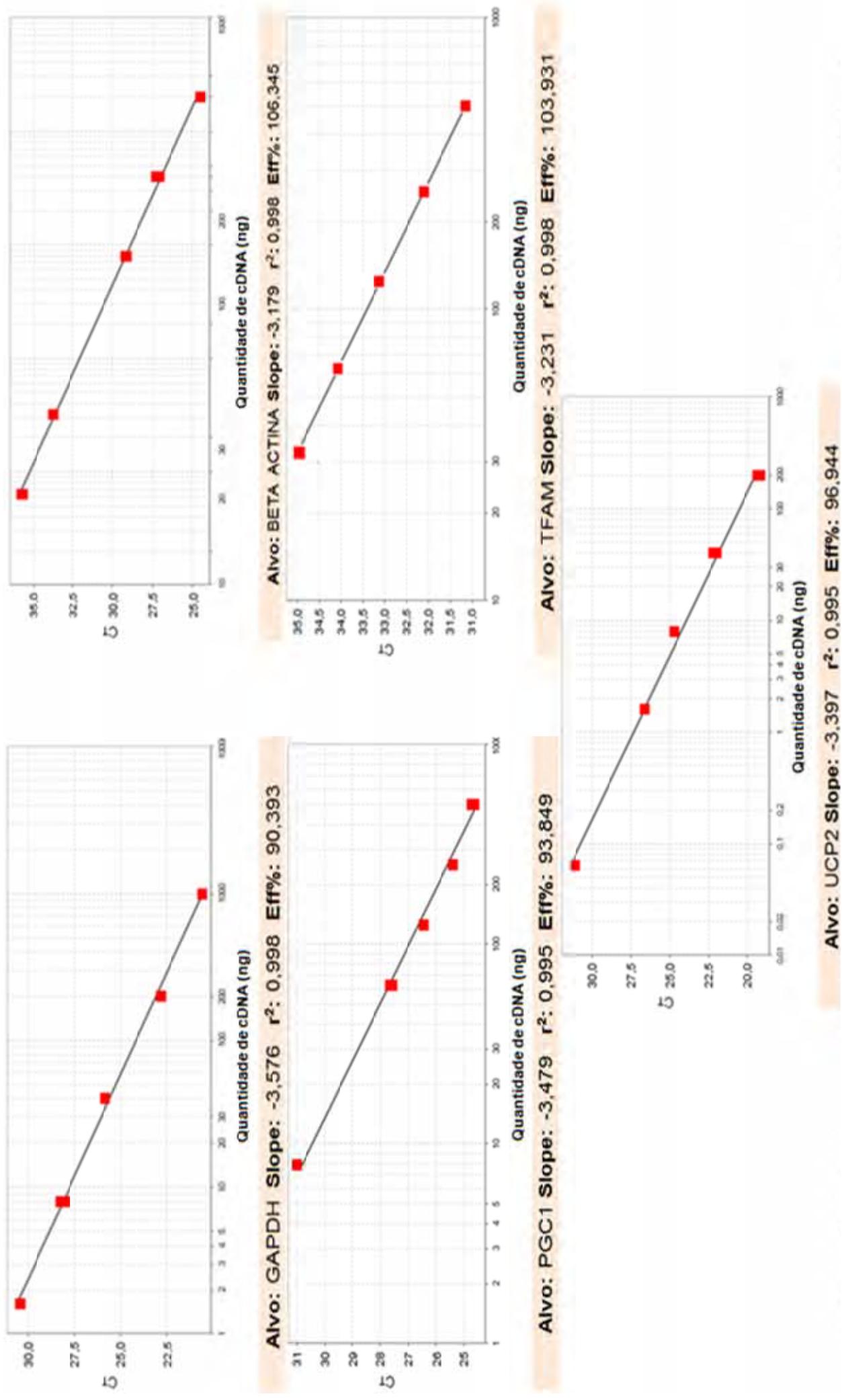


Figura 9: Curva Padrão, inclinação da reta (*slope*), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para o gene de referência GAPDH, Beta Actina, PGC1 α , TFAM e UCP2 em tecido hepático.

Para o gene UCP3, nas amostras de tecido hepático, não foi possível construir a curva padrão para o cálculo da eficiência de amplificação, pois o gene não foi expresso neste tecido, mesmo após a realização de várias reações, inclusive utilizando diluições seriadas mais concentradas (2:1).

