

DANIELLE SERRA DE LIMA MORAES

**NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *FABP3* E
FABP4 E CONTEÚDO DE GORDURA
INTRAMUSCULAR EM SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M827n
2006

Moraes, Danielle Serra de Lima, 1970-

Níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* e conteúdo de gordura intramuscular em suínos / Danielle Serra de Lima Moraes. – Viçosa : UFV, 2006. x, 58f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Paulo Sávio Lopes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-52.

1. Suíno - Genética molecular. 2. Regulação de expressão gênica. 3. Gordura. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.40821

DANIELLE SERRA DE LIMA MORAES

**NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *FABP3* E
FABP4 E CONTEÚDO DE GORDURA
INTRAMUSCULAR EM SUÍNOS**

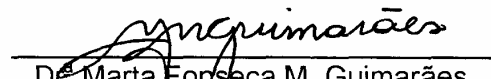
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 17 de fevereiro de 2006.


Prof. Lúcio Alberto de M. Gomide
(Conselheiro)


Prof. Robledo de Almeida Torres


Prof. Ricardo Frederico Euclides


Dr. Marta Fonseca M. Guimarães


Prof. Paulo Sávio Lopes
(Orientador)

À minha família, estímulo maior para todas as minhas batalhas e objetivo único de todas as minhas vitórias.

"...Quem não acende o fogo temendo queimar-se com as chamas sentirá frio e não poderá usufruir dos benefícios da luz.... Porque tudo que vale a pena, exige sacrifícios."

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante em cada um de nós.

À Nossa Senhora Aparecida, pelo auxílio de todas as horas.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo investimento na minha capacitação.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o Programa de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Applied-Biosystem, pelo empréstimo do equipamento ABI Prism 7000, que possibilitou as análises biomoleculares do experimento.

Ao meu orientador, professor Paulo Sávio Lopes, pelo incentivo, pela disponibilidade, pelas orientações, pelo comprometimento e pela amizade.

À minha conselheira, professora Simone Eliza Facioni Guimarães, pelas orientações e pelos ensinamentos em genética molecular.

Ao meu conselheiro, professor Lúcio Alberto de Miranda Gomide, pelas orientações e valiosas sugestões.

Ao professor Robledo de Almeida Torres, pelas sugestões, pelo incentivo e pela amizade.

Ao professor Ricardo Frederico Euclides, pela participação como membro da minha banca examinadora e por sua simpatia e descontração.

À Dr^a Marta Fonseca Martins Guimarães, pela participação como membro da minha banca e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Juarez Donzele, pela atenção e boa vontade no esclarecimento das dúvidas decorrentes do desenvolvimento desta tese.

A todos os funcionários da UFV com os quais convivi, principalmente Adilson, Zé Geraldo e Mário, pelo apoio recebido.

Aos amigos Guilherme, Paulinha, Jane, Peloso e Carlos, pelo carinho e pela ajuda nos abates e nas atividades de laboratório.

Ao colega Leandro Barbosa, pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Aos queridos colegas Fred, Kécya, Alex, Kleibe e Danielle, pelos momentos de luta e de descontração.

A todos os demais professores e colegas da UFV, pela participação na minha formação profissional e no meu aprimoramento pessoal.

A todos os amigos que fiz em Viçosa e que me proporcionaram a sensação de estar “em casa”.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro e minha maior escola.

Aos meus irmãos, pela amizade e disponibilidade.

Em especial, aos meus grandes amores: Sidnei, Victória, Cássia e Vinícius, por serem a razão da minha vida.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Qualidade da carne suína	4
3.2. Técnicas de genética molecular em animais de produção	5
3.2.1. O uso de marcadores moleculares.....	5
3.2.2. O genoma suíno, QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>) e genes candidatos.....	8
3.3. Detecção de marcadores moleculares por meio de PCR quantitativa	11
3.4 Genes <i>FABP3</i> e <i>FABP4</i>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Locais de realização do experimento	22

	Página
4.2. Abate dos animais e coleta de material biológico.....	22
4.3. Análise quantitativa do conteúdo de gordura intramuscular	24
4.4. Confeção dos sistemas de PCR em tempo real.....	24
4.5. Extração do RNA total.....	25
4.6. Tratamento com DNase	26
4.7. Amplificação, detecção e quantificação do cDNA	26
4.7.1. Ciclagem	27
4.8. Análise estatística dos dados.....	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Expressões relativas dos genes <i>FABP3</i> e <i>FABP4</i> , conteúdo de gordura intramuscular e peso corporal de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau)	31
5.2. Análises estatísticas	34
5.2.1. Suínos comerciais	34
5.2.2. Suínos nativos brasileiros (Piau)	35
5.2.3. Suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau)	36
5.2.4. Análise de correlação	38
6. DISCUSSÃO.....	39
6.1. Análise de correlação	43
7. CONCLUSÕES	45
8. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE	53
APÊNDICE A	54

RESUMO

MORAES, Danielle Serra de Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. *Níveis de expressão dos genes FABP3 e FABP4 e conteúdo de gordura intramuscular em suínos*. Orientador: Paulo Sávio Lopes. Conselheiros: Simone Eliza Facioni Guimarães e Lúcio Alberto de Miranda Gomide

Os genes *FABP3* (*heart fatty acid-binding protein gene* – gene da proteína de ligação a ácidos graxos do coração) e *FABP4* (*adipocyte fatty acid-binding protein gene* – gene da proteína de ligação a ácidos graxos do tecido adiposo) têm sido indicados como candidatos à deposição de gordura intramuscular em suínos. O presente trabalho objetivou analisar os níveis de expressão desses genes nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semimembranosus* (SM) de suínos machos castrados e fêmeas comerciais (Landrace X Large White X Pietrain) e nativos brasileiros (raça Piau), em diferentes idades. Visou também avaliar a correlação entre esses níveis de expressão e os percentuais obtidos de gordura intramuscular nas mesmas amostras. Foram utilizadas 18 amostras de animais pertencentes aos dois grupos genéticos divergentes, sendo 12 de suínos comerciais com idades de 1, 21, 60, 90, 120 e 180 dias e 6 de suínos nativos brasileiros (raça Piau) com idades de 1, 90 e 180 dias. As amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* desses animais foram retiradas imediatamente após o abate, congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas

a -70 °C. Foram também utilizadas 18 amostras para obtenção dos percentuais de gordura intramuscular. O RNA total das amostras foi extraído e a expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* foi analisada por meio de PCR em tempo real, usando a tecnologia Taqman™. Foi empregado o método de quantificação relativo (comparativo). Os resultados dos níveis de expressão gênica e do conteúdo de gordura intramuscular foram submetidos a análises estatísticas, utilizando um modelo contendo os efeitos de grupo genético, sexo e idade dos animais. Não houve efeito significativo de grupo genético e sexo nos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*. Foi verificado efeito significativo de idade, a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, sobre a expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* em suínos comerciais, tendo a média obtida ao nascimento diferido significativamente das demais. Houve efeito significativo de sexo e idade sobre o conteúdo de gordura intramuscular do músculo *Longissimus dorsi*, mas não do músculo *Semimembranosus*, de suínos comerciais. Contrariando as expectativas, não foi verificada diferença significativa entre suínos nativos e comerciais quanto ao teor de gordura intramuscular. Em ambos os grupos genéticos foi encontrada correlação significativa entre os genes *FABP3* e *FABP4*, mas as correlações obtidas entre esses genes e o conteúdo de gordura intramuscular não foram significativas. Esses resultados evidenciaram que: 1) o período imediatamente após o nascimento foi determinante na expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nas populações estudadas; e 2) os genes *FABP3* e *FABP4* não apresentam potencial para serem utilizados como marcadores moleculares para deposição de gordura intramuscular nas populações avaliadas, mas, talvez, possam ser usados como preditores de adaptações e, ou, alterações metabólicas dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*.

ABSTRACT

MORAES, Danielle Serra de Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. *Expression levels of the FABP3 and FABP4 genes and intramuscular fat content in pigs*. Adviser: Paulo Sávio Lopes. Committee Members: Simone Eliza Facioni Guimarães and Lúcio Alberto de Miranda Gomide

Genes *FABP3* (heart fatty acid-binding protein gene) and *FABP4* (adipocyte fatty acid-binding protein gene) have been indicated as candidate genes to the intramuscular fat deposition in pigs. The present research aimed to analyze the levels of expression of these genes in the *Longissimus dorsi* (LD) and *Semimembranosus* (SM) muscles of commercial (Landrace X Large White X Pietrain) and Brazilian native (Piau breed) pigs (gilts and barrows) at different ages. It also aimed to evaluate the correlation between these expression levels and intramuscular fat content. Eighteen samples of the two divergent genetic groups of pigs were slaughtered. Of these 12 were samples of commercial pigs at the ages of 1, 21, 60, 90, 120 and 180 days and 6 were of Brazilian native pigs (Piau) at the ages of 1, 90 and 180 days. Samples of the LD and SM muscles of these animals were removed immediately after slaughter. They were frozen in liquid nitrogen at -70°C . The analyses for intramuscular fat content were conducted in pools of equivalent samples (tissues of pigs of the same sex, age and genetic group). The RNA of the samples was extracted and the genes *FABP3* and *FABP4* expressions were analysed from Real Time PCR, using

the Taqman™ technology. In the present research we use the relative quantification type (comparative method). The results of the genes *FABP3* and *FABP4* expression and of the intramuscular fat content were submitted to statistical analyses, using a model containing the effects of the genetic group, sex and animal age. There was no significant genetic group and sex effects for the expression levels of both *FABP3* and *FABP4* genes. Significant age effect was verified at the levels of 1 and 5%, respectively, for the expression of both *FABP3* and *FABP4* genes in commercial pigs. Average expression obtained at birth differed significantly from the other ages. There was significant effect of sex and age on the intramuscular fat content of commercial pigs LD muscle. Significant correlation between *FABP3* and *FABP4* genes was found in both of the genetic groups. No significant correlations were obtained between these genes and intramuscular fat content. These results suggest that: 1) the period immediately after birth was important in the expression of genes *FABP3* and *FABP4* in both populations; 2) *FABP3* and *FABP4* genes did not present potential to be used as molecular markers for intramuscular fat deposition in the populations evaluated, but they might be used as predictors of adaptations and/or metabolic alterations of the LD and SM muscles.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento acelerado de conhecimentos da genética molecular está dando origem a uma nova geração de tecnologia aplicada ao melhoramento genético de suínos.

A década de 1990 foi marcada por grande progresso no conhecimento dos genomas de inúmeras espécies animais e vegetais, o que se refletiu em benefícios consideráveis à espécie suína. Como consequência, ainda na década passada, deu-se início à chamada seleção assistida por marcadores genéticos (MAS). Essas novas tecnologias aliadas à genética quantitativa passaram a orientar os programas mais avançados de melhoramento genético de suínos.

Ainda nessa última década, constatou-se uma associação dos objetivos do melhoramento genético de suínos às exigências da indústria suinícola. Assim, as características qualitativas relacionadas ao produto final, que chega à mesa do consumidor, tornaram-se objetos de seleção. Isso só foi possível devido à utilização de técnicas como o BLUP e os marcadores genéticos, que permitem avaliar características que não se expressam ou não podem ser medidas no indivíduo que está sendo avaliado. Desta forma, foi agregado o aspecto qualitativo ao objetivo de seleção anteriormente praticado.

Todavia, é fundamental a visão de que a MAS é mais uma ferramenta no auxílio aos programas de melhoramento, onde as avaliações fenotípicas e

as análises quantitativas das características continuam a ser o instrumento central da seleção.

Os investimentos aplicados à pesquisa do genoma de suínos ou a conversão dos conhecimentos adquiridos em ferramentas aplicadas à seleção são devidos ao fato de os suínos destacarem-se como espécie de grande expressão comercial e econômica, sendo sua carne a mais consumida no mundo, representando cerca de 38% de toda a carne comercializada. Outro fator que tem estimulado o investimento nessa espécie foi a sua escolha como modelo animal para o estudo de doenças humanas, inclusive para utilização em xenotransplantes.

Diante do exposto, é possível antever grandes perspectivas para o melhoramento genético de suínos, tanto no que se refere ao impacto econômico global quanto no seu aspecto qualitativo, em relação à possibilidade de manipular características de interesse.

No presente estudo, foram analisados os níveis de expressão dos genes *FABP3* (*heart fatty acid-binding protein gene* – gene da proteína de ligação de ácidos graxos do coração) e *FABP4* (*adipocyte fatty acid-binding protein gene* - gene da proteína de ligação de ácidos graxos do tecido adiposo) nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de dois grupos genéticos de suínos, compostos por animais de diferentes sexos, em diferentes fases de desenvolvimento. Esses dois grupos foram escolhidos por serem divergentes em relação à deposição de gordura subcutânea, sendo o suíno comercial tipo carne e o Piau, tipo banha.

A estratégia de utilização de grupos genéticos divergentes pode ser usada em estudos de gene com ação biológica conhecida, envolvido no desenvolvimento ou na fisiologia da característica de interesse ou para o mapeamento de regiões ligadas a características quantitativas (ROTHSCHILD, 1997), pois o estudo de genes candidatos baseia-se em polimorfismos desses genes associados a diferenças fenotípicas. Em grupos genéticos divergentes, a ação do referido gene na determinação da característica tende a ser evidenciada e as diferenças fenotípicas são mais facilmente detectadas.

