

EVELYZE PINHEIRO DOS REIS

EXPRESSÃO DE MIOGENES EM *LONGISSIMUS DORSI* DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL DE 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
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R375e
2015 Reis, Evelyze Pinheiro dos, 1983-
 Expressão de miogenes em *longissimus dorsi* durante o
 período pré-natal de suínos / Evelyze Pinheiro dos Reis. -
 Viçosa, MG, 2015.
 viii, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador : Simone Eliza Facioni Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Suíno. 2. Expressão gênica. 3. PCR em tempo real.
4. Sequenciamento de Ácido Ribonucléico. 5. Miogênese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

EVELYZE PINHEIRO DOS REIS

EXPRESSÃO DE MIOGENES EM *LONGISSIMUS DORSI* DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL DE 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: 27 de fevereiro de 2015.

Marco Antônio Machado

Moysés Nascimento

Débora Martins Paixão
(Coorientadora)

Luciana Navajas Rennó

Simone Eliza Facioni Guimarães
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos, sobrinho, avós e demais
familiares.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar presente em minha vida me trazendo felicidade e me orientar a sempre fazer o bem.

Aos meus pais, irmãos e familiares por sempre me incentivarem a continuar os estudos e por me transbordarem de palavras de amor e carinho.

Aos meus avós queridos pelo amor que me proporcionaram nesses anos de estudos. Uma homenagem especial para aos meus avós Ana Rosa e João Paulo que me deixaram boas lembranças.

À Universidade Federal de Viçosa e Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o Doutorado. A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Simone Eliza Facioni Guimarães pela oportunidade de ser sua orientada, possibilitando que eu realizasse este trabalho e pelos direcionamentos em momentos de dúvida.

À minha coorientadora Débora Martins Paixão por ter me auxiliado na realização deste trabalho e pela ajuda nas coletas do material biológico.

À meu coorientador Fabyano Fonseca e Silva pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos vizinhos e porteiros do Edifício Sofia pela convivência amigável e as boas conversas.

Aos amigos Ana Alice, Anderson, Daniela, Danielle, Diane, Emanuel, Étori, Fernando, Juliana, Júlia, Lorraine, Marisângela, Thiago e Rafael pela amizade, convivência e companhia em muitos eventos.

Aos professores do Nucli e aos colegas de curso pelo intensivo aprendizado e convivência.

Aos amigos do LABTEC André, Carlos, Carolina, Darlene, Débora, Elcer, Érika, José Carlos, Lucas, Mayara, Vanessa, Walmir pela convivência agradável e boas conversas.

Ao técnico do LABTEC Walmir Silva por todo o auxílio durante a realização das reações de qRT-PCR.

Aos funcionários do DZO pela agradável convivência.

Ao veterinário Rogério Pinho por programar e realizar as inseminações das marrãs usadas neste experimento.

Aos funcionários da granja, em especial ao Sr. Zé, e estagiários por me auxiliarem na coleta do material biológico usado neste estudo.

BIOGRAFIA

Evelye Pinheiro dos Reis, filha de Fábio Tiburcio dos Reis e Geralda Filomena Pinheiro dos Reis, nasceu em 1 de julho de 1983 em Timóteo, Minas Gerais, Brasil.

Em 2003 iniciou o curso de bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. Durante a graduação participou do Programa de Educação Tutorial e realizou em 2007 um intercâmbio acadêmico na Universidade da Flórida e um estágio em *Everglades National Park*, na Flórida, Estados Unidos. Foi bolsista de iniciação científica realizando experimentos de genética (diversidade genética e parentesco) em uma espécie de abelha. Graduiu-se em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGGM) da UFV, realizando experimentos de genética (diversidade genética) em uma espécie de formiga. Em fevereiro de 2011 submeteu-se à defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento.

Em março de 2011, iniciou o doutorado pelo PPGGM na UFV, realizando análises de expressão gênica em suínos. Em fevereiro de 2015 submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Genética e Melhoramento.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
PERFIL DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM <i>LONGISSIMUS DORSI</i> DE SUÍNOS DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL ..	11
INTRODUÇÃO.....	11
METODOLOGIA.....	13
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
EXPRESSÃO DE MIOGENES DURANTE O DESENVOLVIMENTO PRÉ- NATAL EM <i>LONGISSIMUS DORSI</i> DE DOIS GRUPOS GENÉTICOS DE SUÍNOS DIVERGENTES	47
INTRODUÇÃO.....	47
METODOLOGIA.....	48
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMO

REIS, Evelyze Pinheiro dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2015. **Expressão de miogenes em *longissimus dorsi* durante o período pré-natal de suínos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientadores: Débora Martins Paixão e Fabyano Fonseca e Silva.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de se avaliar a expressão de miogenes, usando-se a técnica de RNAseq e qRT-PCR, em embriões inteiros (21 dias de gestação ou dpc) e em *longissimus dorsi* de fetos (aos 40, 70 e 90 dpc) de dois grupos genéticos divergentes de suínos (linhas comercial e raça local Piau), de forma a entender as diferenças bioquímicas durante a miogênese que levam a diferenças de musculabilidade entre estes suínos. O primeiro capítulo se baseou na análise de expressão diferencial pela técnica de RNAseq, comparando-se a biblioteca de transcritos identificados nos embriões e fetos de suínos comercial (tipo Landrace e Large-White) com Piau para cada idade pré-natal. Sugere-se que a 21 dpc, há um atraso na miogênese em comercial devido a uma menor expressão de miogenes nesta raça em relação a Piau. Isso pode refletir o retardo no início da diferenciação do miotoma, o que faz com que ocorra um maior período proliferativo das células do somito em comercial, sendo importante para um aumento das células miogênicas nos períodos subsequentes. Aos 40 e 70 dpc, a expressão dos miogenes é maior em fetos da linha comercial do que em Piau. Isso sugere que ocorre uma maior formação de fibras primárias aos 40 dpc e de fibras secundárias aos 70 dpc na linha comercial do que na raça Piau. A ausência de expressão diferencial de miogenes aos 90 dpc sugere que a formação das miofibras já esteja finalizada neste período em ambos os grupos genéticos. O segundo capítulo se baseou na análise da expressão de 13 miogenes por qRT-PCR nos grupos genéticos comercial (tipo Duroc, Large-White e Landrace) e Piau de suínos em cada idade pré-natal. No geral, os resultados sugerem que o gene *LEF1* é candidato primário para se explicar a diferença de musculabilidade entre essas raças, uma vez que sua expressão possivelmente leva a uma maior fusão de mioblastos em comercial em relação a Piau.

ABSTRACT

REIS, Evelyze Pinheiro dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Expression of myogenic genes in *longissimus dorsi* during prenatal periods in pigs.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: Débora Martins Paixão and Fabyano Fonseca e Silva.

This work was conducted with the aim to evaluate the expression of myogenic genes, using RNAseq and qRT-PCR techniques, in whole embryos (at 21 days of gestation or dpc) and in *longissimus dorsi* of fetuses (at 40, 70 and 90 dpc) of two different genetic groups of pigs (commercial lines and local Piau breed), in order to understand biochemical differences during myogenesis that lead to different muscularity between them. The first chapter was based on the analysis of differential gene expression by RNAseq technique, comparing libraries with identified transcripts in embryos and fetuses of commercial pigs (Landrace and Large-White type) with Piau at each prenatal age. It is suggested that at 21 dpc there is a delay on myogenesis in commercial pigs due to a lower expression of myogenic genes in this breed in relation to Piau. This can reflect a delayed onset of myotome differentiation, which causes an increased proliferative period of somite cells in commercial pigs, which is important for increasing myogenic cells in subsequent periods. At 40 and 70 dpc, expression of myogenic genes is higher in fetuses of commercial than in Piau pigs. This suggests that there is an increased formation of primary fibers at 40 dpc and secondary fibers at 70 dpc in commercial in relation to Piau pigs. Non-differential expression of myogenic genes at 90 dpc suggests that formation of myofibers is already finished at this period in both genetic groups. The second chapter was based on the expression analysis of 13 myogenic genes by qRT-PCR in commercial (Duroc, Large-White and Landrace type) and local Piau pigs at each prenatal age. Overall, the results suggest that *LEF1* gene is primary candidate to explain differences in muscularity between these breeds, since its expression could lead to a greater myoblast fusion in commercial in relation to Piau pigs.

INTRODUÇÃO GERAL

Miogênese em suínos

A fibra muscular é o principal constituinte de um tecido muscular e sua massa é determinada pelo número e tamanho das fibras musculares. A miogênese é um processo pré-natal bastante influenciado por fatores genéticos e ambientais (Rehfeldt et al., 2000), sendo caracterizado por mudanças no nível de expressão gênica e do fenótipo celular, durante a formação do tecido muscular (Te Pas et al., 2005).

A miogênese em mamíferos é um processo com muitos passos, sendo que células mesodérmicas pluripotentes (somitos) se diferenciam na linhagem miogênica, seguida pela proliferação/migração de mioblastos e duas ondas de fusão de mioblastos, que resultam na formação de dois tipos de miotubos que diferem quanto à forma e funcionalidade (Murani et al., 2007).

Durante o desenvolvimento embrionário em suínos, a formação dos somitos acontece aproximadamente dos 14 aos 22 dias de gestação (Murani et al., 2007). Somente após os somitos receberem sinais gênicos de PAX3 (Paired box 3), PAX7 (Paired box 7) e GLI (Gliotactin) emitidos a partir de tecidos vizinhos (Kollias e McDermott, 2008), eles passam a sintetizar os fatores de regulação miogênica (MRFs), que são fatores de transcrição que ativam genes específicos do músculo durante os diferentes estágios da miogênese, como o fator miogênico 5 (*MYF5*) e o fator de diferenciação miogênica (*MYOD*) (Olson, 1990; Weintraub et al., 1991; Buckingham, 2001). As células do somito determinadas a entrarem na linhagem miogênica são capazes de proliferar e se dividir para estabelecer um *pool* de mioblastos (Rehfeldt et al., 2000). Posteriormente, os mioblastos proliferantes se diferenciam, a partir de um processo em que as células deixam o ciclo celular e passam a expressar genes específicos do músculo, tal qual a miogenina (*MYOG*), que é outro importante MRF necessário para a formação de miotubos multinucleados (Keren et al., 2006; Kollias e McDermott, 2008) regulando a diferenciação terminal e o *MRF4* que está envolvido na manutenção do tecido muscular (Olson, 1990; Weintraub et al., 1991). Juntos, os MRFs cooperam

para regular a miogênese e formar as fibras musculares maduras (Keren et al., 2006; Kollias e McDermott, 2008).

A formação da fibra muscular acontece em duas ondas para formação de fibras musculares primárias e secundárias (Wigmore e Evans, 2002). Cada onda consiste da proliferação e fusão de mioblastos para formar novas fibras musculares (Te Pas et al., 2005). Enquanto a fibra muscular primária se forma *de novo*, ou seja, nos estágios iniciais de fusão do mioblasto (primeira onda de diferenciação), as fibras secundárias se formam usando as primárias como molde numa segunda onda de diferenciação (Rehfeldt et al., 2000; Te Pas et al., 2005), sendo estas a maioria das fibras do músculo esquelético (Beermann et al., 1978). Em suínos, as duas ondas de formação da fibra muscular possuem relativamente longos períodos de tempo, aproximadamente aos 30 a 60 dias e 54 a 90 dias de gestação (Wigmore e Stickland, 1983).

O número e o tamanho dos miotubos primários são fatores intrínsecos que afetam o número de fibras secundárias. Por outro lado, o número de miotubos secundários é sensível a fatores externos, como a nutrição, enquanto que o número de miotubos primários é geneticamente programado (Maltin et al., 2001).

Algumas populações de mioblastos não diferenciam para formar fibras, mas permanecem próximas as miofibras, sendo denominadas células satélites. Estas células são capazes de se dividir e servem como fonte de novos mionúcleos durante o crescimento pós-natal (Moss e Leblond, 1971; Schultz, 1974), contribuindo para o crescimento das fibras e participando do processo de regeneração muscular (Rehfeldt et al., 2000). Uma pequena porcentagem das células satélites são multipotentes e podem diferenciar em adipócitos ou fibroblastos ao invés de células miogênicas (Aguiari et al., 2008; Kuang et al., 2008; Yablonka-Reuveni et al., 2008). A formação de fibras secundárias parcialmente sobrepõe a formação de adipócitos intramusculares e fibroblastos, sendo assim o músculo esquelético é formado por esses três tipos de células: miócitos, adipócitos e fibroblastos (Du et al., 2010).

O potencial de crescimento do músculo esquelético depende do número de fibras formadas durante o período pré-natal e do grau de hipertrofia pós-natal das fibras musculares, uma vez que o aumento no tamanho da fibra é limitado por fatores genéticos e fisiológicos (Rehfeldt et al., 2000).

Estudos investigando o perfil de expressão gênica em suínos têm sido realizados com o objetivo de entender as mudanças na expressão de genes durante o crescimento e o desenvolvimento do músculo *longissimus dorsi* em raças como Duroc (Te Pas et al., 2005), entre Duroc e Pietrain (Cagnazzo et al., 2006; Murani et al., 2007), entre Piau e fetos do cruzamento entre Yorkshire x Landrace (Sollero et al., 2011) e entre Lantang e Landrace (Zhao et al., 2011), por exemplo, em diferentes idades pré-natais por meio da técnica de *differential display* RT-PCR (Murani et al., 2007) , microarranjo (Te Pas et al., 2005; Cagnazzo et al., 2006; Sollero et al., 2011) e de RNAseq (Zhao et al., 2011).

O estudo da expressão de miogenes comparando a raça local Piau e a linha comercial em períodos pré-natais por meio das técnicas de RNAseq e qRT-PCR ainda não tinha sido realizado. Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar a expressão de miogenes por RNAseq e qRT-PCR, de forma a se entender as características bioquímicas do tecido (tipo muscular) responsáveis pelas diferenças de musculabilidade entre a raça local Piau e a linha comercial.