A fim de confirmar que o gene UCP3 não foi expresso em tecido hepático nas amostras testadas, foi realizada uma reação com todas as 24 amostras do tecido em poços separados da placa de 96 poços, em triplicada, com controles negativos e positivos também em triplicatas. Os resultados deste teste confirmaram que o gene UCP3 não foi expresso no tecido hepático dos animais deste experimento. Chavin et al. (1999), em estudos com ratos, também não encontraram expressão do gene UCP3 em tecido hepático.

A UCP3 é expressa em níveis elevados no músculo esquelético e tecido adiposo marrom e, em menor escala, no coração, tecido adiposo branco e em alguns tipos específicos de neurônios (BOSS et al., 1997; VIDAL-PUIG et al., 1997; VINCENT et al., 2004). Lanni et al. (2002) e Silvestri et al. (2006), afirmaram que a UCP3 normalmente não é expressa em tecido hepático, no entanto, podem ocorrer altos níveis de expressão da UCP3 no fígado quando há uma alimentação rica em gordura. Este não foi o caso dos animais pertencentes ao presente experimento que receberam dieta balanceada a base de fibras, proteínas e carboidratos.

Para as amostras de tecido muscular, também foram construídas as curvas padrão (Figura 10) para os genes de referência GAPDH e Beta Actina e para os genes alvo PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3.