Posteriormente, foi investigada a correlação entre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* entre si e com o conteúdo de gordura intramuscular.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos comerciais (Landrace X Large White X Pietrain) e nativos brasileiros (raça Piau).

2.2 Específicos

1) Determinar os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau) de ambos os sexos, em diferentes fases do desenvolvimento.

2) Analisar, quantitativamente, o conteúdo de gordura intramuscular dos animais em estudo.

3) Correlacionar os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* entre si e com o percentual de gordura intramuscular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Qualidade da carne suína

A qualidade da carne suína inclui, segundo Dekkers *et al.* (2004), aspectos como gordura intramuscular, colesterol, pH final, cor, capacidade de retenção de água ou perda de água, maciez, perda ao cozimento e características sensoriais que envolvem o paladar. A herdabilidade para a maioria dessas características varia de 0,15 a 0,5. Segundo esses autores, é difícil melhorar geneticamente a qualidade da carne por meio de métodos convencionais de seleção baseados no fenótipo, porque a maioria das características de qualidade da carne só pode ser medida após o abate. Assim, apenas informações de parentes podem ser usadas para estimar os valores genéticos, o que limita a precisão da seleção.

As linhagens atuais de suínos apresentam alta taxa de crescimento, com elevada taxa de deposição de carne magra na carcaça. Devol *et al.* (2001) apontaram os efeitos negativos desse aumento no percentual de carne magra na carcaça, sobretudo em relação ao seu processamento e de seus produtos, bem como na qualidade da carne (maciez e palatabilidade). Os autores sugerem como percentuais de gordura intramuscular adequados para boa qualidade da carne 2,5 a 3,0% para maciez e 4% para palatabilidade.

Nesse sentido, Hernández *et al.* (1998) citaram diversos estudos que comprovam que a carne suína é uma valiosa fonte de ácidos graxos

poliinsaturados (PUFA), com relevante concentração de ácidos graxos n-6 (ômega 6) e n-3 (ômega 3). Segundo os autores, a composição da carne suína, sobretudo o conteúdo de ácidos graxos, depende principalmente da origem genética, da idade, do peso ao abate e dos fatores nutricionais dos animais.

Clarke (2001) relatou os efeitos benéficos exercidos pelos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na potencialização da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na oxidação de ácidos graxos, enquanto, simultaneamente, suprimem genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de lipídeos. Os ácidos graxos poliinsaturados governam a expressão de genes ligados aos processos oxidativos pela ativação de um fator de transcrição do peroxissoma e suprimem a expressão de genes relacionados a atividades lipogênicas pela redução da quantidade e da afinidade de ligação ao DNA de fatores de transcrição responsáveis pelo fornecimento de insulina e carboidrato.

3.2 Técnicas de genética molecular em animais de produção

3.2.1 O uso de marcadores moleculares

Na década passada, houve uma rápida aplicação de novas técnicas de genética molecular em animais de produção, inclusive suínos. É grande o número de pesquisas que visam identificar genes ou regiões genômicas que afetam características de importância econômica. Com isso, é cada vez maior o uso de marcadores moleculares no melhoramento animal (DEKKERS *et al.*, 2004).

Entendem-se por marcadores moleculares as seqüências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos. Uma vantagem importante dos marcadores é que eles podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética. As principais qualidades de um bom marcador são alto grau de polimorfismo, herança mendeliana e baixa taxa de mutação (GUIMARÃES, 2001).

Fuji *et al.* (1991) foram os primeiros pesquisadores a desenvolver a técnica para identificação do primeiro marcador genético que governa uma característica importante para o melhoramento genético de suínos. Esses autores identificaram o gene Halotano, cujo efeito tem várias denominações, dentre elas a sigla PSS (*Porcine Stress Syndrome*), que significa Síndrome do Estresse Suíno. O licenciamento desta técnica foi obtido pela The Innovations Foundation, de Toronto, Canadá, sob a denominação HAL-1843. Enquanto a pesquisa e a seleção inicial dos reprodutores eram feitas com base no teste do gás halotano, a seleção atual usa um teste de DNA gerado a partir de estudos do gene clonado. Os suínos portadores do gene PSS apresentam perda na qualidade da carne. O efeito desse gene foi verificado mesmo em animais originados de cruzamentos divergentes, menos suscetíveis ao estresse, sendo caracterizado como um dos principais genes a serem estudados em suínos (BAND *et al.*, 2005a, b).

Marcadores moleculares de DNA têm sido amplamente aplicados em estudos biológicos, na avaliação e caracterização de germoplasma, e em estudos de variabilidade e diversidade genética. De modo específico, no melhoramento genético animal, os marcadores permitem o desenvolvimento de mapas genéticos, visando a seleção assistida por marcadores e a introgressão gênica. Eles também são utilizados na confirmação de pedigrees e estimativas da relação de parentesco entre indivíduos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Além disso, têm-se encontrado novos campos de aplicação, como na rastreabilidade de animais ou nos testes de identidade de produtos específicos.

Um outro tipo de marcador útil nos processos de seleção para o melhoramento genético animal é, segundo Guimarães (2001), o RNA mensageiro (mRNA). As técnicas de emprego de mRNA como marcador baseiam-se no fato de que essas moléculas são sintetizadas em tecidos específicos e sob condições orgânicas bem definidas. Portanto, as técnicas que utilizam o mRNA como marcador permitem que a expressão do gene de interesse seja comparada em diferentes condições de manejo, nas diversas fases do desenvolvimento do animal e nos diferentes órgãos e tecidos.

As técnicas otimizadas de amplificação do RNA são a RT-PCR (Transcrição reversa – Reação em Cadeia da Polimerase), a DDRT-PCR (Transcrição reversa de Expressão Diferencial – Reação em Cadeia da

Polimerase) e, mais recentemente, a Q-PCR em tempo real (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). As principais vantagens desses métodos sobre as abordagens clássicas no estudo da expressão gênica são: a grande sensibilidade, a necessidade de quantidades ínfimas de material amostral e a maior automação, o que permite a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo e reduz o risco de contaminação (GUIMARÃES, 2001).

A implementação da MAS pode ser dividida em quatro etapas: 1) busca de marcadores genéticos, 2) estabelecimento de mapas de ligação, 3) detecção de associação entre os marcadores e as regiões que afetam as características quantitativas; e 4) implementação dos marcadores nos programas de melhoramento animal (HAYS e GODDARD, 2003).

Os marcadores moleculares podem marcar o gene que será introduzido ou utilizado para selecionar a favor ou contra um determinado genótipo. Essa fase da seleção é denominada MAI (*Marker Assisted Introgression* – Introgessão Assistida por Marcadores). Nos programas de seleção, uma linhagem ou raça inferior para determinado loco de interesse econômico recebe a introdução de alelos de uma raça ou linhagem doadora. A fixação desses alelos pode ser feita através de várias gerações de retrocruzamento entre as duas populações (GUIMARÃES, 2001).

Todavia, a eficiência da MAI irá depender da frequência do alelo introduzido na população e do progresso genético para características de interesse econômico. Durante o processo de retrocruzamento, é necessário que a linha receptora seja avaliada constantemente e genotipada, devido à possibilidade de migração de alelos indesejáveis juntamente com os alelos de interesse. Os benefícios da MAI são mais relevantes quando se considera que os alelos introgredidos são provenientes de genes para características de baixa herdabilidade, expressas em somente um dos sexos, de difícil mensuração, ou de expressão tardia no animal. Caso as características de interesse não estejam de acordo com esses padrões, elas deverão ser selecionadas pelo método convencional de seleção fenotípica, até que seja obtido um mapa genômico mais informativo para a espécie (VISSCHER e HALEY, 1998).

3.2.2 O genoma suíno, QTL (*Quantitative Trait Loci*) e genes candidatos

A indústria suinícola tem, segundo Plastow *et al.* (2005), dado maior atenção à qualidade da carne e os programas de melhoramento têm utilizado características de qualidade nos critérios de seleção. Esse fato tem ocorrido devido à maior exigência por parte das indústrias de processamento de carne, do setor de cortes e do mercado consumidor. Além do mais, o desenvolvimento na área genômica também tem estimulado o interesse no melhoramento para qualidade da carne, uma vez que a seleção baseada em marcadores de DNA é mais eficiente em características que não podem ser mensuradas no próprio animal candidato à seleção, ou que podem apenas ser medidas após o abate, ou, ainda, que demandem altos custos para mensuração.

O material genético dos suínos está contido em 19 pares de cromossomos e constitui um dos genomas mais complexos entre os seres vivos eucariotos. Estima-se que esse genoma tenha 3,3 bilhões de pares de bases, os quais contêm mais de 100 mil genes estruturais (MEADUS, 2000). O mapa desse genoma conta com, aproximadamente, 5000 *loci*, que incluem algumas centenas de genes (ROTHSCHILD, 2004).

Resultados de pesquisas indicam que o cromossomo 6 (SSC6) de suínos está, provavelmente, relacionado aos genes com potencial para qualidade da carne. Os QTLs para deposição de gordura intramuscular estão entre os mais freqüentemente publicados (GERBENS *et al.*, 1999, 2000; PIRES *et al.*, 2005). Com o objetivo de refinar resultados para cinco características de interesse no SSC6 (gordura intramuscular, porcentual de carne, maciez, intensidade do aroma e espessura de toucinho), Szyda *et al.* (2003) confirmaram efeito de QTL detectado no SSC6 na deposição da gordura intramuscular.

Assim, embora exista pouco mais de uma dezena de marcadores genéticos em uso nos programas de seleção, o número de marcadores conhecidos e em fase de validação já se aproxima de uma centena, o que demonstra que o conhecimento e o uso dos marcadores genéticos estão em fase inicial, havendo, portanto, grandes perspectivas de progressos nessa área, pois desde que um marcador de DNA (um polimorfismo) tenha sido associado com a variação na característica-alvo, ele pode ser usado para

genotipar animais jovens para pré-seleção antes do teste de desempenho. Este é um diferencial em relação aos esquemas de abate de irmãos, os quais são laboriosos e onerosos. Outra vantagem da incorporação de marcadores nos programas de seleção é a possibilidade de substituição de antigos marcadores já fixados por novos marcadores recém-identificados. A construção de uma base de dados ao longo do tempo fornecerá uma fonte muito útil para esse propósito ou para validação futura de marcadores de DNA identificados em populações experimentais ou para teste de genes candidatos (PLASTOW *et al.*, 2005).

Entende-se por gene candidato um gene seqüenciado e de ação biológica conhecida, que está envolvido com o desenvolvimento de uma dada característica (ROTHSCHILD e SOLLER, 1997). A sua participação pode ser como gene estrutural ou diretamente na atividade regulatória, agindo sobre um determinado segmento na rota metabólica de uma característica e influenciando sua expressão. O gene candidato é considerado um marcador direto, pois apresenta o seu marcador dentro da seqüência, não sofrendo taxa de recombinação entre marcador-QTL, estando estes em permanente desequilíbrio de ligação (GUIMARÃES, 2001).

Dessa forma, a análise genômica por meio de genes candidatos apresenta, segundo Guimarães (2001), as seguintes vantagens:

- Ausência de recombinação, o que evita perda de poder estatístico. As análises são baseadas em dados populacionais, não necessitando de dados de famílias.

- Grande aplicabilidade, podendo ser implementada em qualquer população que possa ser avaliada fenotipicamente e genotipada. Não requer o estabelecimento de pedigrees e pode ser investigado em populações com diferentes bases genéticas.

- Custo decrescente, após a identificação dos polimorfismos.

- Simplicidade operacional, devido à análise de um único locus, o que pode ser realizado em laboratórios de infra-estrutura modesta.

- Conveniente aplicação para MAS, pois seus efeitos são mais estáveis por geração e sua utilização é imediata após sua identificação.

Todavia, o uso dos genes candidatos apresenta algumas limitações, dentre as quais Guimarães (2001) cita:

- Efeitos pleiotrópicos de genes diversos podem interferir na característica desejada e conduzir à identificação errônea de QTLs.

- Altos custos iniciais devido à necessidade de ampliações, análises de restrição e seqüenciamentos.

- Dificuldade no estabelecimento dos efeitos dos genes candidatos diante do efeito de possíveis genes ligados e pleiotropias.

No Quadro 1 está um resumo dos genes candidatos que afetam a qualidade da carne suína. A segregação do gene Halotano ou do PSS (Porcine Stress Syndrome ou Síndrome do Estresse Suíno) é conhecida há várias décadas (FUJI *et al.*, 1991).

O gene RN, ou gene da carne ácida, foi inicialmente pesquisado por meio do teste de potencial de glicogênio. Anteriormente, achava-se que a mutação RN era limitada à raça Hampshire (MILAN *et al.*, 2000). Entretanto, foi verificado que vários outros alelos com efeitos sobre a qualidade de carne estão segregando em outras linhagens comerciais (DEKKERS *et al.*, 2004).

Resultados encontrados por Carmo *et al.* (2005) confirmaram que o gene myf-5 apresenta variação alélica em suínos, que pode ser usada para trabalhos de associação com características de interesse econômico em programas de seleção assistida por marcadores.