RNAseq

Métodos de seqüenciamento de alto rendimento foram desenvolvidos para analisar as populações de RNA expressas (RNA codificante ou não codificante), sendo também conhecidos como RNAseq (Blencowe et al., 2009), permitindo oferecer um perfil de expressão gênica, anotação de genoma e descoberta de RNA não codificante (Mutz et al., 2013) de forma mais acurada do que a técnica de microarranjo (Wang et al., 2009).

O RNAseq fornece dados reprodutíveis, uma leitura quantitativa da abundância de transcritos e pode também ser usado para examinar a diversidade de *splicing* alternativo. Representa a ferramenta mais atual e mais poderosa para caracterizar o transcriptoma (Blencowe et al., 2009) e não requer o conhecimento da sequência do genoma referência (Wang et al., 2009).

O uso de replicatas no experimento de RNAseq é importante para se estimar e diminuir o erro experimental, permitindo detectar o efeito biológico do

tratamento de forma mais precisa. As replicatas biológicas são as replicatas verdadeiras, permitindo detectar variação entre as amostras biológicas utilizadas (Churchill, 2002). Já as replicatas técnicas são medidas repetidas de uma mesma amostra biológica (Marioni et al., 2008). Se o objetivo é avaliar a tecnologia usada, as replicatas técnicas sozinhas são suficientes. Por outro lado se o objetivo é avaliar as diferenças biológicas entre condições, tecidos ou tratamentos, as replicatas biológicas são essenciais (Fang e Cui, 2011). Entretanto, há relato de dados de RNAseq sendo obtidos sem o seqüenciamento de nenhuma replicata, usando-se somente *pool* de RNAs (Liu et al., 2011; Zhao et al., 2011; Li et al., 2012). O *pool* de RNAs tem sido usado em muitos estudos de expressão gênica (Kendzierski et al., 2005) para reduzir o número de corridas de seqüenciamento, por causa do preço do RNAseq quanto ao longo tempo de corrida e acesso limitado aos seqüenciadores de alto rendimento (Liu et al., 2011).

As leituras geradas pela plataforma de seqüenciamento consiste de sinais de fluorescência, os quais são convertidos em seqüências de bases por algoritmos de *base calling* específico da plataforma. Adicionalmente, um *score* de qualidade para cada base é calculado, o que indica a confiabilidade de cada *base call* (Mutz et al., 2013).

Os dados obtidos são convertidos em seqüências de leituras curtas (*short read sequences*), as quais são subsequentemente alinhadas ao genoma referência ou transcriptoma. A quantidade de *reads* mapeadas são contadas, o nível de expressão gênica calculado e pode-se então identificar genes diferencialmente expressos por meio de testes estatísticos (Mutz et al., 2013).

PCR quantitativo em tempo real

O RT-PCR em tempo real (*Real-time Reverse transcription Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica bastante usada para quantificação de mRNA em amostras biológicas. Ela é realizada em duas etapas: na primeira ocorre a transcrição reversa do molde de mRNA em cDNA (DNA complementar) e já na segunda ocorre a quantificação em tempo real de um gene particular por qPCR (reação quantitativa em cadeia da polimerase). Ela apresenta vantagens como

alto rendimento, sensibilidade por causa da análise de quantidades mínimas de cDNA, quantificação acurada (Huggett et al., 2005) e reprodutibilidade.

A transcrição reversa do RNA em cDNA pode ser realizada a partir do uso de *primers* randômicos, oligo-dT ou *primers* alvo específicos. Os *primers* randômicos iniciam a transcrição reversa em vários pontos do transcrito, o que pode produzir mais de um tipo de cDNA por transcrito alvo inicial. Por isso, este método é por definição não específico, mas bastante útil para transcritos com estrutura secundária significativa. Neste caso, a maioria do cDNA sintetizado a partir do RNA total é derivado do RNA ribossômico, uma vez que ele é bastante abundante dentro os transcritos. Isto resultaria em um problema quando se quer analisar a expressão de um gene que é transcrito em baixas quantidades. A síntese de cDNA por meio de oligo-dT é mais específica ao RNA mensageiro e não irá transcrever RNA ribossômico. Estes *primers* se ligam à cauda poli-A do mRNA e, por isso, as reações necessitam de RNA de alta qualidade, não funcionando bem em RNAs fragmentados. Já a síntese por meio de *primers* específicos sintetizam o mais específico cDNA, mas não se torna viável devido a necessidade de reações individuais para cada gene alvo (Bustin e Nolan, 2004).

Para realizar a etapa seguinte de PCR quantitativa, é necessária a construção de *primers* específicos ao transcrito, cuja expressão pretende-se investigar. O comprimento do produto da PCR é uma parte muito importante para o desenho de primers para a RT-PCR. O tamanho máximo do fragmento a ser amplificado (*amplicon*) não deve exceder 400 pb, sendo que o ideal seriam fragmentos de 80 a 150 pb, uma vez que quanto menor o *amplicon*, mais consistentes serão os resultados (Fleige et al., 2006). Quanto maior o comprimento do *amplicon*, aumenta-se a importância da qualidade do RNA. Se não for possível obter um RNA completamente intacto, será de grande utilidade desenhar *primers* para anelar em uma região interna do gene de interesse (Fleige e Pfaffl, 2006).

Os sistemas de qRT-PCR podem utilizar fluoróforos, que se intercalam a dupla fita de DNA, absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, permitindo acompanhar a reação ao longo dos ciclos no termociclador. Este fluoróforo apresenta vantagens como baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. O fluoróforo não ligado ao DNA exibe pouca fluorescência na reação, entretanto o sinal da fluorescência aumenta à medida

que o fluoróforo se liga à fita dupla do DNA nascente e diminui quando o DNA é desnaturado.

Os valores de fluorescência emitidos durante cada ciclo representam a quantidade de produto amplificado. Quanto mais cDNA molde presente no começo da reação, menor o número de ciclos que se leva para alcançar o ponto no qual o sinal de fluorescência é primeiramente gravado como estatisticamente significativo acima do *background* (Gibson et al., 1996). Este ponto é definido como o C_t (*cycle threshold*) e sempre ocorrerá durante a fase exponencial da amplificação (Bustin, 2000).

Os valores de C_t estão inversamente relacionados com a quantidade de cDNA alvo, sendo que eles diminuem linearmente com o aumento da quantidade do cDNA alvo. Essa característica faz com que os valores de C_t possam ser usados como uma medida quantitativa do número de cópias iniciais do alvo (Heid et al., 1996).

Apesar do RT-PCR em tempo real ser usado para quantificar mudanças biológicas relevantes nos níveis de mRNA, existem alguns problemas com o seu uso tais como variabilidade do RNA, variação de protocolos de extração que podem copurificar inibidores e diferentes eficiências da transcrição reversa e da PCR (Bustin e Nolan, 2004).

Para corrigir esses problemas é importante normalizar os dados de RT-PCR e um método bastante usado é o uso de gene referência ou gene interno de expressão constante (*housekeeping gene*) (Huggett et al., 2005; Nygard et al., 2007). Os genes *housekeeping* são aqueles expressos a um nível constante em vários tecidos e em todos os estágios de desenvolvimento, não sendo afetados pelo tratamento experimental (Hendriks-Balk et al., 2007).

A normalização ajusta as diferenças na quantidade e qualidade do material inicial e diferenças no preparo do RNA e síntese do cDNA, desde que o gene referência seja exposto aos mesmos passos de preparação que o gene de interesse (Stahlberg et al., 2004). Por isso, recomenda-se que o gene referência seja propriamente validado em cada experimento para determinar se a expressão gênica não é afetada pelo tratamento experimental (Livak e Schmittgen, 2001).

Os genes referência mais usados são β -actina, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate), HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) e RNA ribossomal 18S. A escolha de qual gene usar necessita de validação

(Huggett et al., 2005), uma vez que ele sempre deve possuir nível de expressão constante (Klein, 2002).

A quantificação da expressão do mRNA pode ser verificada pela quantificação relativa, por meio de um método de quantificação comparativo (método $\Delta\Delta C_T$), que se baseia no fato de que a diferença nos ciclos limiar (ΔC_T) entre o gene de interesse e o gene referência é proporcional ao nível de expressão relativa do gene de interesse (Klein, 2002). O método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ pode ser usado para calcular mudanças relativas na expressão gênica em experimentos de qRT-PCR (Livak e Schmittgen, 2001).

Um método alternativo para se avaliar a quantificação relativa se baseia em modelos mistos lineares, que é um método mais acurado, poderoso e flexível do que os métodos existentes para análise de dados de qRT-PCR, além de ser aplicado a estudos envolvendo mais de dois tratamentos ou pontos de tempo (*time points*) e múltiplos fatores experimentais. A principal vantagem do método é que ele fornece um *P-value* associado com qualquer hipótese linear geral de interesse. Adicionalmente, o modelo permite levar em consideração todas as fontes de variação e é mais poderoso que os métodos que se baseiam em comparações individuais par a par (Steibel et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiari P, Leo S, Zavan B, Vindigni V, et al. (2008). High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 1226-1231.
- Beermann DH, Cassens RG and Hausman GJ (1978). A Second Look at Fiber Type Differentiation in Porcine Skeletal Muscle. *J. Anim. Sci.* 46: 125-132.
- Blencowe BJ, Ahmad S and Lee LJ (2009). Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes Dev.* 23: 1379-1386.
- Buckingham M (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 440-448.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193.

- Bustin SA and Nolan T (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15: 155-166.
- Cagnazzo M, te Pas MF, Priem J, de Wit AA, et al. (2006). Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *J. Anim. Sci.* 84: 1-10.
- Churchill GA (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 32 Suppl: 490-495.
- Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, et al. (2010). Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* 88: E51-60.
- Fang Z and Cui X (2011). Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief. Bioinformatics* 12: 280-287.
- Fleige S and Pfaffl MW (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27: 126-139.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, et al. (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 28: 1601-1613.
- Gibson UE, Heid CA and Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 995-1001.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- Hendriks-Balk MC, Michel MC and Alewijnse AE (2007). Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic. Res. Cardiol.* 102: 195-197.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6: 279-284.
- Kendzierski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, et al. (2005). On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 4252-4257.
- Keren A, Tamir Y and Bengal E (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 224-230.
- Klein D (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* 8: 257-260.

- Kollias HD and McDermott JC (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104: 579-587.
- Kuang S, Gillespie MA and Rudnicki MA (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2: 22-31.
- Li XJ, Yang H, Li GX, Zhang GH, et al. (2012). Transcriptome profile analysis of porcine adipose tissue by high-throughput sequencing. *Anim. Genet.* 43: 144-152.
- Liu S, Lin L, Jiang P, Wang D, et al. (2011). A comparison of RNA-Seq and high-density exon array for detecting differential gene expression between closely related species. *Nucleic Acids Res.* 39: 578-588.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Maltin CA, Delday MI, Sinclair KD, Steven J, et al. (2001). Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction* 122: 359-374.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, et al. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 18: 1509-1517.
- Moss FP and Leblond CP (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec.* 170: 421-435.
- Murani E, Muraniová M, Ponsuksili S, Schellander K, et al. (2007). Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. *BMC Dev. Biol.* 7: 109.
- Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, et al. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 22-30.
- Nygard A-B, Jørgensen CB, Cirera S and Fredholm M (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 8: 67-67.
- Olson EN (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 4: 1454-1461.

- Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G and Ender K (2000). Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livest. Prod. Sci.* 66: 177-188.
- Schultz E (1974). A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat. Rec.* 180: 589-595.
- Sollero BP, Guimaraes SE, Rilington VD, Tempelman RJ, et al. (2011). Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. *Anim. Genet.* 42: 600-612.
- Stahlberg A, Kubista M and Pfaffl M (2004). Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin. Chem.* 50: 1678-1680.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM and Rosa GJ (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94: 146-152.
- Te Pas MF, De Wit AA, Priem J, Cagnazzo M, et al. (2005). Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26: 157-165.
- Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10: 57-63.
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251: 761-766.
- Wigmore PM and Evans DJ (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 216: 175-232.
- Wigmore PM and Stickland NC (1983). Muscle development in large and small pig fetuses. *J. Anat.* 137 (Pt 2): 235-245.
- Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A and Shefer G (2008). Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Anim. Sci.* 86: E207-216.
- Zhao X, Mo D, Li A, Gong W, et al. (2011). Comparative Analyses by Sequencing of Transcriptomes during Skeletal Muscle Development between Pig Breeds Differing in Muscle Growth Rate and Fatness. *PLoS ONE* 6: e19774.

CAPÍTULO I

Perfil de transcritos diferencialmente expressos em *longissimus dorsi* de suínos durante o período pré-natal

INTRODUÇÃO

A massa do tecido muscular é influenciada pelo número e tamanho de seu principal constituinte: as fibras musculares. O processo de formação deste tecido é conhecido como miogênese e ocorre durante o período pré-natal, sendo bastante influenciado por fatores genéticos e ambientais (Rehfeldt et al., 2000), que resultam em mudanças no nível de expressão gênica e do fenótipo celular (Te Pas et al., 2005).

Durante o desenvolvimento embrionário, os somitos após receberem sinais gênicos de PAX3 (Paired box 3), PAX7 (Paired box 7) e GLI (Gliotactin) emitidos a partir de tecidos vizinhos (Kollias e McDermott, 2008), passam a sintetizar os fatores de regulação miogênica (MRFs), que são fatores de transcrição que ativam genes específicos do músculo durante os diferentes estágios da miogênese, como o fator miogênico 5 (MYF5) e o fator de diferenciação miogênica (MYOD) (Olson, 1990b; Weintraub et al., 1991; Buckingham, 2001a). As células do somito determinadas a entrarem na linhagem miogênica são capazes de proliferar e dividir para estabelecer um *pool* de mioblastos (Rehfeldt et al., 2000). Posteriormente, os mioblastos proliferantes se diferenciam, a partir de um processo em que as células deixam o ciclo celular e passam a expressar genes específicos do músculo, tal qual a miogenina (*MYOG*), que é outro importante MRF necessário para a formação de miotubos multinucleados (Keren et al., 2006; Kollias e McDermott, 2008) regulando a diferenciação terminal e o *MRF4* que está envolvido na manutenção do tecido muscular (Olson, 1990b; Weintraub et al., 1991). Juntos, os MRFs cooperam para regular a miogênese e formar as fibras musculares maduras (Keren et al., 2006; Kollias e McDermott, 2008).