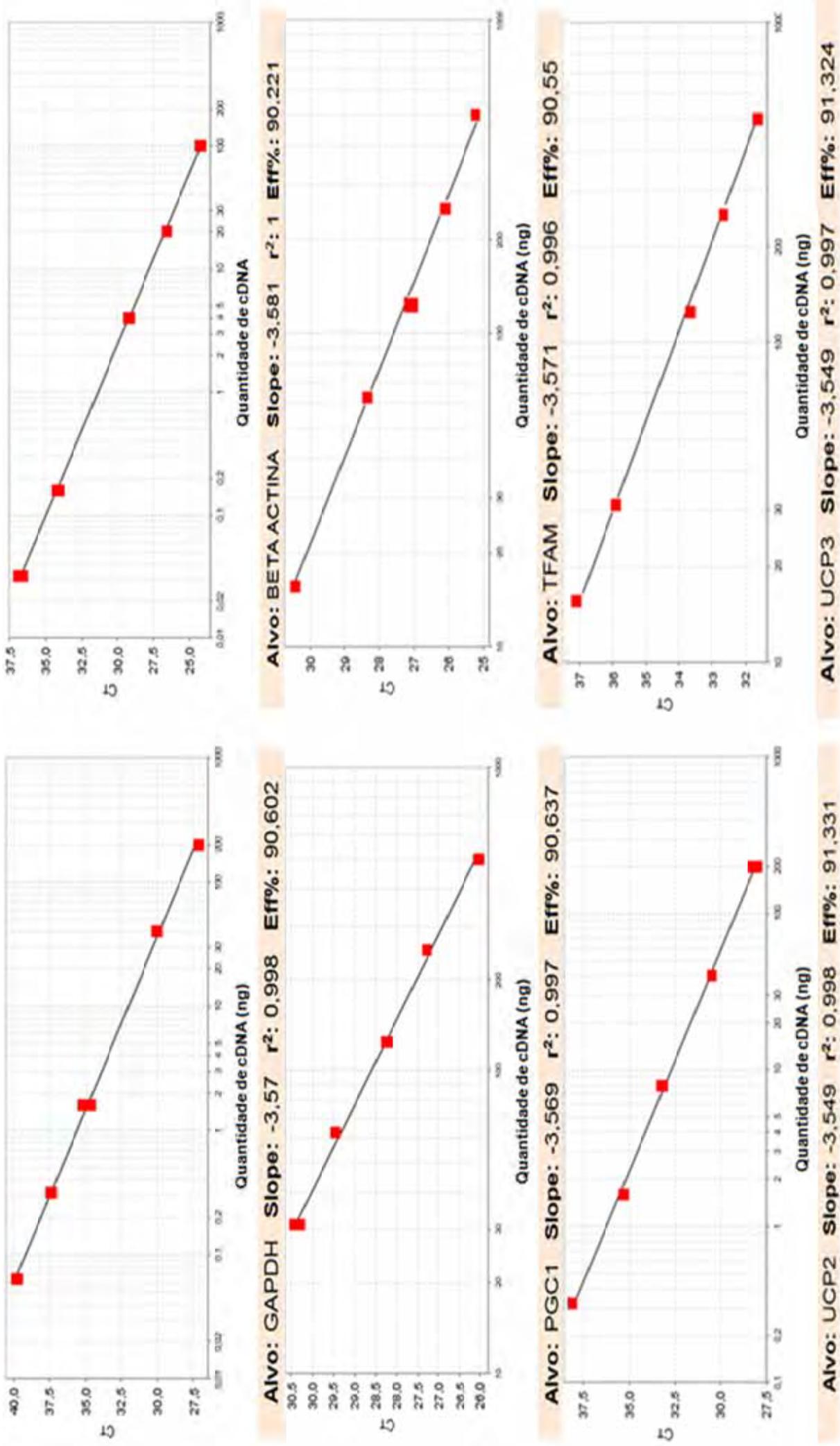


Figura 10: Curva Padrão, inclinação da reta (*slope*), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para o gene de referência GAPDH, Beta Actina, PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular.

Nesse experimento, foram consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação, calculadas através da inclinação da curva padrão (*slope*), do gene alvo e do gene de referência, foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação, 90 a 110% (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Diversos fatores influenciam a eficiência da amplificação, como qualidade da molécula alvo, sequência e concentração dos iniciadores e tamanho do *amplicon* (fragmentos menores, de até 150 pb, geralmente geram eficiências maiores). Os coeficientes r^2 apresentaram valores maiores que 0,99, garantindo assim, pequena variação entre as replicatas técnicas.

Quando a eficiência dos genes está dentro de um limiar aceitável, utiliza-se o método do Ct comparativo. No entanto, se as eficiências não são satisfatórias, lança-se mão do método da Curva Padrão para Quantificação Relativa. Independente do método a ser seguido, em um experimento de quantificação relativa por qRT - PCR, a expressão de um gene de interesse em uma dada amostra é o mesmo (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). No presente trabalho, todos os genes obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites estabelecidos, então, a quantificação relativa dos genes alvo em tecido hepático e muscular puderam seguir pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct).

2.3. Escolha dos Genes de Referência

Os resultados das análises da estabilidade dos genes de referência GAPDH e Beta Actina, obtidos nos programas *GeNorm* e *Expression Suite Software* (Tabela 4) mostraram que os dois genes testados foram adequados para normalização da expressão gênica dos genes alvo com eficácia, uma vez que os valores de M e escores obtidos foram menores que 1,5 (VANDESOMPELE et al., 2002).

Tabela 4: Estabilidade dos genes de referência testados através dos programas *GeNorm* (valores de M) e *Expression Suite* (escores).

	Tecido Hepático	Tecido Muscular
<i>GeNorm</i>	0,190	0,075
<i>Expression Suite</i>	0,055	0,317

2.4. Análise estatística da expressão de genes ligados a Função Mitochondrial em animais selecionados para Consumo Alimentar Residual

A partir do cDNA sintetizado, realizaram-se as reações de PCR quantitativo em tempo real, nas quais foram obtidos os valores de Ct (*threshold cycle*), que representa o número de ciclos de PCR no qual foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal.

Em tecido hepático, os níveis de expressão dos genes TFAM e UCP2 foram significativamente diferentes entre os grupos (CAR positivo e negativo – Tabela 5).

Tabela 5: 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%.

É importante ressaltar que quanto menor o Ct, maior é a expressão do gene, pois mais rapidamente foi detectado o RNA mensageiro do gene estudado. Portanto, quanto maior o Ct, menos expresso é o gene.

Quanto à expressão relativa dos genes em tecido hepático (Figura 11), a expressão do gene TFAM foi 1,9 vezes maior em animais CAR negativo (mais eficientes) quando comparada a expressão em animais CAR positivo. O gene UCP2 teve expressão 1,74 vezes maior em animais CAR negativo em relação animais CAR positivo.