Figueiredo (2004) encontrou alterações na seqüência do gene FABP3 em populações de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau), as quais serviram como marcas para associações dos polimorfismos desse gene com características quantitativas. Os resultados obtidos indicaram, segundo o autor, que o gene FABP3 possui potencial para aplicação em programas de seleção assistida por marcadores moleculares (MAS), para características de interesse econômico de suínos.

Além dos genes mencionados no Quadro 1, foram descritos como genes candidatos para suínos o gene do receptor de estrógeno, associado com o aumento do número de leitões por leitegada (ROTHSCHILD *et al.*, 1996; SHORT *et al.*, 1997); o gene do hormônio de crescimento (GH), relacionado com o ganho de peso diário (CHENG *et al.*, 2000; FARIA, 2004); o KIT, responsável pela cor da pele branca dominante; e FUT 1 e 2, relacionados com a resistência a *E. coli*, que causam a doença do edema em suínos (ROTHSCHILD, 2003).

Quadro 1 – Alguns genes conhecidos com efeitos significativos sobre a qualidade da carne suína

Gene	Cromos.	Referência	Efeitos na Qualidade de Carne
Receptor de Rianodina (RYR1); Halotano – HAL	6	Fujii <i>et al.</i> (1991)	pH, capacidade de retenção de água, cor
Rendimento de Napole – RN; <i>PRKAG3</i>	15	Milan <i>et al.</i> (2000) Ciobanu <i>et al.</i> (2001)	pH, potencial de glicogênio, capacidade de retenção de água
Proteína de ligação a ácidos graxos do tecido adiposo A-FABP (gene <i>FABP4</i>)	4	Gerbens <i>et al.</i> (1998)	Gordura intramuscular (músculo esquelético)
Proteína de ligação a ácidos graxos do coração H-FABP (gene <i>FABP3</i>)	6	Gerbens <i>et al.</i> (1999)	Gordura intramuscular (músculo esquelético)
Família MyoD (MyoD I, Miogenina, Myf-5, Myf-6)	2, 15	Buckingham <i>et al.</i> (1992) Te Pas <i>et al.</i> (1999)	Formação de fibras musculares
Antígeno de leucócito suíno (SLA) ou genes ligados	7	Rothschild <i>et al.</i> (1995) Bidanel <i>et al.</i> (1997)	Cheiro de cachaço; Características de carcaça

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2003).

Resultados obtidos por Peixoto (2004) sugerem que os polimorfismos no gene da leptina são potenciais marcadores para características produtivas de importância econômica, como taxa de crescimento, consumo de ração e espessura de toucinho. No entanto, a autora enfatiza que essas associações foram detectadas em população experimental, sendo necessária a validação desses resultados em populações comerciais. Ainda, Faria (2004) apontou o potencial do marcador microsatélite do gene do fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-I) como bom indicativo dos efeitos do gene candidato IGF-I nas características produtivas.

3.3 Detecção de marcadores moleculares por meio de PCR quantitativa

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente seqüências específicas de DNA, utilizando

pequenos oligonucleotídeos ou primers de 18 a 25 bases que se ligam a determinadas regiões de interesse no genoma. Essa amplificação pode ser obtida também ao utilizar o RNA como material iniciador. Esse procedimento, denominado RT-PCR, é realizado por meio da reação de transcrição reversa, seguida de PCR convencional no cDNA.

A RT-PCR é o método mais sensível para detecção de mRNA (ou RNA total) em pequena quantidade, obtido a partir de amostras limitadas de tecido (BUSTIN, 2000). Essa técnica pode ser utilizada na comparação dos níveis de mRNAs em amostras de diferentes populações, na caracterização de padrões de expressão de mRNA, na discriminação entre mRNAs intimamente relacionados e na análise da estrutura do RNA (BUSTIN, 2000).

Para o desenvolvimento da RT-PCR é necessário um planejamento inicial de primers que flanqueiam a região correta a amplificar, devendo ser ressaltado que as seqüências do gene ou do mRNA de interesse podem ser encontradas em bancos de dados (como o EMBL ou o GenBank). Em geral, a escolha do primer mais eficiente dá-se pelos mesmos fatores utilizados na PCR qualitativa.

A quantificação do mRNA pode ser obtida por métodos semi-quantitativos ou quantitativos. A complexidade do método semiquantitativo impede sua automação e seu uso não é recomendado (BUSTIN, 2000).

O objetivo principal da PCR quantitativa é informar, ao final da reação, a quantidade de produto amplificado relacionado ao número de seqüências-alvo inicialmente nela contidas. O aumento de interesse nessa técnica está em sua elevada sensibilidade, sobretudo quando comparada ao método tradicionalmente utilizado, o Northern blot.

Os procedimentos quantitativos usam técnicas de RT-PCR não competitivas e, mais comumente, RT-PCR competitiva.

A PCR competitiva é, segundo Bustin (2000), uma adaptação quantitativa da PCR na qual um número conhecido de cópias de um DNA (ou RNA) gerado por síntese exógena é amplificado simultaneamente com a amostra em um mesmo tubo. Essa técnica permite determinar a quantidade do RNA de interesse presente em uma amostra de RNA com a ajuda de uma segunda seqüência, denominada Padrão de Quantificação (PQ), que é adicionada à amostra em uma concentração conhecida no início do

procedimento de quantificação. O PQ atravessa, juntamente com o RNA-alvo, as fases de preparação da amostra, transcrição reversa, amplificação por PCR, hibridização e detecção (leitura da densidade ótica automatizada). Os níveis do RNA de interesse nas amostras analisadas são determinados mediante comparação entre a absorbância obtida do PQ e do RNA-alvo de cada amostra.

O erro mínimo na RT-PCR é de aproximadamente 10%, mesmo quando competidor e alvo estão presentes em proporções equivalentes. Sendo assim, procedimentos com base na RT-PCR convencional não são apropriados para uso de rotina, especialmente quando diversos alvos provenientes de muitas amostras estão sendo quantificados (BUSTIN, 2000).

A aplicação de técnicas de fluorescência para a RT-PCR, juntamente com equipamentos adequados capazes de combinar amplificação, detecção e quantificação, tem conduzido ao desenvolvimento de metodologias de RT-PCR cinética que, segundo Bustin (2000), estão revolucionando as possibilidades para quantificação de ácidos nucléicos. Todos os equipamentos atualmente disponíveis no mercado funcionam sem a necessidade de manipulação pós-amplificação, o que evita problemas de contaminação. Outras vantagens advindas dessa tecnologia estão relacionadas à obtenção de resultados em curto espaço de tempo e minimização da mão-de-obra necessária para a realização das análises. O processo completo, iniciado com a transcrição reversa e finalizado com a quantificação total, é semi-automatizado.

Essa técnica, denominada PCR quantitativa em tempo real (QPCR), é um método confiável e utilizado, desde seu advento em 1993, na detecção e quantificação da expressão gênica. Seus resultados baseiam-se na medida de produtos gerados durante cada um dos ciclos do processo de reação em cadeia da polimerase (PCR), os quais são diretamente proporcionais à quantidade do molde presente no início do processo. Por meio dele é possível medir a quantidade do produto de PCR ainda na fase exponencial, pois somente nessa fase é possível estimar a quantidade do molde utilizado inicialmente (GINZINGER, 2002).

Uma das principais aplicações da PCR quantitativa em tempo real é a análise da expressão gênica. O tipo de quantificação para essa aplicação pode ser absoluto ou relativo, sendo este último o mais comumente utilizado.

Em ensaios de quantificação absoluta utiliza-se uma amostra de concentração conhecida para construir uma curva-padrão. Esta curva relacionará o número de cópias dos padrões com o número do ciclo de PCR no qual o sinal fluorescente ultrapassa o limiar (Ct). O *software* de análise, após construir automaticamente a curva-padrão, calcula o número de cópias presentes em cada reação (*unknown*) em função do Ct obtido.

Um outro tipo de quantificação é a relativa, também conhecida como método comparativo. Neste tipo de quantificação não é necessário construir uma curva-padrão, já que os resultados obtidos com a análise do gene de interesse e o controle endógeno são comparados diretamente pelos Cts, por meio de fórmulas aritméticas (GINZINGER, 2002).

Em análise de expressão gênica, é utilizado também um controle interno endógeno, ou seja, é feita a quantificação de um gene que estará sempre presente nas amostras, apresentando expressão constitutiva. O resultado da quantificação do controle endógeno será utilizado para normalizar os resultados obtidos do gene de interesse, corrigindo, assim, diferenças nas concentrações de cDNA utilizadas na reação de PCR e o efeito da presença de inibidores de amplificação. São vários os controles endógenos utilizados, mas os mais comuns são β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), RNA ribossomal (rRNA), entre outros.

Há, atualmente, quatro técnicas capazes de detectar o produto amplificado com, aproximadamente, a mesma sensibilidade. Elas utilizam corantes fluorescentes e combinam os processos de amplificação e detecção de um RNA-alvo para permitir o monitoramento da PCR em tempo real durante a PCR; sua alta sensibilidade elimina a necessidade de uma segunda etapa de amplificação e reduz as chances de aparecimento de resultados falso-positivos. O método mais simples usa corantes fluorescentes (SYBRTM Green) que se ligam especificamente ao DNA fita dupla. Os outros três métodos baseiam-se em sondas de hibridização marcadas com fluorescência para o amplicon correto. Os métodos diferem na sua especificidade, embora nos últimos ciclos de amplificação todos possam mostrar habilidades não correlacionadas ao acúmulo de produtos específicos. Como a detecção do amplicon nos ensaios com sondas moleculares, sondas hidrolíticas (TaqmanTM) e de hibridização depende de uma hibridização bem-sucedida da sonda, esse procedimento de

RT-PCR elimina a necessidade de análise Southern após a PCR ou o seqüenciamento para confirmar a identidade do amplicon (BUSTIN, 2000).

3.4 Genes FABP3 e FABP4

Foi demonstrado que os genes *FABP3* e *FABP4* têm influência na deposição de gordura intramuscular, com impacto limitado sobre a espessura de toucinho. Isto permite a seleção para aumento da gordura intramuscular, que melhora o sabor e a maciez, sem aumentar a espessura de toucinho (DEKKERS *et al.*, 2004).

Segundo Veerkamp *et al.* (2000), as *FABPs* estão envolvidas no transporte de ácidos graxos, a fim de regular sua concentração, bem como de regular o metabolismo, a transdução de sinal, a transcrição gênica e a toxicidade. Teoricamente, é atribuída função às *FABPs* no transporte de ácidos graxos em hepatócitos e cardiomiócitos.

O gene *FABP3* está localizado no cromossomo suíno 6 (GERBENS *et al.*, 1999) e é constituído de quatro éxons, intercalados por três íntrons, existindo como cópia única por cromossomo haplóide no genoma. O produto desse gene é a proteína de ligação de ácidos graxos do coração (*H-FABP*), que constitui de 4 a 8% das proteínas sarcoplasmáticas solúveis no coração dos mamíferos (QIAN *et al.*, 1999). Essa proteína, de 14 kDa, de ligação a ácidos graxos de cadeias longas e a seus derivados acil e carnitina foi indicada como responsável por facilitar o transporte intracelular de ácidos graxos da membrana plasmática para sítios de beta-oxidação nas mitocôndrias e peroxissomas e para o retículo sarcoplasmático, resultando na síntese de lipídios (TROXLER *et al.*, 1993). Os membros dessa família são comumente denominados de acordo com o tecido de onde foram primeiramente isolados e incluem proteínas de ligação a lipídios do fígado, intestino, íleo e adipócitos (QIAN *et al.*, 1999; GLATZ *et al.*, 2003).

De acordo com Wootan e Storch (1994), os genes *FABPs* dos adipócitos e do coração são os membros da família FABP com maior semelhança estrutural, sendo suas seqüências primárias idênticas em 62% da estrutura do gene.

Evidências experimentais com genes da proteína de ligação a ácidos graxos dos adipócitos (*FABP4*) têm sugerido que há maior função desse membro da família na regulação sistêmica e celular do metabolismo (Qian *et al.*, 1999).

A proteína *A-FABP* é sintetizada, exclusivamente, nos adipócitos, enquanto a síntese de *H-FABP* pode ser verificada em vários tecidos, predominantemente em células cardíacas e do músculo esquelético. No músculo esquelético adulto o conteúdo da *H-FABP* varia, dependendo do percentual dos tipos I e IIA de fibras oxidativas (GLATZ *et al.*, 2003).

Swenson e Reece (1996) classificaram os tipos de fibras do músculo esquelético com base na fonte primária de energia (oxidativa ou aeróbica versus glicolítica ou anaeróbica) e velocidade de contração da fibra. Segundo esses autores, embora haja uma faixa de dependência entre elas, as fibras classificadas como tipo I ou \hat{a} apresentam contração lenta, são vermelhas e sempre oxidativas. As fibras do tipo II ou \acute{a} apresentam contração rápida e mostram uma faixa de dependência da energia oxidativa ou glicolítica. Essas últimas são subclassificadas em tipos IIA (vermelha, oxidativa e rápida), IIB (glicolítica, branca e rápida), IIC (oxidativa e intermediária) e IIM (glicolítica e oxidativa e super-rápida). Com base nessa classificação, os músculos brancos como *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*, utilizados na presente pesquisa, contêm, prioritariamente, fibras glicolíticas do tipo IIB (HERNÁNDEZ *et al.*, 1998).