A formação da fibra muscular acontece em duas ondas para formação de fibras musculares primárias e secundárias (Wigmore e Evans, 2002). Cada onda consiste da proliferação e da fusão de mioblastos para formar novas

fibras musculares (Te Pas et al., 2005). Enquanto a fibra muscular primária se forma *de novo*, ou seja, nos estágios iniciais de fusão do mioblasto numa primeira onda de diferenciação, as fibras secundárias se formam usando as primárias como molde numa segunda onda de diferenciação (Rehfeldt et al., 2000; Te Pas et al., 2005), sendo estas a maioria das fibras do músculo esquelético (Beermann et al., 1978). Em suínos, as duas ondas de formação da fibra muscular possuem relativamente longos períodos de tempo, aproximadamente aos 30 a 60 dias e 54 a 90 dias de gestação (Wigmore e Stickland, 1983).

O número e o tamanho dos miotubos primários são fatores intrínsecos que afetam o número de fibras secundárias. Por outro lado, o número de miotubos secundários é sensível a fatores externos, como a nutrição, enquanto que o número de miotubos primários é geneticamente programado (Maltin et al., 2001). O número de fibras formadas durante o período pré-natal e o grau de hipertrofia pós-natal das fibras musculares determinam o potencial de crescimento do músculo esquelético, sendo que o aumento no tamanho da fibra é limitado por fatores genéticos e fisiológicos (Rehfeldt et al., 2000).

Estudos investigando o perfil de expressão gênica em suínos têm sido realizados com o objetivo de entender as mudanças na expressão de genes durante o crescimento e o desenvolvimento do músculo *longissimus dorsi* em raças como Duroc (Te Pas et al., 2005), entre Duroc e Pietrain (Cagnazzo et al., 2006; Murani et al., 2007), entre Piau e fetos do cruzamento entre Yorkshire e Landrace (Sollero et al., 2011) e entre Lantang e Landrace (Zhao et al., 2011), em diferentes idades pré-natais por meio da técnica de *differential display* RT-PCR (Murani et al., 2007), microarranjo (Te Pas et al., 2005; Cagnazzo et al., 2006; Sollero et al., 2011) e de RNAseq (Zhao et al., 2011).

O estudo da expressão de miogenes comparando a raça local Piau e a linha comercial em períodos pré-natais por meio da técnica de RNAseq ainda não tinha sido realizado. Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar a expressão de miogenes por RNAseq, de forma a se entender as características bioquímicas do tecido (tipo muscular) responsáveis pelas diferenças de musculabilidade entre a raça local Piau e a linha comercial (tipo Landrace e Large-White). Para isso, embriões inteiros aos 21 dias de gestação (dpc) e *longissimus dorsi* de fetos aos 40, 70 e 90 dpc das duas raças foram usados neste estudo.

A formação dos somitos acontece aproximadamente dos 14 aos 22 dpc (Murani et al., 2007), sendo que aos 20 dpc são encontradas somente células do somito na região onde o músculo seria formado (Swatland e Cassens, 1973). A formação das fibras primárias ocorre aproximadamente aos 30 a 60 dpc e as fibras secundárias se formam aos 54 a 90 dpc (Wigmore e Stickland, 1983). Dessa forma, as idades analisadas neste estudo permitem concluir sobre o processo de miogênese nas duas raças que diferem quanto à musculabilidade, tendo como informação a expressão gênica diferencial no período de formação dos somitos aos 21 dpc, de formação das fibras primárias aos 40 dpc e das fibras secundárias aos 70 e 90 dpc.

METODOLOGIA

Coleta de material biológico

Vinte e quatro porcas grávidas (3 porcas por idade e para cada raça) de dois grupos genéticos de suínos: raça local Piau e linha comercial (fêmeas tipo Landrace e Large-White inseminadas por macho tipo Large-White) da TOPIGS foram submetidas à cesariana. O embrião inteiro foi coletado aos 21 dias de gestação (dpc) e o músculo *Longissimus dorsi* (LD) foi coletado dos fetos aos 40, 70 e 90 dpc. Amostras de cada embrião/feto foram armazenados em solução RNA holder (BioAgency laboratórios, Brasil) por 16 horas. Depois disso, as amostras foram transferidas para -20°C até que o processamento para obtenção do RNA fosse realizado. Os procedimentos de obtenção dos embriões e fetos foram feitos de acordo com a lei de proteção dos animais aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV 85/2013).

Extração do RNA

O kit RNease Mini (QIAGEN, EUA) foi usado para a extração do RNA das amostras, segundo recomendações do fabricante.

Antes de começar a extração, os objetos usados na secção do embrião ou tecido (bisturi, pinça e pedaços de papel alumínio) e bancada foram limpos com *RNase exterminator* (BioAgency laboratórios, Brasil), com o objetivo de evitar a contaminação e a degradação do RNA a ser extraído. Microtubos de 2 mL estéreis foram identificados e neles foram adicionados 350 µL do mix Tampão RLT/ β -Mercaptoetanol (350 µL: 3 µL).

O embrião inteiro (21 dpc) ou parte do tecido LD (40, 70 e 90 dpc) armazenado no *RNA holder* (BioAgency laboratórios) foi retirado para ser pesado. O excesso de líquido foi drenado no papel alumínio antes da pesagem. O embrião/tecido foi fatiado com o uso de bisturi e pinça. O embrião inteiro foi usado na extração de RNA enquanto que 30 mg de tecido LD foi pesado e transferido para o microtubo previamente identificado e contendo o mix do Tampão.

O embrião/tecido foi macerado por meio de um homogeneizador automático por 1 min até a amostra ficar bem homogênea. Para cada extração foram usadas hastes de maceração limpas com *RNase exterminator* (BioAgency laboratórios). Em seguida foi adicionado 730 µL de água ao homogeneizado e este foi transferido para um microtubo de 2 mL. Foi adicionado 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e misturou-se bem por pipetagem. Os microtubos contendo o homogeneizado foram incubados em banho-maria a 55 °C por 15 min.

Após a incubação, o material foi centrifugado a 14000 r.p.m. a 20 °C por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL devidamente identificado. Foram adicionados 500 µL de Álcool 100% ao lisato e misturou-se bem por pipetagem. Pipetou-se 650 µL por vez do lisato na coluna previamente ajustada a outro tubo de 2 mL e, em seguida, o material foi centrifugado a 10000 rpm a 20 °C por 15 seg. O efluxo foi descartado e o mesmo tubo reutilizado até passar todo o lisato pela coluna.

Posteriormente, para lavar a coluna foram adicionados 350 µL de Tampão RW1 no topo da coluna. O tubo foi fechado e centrifugado a 10000 rpm a 20 °C por 15 seg. O efluxo foi descartado.

Foram adicionados 70 µL de Tampão RDD aos 10 µL de DNase I aliqüotada, misturando-se gentilmente para não desnaturar a DNase. Foram pipetados 80 µL do mix DNase I/Tampão RDD sobre a membrana de sílica da coluna e esta foi deixada sobre a bancada por 15 min. Após este tempo, foram

adicionados 350 μ L de tampão RW1 no topo da coluna e, em seguida, foi centrifugada a 10000 r.p.m. a 20 °C por 15 seg. Este passo permitiu lavar a coluna. O efluxo foi descartado.

Foram adicionados 500 μ L de Tampão RPE no topo da coluna, fechando o tubo com cuidado e centrifugando-se a 10000 r.p.m. a 20 °C por 15 seg. O efluxo foi descartado. Foram adicionados novamente 500 μ L de Tampão RPE no topo da coluna, fechando-se o tubo com cuidado e centrifugando-se a 10000 r.p.m. a 20 °C por 2 min. Este passo permitiu lavar a coluna de forma que não permanecesse resíduo de etanol que poderia interferir na reação.

Em seguida a coluna foi removida com cuidado, o efluxo foi descartado e a coluna colocada no tubo coletor de 1,5 mL fornecido pelo kit. Foram adicionados 30 μ L de água ultrapura no topo da coluna, fechando-se o tubo com cuidado e centrifugando a 10000 r.p.m. a 20 °C por 1 min. Reutilizando o eluído obtido, ele foi colocado no topo da coluna novamente, incubando-se à temperatura ambiente e seguiu-se a mais uma etapa de centrifugação a 14000 r.p.m. a 20 °C por 2 min para aumentar a concentração do RNA total.

Em seguida foi realizada a quantificação do RNA extraído no espectrofotômetro *NanoVue Plus™* (GE Healthcare, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.1 como controle de pureza. A pureza e a integridade do RNA foram conferidas no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA) apresentando RIN acima de 7. O efluxo contendo o RNA total com mais de 500 ng e íntegro foi armazenado em freezer -20 °C por 20 horas ou a -70 °C indefinidamente.

Cada amostra submetida a iniciar a construção das bibliotecas e posterior análise transcricional na plataforma SOLiD™ foi referente ao *pool* de três embriões ou fetos de diferentes porcas para cada idade pré-natal e para cada raça. Assim, dez microgramas de RNA de cada réplica biológica de embriões/fetos foram adicionados em um microtubo de forma a se obter uma amostra de RNA para cada tratamento (8 tratamentos), considerando-se cada raça e cada idade pré-natal.

Preparo das Bibliotecas para sequenciamento (SOLiD™)

A plataforma SOLiD™ utilizada foi a do Centro de Pesquisas René Rachou (BH/MG).

O RNA ribossomal (rRNA) foi depletado usando o Kit *RiboMinus* (Invitrogen, EUA) e a qualidade do RNA depletado foi verificada no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O rRNA foi depletado por meio de hibridação com sondas específicas marcadas com biotina e posterior captura destes complexos por esferas magnéticas ligadas a estreptavidina.

Os mRNAs obtidos foram submetidos a preparação da biblioteca de transcriptoma a ser sequenciada SOLiD™. O sistema SOLiD™ v.4 foi utilizado e todos os procedimentos de processamento de RNA foram realizadas utilizando Kit *Total RNA-seq*, conforme recomendado pelo fabricante (*SOLiD™ Total RNA-seq Kit Protocol*, Life Technologies Corporation, EUA).

Resumidamente, 1µg de RNA total depletado de cada biblioteca (oito bibliotecas totais) nas quatro idades pré-natais (21, 40, 70 e 90 dpc) e duas raças (comercial e Piau), foram fragmentados com RNase III através de incubação em termociclador 37° C por 10 minutos e interrompida pela adição de 90 µl de água sem nuclease. O RNA foi concentrado através da precipitação com etanol segundo o *RiboMinus Concentration Module* (Invitrogen). Para hibridização com adaptadores e posterior preparação de amplificação das bibliotecas de cDNA, produzidas por transcrição reversa a partir de adaptadores P1 ligados à extremidade das moléculas de RNA, foi realizado conforme protocolo do Kit *Total RNA-seq* (*SOLiD™ Total RNA-seq Kit Protocol*, Life Technologies).

Após a transcrição reversa do RNA ligado, as moléculas de cDNA foram selecionadas por tamanho entre 150 e 250 pares de base. O material amplificado foi purificado e quantificado no Qubit v 1.0 (Invitrogen). As bibliotecas foram diluídas a uma concentração ótima para a amplificação monoclonal por PCR de emulsão, utilizando *primers* complementares aos adaptadores P1 das esferas. Na PCR de emulsão estão todos os reagentes necessários para a amplificação do cDNA, mantendo cada esfera distinta da vizinha, o que assegura a ausência de contaminação durante a amplificação de mais de 10 milhões de cópias de cada fragmento inicial.

Ao término da reação de emulsão foi feita uma reação de enriquecimento, onde apenas as microesferas com fragmentos inseridos são capturadas. As esferas foram depositadas em lâminas sobre as quais as

reações sequenciais foram realizadas automaticamente pela plataforma SOLiD™, essas lâminas sem repartições asseguram a utilização de um maior volume inicial de cDNA-esferas a serem analisadas sem confundimento devido a utilização de códigos de barra.

Os dados obtidos a partir do sequenciamento com SOLiD™ foram tratados no programa SAET (SOLiD™ Accuracy Enhancer Tool), uma ferramenta que aumenta a acurácia dos dados brutos. Após este procedimento foram realizados o mapeamento das *reads* contra o transcriptoma referência com o software Bowtie (Langmead et al., 2009) e a análise da expressão diferencial por meio do software DEGseq (Wang et al., 2010).

Mapeamento e Análise da expressão diferencial in silico

O mapeamento das *reads* sequenciadas na plataforma SOLiD contra um transcriptoma de referência foi realizado por meio do programa Bowtie (Langmead et al., 2009). O transcriptoma utilizado foi baseado no genoma do *Sus scrofa* (Sscrofa10.2), atualmente ainda sendo anotado e recebendo atualizações e, por isso, foram encontrados muitos genes sem anotação e/ou com a proteína ainda não caracterizada.

A ferramenta SAMtools transforma os arquivos mapeados no Bowtie em arquivos de extensão .SAM (Sequência Alinhamento / Mapas) (Li et al., 2009) que é uma representação padrão para ler as leituras (*reads*) alinhadas no mapeamento.

Para a análise da expressão diferencial e seleção dos genes diferentemente expressos (DEG) utilizou-se o pacote DEGseq (Wang et al., 2010), encontrado no programa R/Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). O pacote em questão utiliza como *input* as leituras mapeadas no transcriptoma referência por meio da ferramenta Bowtie/SAMtools. A análise de expressão diferencial foi realizada comparando-se as leituras mapeadas da linha comercial com a raça local Piau em cada idade pré-natal.