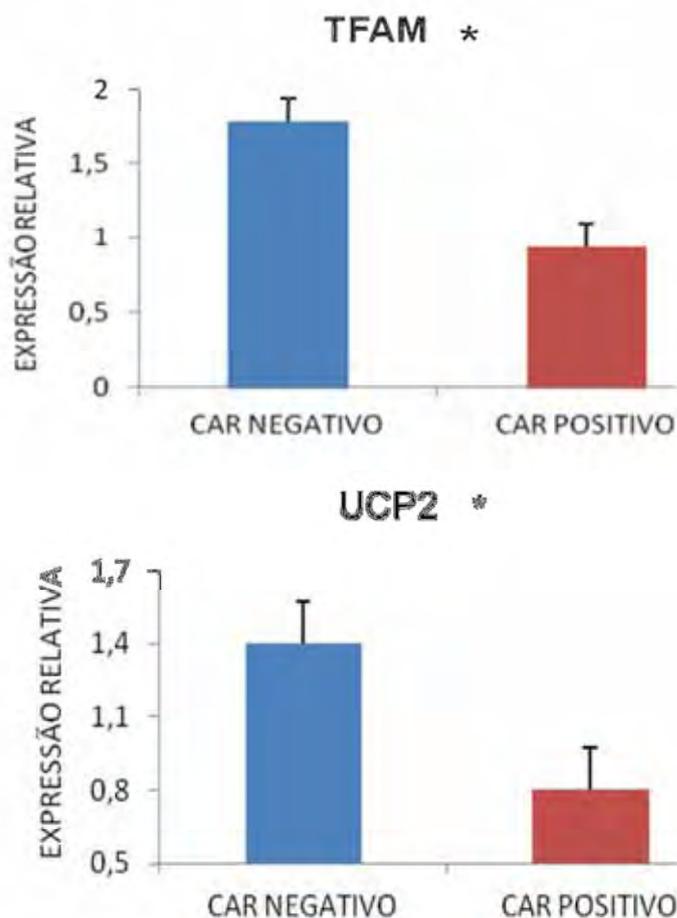


Figura 11: Expressão relativa dos genes alvo TFAM e UCP2 em tecido hepático de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo (*: significativo ao nível de 5%).

Em tecido muscular, somente os níveis de expressão do gene TFAM foram significativamente diferentes entre os grupos (CAR positivo e negativo – Tabela 6).

Tabela 6: Expressão dos genes PGC1 α , TFAM, UCP2 e UCP3 em tecido muscular de animais com consumo residual alimentar positivo e negativo.

GENE	CAR	CT MÉDIO	ERRO PADRÃO	P-VALUE (GxC) ¹
PGC1 α	NEGATIVO	24,08	0,26	0,2846 ^{ns}
	POSITIVO	24,35	0,26	
TFAM	NEGATIVO	32,44	0,21	0,0018*
	POSITIVO	31,66	0,21	
UCP2	NEGATIVO	25,41	0,14	0,4124 ^{ns}
	POSITIVO	25,54	0,14	
UCP3	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%.

Em tecido muscular (Figura 12), a expressão do gene TFAM, foi 1,72 vezes maior em animais CAR positivo quando comparado a animais CAR negativo.

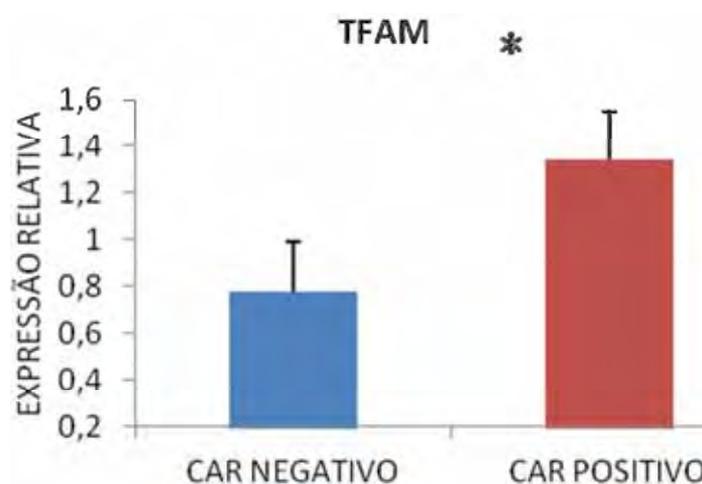


Figura 12: Expressão relativa do gene alvo TFAM em tecido muscular de animais com consumo alimentar residual positivo e negativo (*: significativo ao nível de 5%).