Segundo Ruusunen e Puolanne (2004), a taxa de diferenciação da fibra muscular varia em diferentes músculos. Em animais jovens, as fibras musculares começam em um estado indiferenciado, oxidativo (fibras \acute{a}), mas com tendência a se transformar em glicolíticas. Já as fibras \hat{a} permanecem aeróbicas por toda a vida.

Em suínos, o início do desenvolvimento das fibras musculares do tipo II ou \acute{a} é estimado por volta do 55^o dia após a concepção, e essa transformação tem efeito sobre o tamanho do músculo. Fibras maiores tendem a ter menor número de mitocôndrias por unidade de área, sendo, portanto, menos oxidativas. Em músculos brancos de suínos domésticos, fibras do tipo I e IIA são, geralmente, menos freqüentes que fibras do tipo IIB e suas propriedades são influenciadas pela taxa de crescimento (RUUSUNEN e PUOLANNE, 2004).

Em roedores e bovinos, estudos da expressão gênica têm demonstrado que os níveis de proteína e mRNA, produtos do gene *FABP3*, apresentam correlação positiva com o conteúdo de fibras oxidativas de um dado músculo e, portanto, com o potencial de oxidação e esterificação de ácidos graxos. Assim, o conteúdo de proteína *H-FABP* e o nível de mRNA são mais altos em músculos oxidativos do que em músculos glicolíticos (BRANDSTETTER *et al.*, 2002). Esses autores concluíram que a expressão do gene *FABP3* em músculos *longissimus* de bovinos, assim como em suínos (GERBENS *et al.*, 2001), não é um indicador muito adequado para qualidade da carne, sobretudo escores de marmoreio.

Portanto, essa presença predominante da *H-FABP* em fibras musculares dos tipos I e IIA, associada às suas características de ligação, evidencia seu envolvimento funcional no metabolismo oxidativo (GLATZ *et al.*, 2003).

Polimorfismos no gene *FABP3* foram encontrados por Figueiredo (2004) em populações de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau), os quais serviram como marcas para associações desse gene com características quantitativas, indicando seu potencial para aplicação em programas de seleção de suínos assistida por marcadores moleculares (MAS).

Diferenças nos níveis do produto do gene *FABP3* nos vários tipos de tecidos e nas variações das respostas a estímulos ambientais têm sido amplamente verificadas em diversos mamíferos. Em geral, os níveis de mRNA e proteínas são alterados paralelamente e os padrões de distribuição de mRNA e proteínas são similares em humanos e em outras espécies. A maior expressão relativa ocorre no coração, com os mais baixos níveis de expressão no músculo esquelético pouco ativo. Níveis baixos, mas detectáveis, de expressão ocorrem no músculo esquelético ativo, na aorta, na placenta, na glândula adrenal, no ovário e nos testículos (QIAN *et al.*, 1999).

Em suínos, Brandstetter *et al.* (2002) sugeriram uma regulação da expressão do gene *FABP3* mais em nível traducional do que transcricional.

O gene *FABP4* de suínos foi isolado e seqüenciado por Gerbens *et al.* (1998), para estudo da sua função na diferenciação do acréscimo de gordura intramuscular nesses animais. A seqüência codificadora desse gene é altamente conservada em suínos, humanos, camundongos e ratos. Além disso,

todos os aminoácidos funcionalmente importantes são conservados. O gene *FABP4* está localizado no cromossomo 4 de suínos, e em seu primeiro intron foi detectada uma seqüência microssatélite polimórfica para seis diferentes raças testadas por Gerbens *et al.* (1998). Esta variação genética dentro do gene *FABP4* foi associada a diferenças no conteúdo de gordura intramuscular e, possivelmente, a características de crescimento em uma população de Duroc, ao passo que nenhum efeito na espessura de toucinho (ET) e perda de água por gotejamento foi detectado. Com isso, os autores concluíram que o locus *FABP4* está envolvido na regulação do acréscimo de gordura intramuscular em suínos da raça Duroc.

Os triacilgliceróis constituem a principal forma de lipídio no organismo animal. São transportados entre tecidos em lipoproteínas e armazenados como reserva de energia em tecido adiposo. Foram propostas três vias para a síntese de triacilgliceróis e em todas elas um diacilglicerol é produzido e, subsequente, esterificado, formando um triacilglicerol. Antes de serem metabolizados, no entanto, os ácidos graxos de cadeia longa unem-se, no interior da célula, a uma proteína ligadora de ácidos graxos (SWENSON e REECE, 1996).

De acordo com Glatz *et al.* (2003), a H-FABP citoplasmática tem uma função-pivô na utilização de ácido graxo muscular. Ela serve como uma molécula chaperone intracelular para ácidos graxos de cadeia longa, tendo, talvez, uma ação mais permissiva que regulatória, que geralmente envolve a interação direta com fosfolipídios da membrana e com proteínas específicas. Acredita-se que essa proteína atua como um equivalente intracelular da albumina no plasma, sendo um transportador de ácidos graxos através do citoplasma solúvel, servindo para aumentar a motilidade de ácidos graxos e, portanto, sua sobretaxa de utilização dentro da célula. Ela parece facilitar a transferência de ácidos graxos entre membranas intracelulares.

Essa visão da atuação da *H-FABP* no transporte através do citosol, juntamente com as descobertas sobre os mecanismos moleculares de transporte de ácidos graxos através do sarcolema, conduziu à hipótese da existência de dois mecanismos distintos de armazenamento e transporte de ácidos graxos pelas células musculares.

No primeiro mecanismo, os ácidos graxos entram na célula, absorvidos via difusão passiva ou mediados pelas proteínas *FABPs* associadas à membrana plasmática, para o transporte transcitoplasmático de agente subcelular. Esse processo inclui a liberação do ligante ácido graxo à acil-Coenzima A sintetase intracelular para ativação. Após a formação de acil-CoA, haverá a ligação de um éster à proteína de ligação à acil-CoA (ACBP), uma proteína de 10 kDa também encontrada no citoplasma muscular (GLATZ *et al.*, 2003).

Em outro mecanismo, os ácidos graxos são absorvidos pelas células por meio da interação com proteínas transportadoras de ácidos graxos e são, imediatamente, ativados a ésteres de acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS) do sarcolema. Esses ésteres de acil-CoA também se ligam à ACBP e são translocados para sítios de utilização intracelular. Tanto ácidos graxos saturados como (poli) insaturados são ligados à *H-FABP* com grande afinidade. O ligante prende-se a uma cavidade de ligação interna com a qual seu grupo carboxila, com carga negativa, forma uma ponte de hidrogênio, via uma molécula de água, com resíduos de arginina e tirosina da proteína. Por não se ligar a ésteres de acil-CoA, a *H-FABP* não estaria envolvida nas vias posteriores (GLATZ *et al.*, 2003).

Os ligantes hidrofóbicos, como ácidos graxos, ligam-se às *FABPs* com grande afinidade, mas essas distinguem-se entre si pela estrutura, distribuição entre os diferentes tecidos e especificidade do ligante. A proteína de ligação a ácidos graxos (*FABP*) presente no músculo esquelético é idêntica à *FABP* do coração (*H-FABP*). A *H-FABP* sarcoplasmática atua como principal transportadora de ácidos graxos de cadeia longa (AGCLs) do sarcolema para seus sítios intracelulares de conversão metabólica. Essa proteína deve gozar de uma função integral no metabolismo energético do músculo esquelético, liberando AGCLs para mitocôndrias e peroxissomos para a α -oxidação, ou direcionando AGCLs para esterificação e, conseqüentemente, armazenamento dentro das fibras musculares (BRANDSTETTER *et al.*, 2002).

A relação entre o conteúdo de *FABPs* citoplasmáticas do músculo esquelético, que são idênticas à *H-FABP*, e a capacidade mitocondrial de oxidação de ácidos graxos, tem sido demonstrada, o que sugere que adaptações das *H-FABPs* musculares estão envolvidas nas adaptações do

metabolismo completo para restrição de energia. Dessa forma, o transporte e a absorção de ácidos graxos são os primeiros eventos na oxidação dos ácidos graxos celulares, devendo as *H-FABPs* servir como indicadores precoces de adaptações metabólicas no músculo esquelético (KEMPEN *et al.*, 1998).

Em geral, situações metabólicas que tendem a aumentar a oxidação de ácidos graxos resultam no aumento da quantidade de *H-FABP*. É também interessante ressaltar que, conforme observado no músculo cardíaco, os próprios ácidos graxos estimulam a expressão do gene *FABP3* e de outras proteínas e enzimas que participam do seu metabolismo e da sua utilização (GLATZ *et al.*, 2003).

Adaptações do músculo esquelético parecem contribuir para o aumento da utilização de gordura observado com a restrição de energia. Um estudo realizado por Kempen *et al.* (1998) com mulheres obesas revelou que o conteúdo de *H-FABP* do músculo esquelético aumenta em resposta à restrição da dieta na obesidade, indicando que o músculo esquelético necessita adaptar-se a essa nova situação e que o aumento na capacidade de transporte de ácidos graxos no espaço citoplasmático está relacionado à perda substancial de peso em indivíduos obesos.

Sendo assim, o nível de expressão do gene *FABP3* medido a partir do seu mRNA parece ser um bom indicador de importantes adaptações metabólicas, como as verificadas ao nascimento (KEMPEN *et al.*, 1998).

Em relação ao gene *FABP4*, tem sido demonstrado *in vitro* que ácidos graxos exógenos de cadeia longa induzem a expressão gênica de *FABP4* ao nível transcricional nos adipócitos 3T3. Esse mesmo mecanismo parece atuar *in vivo* no músculo esquelético, uma vez que a restrição de energia parece estar associada com o aumento dos níveis basais de ácidos graxos plasmáticos (KEMPEN *et al.*, 1998), o que também compreende uma adaptação metabólica.

Ainda, Wootan e Storch (1994) expõem as funções das proteínas ligadoras de ácidos graxos (*FABP*), as quais parecem estar envolvidas no transporte, metabolismo ou armazenamento de ácidos graxos livres (AGL). Essas funções não são necessariamente exclusivas dessa família de proteínas. As *FABPs* são encontradas em elevadas concentrações em tecidos que usam grandes quantidades de AGL e são requeridas no transporte de altas concentrações desses ácidos graxos.

Em complemento a essas informações, Kempen *et al.* (1998) encontraram evidências que indicam que a habilidade do músculo esquelético para metabolizar ácidos graxos está relacionada ao seu conteúdo de H-FABP e que essas proteínas atuam como carreadoras de ácidos graxos entre a membrana plasmática e a membrana mitocondrial externa. Todavia, o significado fisiológico da otimização entre o conteúdo de *H-FABP* do músculo esquelético e a restrição de energia ainda necessita ser estabelecido, pois, em geral, a *FABP* parece estar presente em excesso e tem sido calculado que somente 2% do seu conteúdo total é complexado com ácidos graxos.

Dessa forma, a *H-FABP* deve estar envolvida, nas células musculares, com o tráfego citosólico de ácidos graxos até seus receptores nucleares. Devido à afinidade de ligação dos ácidos graxos com a *H-FABP*, é mais provável que essa proteína não exerça influência sobre o ligante em relação às vias metabólicas específicas, como α -oxidação ou esterificação (GLATZ *et al.*, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de realização do experimento

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos e no Laboratório de Biotecnologia Animal, do Departamento de Zootecnia, e no Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

4.2 Abate dos animais e coleta de material biológico

Foram abatidos 36 animais, sendo 24 suínos comerciais (12 machos e 12 fêmeas) e 12 suínos nativos (6 machos e 6 fêmeas), conforme idades representadas no Quadro 2. Os animais nasceram entre os meses de junho e julho de 2003 e foram abatidos nos meses de julho, agosto, setembro, outubro e dezembro do mesmo ano. Os machos foram castrados na primeira semana após o nascimento.

Os suínos comerciais (tipo carne) pertenciam à linhagem desenvolvida na UFV, proveniente do cruzamento das raças Large White, Landrace e Pietrain. Os suínos nativos brasileiros eram da raça Piau (tipo banha). Esses dois grupos genéticos foram escolhidos por serem divergentes em relação à deposição de gordura subcutânea.

Quadro 2 – Idades ao abate de acordo com o grupo genético dos animais

Idade de Abate	Grupo Genético e Sexo dos Animais
1 dia (nascimento)	Comercial (2 machos e 2 fêmeas) Piau (2 machos e 2 fêmeas)
21 dias (desmama)	Comercial (2 machos e 2 fêmeas)
60 dias (saída da creche)	Comercial (2 machos e 2 fêmeas)
90 dias	Comercial (2 machos e 2 fêmeas) Piau (2 machos e 2 fêmeas)
120 dias	Comercial (2 machos e 2 fêmeas)
180 dias	Comercial (2 machos e 2 fêmeas) Piau (2 machos e 2 fêmeas)

Os animais receberam manejo e alimentação-padrão para suínos comerciais da Granja de Melhoramento de Suínos da Universidade Federal de Viçosa, com ração à base de milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas, formulada para atender às exigências nutricionais dos animais nas diferentes fases, de acordo com recomendações de Rostagno *et al.* (2000). No período de 71 a 180 dias de idade foi utilizado 1,45% de óleo de soja na ração, para atender à exigência de energia. Todavia, esses animais passaram por um período de restrição alimentar involuntária por volta dos 80^o ao 100^o dias de idade.