O arquivo de saída após análise com o pacote DEGseq contém genes diferentemente expressos entre as bibliotecas e o P-value calculado para cada gene. Este P-value é confirmado pelos valores para correção de testes múltiplos que propõem uma medida de significância estatística nos estudos do

genoma baseados no conceito de Taxa de Falsa Descoberta – FDR ou q (*False Discovery Rate*). A FDR é definida como a proporção esperada de falso-positivo, oferecendo um equilíbrio entre o número de verdadeiros e falsos positivos (confiabilidade estatística) (Storey e Tibshirani, 2003).

O valor da expressão relativa entre as raças dentro das idades gestacionais é dado por meio do logaritmo na base 2 do *foldchange* ($\log_2\text{foldchange}$). O *foldchange* é a razão entre o número de *reads* para um gene, após normalização, de comercial e Piau. Neste trabalho só foram analisados os genes que foram significativos com $q \leq 0,001$. Os DEGs identificados foram separados em arquivos contendo somente genes com $\log_2\text{foldchange} < 0$ (genes mais expressos na raça Piau do que em comercial) ou ≥ 0 (genes mais expressos na linha comercial do que em Piau).

Ontologia e rede gênica

Foram obtidas as anotações do *HUGO Gene Nomenclature Committee* (símbolo do HGNC – *Human Gene Nomenclature*) para os genes diferencialmente expressos por meio do programa BIOMART/ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>), usando-se o banco de dados de genes disponível, juntamente com o conjunto de dados para *Sus scrofa*. Quando os símbolos do HGNC não estavam disponíveis para suínos, os mesmos foram obtidos por meio de análise de ortologia com o conjunto de dados para *Homo sapiens*. Posteriormente, os símbolos HGNC foram submetidos à análise de ontologia gênica no programa ToppCluster (Kaimal et al., 2010).

O programa ToppCluster é uma ferramenta da web com objetivo primário de identificar funções biológicas em conjuntos de dados que envolvem numerosos genes (Kaimal et al., 2010). O ToppCluster utiliza o teste da hipergeométrica para obter um *P-value* para 17 categorias de anotação gênica, incluindo a ontologia gênica (GO - componente celular, função molecular e processo biológico), utilizando anotações de genes ortólogos em humanos. Utilizou-se o método de correção de Bonferroni de teste múltiplos para controlar falso positivo e o ponto de corte foi o *P-value* de 0,05. O programa Cytoscape (Shannon et al., 2003) foi usado para visualizar e editar os

processos biológicos e as vias gênicas identificadas no ToppCluster. A categoria de GO relacionada ao componente celular envolve estruturas subcelulares, localização e complexos macromoleculares. Já a GO de processo biológico possui objetivos biológicos amplos, que são realizados por agrupamentos ordenados da função molecular e a GO de função molecular descreve as tarefas realizadas por produtos de genes individuais (Dennis et al., 2003). Dentre as categorias obtidas para as GOs no programa Toppcluster, foi gerada uma rede resumida contendo as categorias amostradas relacionadas ao desenvolvimento e à estrutura muscular e, conseqüentemente, foi possível identificar os genes que agruparam em cada categoria. Os genes relacionados à miogênese foram submetidos a análise no programa DAVID (Dennis et al., 2003; Huang da et al., 2009) usando-se a estatística EASE a 0,05, o que permitiu mostrar os genes em mapas de vias metabólicas, como as do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), de forma a facilitar a interpretação biológica em um contexto de rede gênica (Huang da et al., 2009). Adicionalmente os genes tiveram suas funções investigadas por meio do banco de dados presente no *Gene Cards* (Safran et al., 2010), que fornece informação concisa sobre todos genes humanos conhecidos e preditos, além de informação sobre as ontologias gênicas que não foram obtidas pelo programa Toppcluster.

RESULTADOS

As análises de expressão diferencial por meio do pacote DEGseq foram realizadas comparando-se a biblioteca de transcritos identificados nos embriões e fetos de suínos comercial com Piau para cada idade pré-natal. Para cada idade, foram gerados dois conjuntos de dados com genes *upregulated* (mais expressos na linha comercial em comparação com a raça Piau) e *downregulated* (mais expressos na linha Piau em comparação com a linha comercial). Para a idade de 21 dpc foram obtidos 2595 genes diferencialmente expressos *upregulated* e 1460 *downregulated*; para 40 dpc foram obtidos 1501 genes *upregulated* e 2498 *downregulated*; para 70 dpc, 1865 genes

upregulated e 1129 *downregulated*; e finalmente para 90 dpc, 823 genes foram *upregulated* e 494 *downregulated* (Tabela 1).

A partir da análise de GO no programa Toppcluster foram identificadas as categorias relacionadas ao desenvolvimento muscular e a estrutura da fibra muscular. Assim, 228 miogenes foram *downregulated* aos 21 dpc; 90 *upregulated* aos 40 dpc; 23 *upregulated* aos 70 dpc e nenhum miogene foi identificado aos 90 dpc (Tabela 1).

Tabela 1: Número de genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas da linha Comercial e raça Piau.

Comparação entre diferentes bibliotecas	Número de genes diferencialmente expressos (DEG)					
	Geral			Miogenes		
	DEG up	DEG down	DEG Total	DEG DM up	DEG DM down	DEG DM Total
21C/21P	2595	1460	4055	0	228	228
40C/40P	1501	2498	3999	90	0	90
70C/70P	1865	1129	2994	23	0	23
90C/90P	823	494	1317	0	0	0

C: Comercial; P: Piau; DEG: genes diferencialmente expressos; up: *upregulated*; down: *downregulated*; DM: desenvolvimento muscular

Redes gênicas relacionadas ao desenvolvimento e à estrutura muscular

A análise de GOs no programa Toppcluster para todos os genes diferencialmente expressos, identificados pela análise de RNAseq, gerou uma rede com 440 categorias, sendo que dentre elas foram selecionadas 23 categorias com relação direta ao desenvolvimento e à estrutura muscular que formaram uma rede resumida (Figura 1). Estas categorias incluem: 1) Banda I; 2) Complexo miosina II; 3) Complexo miosina muscular; 4) Constituinte estrutural do músculo; 5) Contração do músculo esquelético; 6) Desenvolvimento do embrião de Cordados; 7) Desenvolvimento do embrião; 8) Desenvolvimento da estrutura muscular; 9) Desenvolvimento do órgão; 10) Desenvolvimento do órgão muscular; 11) Disco Z; 12) Fibra contrátil; 13) Finalização do desenvolvimento do embrião ao nascimento; 14) Ligação a

miosina II; 15) Miofibrila; 16) Morfogênese do órgão; 17) Morfogênese do tecido; 18) Movimento do músculo esquelético; 19) Parte da fibra contráctil; 20) Processo do sistema muscular; 21) Regulação da contração do músculo esquelético; 22) Sarcômero; e 23) Sarcoplasma. Estas categorias juntamente com os seus genes podem ser melhor visualizadas nas Tabelas Suplementares 1, 2, 3 com as GOs de componente celular, função molecular e processo biológico, respectivamente.

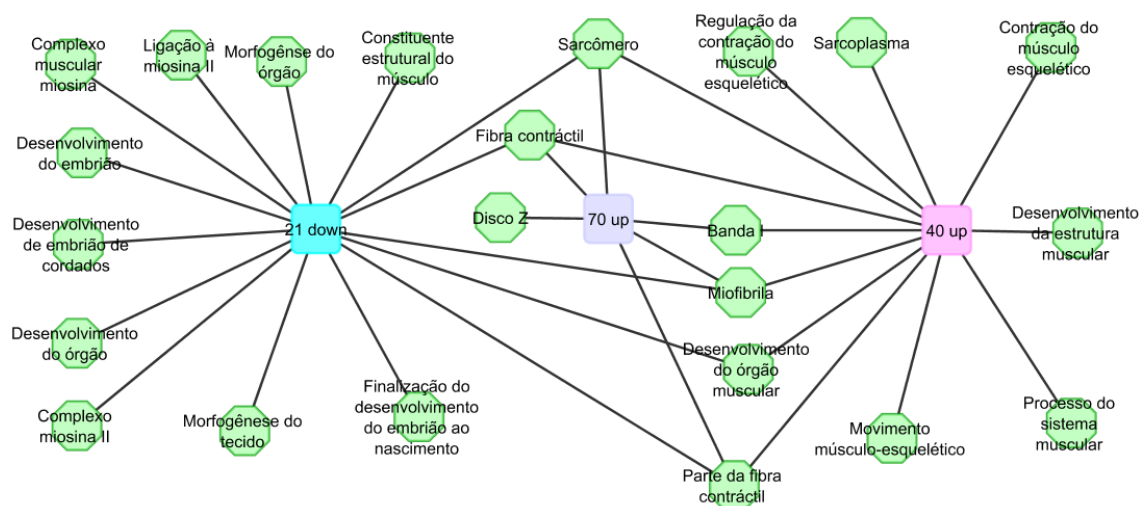


Figura 1: Rede gênica resumida contendo as categorias de Ontologia Gênica selecionadas com relação ao desenvolvimento muscular e a estrutura da fibra muscular em suínos nas idades pré-natais de 21, 40 e 70 dpc em que foram identificados. Os genes aos 21 dpc foram *downregulated*, ou seja, mais expressos em embriões de Piau do que em comercial. Aos 40 e 70 dpc, os genes foram *upregulated*, ou seja, mais expressos em fetos de comercial do que em Piau.

Aos 21 dias de gestação, 228 miogenes foram *downregulated*, ou seja, mais expressos em embriões de suínos Piau que em comercial. Dentre eles estão genes que compõem o complexo miosina II, complexo miosina muscular, constituinte estrutural do músculo, desenvolvimento do embrião, desenvolvimento do embrião de Cordados, desenvolvimento do órgão, desenvolvimento do órgão muscular, fibra contráctil, finalização do desenvolvimento do embrião ao nascimento, ligação à miosina II, miofibrila, morfogênese do órgão, morfogênese do tecido, parte da fibra contráctil e sarcômero.

Aos 40 dpc, 90 miogenes foram *upregulated*, ou seja, mais expressos nos fetos de suínos comercial que em Piau. Dentre eles estão genes que compõem a banda I, contração do músculo esquelético, desenvolvimento da estrutura muscular, desenvolvimento do órgão muscular, fibra contráctil, miofibrila, movimento do músculo esquelético, parte da fibra contráctil, processo do sistema muscular, regulação da contração do músculo esquelético, sarcômero e sarcoplasma.

Aos 70 dpc, 23 miogenes foram *upregulated*, ou seja, mais expressos nos fetos de suínos comercial que em Piau. Estes genes compõem a fibra muscular, Banda I, Disco Z, parte da fibra contráctil, miofibrila e sarcômero. E aos 90 dpc, nenhum miogene foi identificado na análise de GO.

Vias metabólicas em que miogenes estão inseridos

Os miogenes presentes nas 23 categorias selecionadas foram analisados no programa DAVID, onde foi possível identificar as vias metabólicas em que os genes estão inseridos (Tabela Suplementar 4). Algumas vias se destacam, devido à importância para o desenvolvimento muscular como adesão focal, interação receptor-ECM (ECM: matriz extracelular), regulação do citoesqueleto de actina, vias de sinalização do cálcio, HEDGEHOG, MAPK e WNT.

Aos 21 dias de gestação, os miogenes foram mais expressos em embriões de suínos Piau do que em comercial (genes *downregulated*) e as seguintes vias metabólicas foram consideradas as mais importantes para o desenvolvimento muscular: adesão focal, interação receptor-ECM, vias de sinalização HEDGEHOG e WNT, regulação do citoesqueleto de actina (Tabela Suplementar 5).

Aos 40 e 70 dias de gestação, os miogenes foram mais expressos em fetos de suínos comercial do que em Piau (genes *upregulated*). Aos 40 dias, as seguintes vias metabólicas foram consideradas as mais importantes: vias de sinalização do cálcio, MAPK e regulação do citoesqueleto de actina (Tabela Suplementar 6). Aos 70 dias, somente a via de sinalização do cálcio foi considerada importante (Tabela Suplementar 7). Aos 90 dpc, não foi

identificada nenhuma via metabólica, uma vez que nenhum miogene foi identificado na análise de GO.

Assim, com base na informação da ontologia gênica e da via metabólica foi possível identificar genes com funções relacionadas a fisiologia muscular, o que permitiu inserir esses genes em redes metabólicas funcionais com a adição de cinco outros genes (*CSRP3*, *HIF1AN*, *MYOG*, *RSPO3* e *SOX7*), que foram identificados como importantes por estarem envolvidos no processo de desenvolvimento muscular e a estrutura da fibra muscular. Os genes identificados estão presentes em processos biológicos importantes para a musculabilidade como, por exemplo, contração do músculo esquelético, desenvolvimento do embrião, desenvolvimento do órgão, desenvolvimento do órgão muscular, desenvolvimento da estrutura muscular, movimento músculo-esquelético e processo do sistema muscular, além das funções moleculares de diferenciação muscular e fibra contrátil.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o perfil da expressão gênica diferencial de transcritos foi investigado após sequenciamento do RNA (RNAseq) de embriões inteiros aos 21 dpc e de tecido muscular *longissimus dorsi* de fetos aos 40, 70 e 90 dias de gestação. O período de 21 dpc envolve a formação de somitos que ocorre aproximadamente dos 14 aos 22 dpc (Murani et al., 2007). Além disso, os períodos de 40, 70 e 90 dpc compreendem os estágios das duas ondas de fusão dos mioblastos para a formação das fibras primárias e secundárias (Wigmore e Stickland, 1983; Wigmore e Evans, 2002) e, por isso, os períodos analisados fornecem informações sobre os mecanismos moleculares e bioquímicos durante o desenvolvimento do músculo esquelético entre dois grupos genéticos que diferem quanto à musculabilidade.