As UCPs são proteínas encontradas na membrana interna da mitocôndria e exercem várias funções, entre elas, controle da síntese de ATP, da produção de oxigênio reativo e regulação do metabolismo de ácidos graxos (LEDESMA et al., 2002 e ECHTAY, 2007). No presente trabalho, em tecido

muscular, 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 (2006²) 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*) 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). Em frangos de corte, Ojano-Dirain et al. (2007) também encontraram uma tendência de maior expressão do gene avUCP (proteína desacopladora aviária – 70 e 71% de homologia com UCP2 e 3 respectivamente) em tecido muscular peitoral de animais de baixa eficiência alimentar.

Em tecido hepático, houve uma maior expressão do gene UCP2 em animais CAR negativo (mais eficientes). Dentre as funções da UCP2, está a diminuição da produção da ATP, o que leva a um aumento no requerimento energético e produção de calor (MILLET et al., 1997; HARROLD et al., 2000). Desta forma, esse resultado não seria esperado, já que segundo Basarab² et al. (2003), animais mais eficientes apresentam menor consumo de energia metabolizável, menor retenção de energia e produzem menos calor que animais menos eficientes. Entretanto, estes autores avaliaram o desempenho dos animais, mas não verificaram o que acontece especificamente no tecido hepático. Referências na literatura em relação à expressão deste gene no fígado não foram encontradas.

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), e, ao contrário, em tecido hepático, houve maior expressão do gene TFAM 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 músculo *Longissimus dorsi*, em animais com alto e baixo CAR (*Limousin x Friesian*).

A produção de energia através da fosforilação oxidativa requer coordenação da ação dos genes envolvidos nesse processo, e um dos principais reguladores é o co-ativador PGC1 α , que é essencial para garantir que a capacidade oxidativa seja ajustada de acordo com as necessidades energéticas das células (GOFART et al., 2003 e HOCK, et al., 2009). No músculo, o PGC1 α induz o desacoplamento da proteína UCP2, gerando calor (KNUTTI et al., 2001). Neste experimento, não houve diferenças significativas nos níveis de expressão do gene PGC1 α entre animais CAR positivo e negativo em nenhum dos tecidos estudados (muscular e hepático). Estes resultados são semelhantes aos descritos por Ojano-Dirain et al. (2007), utilizando duodeno e músculo peitoral de frangos de corte, que não encontraram diferenças entre a expressão desse gene em animais de alta e baixa eficiência alimentar. Da mesma forma, Bottje e Carstens (2009), estudando a expressão da proteína PGC1 α utilizando a técnica *Western blot*, não observaram expressão diferencial desta proteína em tecido muscular de frangos de corte de alta e baixa eficiências. Entretanto, os autores encontraram maior quantidade da mesma no fígado de frangos de baixa eficiência.

O resultado obtido no presente estudo, no tecido muscular, foi consistente com o observado para as UCPs, pois o PGC1 α ajusta a expressão das UCPs, que também não tiveram resposta significativa aos tratamentos neste tecido. Entretanto, em tecido hepático, o gene UCP2 apresentou diferenças significativas nos níveis de expressão. Esta inconsistência também foi observada em relação ao TFAM. O PGC1 α é um regulador do gene TFAM, e este apresentou níveis de expressão significativamente diferentes entre os tratamentos. Kelly et al., (2011), também observaram inconsistências em relação a estes mesmos genes. Apesar de estes autores terem encontrado diferenças significativas na expressão do gene PGC1 α em tecido muscular (*Longissimus dorsi*) de bovinos de origem europeia, em animais de alto e baixo CAR, não encontraram diferenças significativas entre os genes UCP2 e TFAM nos mesmos grupos de animais.

As associações aparentemente contraditórias revelam que são necessários mais estudos para que se possa utilizar estes genes na seleção assistida para o consumo alimentar residual.

CONCLUSÃO

Foram encontradas diferenças nos níveis de expressão dos genes UCP2 (tecido hepático) e TFAM (tecido hepático e muscular) em animais extremos para consumo alimentar residual. Estes resultados indicam que estes genes são possíveis candidatos a serem utilizados como marcadores em programas de melhoramento, visando o aumento da eficiência alimentar em bovinos Nelore.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNB, **Associação dos Criadores de Nelore do Brasil**. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca/Historico>>. Acessado em 30 de janeiro de 2012.