Os abates foram realizados na própria granja, em instalação construída para este fim. Em virtude de o tamanho corporal não se ajustar ao equipamento utilizado em animais maiores, os animais com até 90 dias de idade foram insensibilizados quimicamente com clorofórmio e injeção intramuscular de azaperone (2,2 mg/kg). Após essa idade, os animais foram submetidos à insensibilização elétrica, posicionando-se os eletrodos do insensibilizador (Sulmaq, modelo 7654) na porção dorsal do pescoço dos animais e aplicando uma voltagem de 300 volts, por cerca de 5 segundos. Após a insensibilização, todos os animais foram abatidos por punção do coração, por meio de inserção sobre a axila esquerda.

Imediatamente após o abate, foram retiradas amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*, que foram embalados em papel

alumínio, identificados e congelados por imersão em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material coletado foi colocado em sacos plásticos de polietileno devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer (FORMA) a -700 °C, onde foi mantido até a realização da última coleta. Após a última coleta, foram realizadas as análises biomoleculares e a quantificação do conteúdo de gordura intramuscular.

4.3 Análise quantitativa do conteúdo de gordura intramuscular

Após a obtenção de amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos, em todos os períodos de coleta, foi realizada, no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química, a análise quantitativa do conteúdo de gordura intramuscular contido no material coletado, de acordo com a metodologia descrita por Barros (2001) e Benevenuto Júnior (2001). Para a realização dessa análise foram feitos pools das amostras equivalentes (tecidos de dois animais do mesmo sexo, idade e grupo genético).

4.4 Confeção dos sistemas de PCR em tempo real

O desenho e a construção dos primers e das sondas marcadas para o gene candidato (*H-FABP*) e para um gene constitutivo (controle endógeno – β -actina) foram feitos por meio do serviço Assay-by-Design, usando a tecnologia Taqman™, disponibilizado pela Empresa Applied-Biosystem. A partir das seqüências de cDNA obtidas no Gen Bank (disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>>) para X98558, Y16036 e AJ312193, respectivamente, para *FABP3*, *FABP4* e gene da β -actina, foram construídas as sondas complementares marcadas com a indicação das regiões de fronteira exon-exon. Cada um dos ensaios tinha, em um só tubo, os primers e a sonda marcada fluorescentemente para cada gene, já otimizados para as reações de PCR em tempo real.

4.5 Extração do RNA total

Antes da extração do RNA, todo material foi tratado com DEPC (dietil-pirocarbonato) e posteriormente autoclavado, evitando-se a degradação do material devido à presença de RNase.

Foram submetidos à extração 50 a 100 mg de tecido triturado, aos quais foram adicionados 750 μ L de trizol gelado. A mistura foi agitada em equipamento do tipo vortex, recebendo, em seguida, 250 μ L de água DEPC (dietil-pirocarbonato). As amostras foram mantidas no gelo durante todo o processo.

Os tubos com as amostras foram incubados a 30 °C, por 5 minutos. Decorrido esse período foram adicionados, a cada tubo, 200 μ L de clorofórmio gelado, após o que os tubos foram agitados vigorosamente com as mãos por 15 segundos e, novamente, incubados a 30 °C, por 5 minutos. A seguir, foram submetidos a uma centrifugação de 11.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C, em centrífuga refrigerada (Eppendorf). Ao final da centrifugação, foi recuperado o sobrenadante de cada tubo (500 μ L), que foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, devidamente identificado. A esse volume foram adicionados igual volume de álcool isopropílico gelado e 40 μ L de acetato de sódio 3M.

A mistura foi incubada a 30 °C, por 10 minutos, e posteriormente centrifugada a 11.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pélete de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Após essa etapa do procedimento, os tubos contendo as amostras foram incubados por pelo menos 14 horas a -70 °C.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Posteriormente, foram feitas a remoção do sobrenadante e a secagem do pélete à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Foi efetuada, então, a ressuspensão do pélete em 50 μ L de água DEPC gelada. Os tubos foram mantidos a -70 °C em ultrafreezer (FORMA), até o tratamento com DNase.

Antes de dar início ao tratamento com DNase, as amostras retiradas do ultrafreezer foram incubadas entre 55 e 60 °C, por 10 minutos.

4.6 Tratamento com DNase

Foi utilizado o protocolo descrito por Colonna-Romano (1998), conforme descrição a seguir.

Para cada amostra foram adicionados: 50,0 μ L de RNA (diluição de 15 μ g de RNA, em H₂O DEPC); 4,0 μ L de DNase I (40 un.); 7,0 μ L de tampão 10X da PCR sem Mg⁺⁺; 7,0 μ L MgCl₂ 25 mM; e 2,0 μ L de H₂O DEPC. Dessa forma, foram obtidos 70,0 μ L de solução final.

A mistura foi incubada a 37 °C, por 30 minutos, após o que foi adicionado clorofórmio (1:1 do vol. final), e cada tubo foi agitado em vortex por 15 segundos. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas no gelo por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 4 °C, por 10 minutos, a 12.000 rpm.

O sobrenadante foi coletado e precipitado pela adição de 1 μ g/ μ L de glicogênio, 0,15 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi armazenada a -70 °C, por pelo menos 14 horas.

Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Após a remoção do sobrenadante, procedeu-se, por duas vezes, a lavagem do pélete com 1 mL de etanol 75% gelado. A cada lavagem os tubos foram centrifugados a 10.600 rpm por 10 minutos e, após descartar-se o sobrenadante, submetidos à secagem ao ar por cerca de 30 minutos. Foi feita, então, a ressuspensão do pélete em 25 μ L de H₂O DEPC.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (OD₂₆₀/OD₂₈₀) e a integridade do RNA total extraído foi verificada em gel de agarose desnaturante.

4.7 Amplificação, detecção e quantificação do cDNA

Para que as reações de PCR em tempo real fossem otimizadas, foram feitos pools das amostras equivalentes (tecidos de dois animais do mesmo sexo, idade e grupo genético) após a extração do RNA total. Na confecção dos pools foi considerada a concentração do RNA total por amostra, de modo que

cada uma delas estivesse equivalentemente representada. A concentração-padrão de RNA total para amplificação em todas as reações foi fixada em 100 ng.

Após a extração, o RNA total foi submetido à reação composta por um único procedimento para produção do cDNA e subsequente início das amplificações em tempo real. Essa reação foi feita em apenas um tubo por amostra e não envolveu outros passos de manipulação, além daquele inicial.

As reações para cada um dos genes foram conduzidas em tubos individuais. Não foram utilizadas reações multiplex. O controle endógeno também foi amplificado separadamente, para evitar a competitividade que pode existir em sistemas de PCR multiplex. Para tanto, foi preparado um pré-mix de acordo com as instruções contidas no Manual da *Applied Biosystems* (2003) e descritas a seguir, em volume suficiente para o processamento de uma amostra:

Foram adicionados 12,5 μ L de TaqmanTM PCR Master Mix e 0,63 μ L de enzima para transcrição e inibidor de RNase (40x Multiscribe e RNase inhibitor mix), perfazendo um volume final de pré-mix igual a 13,13 μ L.

Posteriormente, foram adicionados 1,25 μ L de Assay-by-Design (volume final de pré-mix igual a 14,38 μ L) e até 9,37 μ L de RNA (RNA total na reação deveria ter a concentração de 10 a 100 ng). Nos casos em que os volumes finais da reação não atingiram 25 μ L, esse volume foi completado com água.

A placa foi centrifugada e levada ao ABI PRISM 7000, para dar início aos processos de transcrição do RNA em cDNA e de quantificação do DNA amplificado.

4.7.1 Ciclagem

A temperatura e os tempos de ciclagem foram fornecidos para cada gene pelo sistema *Assay-by-Design*. O sistema de detecção de seqüências ABI Prism 7000 foi, então, calibrado para as condições indicadas. No presente estudo, foi empregada a quantificação relativa (método comparativo). No método comparativo, os resultados obtidos com a análise do gene de interesse e do controle endógeno (β actina) foram comparados diretamente, por meio das seguintes fórmulas aritméticas:

$\Delta CT = CT (\text{alvo}) - CT (\text{referência})$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$

Quantidade relativa = $2^{-\Delta\Delta CT}$

em que

CT = *Threshold Cycle* – ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção, servindo como base para comparação entre amostras.

Threshold = limiar de detecção estabelecido pelo usuário ao analisar resultados no final de uma corrida em tempo real. Serve como ponto de referência, em que todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente à mesma quantidade de produto de PCR. O *Threshold* deve ser posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação, em que a eficiência de PCR é maior.

Controle endógeno ou gene de referência = controle usado para normalizar a amplificação do gene-alvo com sua própria amplificação, obtendo um valor real de expressão do alvo em relação ao total de RNA utilizado na reação. No presente experimento, foi utilizado o gene da β -actina.

Calibrador = amostra(s) usada(s) como base para comparação em análises de quantificação relativa. No presente estudo, foi utilizado como amostra calibradora o material coletado de suíno comercial do sexo masculino, com 180 dias de idade, sendo respeitada a especificidade do tecido analisado em cada situação (músculo *Longissimus dorsi* ou *Semimembranosus*). O resultado foi uma medida relativa da expressão gênica.

Alvo = gene FABP3 ou FABP4 (expressão).

Quantidade Relativa = resultado quantitativo obtido por meio de fórmula aritmética a partir dos valores fornecidos pelo equipamento ABI Prism 7000, ao final da QPCR, para os genes de interesse e para o controle endógeno (β -actina). Esse resultado indicou as expressões relativas dos genes FABP3 e FABP4, ou seja, os níveis de expressão dos respectivos mRNAs em relação à amostra calibradora.

Além desses elementos, o método de Q-PCR utilizou:

Referência Passiva = controle usado para normalizar sinal fluorescente entre os poços, corrigindo diferenças causadas por flutuações não relacionadas

a termociclagem, como volume de reação, número de amostras ou evaporação. Foi utilizada a molécula fluorescente ROX, que esteve presente em todos os reagentes da Applied Biosystems.

Reporter = molécula fluorescente (FAM) presente na extremidade 5' da sonda e cuja emissão de sinal aumentará ao longo da termociclagem à medida que é clivado um maior número de sondas pela polimerase, separando Reporters de NFQs.

NFQ (*Non Fluorescent Quencher*) = molécula não-fluorescente presente na extremidade 3' da sonda, cuja função é “abafar” o sinal do *reporter*, enquanto a sonda permanecer intacta. Ao longo da termociclagem, à medida que as sondas são clivadas pela polimerase, o sinal emitido pelo NFQ (calor) cai levemente, enquanto o sinal do reporter aumenta consideravelmente.

4.8 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos representam medidas relativas da expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* comparadas, em número de vezes, com a expressão dos mesmos genes em uma amostra calibradora. Cada amostra calibradora consistiu de material coletado em suínos comerciais do sexo masculino, com 180 dias de idade, sendo respeitada a especificidade do tecido analisado em cada situação (músculo *Longissimus dorsi* ou *Semimembranosus*).

A partir dos resultados quantitativos fornecidos por PCR em tempo real para a expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* em suínos comerciais, os dados referentes aos níveis de mRNA em cada tecido (*Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*) foram submetidos à análise de variância em um modelo contendo os efeitos de sexo (macho e fêmea) e idade (nascimento, 21, 60, 90, 120 e 180 dias).

O modelo estatístico utilizado na análise para cada músculo, no grupo genético comercial, é descrito por:

$$y_{ij} = \bar{y} + S_i + I_j + e_{ij}$$

em que

y_{ij} = valor observado da expressão gênica no sexo i e na idade j ;

\bar{y} = média geral;

S_i = efeito do sexo i (1 = machos castrados, 2 = fêmeas);

l_j = efeito da idade j ($j=1, 21, 60, 90, 120, 180$ dias); e

e_{ij} = erro aleatório.

O número de observações referentes aos suínos nativos brasileiros (Piau) foi insuficiente para que os dados fossem utilizados individualmente nas análises de variância, sendo discutidas somente as médias aritméticas obtidas em ambos os sexos, nas diferentes idades (nascimento, 90 e 180 dias).

Os dados dos dois grupos genéticos foram analisados conjuntamente, utilizando um modelo que incluiu os efeitos de grupo genético, sexo e idade. Nesse caso, foram utilizadas as idades ao nascimento, aos 90 dias e aos 180 dias. O modelo estatístico utilizado na análise conjunta dos dois grupos genéticos é descrito por:

$$y_{ijk} = \bar{y} + S_i + l_j + G_k + e_{ijk}$$

em que

y_{ijk} = valor observado da expressão gênica no sexo i e na idade j , do grupo genético k ;

\bar{y} = média geral;

S_i = efeito do sexo i (1 = machos castrados, 2 = fêmeas);

l_j = efeito da idade j ($j = 1, 90, 180$ dias);

G_k = efeito do grupo genético k (1 = comercial, 2 = Piau); e

e_{ij} = erro aleatório.