A massa muscular é influenciada pelo número e tamanho das fibras musculares, que é o principal constituinte do músculo (Rehfeldt et al., 2000) e, por esta razão, este trabalho focou na identificação de genes envolvidos com a formação das células da linhagem miogênica nos períodos analisados, uma vez que a expressão diferencial observada entre os dois grupos genéticos poderia explicar as diferenças de musculabilidade entre as duas raças.

Suíños da raça Piau nunca participaram de um programa de melhoramento animal e, por isso, espera-se que animais desta raça apresentem um alto nível de gordura do que animais da linha comercial (Serao et al., 2011), que apresentam maior quantidade de músculo. Assim, amostras obtidas dos embriões e fetos dos grupos genéticos Piau e linha comercial (tipo Landrace e Large-White) foram usadas para permitir comparações entre raças para cada idade pré-natal, de forma a identificar genes que poderiam explicar as diferenças fenotípicas observadas entre as duas linhas genéticas no período pós-natal.

O desenvolvimento muscular é um processo biológico complexo, regulado por inúmeros genes que interagem e uma série de vias de transdução de sinal (Zhao et al., 2011). A atividade dos fatores de regulação miogênica (MRFs) são controlados tanto por vias regulatórias que ativam ou inibem a sua atividade, e fatores adicionais são também prováveis de estarem envolvidos em muitos dos circuitos de transcrição que controlam a miogênese (Kong et al., 1997). Neste trabalho foram identificadas sete vias de sinalização importantes para o desenvolvimento muscular, sendo elas as vias de adesão focal, interação receptor-ECM, regulação do citoesqueleto de actina, de sinalização do cálcio, HEDGEHOG, MAPK e WNT.

Aos 21 dpc, verificou-se que a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da fibra muscular e sua estrutura é maior em embriões da raça Piau do que da linha comercial. Nesta idade, foram identificados genes pertencentes às vias de adesão focal, interação receptor-ECM, regulação do citoesqueleto de actina e de sinalização HEDGEHOG e WNT, sendo, portanto, mais expressos em embriões de Piau do que em comercial. A via de adesão focal é importante por transmitir o sinal extracelular para o núcleo, resultando em uma apropriada resposta celular ao microambiente (Yu et al., 2013). A via de interação receptor-ECM possui um papel morfogênético em guiar a diferenciação e o rearranjo das células (Reilly e Engler, 2010). As interações celulares com a ECM são determinantes de funções da célula e do tecido como sobrevivência, crescimento e diferenciação (Giancotti e Ruoslahti, 1999). Os genes presentes na via de sinalização de regulação ao citoesqueleto de actina podem indicar um remodelamento funcional e estrutural da célula ocorrendo durante o desenvolvimento, incluindo, por exemplo, a formação do aparato contrátil (Murani et al., 2007). A via de sinalização HEDGEHOG está envolvida

na proliferação celular, diferenciação e modelamento do tecido (Heretsch et al., 2010), além de especificar padrões de crescimento celular e diferenciação (Ingham e McMahon, 2001). A via de sinalização WNT pode controlar a expressão de fatores de regulação miogênica (MRFs) como *MYF5* e *MYOD*, influenciando a sobrevivência e a diferenciação miogênica (Cossu e Borello, 1999; von Maltzahn et al., 2012).

O período de 21 dpc é caracterizado pela expressão de fatores de transcrição que ativam ou regulam a expressão de genes envolvidos na formação e proliferação de células do somito. Por exemplo, os genes codificadores para as moléculas de colágeno (*COL3A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL1A1* e *COL5A1*) pertencem às vias de sinalização de interação receptor-ECM e de adesão focal. O colágeno intramuscular é importante por fornecer suporte, ligação e nutrição para as células (Bao et al., 2007).

ITGA5 pertence às vias de sinalização interação receptor-ECM, de adesão focal e regulação do citoesqueleto de actina. Este gene codifica para uma subunidade da integrina, que forma o receptor para a fibronectina, necessária durante o desenvolvimento embrionário. As integrinas possuem capacidade de mediar interações celulares, motilidade e sinalização intracelular, além de serem importantes para a morfogênese do tecido durante o desenvolvimento (Tarone et al., 2000).

Os genes *GLI3*, *PTCH1* e *SUFU* pertencem a via de sinalização HEDGEHOG. *GLI3*, na ausência da sinalização HEDGEHOG, atua na inibição da sinalização WNT por meio da inativação da β -catenina (Ulloa et al., 2007). *PTCH1* codifica para uma proteína receptora da via de sinalização HEDGEHOG que pode reprimir a expressão de genes alvo da via como o fator de transcrição *GLI1* como também dele mesmo, mantendo um balanço essencial para o desenvolvimento normal (Rahnama et al., 2006). *SUFU* participa como regulador negativo da via de sinalização HEDGEHOG, por meio da supressão da atividade e função dos fatores de transcrição *GLI* (Ding et al., 1999), que pode aumentar a expressão de genes específicos do músculo como *MYOD* (Voronova et al., 2013).

WNT1 pertence a via de sinalização HEDGEHOG e WNT. Este gene possui forte atividade mitogênica e transformadora e, provavelmente, atua como fator de sobrevivência (Wodarz e Nusse, 1998). Possui o potencial de ativar direta ou indiretamente a transcrição de *MYF5* e *MYOD*, e também

promover a sobrevivência e a expansão da população de células do somito determinada a entrar na linhagem miogênica (Cossu e Borello, 1999).

Os genes *MRAS*, *FGF2* e *MYLK* pertencem a via de regulação do citoesqueleto de actina. *MRAS* pode regular negativamente a expressão ou função dos fatores de transcrição específicos do músculo como *MYOD* e da família *MEF2* (Lassar et al., 1989; Winter e Arnold, 2000; Tortorella et al., 2001). *FGF2* pode estar relacionado com a indução de síntese de DNA, sendo detectadas proteínas somente em células musculares esqueléticas proliferantes (Hannon et al., 1996).

Os genes *DVL2*, *CHD8* e *LEF1* estão presentes na via de sinalização WNT. *DVL2* pode inibir a miogênese (Yamaguchi et al., 2012). *CHD8* pode atuar como regulador negativo da atividade transcricional de vários genes induzidos pela ativação da via de sinalização WNT/ β -catenina (Nishiyama et al., 2012), além de poder prevenir a apoptose (Nishiyama et al., 2009). *LEF1* pode induzir a progressão do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose por meio da ativação da transcrição de *E2F1* (Zhou et al., 2008).

Um outro gene que podemos citar é *AKT2*, que está presente na via de adesão focal. Este gene pode funcionar como um gene anti-apoptótico controlando a sobrevivência celular durante o processo de diferenciação (Fujio et al., 2001).

Além destes genes, os miogenes *RSPO3* e *SOX7*, não incluídos em vias metabólicas, foram considerados importantes para o progresso do desenvolvimento da fibra muscular. *RSPO3* é um regulador positivo da miogênese no músculo esquelético por meio da ativação da via de sinalização WNT/ β -catenina, sendo também um sinal para a indução da expressão de *MYF5* (Han et al., 2011). *SOX7* é um regulador negativo da via de sinalização WNT/ β -catenina (Chan et al., 2012), podendo funcionar como um gene supressor de tumor (Takash et al., 2001).

De forma interessante, Cagnazzo et al. (2006) analisaram a expressão de transcritos em músculo *longissimus dorsi* em fetos e embriões de suínos Pietrain (tipo carne) e Duroc (tipo gordura), que diferem quanto à musculosidade. Observaram que a expressão de miogenes foi maior em Duroc do que em Pietrain aos 14 a 49 dpc e, assim, os autores sugeriram que o processo de miogênese em Pietrain é tardio, o que pode resultar em um amplo *pool* de células satélites miogênicas disponível para a hipertrofia muscular, ou

possivelmente em um aumento no número de miofibras. De forma semelhante, nossos resultados sugerem que o processo de miogênese na linha comercial (tipo carne) seja mais tardio do que em Piau (tipo gordura) aos 21 dpc, o que possivelmente é responsável pela maior musculosidade pós-natal observada em comercial.

De fato, sugere-se que o possível atraso na miogênese em comercial é devido a menor expressão de miogenes a 21 dpc e pode refletir o retardo no início da diferenciação do miotoma. Esse retardo já foi detectado em uma linha de codornas e permite um aumento nas populações de células precursoras que proliferam por um tempo maior, resultando em um aumento nas células miogênicas nos períodos subsequentes (Coutinho et al., 1993).

Além disso, os miogenes foram agrupados nas GOs de complexo miosina II, complexo miosina muscular, constituinte estrutural do músculo, fibra contráctil, ligação a miosina II, miofibrila, parte da fibra contráctil e sarcômero, que indicam que as células neste período expressam genes específicos do músculo para formarem posteriormente a estrutura da fibra muscular. Há um controle do número de células determinadas a entrarem na linhagem miogênica e proliferação de somitos por meio do balanço de expressão de ativadores e inibidores da miogênese.

Aos 40 e 70 dpc, a expressão diferencial de genes relacionados ao músculo é maior em fetos da linha comercial do que da raça Piau. Isso sugere que pode ocorrer uma maior formação de fibras primárias aos 40 dpc e de fibras secundárias aos 70 dpc na linha comercial em relação a raça Piau, o que pode ser responsável pela maior musculosidade pós-natal em comercial. De fato, o número de fibras secundárias é afetada pelo número e tamanho das fibras primárias, sendo sensível aos fatores externos como a nutrição, e o número de fibras primárias é geneticamente programado (Maltin et al., 2001). Já a ausência de expressão de miogenes aos 90 dpc sugere que o processo de formação das miofibras já esteja finalizado neste período em ambos os grupos genéticos.

Aos 40 dpc, os DEGs pertencentes as vias de sinalização do cálcio, MAPK e regulação do citoesqueleto de actina foram mais expressos em fetos de comercial do que em Piau. Os genes pertencentes a via de sinalização de regulação ao citoesqueleto de actina pode indicar um remodelamento funcional e estrutural da célula (Murani et al., 2007) durante a primeira onda de fusão de

mioblastos e, por isso, sugerimos que a formação de fibras primárias seja mais intensa em comercial do que em Piau. De fato, genes pertencentes a via de sinalização MAPK podem ativar fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação (Keren et al., 2006) como MEF2A, MEF2C e MYOD (Wu et al., 2000), podendo acelerar a diferenciação de mioblastos (Lechner et al., 1996). Adicionalmente, a sinalização de cálcio pode ativar a proliferação celular, promovendo a síntese de DNA e a mitose (Berridge, 1995). Assim, os resultados indicam uma maior síntese de DNA em comercial do que em Piau, como resultado da proliferação de mioblastos e sua primeira onda de fusão para formação de fibras primárias. Além disso, algumas GOs identificadas nesta idade indicam que as fibras primárias já expressam genes envolvidos com o desenvolvimento da sua estrutura e fisiologia (GOs como banda I, contração do músculo esquelético, desenvolvimento da estrutura muscular, fibra contrátil, miofibrila, movimento do músculo esquelético, parte da fibra contrátil, regulação da contração do músculo esquelético, sarcômero e sarcoplasma).

Este período de 40 dpc é caracterizado pela expressão de fatores de transcrição que ativam ou inibem a expressão de genes para a diferenciação de mioblastos em miotubos primários (primeira onda de fusão). Por exemplo, *ATP2A1* e *TNNC2* pertencem a via de sinalização do cálcio. *ATP2A1* já foi descrito como *upregulated* durante a diferenciação de mioblastos em miotubos (Stenoien et al., 2007). *TNNC2* codifica para a subunidade do filamento fino miofibrilar de ligação ao cálcio que regula o acoplamento excitação-contração do músculo (Li et al., 2008).

CACNA1S pertence a via de sinalização do cálcio e MAPK. Este gene codifica para um canal de voltagem de Ca^{+2} que funciona como um sensor de voltagem no acoplamento excitação-contração do músculo esquelético (Tuluc et al., 2009). A expressão funcional destes canais de cálcio podem parcialmente contribuir para o processo de fusão (Bidaud et al., 2006). De fato, o bloqueio de canais de cálcio pode inibir a diferenciação de mioblastos, uma vez que há uma diminuição de Ca^{+2} intracelular (Porter et al., 2002).

MYLK2 pertence às vias de sinalização do cálcio e de regulação do citoesqueleto de actina. Este gene codifica para uma enzima dependente de Ca^{+2} e calmodulina que é responsável pela contração muscular por meio da fosforilação da cadeia leve respiratória da miosina sarcomérica, o que facilita a

interação da miosina com os filamentos de actina (Lazar e Garcia, 1999; Stull et al., 2011).

FGF6 e *FGF8* pertencem as vias de sinalização MAPK e de regulação do citoesqueleto de actina. *FGF6* é capaz de regular a diferenciação do músculo esquelético. Ele pode inibir a miogênese por meio da inativação das proteínas HLH (*Helix Loop Helix*) miogênicas após downregular a transcrição de *MYOD1* e *MYOG* (Coulier et al., 1994). *FGF8* inibe a expressão de desmina e regula a diferenciação de mioblastos em miotubos por meio da regulação da expressão de *MYOD* (Omoteyama e Takagi, 2009).

MAP2K1 e *MEF2C* pertencem a via de sinalização MAPK. *MEF2C* é um fator de transcrição da família MEF e já foi descrito como *upregulated* durante a diferenciação do mioblasto no músculo esquelético (Martin et al., 1993). *MAP2K1* pertence às vias de sinalização MAPK e de regulação do citoesqueleto de actina. Este gene possui papéis contrários dependendo do estágio de diferenciação miogênica (Jo et al., 2009). Por exemplo, *MAP2K1* pode atuar negativamente no controle da proliferação de mioblastos, por meio da supressão da atividade de *MYOD* nos estágios iniciais da miogênese (Perry et al., 2001). Entretanto, posteriormente a presença de *MAP2K1* no núcleo de mioblastos proliferantes pode ter um papel estimulatório na diferenciação muscular (Jo et al., 2009).