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 215 – 233, 2002.

ALAM, T. I.; KANKI, T.; MUTA, T.; UKAJI, K.; ABE, Y.; NAKAYAMA, H.; TAKIO, K.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. **Nucleic Acids Research**, n.31, p. 1640–1645, 2003.

ALMEIDA, A. P.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.34, n.3, p.133-148, 2010.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5350–5354, 1977.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; PARKER, B. A.; REISER, J.; RENART, J.; STARK, G. R.; WAHL, G. M. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. **Methods in Enzymology**, v. 68, p. 220–242, 1979.

¹BASARAB, J.A. Latest indicator of feed efficiency could spur new generation of efficient cattle. Animal Science newsletter, Flórida, 2003. Disponível em <http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/UF/00/06/73/34/00047/00001.pdf>. Acessado em: 11 de março de 2013.

²BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E.K.; SNELLING, W.M.; LYLE, K.L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **The Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p.189-204, 2003.

BOSCHINI, R.; GARCIA JÚNIOR, J.R. Regulação da expressão gênica das UCP-2 e UCP-3 pela restrição energética, jejum e exercício físico. **Revista de nutrição**, p.753-764, 2005.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; SULLO, A.; SEYDOUX, V. Uncoupling protein 3 (UCP3): a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Letters**, n. 408, v. 1, p. 39-42, 1997.

BOTTJE, W.; TANG, Z.X.; IQBAL, M.; CAWTHON, D.; OKIMOTO, R.; WING, T.; COOPER, M. Association of Mitochondrial Function with Feed Efficiency within a Single Genetic Line of Male Broilers. **Poultry Science**, v.81, p. 546-555, 2002.

BOTTJE, W.; PUMFORD, N.R.; DIRAIN, C.O.; IQBAL, M.; LASSITER, K. Feed Efficiency And Mitochondrial Function. **Poultry Science**, v.85, p. 8-14, 2006.

BOTTJE, W.; CARSTENS, G. E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**, n. 87, 2009.

BRANCO, R. H.; BONILHA, S. F. M.; RAZOOK, A. G.; CORVINO, T. L. S.; NETO, A, P.; FIGUEIREDO, L. A. Consumo alimentar residual de machos Nelore selecionados para peso pós-desmame. In: 46^º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2009, Maringá, SP.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, p. 155–166, 2004.

CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B.; BERNARD, C.; HOCQUETTE, J. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 701–710, 2008.

CHAVIN, K. D.; YANG, S.; LIN, H. Z.; VADAPPURAM, J. C.; CHACKO, P.; HOEKI, J.B.; WALAJTYS-RODEI, E.; RASHID, A.; CHEN, C.H.; HUANG, C. C.; WU, T.C.; LANE, M. D.; DIEHL, A. M. Obesity Induces Expression of Uncoupling Protein-2 in Hepatocytes and Promotes Liver ATP Depletion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5692–5700, 1999.

CHEN, Y.; GONDRO, C.; QUINN, K.; HERD, R. M.; PARNELL, P. F.; VANSELOW, B. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. **Animal Genetics**, v. 42, p. 475–490, 2011.

CLAYTON, D.A. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, n.7, p. 453-478, 1991.

CLOSE, T. J.; WANAMAKER, S.; CALDO, R. A.; TURNER, S. M.; ASHLOCK, D. A.; DICKERSON, J. A.; WING, R. A.; MUEHLBAUER, G. J.; KLEINHOF, A.; WISE, R. P. A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. **Plant Physiology**, v. 134, p. 960–968, 2004.

CORVINO, T. L. S.; BRANCO, R. H.; BONILHA, S. F. M.; RAZOOK, A. G.; NETO, A, P.; CASTILHOS, A. M.; FIGUEIREDO, L. A. Consumo alimentar residual e reatividade de bovinos Nelore. In: 46^o REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2009, Maringá, SP.

DEL CLARO, A. C.; MERCADANTE, M. E. Z.; SILVA, J. A. II V. Meta-análise de parâmetros genéticos relacionados ao consumo alimentar residual e a suas características componentes em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 302-310, Brasília, 2012.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? **Free Radical Biology and Medicine**, n. 43, p.1351–1371, 2007.

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.