Foi efetuada a análise de correlação entre as variáveis FABP3, FABP4 e gordura intramuscular nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros. Essa análise foi feita de maneira individual para cada grupo genético (comercial e raça Piau) e, conjuntamente, com os dados dos dois grupos genéticos em estudo.

As análises estatísticas foram feitas mediante o uso do sistema SAS (*Statistical Analysis System*, 1995).

5. RESULTADOS

5.1 Expressões relativas dos genes *FABP3* e *FABP4*, conteúdo de gordura intramuscular e peso corporal de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau)

Os valores referentes aos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* dos músculos *Longissimus dorsi* (Tabela 1) e *Semimembranosus* (Tabela 2) de suínos comerciais e nativos brasileiros (raça Piau) de ambos os sexos, em diferentes fases do desenvolvimento, tiveram como finalidade estabelecer um referencial (padrão) para o número de vezes que esses genes se expressaram em relação a uma amostra calibradora, uma vez que foi utilizado o método relativo (ou comparativo) de expressão gênica. Esses valores, bem como os percentuais relativos ao conteúdo de gordura intramuscular (músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*) dos dois grupos genéticos em estudo, foram utilizados na realização das análises estatísticas.

Cada um dos pesos médios corporais de suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau) de ambos os sexos, em diferentes fases de desenvolvimento, foi obtido a partir de dois animais do mesmo sexo, idade e grupo genético.

Os animais sofreram restrição alimentar involuntária no período compreendido entre o 80^o e 100^o dia de idade.

Tabela 1 – Níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais e nativos brasileiros de diferentes sexos em diversas idades

Grupo Genético	Sexo	Idade (em dias)	<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Comercial	Machos castrados	1	32	3,063
		21	2,395	0,44
		60	2,639	2,189
		90	1,932	1,003
		120	2,54	0,081
		180*	1	1
	Fêmeas	1	26,446	4,908
		21	0,911	0,253
		60	2,338	1,474
		90	2,42	1,046
		120	5,959	0,07
		180	5,918	0,092
Piau	Machos castrados	1	21,185	0,511
		90	0,892	0,693
		180	1,157	0,155
	Fêmeas	1	36,504	2,274
		90	2,063	0,229
		180	1,653	0,566

* Amostra calibradora.

Tabela 2 – Níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros de diferentes sexos em diversas idades

Grupo Genético	Sexo	Idade (em dias)	<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Comercial	Machos castrados	1	3,771	1,053
		21	7,674	0,804
		60	2,235	0,883
		90	1,025	0,671
		120	0,182	0,386
		180*	1	1
	Fêmeas	1	1,39	0,228
		21	2,219	1,189
		60	0,865	0,285
		90	0,396	3,446
		120	0,133	0,024
		180	0,249	0,841
Piau	Machos castrados	1	22,316	5,315
		90	0,103	1,647
		180	1,602	1,575
	Fêmeas	1	19,293	3,021
		90	0,227	0,66
		180	3,01	1,474

* Amostra calibradora.

5.2 Análises estatísticas

5.2.1 Suínos comerciais

Não foram verificados efeitos significativos de sexo e de idade sobre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais.

Não houve efeito de sexo sobre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais. Porém, foi verificado efeito de idade, a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, sobre a expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nesse músculo. Na Tabela 3 estão as médias de expressão gênica referentes às diferentes idades de abate dos suínos comerciais.

As médias dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* de suínos comerciais foram significativamente maiores ($P < 0,05$) ao nascimento (animais abatidos com um dia de idade). Nas demais idades de abate, as médias não diferiram significativamente entre si e foram bem menores que ao nascimento.

Houve efeito de sexo e idade sobre o conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais, a 5% de probabilidade. Os machos castrados apresentaram maior conteúdo de gordura intramuscular do que as fêmeas (2,0% versus 1,73%).

As médias do conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais (Tabela 3) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) até os 60 dias de idade, tendo sido constatado que a média verificada ao nascimento não diferiu significativamente das médias obtidas a partir dos 90 dias de idade.

Não foi verificado efeito de sexo e idade sobre o conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais, a 5% de probabilidade. As médias de conteúdo de gordura intramuscular, referentes às diferentes idades de abate dos suínos comerciais, estão na Tabela 4.

Tabela 3 – Médias dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), e do conteúdo de gordura intramuscular (GIM) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais em diferentes idades de abate

Idade (em dias)	<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Gordura Intramuscular (%)
1	29,223 A	3,985 A	1,90 AB
21	1,653 B	0,347 B	2,40 A
60	2,488 B	1,831 B	2,25 A
90	2,176 B	1,025 B	1,45 B
120	4,249 B	0,075 B	1,50 B
180	3,459 B	0,546 B	1,50 B

Médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas) nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste SNK.

Tabela 4 – Médias do conteúdo de gordura intramuscular (GIM) no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais em diferentes idades de abate

Idade (em dias)	Gordura Intramuscular (%)
1	2,30
21	1,60
60	1,10
90	1,10
120	1,15
180	1,20

5.2.2 Suínos nativos brasileiros (Piau)

Em razão do pequeno número de observações, os resultados obtidos a partir da expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* de suínos nativos brasileiros (Piau) não foram submetidos a análises estatísticas. Porém, ao comparar as médias obtidas entre machos e fêmeas, foi observada pequena variação entre elas para ambos os genes avaliados. Em relação à variável idade, foi observado um grande distanciamento entre a média obtida dos animais abatidos no primeiro dia de vida e as médias das demais idades (90 e 180 dias), principalmente para a expressão do gene *FABP3*. Essas médias estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Médias obtidas a partir da expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos nativos brasileiros de ambos os sexos, em diferentes idades de abate

Variáveis		<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)		<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	
		N	M	N	M
Sexo	Machos castrados	3	7,879	3	1,649
	Fêmeas	3	10,458	3	1,371
Idade (em dias)	1	2	24,824	2	2,780
	90	2	0,821	2	0,807
	180	2	1,855	2	0,942

N = número de observações (cada observação corresponde a um *pool* de dois animais); e M = média.

5.2.3 Suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau)

Somente a idade apresentou efeito significativo nos níveis de expressão dos genes *FABP3* ($P < 0,01$) e *FABP4* ($P < 0,05$) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais e nativos (Tabela 6).

Tabela 6 – Médias dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), do músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais e nativos brasileiros em diferentes idades de abate

Idade (em dias)	<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
1	29,034 A	2,689 A
90	1,827 B	0,743 B
180	2,432 B	0,453 B

Médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas) nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste SNK.

Os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* foram maiores nos animais abatidos ao nascimento. Não houve diferença nos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* dos animais abatidos aos 90 e 180 dias.

Os resultados da análise de variância dos dados obtidos a partir dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros foram agrupados nas idades de abate de 1, 90 e 180 dias. Somente a idade apresentou efeito significativo a 5% de probabilidade, para o gene *FABP3* no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros (Tabela 7). Não houve efeito de idade sobre a expressão do gene *FABP4*.

Tabela 7 – Médias dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, relativos a uma amostra calibradora ($2^{-\Delta\Delta CT}$), do músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais e nativos brasileiros em diferentes idades de abate

Idade (em dias)	<i>FABP3</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>FABP4</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
1	11,692 A	2,404
90	0,438 B	1,606
180	1,465 B	1,223

Médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas) nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste SNK.

Nenhum dos fatores avaliados (sexo, idade e grupo genético) influenciou ($P>0,05$) os teores de GIM dos músculos SM e LD nas amostras agrupadas de suínos comerciais e nativos brasileiros (Tabela 8).

Tabela 8 – Médias do conteúdo de gordura intramuscular dos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semimembranosus* (SM) de suínos comerciais e nativos brasileiros em diferentes idades de abate

Idade (em dias)	Gordura Intramuscular (%)	
	LD	SM
1	2,125	2,425
90	1,550	2,000
180	2,225	1,150

5.2.4 Análise de correlação

Os resultados das análises de correlação entre as variáveis *FABP3*, *FABP4* e gordura intramuscular, nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semimembranosus* (SM) de suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau), estão na Tabela 9. Em suínos comerciais, houve correlação significativa ($P < 0,01$) entre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* apenas no músculo LD. Já nos suínos nativos, essa mesma correlação foi significativa ($P < 0,05$) em ambos os músculos LD e SM. Ainda, quando os dados relativos aos dois tecidos (músculos LD e SM) e aos dois grupos genéticos (comercial e Piau) foram analisados conjuntamente, também foi observada correlação significativa ($P < 0,01$) entre os genes *FABP3* e *FABP4*.

Tabela 9 – Correlações entre as variáveis *FABP3*, *FABP4* e gordura intramuscular (GIM) nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semimembranosus* (SM) de suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau)

Variáveis	Suínos Comerciais		Suínos Nativos		Suínos Comerciais e Nativos
	LD	SM	LD	SM	LD e SM
<i>FABP3</i> x <i>FABP4</i>	0,786 **	-0,019 ns	0,843 *	0,915 *	0,627 **
<i>FABP3</i> x GIM	0,005 ns	0,250 ns	0,025 ns	0,220 ns	0,227 ns
<i>FABP4</i> x GIM	0,162 ns	-0,221 ns	0,045 ns	0,375 ns	0,180 ns

ns = não-significativo.

* significativo, a 5% ($p < 0,05$).

** significativo, a 1% ($p < 0,01$).

As correlações entre *FABP3* e GIM e entre *FABP4* e GIM não foram significativas ($P > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

De modo semelhante ao presente trabalho, em que não foi verificado ($P > 0,05$) efeito de sexo sobre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* de suínos comerciais, Brandstetter *et al.* (2002) não encontraram diferenças significativas nos níveis de expressão do gene *FABP3* entre os diferentes sexos, após avaliarem a atividade oxidativa da proteína *FABP* nos músculos esqueléticos *Semitendinosus* (glicolítico), *Triceps brachii* (misto) e *Splenius* (oxidativo) de touros da raça Belgian Blue. Tendo em vista que esses autores não encontraram efeito de sexo ao comparar músculos com metabolismos diferentes, era esperado que também não fosse encontrado esse efeito após comparação entre dois músculos com o mesmo tipo de metabolismo (glicolítico).

Apesar da ausência de efeito de sexo sobre a expressão dos genes *FABPs*, foi verificado ($P < 0,05$) efeito de sexo sobre o conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi*, mas não no músculo *Semimembranosus*, de suínos comerciais. O músculo *Longissimus dorsi* de machos castrados apresentou maior conteúdo de gordura intramuscular do que o de fêmeas, o que está em consonância com a influência primária que o sexo exerce sobre a composição corporal de suínos criados em rebanhos comerciais (NOBLET *et al.*, 1994), com maior deposição de proteínas e menor deposição de gordura em fêmeas do que em animais castrados. Benevenuto Jr. (2001)

também verificou maior teor de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* em machos castrados do que em fêmeas de suínos F2 provenientes do cruzamento entre animais comerciais e nativos brasileiros. Segundo Donzele (2001), a maior deposição de gordura em machos castrados do que em fêmeas se deve à ausência de hormônios sexuais, que têm papel relevante na absorção de aminoácidos para síntese de proteína.

A ausência do efeito de sexo ($P > 0,05$) sobre o teor de gordura intramuscular no músculo *Semimembranosus*, observada no presente estudo, pode ter sido consequência das propriedades histoquímicas desse músculo, as quais foram avaliadas por Ruusunen e Puolanne (2004). Após comparação entre as médias obtidas por meio de medidas das áreas das fibras que compõem os músculos *Longissimus dorsi* ($5,23 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e *Semimembranosus* ($5,65 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), os autores demonstraram que o aumento da área das fibras é acompanhado por redução do número de capilares por área. Considerando que a combinação de alguns hormônios e fatores de crescimento provenientes da circulação (fatores endócrinos) e outros secretados pela própria célula e por células vizinhas (fatores autócrinos e parácrinos, respectivamente) exercem influência sobre a deposição de gordura nos músculos esqueléticos e no tecido adiposo de suínos (BRAMELD *et al.*, 1998), é possível que músculos com densidade de capilares mais baixa nas fibras, como o músculo *Semimembranosus*, se tornem menos suscetíveis às ações hormonais (e, conseqüentemente, ao efeito de sexo), quando comparados a outros músculos com maior densidade de capilares, como o *Longissimus dorsi*.

Brameld *et al.* (1998) verificaram, ainda, que os mecanismos de ação dos vários agentes envolvidos no desenvolvimento dos tecidos musculares e do tecido adiposo de suínos (por exemplo, hormônios do crescimento) podem apresentar diferenças entre os tipos de tecidos e entre os diferentes músculos, o que evidencia ainda mais a possibilidade de respostas diferentes aos estímulos hormonais entre eles.