Os seguintes miogenes não incluídos em vias metabólicas se demonstraram importantes para o progresso da miogênese: *CSRP3*, *HIF1AN* e *MYOG*. *CSRP3* é um regulador positivo que promove a diferenciação miogênica de mioblastos, sendo primeiramente expresso e acumulado no núcleo quando há formação e crescimento de miotubos (Arber et al., 1994). *HIF1AN* está envolvido na regulação negativa da apoptose (Yan et al., 2011), e além disso é importante para a diferenciação dos mioblastos, sendo um fator de transcrição crucial na regulação da miogênese (Li et al., 2007). *MYOG* é um MRF importante na diferenciação muscular sendo necessário para a formação de miotubos multinucleados (Keren et al., 2006; Kollias e McDermott, 2008).

Estes resultados em conjunto sugerem que aos 40 dpc há expressão diferencial de miogenes favorecendo a maior fusão de mioblastos em comercial do que em Piau, o que pode ser responsável pela formação de mais fibras primárias em comercial, sendo esta característica geneticamente programada (Maltin et al., 2001). Alguns genes inibidores da miogênese foram

diferencialmente expressos nesta idade como *FGF6* e *FGF8*. Isso indica que além da ativação de miogenes ocorre também a regulação destes genes para se controlar a diferenciação celular de forma a se ter o número correto de células no tecido muscular, uma vez que o número de miotubos primários afeta o número de miotubos secundários (Maltin et al., 2001).

Aos 70 dpc, os DEGs pertencentes a via de sinalização do cálcio foram mais expressos em fetos de comercial do que em Piau. Como esta via pode ativar a síntese de DNA e a mitose (Berridge, 1995), sugere-se uma maior síntese de DNA e mitose em comercial do que em Piau, como resultado da proliferação de mioblastos e sua segunda onda de fusão para formação de fibras secundárias. Nesta idade, somente poucos miogenes diferencialmente expressos foram identificados, sendo relacionados às GOs de fibra muscular, Banda I, Disco Z, parte da fibra contráctil, miofibrila e sarcômero.

Como exemplos pode-se mencionar os genes *ATP2A1*, *CACNA1C* e *RYR1*. *ATP2A1* também foi diferencialmente expresso aos 40 dpc neste estudo e já foi descrito como *upregulated* durante a diferenciação de mioblastos em miotubos (Stenoien et al., 2007). *RYR1* codifica o receptor de ryanodina que possui a função de mediar a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático para o meio intracelular do músculo esquelético (Rossi et al., 2007). *CACNA1C* é um canal de voltagem de Ca^{+2} que está localizado próximo ao canal de liberação de Ca^{+2} (*RYR1*) no retículo endoplasmático. Com a despolarização da membrana, *CACNA1S* sofre uma alteração conformacional que rapidamente ativa *RYR1*, por meio de interações proteína-proteína (Tuluc et al., 2009). O funcionamento dos canais de Ca^{+2} é necessário para a diferenciação de mioblastos (Porter et al., 2002).

Estes resultados indicam que aos 70 dpc há uma maior fusão de mioblastos para a formação de miotubos secundários em fetos de comercial do que em Piau. Além disso, a formação de maior número de fibras primárias aos 40 dpc em comercial do que em Piau favorece uma maior formação de fibras secundárias aos 70 dpc em comercial em relação a Piau. De fato, as fibras secundárias se formam usando as primárias como molde (Rehfeldt et al., 2000; Te Pas et al., 2005), sendo que seu número é influenciado pelo número de miotubos primários já formados (Maltin et al., 2001).

Aos 90 dpc, não foram identificados miogenes pela análise de GO e, portanto, não foi possível identificar vias metabólicas. Esse resultado sugere

que o desenvolvimento da fibra muscular e da sua estrutura já estejam finalizados aos 90 dpc. De fato, a segunda onda de fusão de mioblastos para a formação de fibras secundárias em suínos começa aos 54 dpc finalizando aos 90 dpc (Wigmore e Stickland, 1983).

Em resumo, a maior expressão dos miogenes em Piau do que em comercial aos 21 dpc indica que a miogênese seja tardia em comercial, o que pode resultar em um maior período proliferativo das células do somito nesta raça, sendo importante para a formação de um maior número das outras células da linhagem miogênica em comercial. Aos 40 e 70 dpc, os genes são mais expressos em comercial do que em Piau. Como estes períodos são críticos na formação das fibras musculares, sugerimos que miogenes expressos, em sua maioria, favorecem a uma maior fusão de mioblastos em comercial do que em Piau para originarem os miotubos primários e secundários, fazendo com que comercial apresente maior musculosidade pós-natal que Piau. As informações discutidas neste trabalho podem ser melhor visualizadas no fluxograma representado na Figura 2.

É importante lembrar que o número de fibras formadas durante o período pré-natal e o grau de hipertrofia pós-natal das fibras musculares determinam o potencial de crescimento do músculo esquelético, sendo que o aumento no tamanho da fibra é limitado por fatores genéticos e fisiológicos (Rehfeldt et al., 2000). A musculosidade pós-natal observada em comercial é maior do que em Piau, sendo consequência do maior período proliferativo das células do somito e do maior número de fibras primárias e secundárias formadas em comercial durante o período pré-natal. Em nosso estudo, por meio da análise da expressão de miogenes, foi possível sugerir que a miogênese em comercial é tardia e que aos 40 e 70 dpc ocorre uma maior expressão de miogenes que estimulam a diferenciação de mioblastos para formação das fibras primárias e secundárias.

Assim, os genes listados neste estudo representam possíveis candidatos para se avaliar o desenvolvimento do músculo pré-natal de forma a explicar as diferenças de musculosidade observadas em indivíduos adultos de outros grupos genéticos divergentes. Além disso, este estudo fornece novos dados em relação a expressão diferencial de miogenes envolvidos em quatro períodos (21, 40, 70 e 90 dpc) que compreendem a formação dos somitos e as duas ondas de formação das miofibras, contribuindo para um melhor

entendimento dos fatores genéticos que atuam durante a miogênese em suínos comercial (tipo Landrace e Large-White) e Piau.

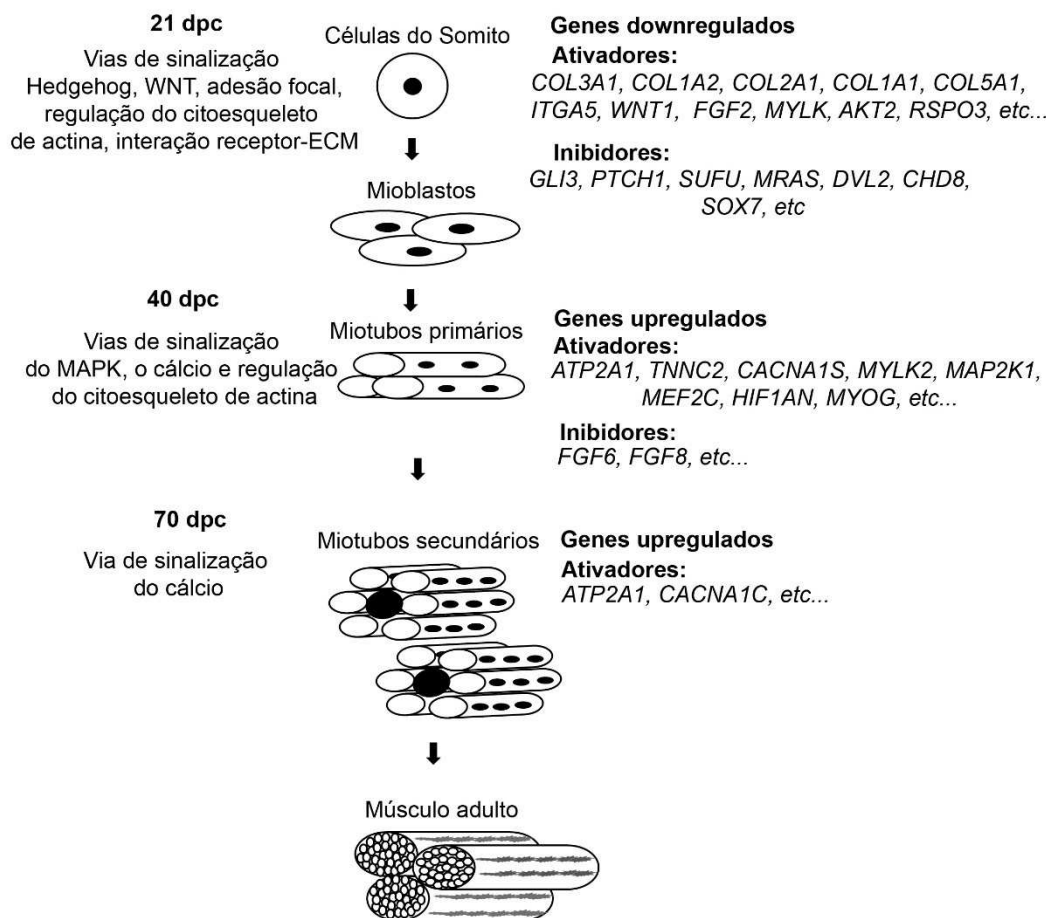


Figura 2: Resumo da regulação da miogênese por genes diferencialmente expressos comparando-se comercial com Piau. Aos 21 dpc, os miogenes foram *downregulated*, ou seja, mais expressos em Piau do que em comercial. Aos 40 e 70 dpc, os miogenes foram *upregulated*, ou seja, mais expressos em comercial do que em Piau. Indicados estão as vias metabólicas identificadas em cada idade e os genes ativadores e inibidores da miogênese.

CONCLUSÕES

Ao se comparar embriões aos 21 dpc de suínos comercial (tipo Landrace e Large-White) e raça local Piau, sugere-se que a miogênese em comercial é tardia.

Ao se comparar fetos aos 40 e 70 dpc de suínos comercial e Piau, identificou-se uma maior expressão de miogenes que estimulam a fusão de

mioblastos em comercial do que em Piau para originarem fibras primárias e secundárias.

A miogênese é regulada por um balanço de genes ativadores e inibidores.

Aos 90 dpc, não há expressão diferencial de miogenes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arber S, Halder G and Caroni P (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79: 221-231.
- Bao X, Zeng Y, Wei S, Wang G, et al. (2007). Developmental changes of Col3a1 mRNA expression in muscle and their association with intramuscular collagen in pigs. *J. Genet. Genomics* 34: 223-228.
- Beermann DH, Cassens RG and Hausman GJ (1978). A Second Look at Fiber Type Differentiation in Porcine Skeletal Muscle. *J. Anim. Sci.* 46: 125-132.
- Berridge MJ (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17: 491-500.
- Bidaud I, Monteil A, Nargeot J and Lory P (2006). Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 27: 75-81.
- Buckingham M (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11: 440-448.
- Cagnazzo M, te Pas MF, Priem J, de Wit AA, et al. (2006). Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *J. Anim. Sci.* 84: 1-10.
- Chan DW, Mak CS, Leung TH, Chan KK, et al. (2012). Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt/b-catenin signaling in endometrial cancer. *Oncotarget* 3: 1546-1556.
- Cossu G and Borello U (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18: 6867-6872.
- Coulier F, Pizette S, Ollendorff V, deLapeyriere O, et al. (1994). The human and mouse fibroblast growth factor 6 (FGF6) genes and their products:

- possible implication in muscle development. *Prog. Growth Factor Res.* 5: 1-14.
- Coutinho LL, Morris J, Marks HL, Buhr RJ, et al. (1993). Delayed somite formation in a quail line exhibiting myofiber hyperplasia is accompanied by delayed expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chain. *Development* 117: 563-569.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, et al. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4: P3.
- Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, et al. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.* 9: 1119-1122.
- Fujio Y, Mitsuuchi Y, Testa JR and Walsh K (2001). Activation of Akt2 Inhibits anoikis and apoptosis induced by myogenic differentiation. *Cell Death Differ.* 8: 1207-1212.
- Giancotti FG and Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
- Han XH, Jin YR, Seto M and Yoon JK (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 286: 10649-10659.
- Hannon K, Kudla AJ, McAvoy MJ, Clase KL, et al. (1996). Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms. *J. Cell Biol.* 132: 1151-1159.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L and Giannis A (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 6613-6624.
- Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4: 44-57.
- Ingham PW and McMahon AP (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087.
- Jo C, Jang BG and Jo SA (2009). MEK1 plays contrary stage-specific roles in skeletal myogenic differentiation. *Cell. Signal.* 21: 1910-1917.

- Kaimal V, Bardes EE, Tabar SC, Jegga AG, et al. (2010). ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. *Nucleic Acids Res.* 38: W96-102.
- Keren A, Tamir Y and Bengal E (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 224-230.
- Kollias HD and McDermott JC (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104: 579-587.
- Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ and Konieczny SF (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4750-4760.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M and Salzberg SL (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10: R25.
- Lassar AB, Thayer MJ, Overell RW and Weintraub H (1989). Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell* 58: 659-667.
- Lazar V and Garcia JG (1999). A single human myosin light chain kinase gene (MLCK; MYLK). *Genomics* 57: 256-267.
- Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, et al. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 4355-4359.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, et al. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
- Li X, Zhu L, Chen X and Fan M (2007). Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts. *Med. Hypotheses* 69: 629-636.
- Li Y, Chen Y, Li J, Wang C, et al. (2008). Molecular characterization, expression profile and polymorphisms of the porcine TNNC2 gene. *Hereditas* 145: 274-282.
- Maltin CA, Delday MI, Sinclair KD, Steven J, et al. (2001). Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction* 122: 359-374.