EUCLIDES FILHO, K.; FIGUEIREDO, G. R.; EUCLIDES, V.P.B.; SILVA, L.O.C.; CUSINATO, V.Q. Eficiência bionutricional de animais da raça Nelore seus mestiços com Caracu, Angus e Simental. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n.1, p.331-334, 2002.

EXPRESSION SUITE SOFTWARE HELP; Expression Suite Software Version v.1.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, 2012. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/forms/expressionsuite-software-registration.html>>. Acessado em 12 de maio de 2012.

FISHER, R. P. & CLAYTON, D. A. "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. **Molecular Cell Biology**, n.8, v.8, p.3496-3509, 1988.

FALKENBERG, M.; GASPARI, M.; RANTANEN, A.; TRIFUNOVIC, A.; LARSSON, N.G.; GUSTAFSSON, C.M. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. **Nature Genetics**, v.31, p.289–294, 2002.

FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; LEVI-MEYRUEIS.; C. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, n.15, v.3, p.269-272, 1997.

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.

GIACHETTO, P. F. A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura. Embrapa Informática Agropecuária Campinas, SP, 2010. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/885253/1/doc111.pdf>. Acessado em 14 de fevereiro de 2013.

GOFFART, S.; WIESNER, R. J. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. **Experimental Physiology**, v. 88, p. 33–40, 2003.

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.

HESSELINK, M. K. C.; MENSINK, M.; SCHRAUWEN, P. Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. **Obesity Research**; v. 11, n. 12, p: 1429-1443, 2003.

HOCK, M. B.; KRALLI, A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p.177–203, 2009.

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.

KANKI, T.; NAKAYAMA, H.; SASAKI, N.; TAKIO, K.; ALAM, T.I.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Mitochondrial nucleoid and transcription factor A, **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1011, p. 61–68, 2004.

KOCH, R.M.; SWINGER, L.A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K.E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 22, p.486-494, 1963.

KNUTTI, D.; KRALLI, A. PGC-1, a versatile coactivator. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, n. 8, v.12, 2001.

¹ KOLATH, W. H.; KERLEY, M. S.; GOLDEN, J. W.; KEISLER, D.H. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. **Journal of Animal Science**, n. 84, p. 861 - 865, 2006.

² 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.

LANNA, D. P. D.; CALEGARI, L.; ALMEIDA, R.; BERNDT, A. Conversão Alimentar – Eficiência econômica da vacas de corte de raças puras e cruzadas. In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA DE CORTE, Lavras, v.3, p. 87-110, 2003.

LANNI, A.; MANCINI, F.; SABATINO, L.; SILVESTRI, E.; FRANCO, R.; DE ROSA, G.; GOGLIA, F.; COLANTUONI, V. De novo expression of uncoupling protein 3 is associated to enhanced mitochondrial thioesterase-1 expression and fatty acid metabolism in liver of fenofibrate-treated rats. **FEBS Letters**, v. 525, p. 7-12, 2002.

LEDESMA, A.; LACOBIA, M. G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biology**, 2002.

LEDUR, M. C. O uso de marcadores moleculares na produção de aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 38., 2001, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, p. 620-633, 2001.

LIFE TECHNOLOGIES, Real Time Handbook, Foster, 2012. Disponível em: <https://lifetech.postclickmarketing.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf>. Acessado em: 9 de dezembro de 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MA, H.; SHIEH, K.-J.; CHEN, G.; QIAO, T.; CHUANG, M. Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v. 2, p. 1-15, 2006.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J.F.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), **Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization**. Press Norfolk, UK, 2007.

MARINO, J.H.; COOK, P.; MILLER, K.S. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR, J.; **Journal of Immunological Methods**, v. 283, p.291–306, 2003.

MEI, R.; HUBBELL, E.; BEKIRANOV, S.; MITTMANN, M.; CHRISTIANS, F. C.; SHEN, M. M.; LU, G.; FANG, J.; LIU, W. M.; RYDER, T. Probe selection for high-density oligonucleotide arrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11237-11242, 2003.

MILLET, L.; VIDAL; H.; ANDRIELLI, F.; LARROUY, D.; RION, J. P.; RICQUIER, D. Increased uncoupling protein-2 and-3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, n.11, p. 2665-2670, 1997.

NISOLI, E.; CLEMENTI, E.; PAOLUCCI, C.; COZZI, V.; TONELLO, C.; CIORATI, C.; BRACALE, R.; VALERIO, A.; FRANCOLINI, M.; MONCADA, S.; CARRUBA, M. O. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitricoxide. **Science**, v. 299, p. 896–899, 2003.