Contrariando as expectativas, o grupo genético não foi ($P > 0,05$) uma importante fonte de variação sobre os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* nos músculos *Longissimus dorsi* e *Semimembranosus* dos animais comerciais e nativos brasileiros. Segundo Ruusunen e Puolanne (2004), a

seleção intensiva para taxa de crescimento e proporções mais elevadas de carne magra pode ter causado uma alteração na composição do tipo de fibra, com aumento no diâmetro das fibras do tipo IIB (glicolítica, branca e rápida) de suínos comerciais, quando comparada com outras raças de menor taxa de crescimento à mesma idade. Muitos músculos de suínos domésticos contêm, conforme esses autores, mais fibras do tipo IIB e menos fibras do tipo IIA (vermelha, oxidativa e rápida) que os músculos de suínos nativos. Assim, era de se esperar menor expressão do gene *FABP3* nos músculos de suínos comerciais, já que Brandstetter *et al.* (2002) verificaram maior conteúdo da proteína *H-FABP* e do nível de mRNA em músculos oxidativos que em glicolíticos. No entanto, no presente trabalho, essa diferença não foi ($P > 0,05$) refletida nos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* entre os dois grupos genéticos de suínos avaliados, o que pode ter ocorrido devido ao número reduzido de animais avaliados, sobretudo os da raça Piau, uma vez que, ao observar os dados obtidos nas diferentes idades, constatou-se aparente efeito de grupo genético sobre a expressão destes genes.

A idade foi ($P < 0,05$) a fonte de variação mais importante no presente trabalho. De modo semelhante, Qian *et al.* (1999) encontraram a maior elevação no conteúdo de *H-FABP* ao nascimento, após avaliarem sua distribuição durante o desenvolvimento de camundongos. Todavia, os autores constataram aumento progressivo dessa proteína até a desmama, o que não foi verificado no presente estudo.

A maior expressão do gene *FABP3* logo após o nascimento pode ser explicada pela diferenciação do metabolismo muscular, da existência de processos adaptativos e do tipo de gordura ingerida/depositada.

A diferenciação das fibras musculares das oxidativas do tipo IIA para glicolíticas do tipo IIB, que se inicia aos 55 dias após a concepção (RUUSUNEN e PUOLANNE, 2004), atua no sentido de reduzir a expressão dos genes *FABPs* devido à diminuição do metabolismo oxidativo no músculo. Vale também lembrar que o período pós-natal é um período de grande adaptação na vida animal, levando à maior necessidade de energia, pelo que a beta-oxidação é mais demandada, gerando maior necessidade de atuação da *H-FABP* e, conseqüentemente, da expressão do gene *FABP3* (GLATZ *et al.*, 2003). Além disto, o início da fase de amamentação do animal leva à alteração

na composição da gordura a que os leitões têm acesso, com aumento da presença de ácidos graxos saturados, já que a gordura do leite das porcas é mais saturada que aquela de suas dietas, que são à base de milho e soja (DARRAGH e MOUGHAN, 1998). Esta alteração na composição da gordura da dieta em favor de uma maior ingestão de AGS após o nascimento inibe a expressão do gene *FABP3* (CLARKE, 2001). Por outro lado, após o período de amamentação, a oferta de dieta baseada em gordura insaturada (soja e milho) e a intensa atuação dos hormônios de crescimento, que favorecem a deposição de gordura insaturada, deveriam ter atuado no sentido de levar a um novo incremento na expressão do gene *FABP3* (CLARKE, 2001). O fato disto não ter sido observado leva a crer que a diferenciação de fibras musculares e o fim do período crítico do processo de adaptação pós-natal são mais proeminentes em seus efeitos sobre a expressão do gene *FABP3*.

Com aumento da idade, há aumento na proporção de fibras glicolíticas, com conseqüente diminuição na proporção das fibras oxidativas do tipo I e IIA (RUUSUNEN e PUOLANNE, 2004), o que possibilita a diminuição do metabolismo oxidativo no músculo e conseqüente aumento dos depósitos de gordura intramuscular devido à diminuição na concentração de H-FABP (KEMPEN *et al.*, 1998; GLATZ *et al.*, 2003). Assim, era de se esperar, especialmente nos animais Piau, que houvesse aumento no conteúdo de gordura intramuscular com o aumento da idade e correlação negativa entre essa gordura e o nível de expressão do gene *FABP3*. Entretanto, a restrição alimentar a que os animais foram involuntariamente submetidos entre o 80º e o 100º dias de idade pode ter contribuído para que a deposição de gordura na carcaça, em especial a intramuscular (mais tardia), fosse prejudicada. Esta hipótese fica evidenciada pelo fato de, mesmo após 180 dias, apenas duas fêmeas comerciais terem apresentado peso vivo acima de 85 kg, que, segundo Kolstad (2001), é o peso acima do qual suínos comerciais começam a depositar gordura inter e intramuscular.

Porém, mais importante parece ser o fato de o teor de gordura intramuscular dos animais mais novos ter se apresentado inusitadamente elevado. Embora não tenham sido encontrados na literatura argumentos capazes de esclarecer satisfatoriamente esses resultados, essas medidas de gordura podem ser decorrentes da existência, ao nascimento, de células

adipócitas precursoras do tecido adiposo. Essas células foram observadas em animais e em seres humanos, antes e após o nascimento, e descritas por Ailhaud *et al.* (1992) como células com potencial variável de replicação e diferenciação, dependente da idade e do depósito de gordura.

6.1 Análise de correlação

Contrariando os resultados obtidos no presente trabalho, Gerbens *et al.* (1999; 2001) estimulam a utilização da expressão do gene *FABP3* como preditora de características de qualidade da carne, considerando, indiretamente, o conteúdo de gordura intramuscular mais alto nas fibras musculares oxidativas. Em suínos, continuam os autores, o nível de mRNA do gene *FABP* parece ser melhor preditor de gordura intramuscular do que o conteúdo de proteína *FABP*, sendo sugerida uma regulação da expressão de *FABP3* mais em nível traducional do que transcricional.

Gerbens *et al.* (2000) avaliaram os efeitos das variações do gene *FABP4* sobre o conteúdo de gordura intramuscular e espessura de toucinho de suínos F2 provenientes do cruzamento entre a raça chinesa Meishan e raças comerciais ocidentais. O envolvimento do gene no acréscimo de gordura intramuscular foi estudado para confirmar resultados preliminares obtidos para suínos da raça Duroc. Todavia, contrariando resultados anteriores e de forma semelhante ao presente estudo, nenhuma evidência foi encontrada para o efeito do gene *FABP4* sobre o conteúdo de gordura intramuscular nessa população.

Silva (2005) comparou as seqüências de nucleotídeos do gene *FABP4* de suínos comerciais e Piau, e constatou que não houve polimorfismo de nucleotídeos nos fragmentos seqüenciados. Possivelmente, segundo o autor, o efeito no conteúdo de gordura intramuscular não seja devido à ação do gene *FABP4*, mas de um ou mais genes ligados.

Também de maneira análoga à presente pesquisa, Nechtelberger *et al.* (2001) não detectaram influência significativa dos polimorfismos do *FABP4* sobre a gordura intramuscular após estudarem a associação entre tais polimorfismos e essa característica de interesse, nas três raças mais

importantes da Áustria (Pietrain, Large White e Landrace). Em relação à dimensão desse efeito, esse marcador genético não pode, segundo os autores, ser recomendado para seleção de características de carcaça em populações de suínos da Áustria.

Apesar de a literatura apontar os genes *FABP3* e *FABP4* como sendo os membros da família *FABP* com maior semelhança estrutural (WOOTAN e STORCH, 1994), não foram encontrados dados que evidenciassem qualquer relação funcional entre eles. No entanto, com exceção do músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais, neste estudo foi observada, em todos os casos, correlação significativa entre a expressão dos referidos genes.

A correlação observada somente entre os genes avaliados e o músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais pode ter sido consequência de alterações na composição do tipo de fibras IIB e IIA sofridas por esses animais por meio de seleção intensiva para taxa de crescimento e proporções mais elevadas de carne magra. Tal hipótese é confirmada no exposto por Ruusunen e Puolanne (2004), já mencionados anteriormente, quando relatam diferenças entre os tipos de fibras de suínos comerciais e nativos.

Em adição a essa hipótese, Brameld *et al.* (1998) encontraram que muitos dos fatores envolvidos no controle do crescimento muscular e deposição de gordura são produzidos localmente nos tecidos de suínos e que a expressão dos seus genes tem sido afetada por manipulações da dieta de uma maneira tecido-específica. Apesar de esses autores não mencionarem a expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, a correlação significativa entre suas expressões, encontrada na presente pesquisa, também evidencia a existência de especificidade tecidual na ação desses genes, em suínos comerciais.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos dentro das condições experimentais da presente pesquisa, foi possível concluir que:

1. as variáveis “sexo” e “grupo genético” não foram importantes fontes de variação nos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* dos grupos genéticos de suínos avaliados;

2. o período imediatamente após o nascimento foi determinante na expressão dos genes *FABP3* e *FABP4*, quando comparado às demais idades avaliadas;

3. não houve evidências que sugerissem o envolvimento dos genes *FABP3* e *FABP4* na deposição de gordura intramuscular, indicando que esses genes não apresentaram potencial para serem utilizados como marcadores para essa característica fenotípica nas populações avaliadas; e

4. os níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* possuem potencial para serem usados como preditores precoces de adaptações e, ou, alterações metabólicas dos músculos esqueléticos pesquisados (*Longissimus dorsi* e *Semimembranosus*).

8. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

1. Análise qualitativa do conteúdo de gordura intramuscular – é interessante que sejam feitas avaliações periódicas (a cada 15 dias) do tipo de gordura intramuscular depositado, para avaliação do momento exato em que ocorre a transição na deposição de ácidos graxos insaturados para ácidos graxos saturados. Esse conhecimento auxiliará no melhor entendimento da expressão de genes envolvidos na deposição da gordura intramuscular.

2. Estudo comparativo entre músculos com metabolismos oxidativo e glicolítico – no presente estudo foram analisados somente os níveis de expressão gênica em músculos glicolíticos. É fundamental um estudo que avalie as diferenças no comportamento dos genes envolvidos na deposição da gordura intramuscular entre músculos com metabolismos diferentes.

3. Análise de espessura de gordura de cobertura, área de olho de lombo, porcentual de carne magra e da diferenciação das fibras musculares de vermelha para branca deve ser realizada ao longo do desenvolvimento do animal.

4. Estudos que visem estabelecer a influência de fatores como sexo, idade e grupo genético sobre o teor de gordura intramuscular nos músculos de suínos que apresentam valor comercial devem ser realizados.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILHAUD, G.; GRIMALDI, P.; NÉGREL, R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 12, p. 207-33, 1992.

BAND, G. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S. *et al.* Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality traits of F2 pigs resulting from divergent crosses. *Genet. Mol. Biol.*, v. 28, n. 1, p. 88-91, 2005a.

BAND, G. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S. *et al.* Relationship between the porcine stress syndrome gene and carcass and performance traits in F2 pigs resulting from divergent crosses. *Genet. Mol. Biol.*, v. 28, n. 1, p. 92-96, 2005b.

BARROS, L. B. *Efeito de diferentes planos nutricionais sobre a qualidade da carne de fêmeas suínas abatidas aos 95, 105 ou 115 kg de peso vivo.* 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

BENEVENUTO JÚNIOR, A.A. *Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados.* 2001. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

BRAMELD, J.; SENSKY, P.; BUDD, T.; HARPER, J. *et al.* *Protein and fat metabolism in muscle and adipose tissue – its influence on meat quality.* Progress and Pig Science. Nottingham University Press. Nottingham. 1998. p. 443-460.

BRANDSTETTER, A. M.; SAUERWEIN, H.; VEERKAMP, J. H.; GEAY, Y.; HOCQUETTE, J. F. Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. *Livestock Production Science*, v. 75, p. 199-208, 2002.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 25, p. 169-193, 2000 (disponível em: <<http://www.endocrinology.org>>).

CARMO, F. M. S.; GUIMARAES, S. E. F., LOPES, P. S. *et al.* Association of MYF5 gene allelic variants with production traits in pigs. *Genet. Mol. Biol.*, v. 28, n. 3, p. 363-369, 2005.

CHENG, W. T. K.; LEE, C. H.; HUNG, C. M. *et al.* Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. *Theriogenology*, v. 54, p. 1226-1237, 2000.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 1129-1132, 2001.

COLONNA-ROMANO, S.; LEONE, A.; MARESCA, B. Differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR). Berlim: Springer, 1998. 124 p.

DARRAGH A. J.; MOUGHAN, P. J. *The composition of colostrum and milk*. The Netherlands: Wageningen Pers Wageningen, 1998. p. 3-21.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons 1, 2. *J. Anim. Sci.*, v. 82, p. E313-E328, 2004. (E. Suppl.)

DEVOL, D. L.; McKEITH, F. K.; BECHTEL, P. J. *et al.* Variation in composition and palatability traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 385-395, 1988.

DONZELE, J.L.; ABREU, M. L. T.; ORLANDO, U. A. D. Nutritional Requirements and Carcass Quality of Swine of Different Sexes. Second International Virtual Conference on Pork Quality. 2001. Via Internet.

FARIA, D. A. *Associação de polimorfismos de gene do hormônio de crescimento (GH) e do marcador microssatélite do gene do fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-I) com características quantitativas em suínos*. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares*. 2. ed., Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, 1996. 219 p.