- Martin JF, Schwarz JJ and Olson EN (1993). Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5282-5286.
- Murani E, Muraniová M, Ponsuksili S, Schellander K, et al. (2007). Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. *BMC Dev. Biol.* 7: 109.
- Nishiyama M, Oshikawa K, Tsukada Y, Nakagawa T, et al. (2009). CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 11: 172-182.
- Nishiyama M, Skoultchi AI and Nakayama KI (2012). Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt-beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 32: 501-512.
- Olson EN (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* 4: 1454-1461.
- Omoteyama K and Takagi M (2009). FGF8 regulates myogenesis and induces Runx2 expression and osteoblast differentiation in cultured cells. *J. Cell. Biochem.* 106: 546-552.
- Perry RL, Parker MH and Rudnicki MA (2001). Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol. Cell* 8: 291-301.
- Porter GA, Jr., Makuck RF and Rivkees SA (2002). Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 277: 28942-28947.
- Rahnama F, Shimokawa T, Lauth M, Finta C, et al. (2006). Inhibition of GLI1 gene activation by Patched1. *Biochem. J.* 394: 19-26.
- Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G and Ender K (2000). Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livest. Prod. Sci.* 66: 177-188.
- Reilly GC and Engler AJ (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J. Biomech.* 43: 55-62.

- Rossi D, Murayama T, Manini I, Franci D, et al. (2007). Expression and functional activity of ryanodine receptors (RyRs) during skeletal muscle development. *Cell Calcium* 41: 573-580.
- Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, et al. (2010). GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database* 2010: baq020.
- Serao NV, Veroneze R, Ribeiro AM, Verardo LL, et al. (2011). Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 28-34.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13: 2498-2504.
- Sollero BP, Guimaraes SE, Rilington VD, Tempelman RJ, et al. (2011). Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. *Anim. Genet.* 42: 600-612.
- Stenoien DL, Knyushko TV, Londono MP, Opresko LK, et al. (2007). Cellular trafficking of phospholamban and formation of functional sarcoplasmic reticulum during myocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292: C2084-2094.
- Storey JD and Tibshirani R (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 9440-9445.
- Stull JT, Kamm KE and Vandenboom R (2011). Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 510: 120-128.
- Swatland HJ and Cassens RG (1973). Prenatal development, histochemistry and innervation of porcine muscle. *J. Anim. Sci.* 36: 343-354.
- Takash W, Cañizares J, Bonneaud N, Poulat F, et al. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res.* 29: 4274-4283.
- Tarone G, Hirsch E, Brancaccio M, De Acetis M, et al. (2000). Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 725-731.

- Te Pas MF, De Wit AA, Priem J, Cagnazzo M, et al. (2005). Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26: 157-165.
- Tortorella LL, Milasincic DJ and Pilch PF (2001). Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 13709-13717.
- Tuluc P, Molenda N, Schlick B, Obermair GJ, et al. (2009). A CaV1.1 Ca²⁺ channel splice variant with high conductance and voltage-sensitivity alters EC coupling in developing skeletal muscle. *Biophys. J.* 96: 35-44.
- Ulloa F, Itasaki N and Briscoe J (2007). Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Curr. Biol.* 17: 545-550.
- von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF and Rudnicki MA (2012). Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol.* 22: 602-609.
- Voronova A, Coyne E, Al Madhoun A, Fair JV, et al. (2013). Hedgehog signaling regulates MyoD expression and activity. *J. Biol. Chem.* 288: 4389-4404.
- Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, et al. (2010). DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 26: 136-138.
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251: 761-766.
- Wigmore PM and Evans DJ (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 216: 175-232.
- Wigmore PM and Stickland NC (1983). Muscle development in large and small pig fetuses. *J. Anat.* 137 (Pt 2): 235-245.
- Winter B and Arnold HH (2000). Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23: 4211-4220.
- Wodarz A and Nusse R (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 59-88.

- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, et al. (2000). p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3951-3964.
- Yamaguchi Y, Naiki T and Irie K (2012). Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417: 427-432.
- Yan B, Kong M and Chen YH (2011). Prevention of apoptosis by the interaction between FIH1 and Bax. *Mol. Cell. Biochem.* 348: 1-9.
- Yu H, Lui YS, Xiong S, Leong WS, et al. (2013). Insights into the role of focal adhesion modulation in myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 22: 136-147.
- Zhao X, Mo D, Li A, Gong W, et al. (2011). Comparative Analyses by Sequencing of Transcriptomes during Skeletal Muscle Development between Pig Breeds Differing in Muscle Growth Rate and Fatness. *PLoS ONE* 6: e19774.
- Zhou F, Zhang L, Gong K, Lu G, et al. (2008). LEF-1 activates the transcription of E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 149-153.

Tabela Suplementar 1: Categorias para a GO de Componente Celular relacionadas a formação do tecido muscular esquelético com seus respectivos genes

Categorias	Idade pré-natal	Expressão	Genes
Banda I	40	Up	ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CSRP3, DES, JPH2, LDB3, MYL3, MYL9, MYPN, PALLD, PGM5, SLC4A1
	70	Up	ATP2A1, CACNA1C, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, NEB, OBSCN, PALLD, RYR1, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1
Complexo Miosina II	21	Down	MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYOM1
Complexo Miosina muscular	21	Down	MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYOM1
Disco Z	70	Up	CACNA1C, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, NEB, OBSCN, PALLD, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1
Fibra contráctil	21	Down	ANK1, CACNA1C, CASQ2, CMYA5, GJA1, HOMER1, ITGB1BP2, JPH1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYL7, MYOM1, RYR2, SCN3B, SYNE1, SYNM, TNNT2
	40	Up	ABRA, ACTA2, ANK1, ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CSRP3, DES, ENO1, HABP4, JPH2, LDB3, MYL3, MYL9, MYLK2, MYO18B, MYPN, PALLD, PGM5, SLC4A1, TNNC2, TNNT1, TPM2
	70	Up	ACTA1, ATP2A1, CACNA1C, DAG1, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, MYL6B, MYOM1, NEB, OBSCN, PALLD, PDE4DIP, RYR1, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1, SVIL, SYNE1, TMOD1
Miofibrila	21	Down	ANK1, CACNA1C, CASQ2, CMYA5, HOMER1, ITGB1BP2, JPH1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYL7, MYOM1, RYR2, SCN3B, SYNE1, SYNM, TNNT2
	40	Up	ABRA, ANK1, ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CSRP3, DES, ENO1, HABP4, JPH2, LDB3, MYL3, MYL9, MYLK2, MYO18B, MYPN, PALLD, PGM5, SLC4A1, TNNC2, TNNT1, TPM2
	70	Up	ACTA1, ATP2A1, CACNA1C, DAG1, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, MYOM1, NEB, OBSCN, PALLD, PDE4DIP, RYR1, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1, SVIL, SYNE1, TMOD1
Parte da fibra contráctil	21	Down	ANK1, CACNA1C, CASQ2, CMYA5, HOMER1, ITGB1BP2, JPH1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYL7, MYOM1, RYR2, SCN3B, SYNE1, SYNM, TNNT2
	40	Up	ABRA, ACTA2, ANK1, ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CSRP3, DES, ENO1, HABP4, JPH2, LDB3, MYL3, MYL9, MYLK2, MYO18B, MYPN, PALLD, PGM5, SLC4A1, TNNC2, TNNT1, TPM2
	70	Up	ACTA1, ATP2A1, CACNA1C, DAG1, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, MYL6B, MYOM1, NEB, OBSCN, PALLD, RYR1, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1, SVIL, SYNE1
Sarcômero	21	Down	ANK1, CACNA1C, CASQ2, CMYA5, HOMER1, ITGB1BP2, JPH1, MURC, MYBPC3, MYH7, MYL3, MYL4, MYL7, MYOM1, RYR2, SCN3B, SYNE1, TNNT2
	40	Up	ABRA, ANK1, ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CSRP3, DES, ENO1, HABP4, JPH2, LDB3, MYL3, MYL9, MYLK2, MYO18B, MYPN, PALLD, PGM5, SLC4A1, TNNC2, TNNT1, TPM2
	70	Up	ACTA1, ATP2A1, CACNA1C, DMD, DST, FHL3, FHOD3, FLNC, MYH7, MYOM1, NEB, OBSCN, PALLD, RYR1, SCN1A, SLC4A1, SPTAN1, SYNE1
Sarcoplasma	40	Up	ANK1, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, DHRS7C, DMPK, DTNBP1, FABP3, HRC, JPH2, NOS1, PLN, PYGM, TMEM38A, TRDN

Tabela Suplementar 2: Categorias para a GO de Função Molecular relacionadas a formação do tecido muscular esquelético com seus respectivos genes

Categorias	Idade pré-natal	Expressão	Genes
Constituinte estrutural do músculo	21	Down	ASPH, JPH1, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYOM1, MYOM2, SYNM
Ligação a miosina II	21	Down	GCSAM, MYL3, MYL4

Tabela Suplementar 3: Categorias para a GO de Processo Biológico relacionadas a formação do tecido muscular esquelético com seus respectivos genes

Categorias	Idade pré-natal	Expressão	Genes
Contração muscular esquelético	40	Up	ATP2A1, CASQ1, CHRNA1, DMPK, IKBKB, MYLK2, TNNC2, TNNT1
Desenvolvimento da estrutura muscular	40	Up	ACHE, ANKRD2, AXIN1, BASP1, BIN1, CACNA1S, CASQ1, CDH15, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CNTFR, CSRP3, DMPK, DNAJA3, DOK7, ERBB2, ERBB3, EVC, FGF2, FGF6, FGF8, FOXP2, GATA6, HIF1AN, JPH2, LIF, MAPK12, MEF2C, MSC, MYL3, MYLK, MYLK2, MYOG, MYOZ1, MYPN, NEURL2, NMRK2, NOS1, NTF3, PPP2R3A, RBP4, RXRG, SGCA, SGCG, SOX17, SRPK3, TBX5, TCF23, TEAD4, TRIM72, TSC1, UNC45B, YBX1
Desenvolvimento do embrião de Cordados	21	Down	ADAM10, ALS2, ALX1, APOB, BMP2, BRCA2, C6, CCNB2, CHD7, CHD8, CHST11, COBL, COL1A1, COL2A1, COPS3, CUL3, DLG1, DLK1, DVL2, E2F8, EXT1, GAB1, GATA4, GJA1, GLI3, HCN4, HEG1, HEY2, HOPX, HOXB8, IFT88, KIAA1217, LEF1, LHX2, MEOX1, MNX1, MYCN, NASP, NCAPG2, OTX2, PAX6, PHACTR4, PPP2R3A, PTCH1, RBBP8, ROCK2, RSPO3, SALL1, SALL4, SOX10, SRSF1, STIL, SUFU, TBX3, TCF7, TEAD4, TET1, WNT1, WNT2, ZFAND5, ZIC5
Desenvolvimento do embrião	21	Down	ADAM10, ALS2, ALX1, APOB, BMP2, BRCA2, C6, CCNB2, CD44, CELF1, CFC1, CHD7, CHD8, CHST11, COBL, COL1A1, COL2A1, COPS3, CUL3, DLG1, DLK1, DVL2, E2F8, EPOR, EXT1, FGF2, FOXF2, GAB1, GATA4, GJA1, GLI3, GTF2IRD1, HCN4, HEG1, HESX1, HEY2, HOPX, HOXA11, HOXA13, HOXB8, HOXD13, HTR2B, IFT88, KIAA1217, LAMA3, LAMA4, LEF1, LEO1, LHX2, MEOX1, MNX1, MYCN, NASP, NCAPG2, NR5A2, OTX2, PAX6, PHACTR4, PPP2R3A, PTCH1, RBBP8, RET, ROCK2, RSPO3, RYR2, SALL1, SALL4, SIM2, SOX10, SOX2, SOX7, SRSF1, STIL, SUFU, TBX20, TBX3, TBX5, TCF7, TEAD4, TET1, TIMELESS, TOP1, TP63, WNT1, WNT2, YAP1, ZFAND5, ZIC3, ZIC5

Tabela Suplementar 3: Categorias para a GO de Processo Biológico relacionadas a formação do tecido muscular esquelético com seus respectivos genes (continuação)