NORDFORS, L.; HOFFSTEDT, J.; NYBERG, B.; THOME, A.; ARNER, P.; SCHALLING, M. Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects. **Diabetologia**, v.41, n.8, p. 935 – 939, 1998.

OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T.; COOPER, M.; BOTTJE, W.G. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p. 372–381, 2007.

OHGAKI, K.; KANKI, T.; FUKUOH, A.; KURISAKI, H.; AOKI, Y.; IKEUCHI, M.; KIM, S. H.; HAMASAKI, N.; KANG, D. The C-terminal tail of mitochondrial transcription factor a markedly strengthens its general binding to DNA. **J. Biochemistry**, n.141, p.201–211, 2007.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M.D.; YOUNG, M.D. From RNA-Seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, n. 220, 2010.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, 332 p, 2008.

PUIGSERVER, P.; ADELMANT, G.; WU, Z.; FAN, M.; XU, J.; O'MALLEY, B.; SPIEGELMAN, B.M. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. **Science**, v. 286, p. 1368 – 1371, 1999.

RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Ganhos de produtividade com o uso de touros provados. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. **Requisitos de qualidade na bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, p.93-114, 2007.

REUNOL, F. Criações mais eficientes, Agência FAPESP, Especial. Disponível em:<<http://www.agencia.fapesp.br/materia/11704/especiais/criacoes-mais-eficientes>>. Acessado em 5 de julho de 2010.

RIBEIRO, F. R. B. Consumo alimentar residual e eficiência alimentar em bovinos de corte, **Casa Branca Press**, ano 5, n. 9, p. 8 -11, 2010.

RICQUIER, D.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD. F. Molecular studies of the uncoupling protein. **The FASEB Journal**, v.5, p. 2237-2242, 1991.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **The Journal of Physiology**, n.529, p.3-10, 2000.

RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.154–160, 1997.

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.

SPENCER, A. C. RNA-seq Reveals Differential Gene Expression in the Liver between Broiler Chickens with High and Low Feed Efficiencies. Plant and Animal Genome XXI, San Diego, 2013. Disponível em: <https://pag.confex.com/pag/xxi/webprogram/Paper5644.html>. Acessado em 10 de março de 2013.

SPIEGELMAN, B.M.; HEINRICH, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. **Cell**, n. 119, n.2, p. 157-167, 2004.

STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, J.M.G. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, n.94, p. 146–152, 2009.

STONE, R. T.; REXROAD, C. E.; SMITH, T. P. L. Bovine UCP2 and UCP3 map to BTA15. **Animal Genetics**, v.30, p. 378–381, 1999.

TAKAMATSU, C.; UMEDA, S.; OHSATO, T.; OHNO, T., ABE, Y.; FUKUOH, A.; SHINAGAWA, H.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA binding protein. **EMBO reports**, n.3, p.451– 456, 2002.

THOMPSON, M. P.; KIM, D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. **FEBS Letters**, n. 568, p. 4–9, 2004.

TOO, H.P. Real time PCR quantification of GFRa-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, v.114, p.146–153, 2003.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O. Mitochondrial uncoupling proteins 3 (UCP3) in skeletal muscle. **Frontiers in Bioscience**, n.1, v.6, p.570-574, 2001

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 2002.

VIDAL-PUIG, A.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J. S.; LOWELL, B.B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.235, n.1, p.79 -82, 1997.

VINCENT, A. M.; OLZMANN, J. A.; BROWNLEE, M.; SIVITZ, W. I.; RUSSELL, J. W. Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. **Diabetes**, v. 53, p. 726-734, 2004.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**. Advance Online Publication, 2008.

WEIKARD, R.; KUHN, C.; GOLDAMMER, T.; FREYER, G.; SCHWERIN, M. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, v. 21, p.1–13, 2005;

WONG, M.L.; MEDRANO, J. RealTime PCR for mRNA quantification. **Biotechniques**, v. 39, p. 75 - 85, 2005.

ZULKIFLI, N.A.; NAIK, M.; PITCHFORD, W.S.; BOTTEMA, C.D.K.; Cattle Residual Feed Intake Candidate Genes. **The Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics**, v. 18, p. 668-671, 2007.