FIGUEIREDO, F. C. *Estudo do gene da proteína de ligação de ácidos graxos – coração (H-FABP) em suínos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

FUJI, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S. *et al.* Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, v. 253, p. 448-451, 1991.

GERBENS, F.; VERBURG, F. J.; Van MOERKERK, H. T. B.; ENGEL, B.; BUIST, W. *et al.* Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 79, p. 347-354, 2001.

GERBENS, F.; DE KONING, D. J.; HARDERS, F. L.; MEUWISSEN, T. H.; JANSS, L. L.; GROENEN, M. A.; VEERKAMP, J. H.; van ARENDONK, J. A.; TE PAS, M. F. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 78, n. 3, p. 552-9, 2000.

GERBENS, F.; VAN ERP, A. J.; HARDERS, F. L.; VERBURG, F. J.; MEUWISSEN, T. H.; VEERKAMP, J. H.; TE PAS, M. F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 77, n. 4, p. 846-52, 1999.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, v. 30, p. 503-512, 2002.

GLATZ, J. F. C.; SCHAAP, F. G.; BINAS, B.; BONEN, A.; van der Vusse, G. J.; Luiken, J. J. F. P. Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 178, Issue 4, p. 367-371, 2003.

GUIMARÃES, S. E. F. Análises de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, J. C. C. *Melhoramento genético aplicado à produção animal*. 3. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, p. 383-419, 2001.

HAYS, B.; GODDARD, M. E. Evaluation of marker assisted selection in pig enterprises. *Livestock Production Science*, v. 81, p. 197-211, 2003.

HERNÁNDEZ, P.; NAVARRO, J. L.; TOLDRÁ, F. Lipid composition and lipolytic enzyme activities in porcine skeletal muscles with different oxidative pattern. *Meat Science*, v. 49, n. 1, p. 1-10, 1998.

KEMPEN, K. P. G., SARIS, W. H. M.; KUIPERS, H.; GLATZ, J. F. C.; van der VUSSE, G. J. Skeletal muscle metabolic characteristics before and after energy restriction in human obesity: fibre type, enzymatic-oxidative capacity and fatty acid-binding protein content. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 28, Issue 12, p. 1030-1037, 1998.

KOLSTAD, K. Fat deposition and distribution measured by computer tomography in three genetic groups of pigs. *Livestock Production Science*, v. 67, p. 281-292, 2001.

MANUAL DA APPLIED BIOSYSTEM. Expressão gênica. Disponível em: <<http://www.abiexpert.com.br/edicoes/5%20edicao/usermetodos.htm>>. Acesso em: 15 Ago. 2003.

MEADUS, W. J. What's new in swine molecular biology? In: _____. *Swine genetics for 2000 and beyond: the new way or the old way*. Canmore, Canadá, 2000.

MILAN, D.; JEON, J. T.; LOOFT, C.; AMARGER, V.; ROBIC, A. *et al.* A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, v. 288, n. 22, p. 1248-1251, 2000.

NECHTELBERGER, D.; PIRES, V.; SOOLKNET, J.; STUR BREM, G.; MUELLER, M.; MUELLER, S. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 79, n. 11, p. 2798-804, 2001.

NOBLET, J.; SHI, X. S.; DUBOIS, S. Effect of body weight on net energy value of feeds for growing pigs. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 645-657, 1994.

PEIXOTO, J. O. *Associação entre polimorfismos no gene candidato Leptina e características quantitativas em suínos*. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

PIRES, A. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; GOMIDE, L. A. M.; BENEVENUTO JÚNIOR, A. A.; CARMO, F. M. S. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6 [Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 6 de suínos, associados à qualidade da carne]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 5, p. 608-615, 2005.

PLASTOW, G. S.; CARRIÓN, D.; GIL, M.; A-REGUEIRO, J. A.; FONT I FURNOLS, M.; GISPERT, M.; OLIVER, M. A.; VELARDE, A.; GUÀRDIA, M. D.;

- HORTÓS, M. *et al.* Quality pork genes and meat production. Review article. *Meat Science*, v. 70, Issue 3, p. 409-421, 2005.
- QIAN, Q.; KUO, L.; YU, Y. T.; ROTTMAN, J. N. A concise promoter region of the heart fatty acid-binding protein gene dictates tissue-appropriate expression. *American Heart Association*, v. 84, p. 276-289, 1999.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. *Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais.* Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 141 p.
- ROTHSCHILD, M. F. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genet Res.*, v. 83, n. 1, p. 1-6, 2004.
- ROTHSCHILD, M. F. Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comp. Funct. Genom.*, v. 4, p. 266-270, 2003.
- ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe*, v. 8, p.13-20, 1997.
- ROTHSCHILD, M. F. Identification of major genes and quantitative trait loci in swine. *NSIF Proceedings*, 1997. 7 p.
- ROTHSCHILD, M. F.; JACOBSON, D.; VASKE, D.A. *et al.* The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 93, p.201-205, 1996.
- RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Histochemical properties of fibre types in muscles of wild and domestic pigs and the effect of growth rate on muscle fibre properties. *Meat Science*, v. 67, p. 533-539, 2004.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT™ SAS *user's guide for windows environment* 6.11 ed. Cary : SAS Institute, 1995.
- SHORT, T. H.; SOUTHWOOD, O. I.; DE VRIES, A. *et al.* Evidence of a new genetic marker for litter size in pigs. *Journal of animal Science*, v. 75, p. 29, 1997. (Suppl. 1).
- SILVA, K. M. *Estudo do gene da A-FABP (proteína de ligação de ácidos graxos dos adipócitos) e mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 em suínos obtidos por cruzamento entre populações geneticamente divergentes.* 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E.; TORRES, R. A. Utilização de marcadores genéticos em suínos. II. Características de desempenho e de qualidade da carne. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, v. 11, n. 1, p. 11-20, 2003.

SZYDA, J.; GRINDFLEK, E.; LIU, Z.; LIEN, S. Multivariate mixed inheritance models for QTL detection on porcine chromosome 6. *Genet. Res.*, v. 81, p. 65-73, 2003.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes: Fisiologia dos animais domésticos. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TROXLER, R. F.; OFFNER, G. D.; JIANG, J. W.; WU, B. L.; SKARE, J. C.; MILUNSKY, A.; WYANDT, H. E. Localization of the gene for human heart fatty acid binding protein to chromosome 1p32-1p33. *Hum Genet.*, v. 92, n. 6, p. 563-6, 1993.

VEERKAMP, J. H.; van MOERKERK, H. T. B.; ZIMMERMAN, A. W. Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport. Studies on different types and mutant proteins. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, Issue 19, p. 5959-5966, 2000.

VISSCHER, P. M.; HALEY, C. S. Utilizing genetic markers in pig breeding programs. *Animal Breeding Abstracts*, v. 63, p. 1-8, 1998.

WOOTAN, M. G.; STORCH, J. Regulation of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid binding proteins by acceptor membrane lipid composition and structure. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 14, p. 10517-10523, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A – Conteúdo de gordura intramuscular (GIM) de suínos comerciais e nativos brasileiros (Piau) de ambos os sexos, em diferentes fases do desenvolvimento

Observação	Grupos Genéticos	Sexo	Tecido	Idade (em dias)	GIM (%)
1	1	1	1	1	2,10
2	1	2	1	1	1,73
3	1	1	2	1	1,78
4	1	2	2	1	2,95
5	2	1	1	1	2,46
6	2	2	1	1	2,34
7	2	1	2	1	3,08
8	2	2	2	1	2,13
9	1	1	1	21	2,66
10	1	2	1	21	2,29
11	1	1	2	21	1,51
12	1	2	2	21	1,77
13	1	1	1	60	2,22
14	1	2	1	60	2,39
15	1	1	2	60	1,20
16	1	2	2	60	1,01
17	1	1	1	90	1,55
18	1	2	1	90	1,43
19	1	1	2	90	1,21
20	1	2	2	90	1,06
21	2	1	1	90	1,69
22	2	2	1	90	1,70
23	2	1	2	90	3,78
24	2	2	2	90	2,12
25	1	1	1	120	1,70
26	1	2	1	120	1,32
27	1	1	2	120	1,38
28	1	2	2	120	1,01
29	1	1	1	180	1,80
30	1	2	1	180	1,22
31	1	1	2	180	1,52
32	1	2	2	180	0,91
33	2	1	1	180	2,27
34	2	2	1	180	3,75
35	2	1	2	180	1,22
36	2	2	2	180	1,09

Observação = animal abatido; grupos genéticos 1 = comercial e 2 = Piau; sexos 1 = macho e 2 = fêmea; tecidos 1 = *Longissimus dorsi*; 2 = *Semimembranosus*; e GIM = gordura intramuscular medida em porcentagem.

Tabela 2A – Número de animais e médias aritméticas dos pesos corporais de suínos comerciais de ambos os sexos, em diferentes fases do desenvolvimento

Idade (em dias)	Machos Castrados		Fêmeas	
	n	μ	N	μ
1	2	1,325	2	1,285
21	2	5,445	2	6,765
60	2	13,850	2	22,500
90	2	27,800	2	29,450
120	2	47,200	2	53,200
180	2	68,000	2	88,600

n = número de animais; e μ = média aritmética.

Tabela 3A – Número de animais e médias aritméticas dos pesos corporais de suínos nativos brasileiros (Piau) de ambos os sexos, em diferentes fases do desenvolvimento

Idade (em dias)	Machos Castrados		Fêmeas	
	n	μ	n	μ
Nasc.	2	0,770	2	0,965
90	2	24,485	2	19,440
180	2	42,800	2	53,350

n = número de animais; e μ = média aritmética.

Tabela 4A – Análise de variância dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais

FV	<i>FABP3</i>			<i>FABP4</i>		
	GL	QM	F	GL	QM	F
Sexo	1	0,18370	0,8767 ns	1	0,00037	0,979 ns
Idade	5	234,374	0,0007**	5	4,21843	0,016 *
Resíduo	5	6,887		5	0,47734	

ns = não-significativo.

* significativo a 5% ($p < 0,05$).

** significativo a 1% ($p < 0,01$).

Tabela 5A – Análise de variância dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais

FV	<i>FABP3</i>			<i>FABP4</i>		
	GL	QM	F	GL	QM	F
Sexo	1	9,42343	4,85 ns	1	0,12352	0,14 ns
Idade	5	6,33247	0,1102 ns	5	0,80117	0,91 ns
Resíduo	5	1,94179		5	0,87951	

ns = não-significativo.

Tabela 6A – Análise de variância do conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* de suínos comerciais

FV	Conteúdo de Gordura Intramuscular		
	GL	QM	F
Sexo	1	0,270	0,034*
Idade	5	0,347	0,010*
Resíduo	5	0,032	

* significativo a 5% ($p < 0,05$).

Tabela 7A – Análise de variância do conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Semimembranosus* de suínos comerciais

FV	Conteúdo de Gordura Intramuscular		
	GL	QM	F
Sexo	1	0,0008	0,951ns
Idade	5	0,4528	0,196ns
Resíduo	5	0,2008	

ns = não-significativo.

Tabela 8A – Análise de variância dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Longissimus dorsi* (LD) de suínos comerciais e nativos brasileiros agrupados nas idades de abate de 1, 90 e 180 dias

FV	<i>FABP3</i>			<i>FABP4</i>		
	GL	QM	F	GL	QM	F
Grupo genético	1	3,267	0,18 ns	1	3,723	3,94 ns
Sexo	1	23,629	1,34 ns	1	0,603	0,64 ns
Idade	2	965,522	54,62**	2	5,912	6,26 *
Resíduo	7	17,676		7	0,945	

ns = não-significativo.

* significativo a 5% ($p < 0,05$).

** significativo a 1% ($p < 0,01$).

Tabela 9A – Análise de variância dos níveis de expressão dos genes *FABP3* e *FABP4* no músculo *Semimembranosus* (SM) de suínos comerciais e nativos brasileiros agrupados nas idades de abate de 1, 90 e 180 dias

FV	<i>FABP3</i>			<i>FABP4</i>		
	GL	QM	F	GL	QM	F
Grupo Genético	1	124,935	4,03 (ns)	1	3,468	1,41 (ns)
Sexo	1	2,297	0,07 (ns)	1	0,211	0,09 (ns)
Idade	2	154,880	5,00 *	2	1,454	0,59 (ns)
Resíduo	7	30,984		7	2,467	

ns = não-significativo.

* = significativo a 5% ($p < 0,05$).

Tabela 10A – Análise de variância do conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* (LD) de suínos comerciais e nativos brasileiros agrupados nas idades de abate de 1, 90 e 180 dias

FV	Conteúdo de Gordura Intramuscular		
	GL	QM	F
Grupo genético	1	1,470	0,070 ns
Sexo	1	0,013	0,845 ns
Idade	2	0,531	0,260 ns
Resíduo	7	0,323	

ns = não-significativo.

Tabela 11A – Análise de variância do conteúdo de gordura intramuscular no músculo *Semimembranosus* (SM) de suínos comerciais e nativos brasileiros agrupados nas idades de abate de 1, 90 e 180 dias

FV	Conteúdo de Gordura Intramuscular		
	GL	QM	F
Grupo genético	1	1,267	0,191ns
Sexo	1	0,441	0,421ns
Idade	2	1,686	0,128ns
Resíduo	7		

ns = não-significativo.