Categorias	Idade pré-natal	Expressão	Genes
Desenvolvimento do órgão	21	Down	ADAMTS2, AEBP1, AGTPBP1, AHSP, AKAP5, AKT2, ALS2, ALX1, ANK1, ANKH, APOD, AQP3, ARX, ASPM, ASPN, ATF2, ATIC, ATRX, AXL, BAAT, BAG3, BCAT2, BCL11B, BCOR, BDH1, BMP2, BMPR1B, BRCA2, BTBD, BVES, CACNB2, CCNB2, CCNF, CD34, CD44, CDK5RAP2, CENPE, CENPF, CHD7, CHST11, COBL, COL13A1, COL19A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL5A1, COL7A1, COL8A2, DCT, DISC1, DLG1, DMRT2, DPYSL2, DVL2, DYNC1H1, E2F1, E2F8, EID2B, EPOR, ETV5, EXOC6, EXT1, EZH2, FECH, FGF19, FGF2, FKBP4, FLT3, FMOD, FOXF2, FREM2, FST, FYN, GAB1, GATA4, GJA1, GLI3, HAS2, HEG1, HESX1, HEY2, HMGB1, HOMER1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXB8, HOXD13, HTR2B, IFT88, IL6R, IQGAP3, IRF8, IRS1, ITGB1BP2, JPH1, KERA, KIF18A, KIF2A, KRT10, LAMA3, LEF1, LEO1, LHX2, LHX6, LIFR, LOXL3, LUM, MALT1, MAP1S, MEF2B, MEIS1, MEIS2, MKI67, MNX1, MRAS, MREG, MURC, MYBPC3, MYCN, MYH11, MYH7, MYL3, MYL4, MYLK, NAB2, NCKAP1L, NID1, NPHS1, NR2F1, OTX2, OXTR, PAX6, PHACTR4, PHF2, PLN, PLXND1, PODXL, POU2F3, PPARGC1B, PPP2R3A, PSME3, PTCH1, PTPRC, PYGO1, RBM15, RBM20, RBM24, RET, ROCK2, RP1, RSPO3, RTKN2, RYR2, SALL1, SALL3, SALL4, SAV1, SEC24D, SEPT4, SF1, SIM2, SLIT1, SMOC1, SNAI2, SOCS1, SOX10, SOX2, SPARC, SPEG, SPTA1, SPTB, STAT5A,
Desenvolvimento do órgão muscular	21	Down	AEBP1, ALS2, BMP2, BVES, CACNB2, CENPF, COL19A1, EID2B, FGF2, GATA4, GJA1, HEY2, HOMER1, ITGB1BP2, JPH1, LEF1, MEF2B, MNX1, MRAS, MURC, MYBPC3, MYH7, MYL3, MYL4, MYLK, NPHS1, RBM24, RYR2, SAV1, SPEG, TBX20, TBX3, TBX5, TEAD4, TNC, TNNT2, UTRN, WNT1, WNT2
	40	Up	ACHE, ANKRD2, BASP1, CACNA1S, CASQ1, CHRNA1, CHRND, CNTFR, CSRP3, DMPK, DNAJA3, DOK7, ERBB2, ERBB3, EVC, FGF2, FGF8, FOXP2, GATA6, HIF1AN, JPH2, LIF, MAPK12, MEF2C, MSC, MYL3, MYLK, MYLK2, MYOG, NMRK2, NOS1, RBP4, RXRG, SGCA, SGCG, SOX17, SRPK3, TBX5, TCF23, TEAD4, TRIM72, UNC45B
Finalização do desenvolvimento do embrião ao nascimento	21	Down	ADAM10, ALS2, ALX1, APOB, BMP2, BRCA2, C6, CCNB2, CHD7, CHD8, CHST11, COBL, COL1A1, COL2A1, COPS3, CUL3, DLG1, DLK1, DVL2, E2F8, EXT1, GAB1, GATA4, GJA1, GLI3, HCN4, HEG1, HEY2, HOPX, HOXB8, IFT88, KIAA1217, LEF1, LHX2, MEOX1, MNX1, MYCN, NASP, NCAPG2, OTX2, PAX6, PHACTR4, PPP2R3A, PTCH1, RBBP8, ROCK2, RSPO3, SALL1, SALL4, SOX10, SRSF1, STIL, SUFU, TBX3, TCF7, TEAD4, TET1, WNT1, WNT2, ZFAND5, ZIC5
Morfogênese do órgão	21	Down	AGTPBP1, ALX1, AQP3, ASPN, ATF2, ATIC, BAAT, BCL11B, BCOR, BMP2, BMPR1B, CD34, CD44, CHD7, CHST11, COL13A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL5A1, COL8A2, DLG1, DVL2, ETV5, FGF2, FMOD, FST, GATA4, GJA1, GLI3, HEG1, HESX1, HEY2, HOXA11, HOXA13, HOXB8, HOXD13, HTR2B, IFT88, LEF1, LIFR, MEIS1, MKI67, MYBPC3, MYCN, MYH7, MYL3, MYLK, NAB2, OTX2, PAX6, PHACTR4, PPARGC1B, PPP2R3A, PTCH1, RBM15, RP1, RYR2, SALL1, SAV1, SLIT1, SNAI2, SOCS1, SOX2, STAT5A, STIL, STX2, SUFU, TBX20, TBX3, TBX5, TCF7, TNC, TNNT2, TP63, WNT1, WNT2, YAP1, ZFAND5, ZIC3

Tabela Suplementar 3: Categorias para a GO de Processo Biológico relacionadas a formação do tecido muscular esquelético com seus respectivos genes (continuação)

Categorias	Idade pré-natal	Expressão	Genes
Morfogênese do tecido	21	Down	ALX1, BMP2, CD44, COBL, COL1A1, COL1A2, COL5A1, DLG1, DVL2, ETV5, FGF2, FOXF2, FREM2, FST, GATA4, GJA1, GLI3, HEY2, HOXA11, HOXA13, HOXD13, ITGA5, LEF1, LHX2, MYBPC3, MYH7, MYL3, MYLK, PHACTR4, PLXND1, PODXL, PTCH1, RBM15, RET, ROCK2, RSPO3, RYR2, SALL1, SALL4, SNAI2, SOX2, STAT5A, STIL, SUFU, TBX20, TBX3, TBX5, TIMELESS, TNC, TNNT2, TP63, WNT1, WNT2, YAP1, ZIC3, ZIC5
Movimento do músculo esquelético	40	Up	ATP2A1, CASQ1, CHRNA1, CHRND, DMPK, HIPK2, IKBKB, MYLK2, TNNC2, TNNT1
Processo do sistema muscular	40	Up	ACTA2, ADORA1, ANKRD2, ATP2A1, CACNA1S, CASQ1, CHRNA1, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNG, CNN1, CSRP3, DES, DMPK, FBXO32, HRC, IKBKB, LMCD1, MAP2K1, MYBPH, MYL3, MYL9, MYLK, MYLK2, NOS1, P2RX6, SCN4A, SCN4B, SGCA, TNNC2, TNNT1, TPM2, TRDN, TRIM72
Regulação da contração do músculo esquelético	40	Up	ATP2A1, CASQ1, DMPK, MYLK2

Tabela Suplementar 4: Vias metabólicas do KEGG identificadas no programa DAVID para todos miógenes.

Via metabólica	P-value	Genes
Dilated cardiomyopathy	2,92E+07	MYL3, MYBPC3, DAG1, CACNB2, MYH7, TPM2, CACNA1S, TNNT2, DES, SGCG, ITGA5, DMD, PLN, RYR2, CACNA1C, SGCA
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	8,93E+06	MYL3, MYBPC3, DAG1, CACNB2, MYH7, TPM2, CACNA1S, TNNT2, DES, SGCG, ITGA5, DMD, RYR2, CACNA1C, SGCA
Pathways in cancer	1,48E+09	E2F1, FGF19, FGF6, FGF8, ERBB2, STAT5A, GLI3, SUFU, WNT2, WNT1, FGF2, AKT2, AXIN1, DVL2, TCF7, RET, BMP2, MAP2K1, FLT3, RXRG, BRCA2, LEF1, LAMA4, LAMA3, PTCH1, IKBKB
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1,79E+09	TCF7, DAG1, GJA1, CACNB2, LEF1, CACNA1S, DES, SGCG, ITGA5, DMD, RYR2, CACNA1C, SGCA
Focal adhesion	4,68E+09	MYL7, MAP2K1, ROCK2, ERBB2, TNC, COL3A1, MYLK2, COL2A1, FLNC, COL5A1, MYL9, LAMA4, LAMA3, ITGA5, FYN, COL1A1, MYLK, AKT2
Basal cell carcinoma	4,92E+10	DVL2, WNT2, WNT1, TCF7, BMP2, LEF1, PTCH1, GLI3, SUFU, AXIN1
ECM-receptor interaction	1,59E+10	LAMA4, LAMA3, CD44, ITGA5, TNC, COL3A1, DAG1, COL2A1, COL1A1, COL5A1
Calcium signaling pathway	2,67E+12	NOS1, TNNC2, ERBB3, ERBB2, MYLK2, CACNA1S, P2RX6, PLN, ATP2A1, RYR1, RYR2, HTR2B, CACNA1C, MYLK
Vascular smooth muscle contraction	0.00134805	MAP2K1, ACTA2, ROCK2, MYL6B, MYH11, MYLK2, CACNA1C, CACNA1S, MYLK, MYL9
MAPK signaling pathway	0.00164743	FGF6, MEK2, FGF19, FGF8, MAP2K1, NTF3, MRAS, CACNB2, FLNC, CACNA1S, ATF2, MAPK12, IKBKB, CACNA1C, FGF2, AKT2
Regulation of actin cytoskeleton	0.00177160	FGF6, FGF19, MYL7, FGF8, MAP2K1, ROCK2, MRAS, IQGAP3, NCKAP1L, MYLK2, MYL9, ITGA5, FGF2, MYLK
Acute myeloid leukemia	0.00246245	TCF7, MAP2K1, FLT3, STAT5A, LEF1, IKBKB, AKT2
Cardiac muscle contraction	0.00248224	TNNT2, MYL3, RYR2, CACNB2, MYH7, TPM2, CACNA1C, CACNA1S
Thyroid cancer	0.00470872	RET, TCF7, MAP2K1, RXRG, LEF1
Melanoma	0.00676909	E2F1, FGF6, FGF19, FGF8, MAP2K1, FGF2, AKT2
Viral myocarditis	0.00676909	SGCG, FYN, DMD, MYH11, DAG1, MYH7, SGCA
Endometrial cancer	0.00773308	TCF7, MAP2K1, ERBB2, LEF1, AXIN1, AKT2
HEDGEHOG signaling pathway	0.01053618	WNT2, WNT1, BMP2, PTCH1, GLI3, SUFU
T cell receptor signaling pathway	0.01453038	PTPRC, MAPK12, MAP2K1, FYN, MALT1, IKBKB, AKT2, DLG1
Prostate cancer	0.01940430	E2F1, TCF7, MAP2K1, ERBB2, LEF1, IKBKB, AKT2
Wnt signaling pathway	0.02789071	DVL2, WNT2, WNT1, TCF7, CHD8, ROCK2, LEF1, SOX17, AXIN1
Pancreatic cancer	0.02854982	E2F1, MAP2K1, ERBB2, BRCA2, IKBKB, AKT2
Melanogenesis	0.03088493	DVL2, DCT, WNT2, WNT1, TCF7, MAP2K1, LEF1
Non-small cell lung cancer	0.03971488	E2F1, MAP2K1, ERBB2, RXRG, AKT2

Tabela Suplementar 5: Vias metabólicas do KEGG identificadas pelo programa DAVID para a idade de 21 dias de gestação, sendo que miogenes são *downregulated* (mais expressos em Piau do que em Comercial).

Via metabólica	P-value	Genes
Basal cell carcinoma	3,07E+10	DVL2, WNT2, WNT1, TCF7, BMP2, LEF1, PTCH1, GLI3, SUFU
Pathways in cancer	6,31E+09	E2F1, DVL2, FGF19, RET, BMP2, TCF7, FLT3, STAT5A, LEF1, BRCA2, GLI3, SUFU, WNT2, WNT1, LAMA4, LAMA3, PTCH1, FGF2, AKT2
ECM-receptor interaction	9,70E+09	LAMA4, LAMA3, CD44, ITGA5, TNC, COL3A1, COL1A2, COL2A1, COL1A1, COL5A1
Focal adhesion	2,66E+10	MYL7, ROCK2, TNC, COL3A1, COL2A1, COL5A1, LAMA4, LAMA3, FYN, ITGA5, COL1A2, COL1A1, MYLK, AKT2
Dilated cardiomyopathy	1,41E+12	TNNT2, MYL3, ITGA5, PLN, MYBPC3, RYR2, CACNB2, MYH7, CACNA1C
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	5,26E+11	TNNT2, MYL3, ITGA5, MYBPC3, RYR2, CACNB2, MYH7, CACNA1C
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.00166535	TCF7, ITGA5, RYR2, GJA1, CACNB2, LEF1, CACNA1C
HEDGEHOG signaling pathway	0.00238801	WNT2, WNT1, BMP2, PTCH1, GLI3, SUFU
Cardiac muscle contraction	0.00987986	TNNT2, MYL3, RYR2, CACNB2, MYH7, CACNA1C
Hematopoietic cell lineage	0.01467708	CD44, CD34, ITGA5, FLT3, EPOR, IL6R
Acute myeloid leukemia	0.01617676	TCF7, FLT3, STAT5A, LEF1, AKT2
Melanogenesis	0.02543894	DVL2, DCT, WNT2, WNT1, TCF7, LEF1
Regulation of actin cytoskeleton	0.02802797	FGF19, MYL7, ROCK2, ITGA5, MRAS, IQGAP3, NCKAP1L, FGF2, MYLK
Wnt signaling pathway	0.04169522	DVL2, WNT2, WNT1, TCF7, CHD8, ROCK2, LEF1

Tabela Suplementar 6: Vias metabólicas do KEGG identificadas pelo programa DAVID para a idade de 40 dias de gestação, sendo que os miogenes são *upregulated* (mais expressos em Comercial do que em Piau).

Via metabólica	P-value	Genes
Calcium signaling pathway	2,44E+09	NOS1, P2RX6, TNNC2, ERBB3, ERBB2, PLN, ATP2A1, MYLK2, CACNA1S, MYLK
Dilated cardiomyopathy	3,75E+10	DES, SGCG, MYL3, PLN, TPM2, CACNA1S, SGCA
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2,91E+12	DES, SGCG, MYL3, TPM2, CACNA1S, SGCA
MAPK signaling pathway	4,35E+12	FGF6, MEF2C, FGF8, MAPK12, MAP2K1, NTF3, IKBKB, FGF2, CACNA1S
Vascular smooth muscle contraction	0.00103614	MAP2K1, ACTA2, MYLK2, CACNA1S, MYLK, MYL9
Regulation of actin cytoskeleton	0.00357908	FGF6, FGF8, MAP2K1, MYLK2, FGF2, MYLK, MYL9
Pathways in cancer	0.00715509	FGF6, FGF8, MAP2K1, ERBB2, RXRG, IKBKB, FGF2, AXIN1
Melanoma	0.01339646	FGF6, FGF8, MAP2K1, FGF2
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.01608535	DES, SGCG, CACNA1S, SGCA

Tabela Suplementar 7: Vias metabólicas do KEGG identificadas pelo programa DAVID para a idade de 70 dias de gestação, sendo que os miogenes são *upregulated* (mais expressos em Comercial do que em Piau).

Via metabólica	P-value	Genes
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2,38E+11	DMD, DAG1, MYH7, CACNA1C
Dilated cardiomyopathy	3,01E+11	DMD, DAG1, MYH7, CACNA1C
Viral myocarditis	0.00509786	DMD, DAG1, MYH7
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.00582360	DMD, DAG1, CACNA1C
Calcium signaling pathway	0.02907244	ATP2A1, RYR1, CACNA1C

CAPÍTULO II

Expressão de miogenes durante o desenvolvimento pré-natal em *longissimus dorsi* de dois grupos genéticos de suínos divergentes

INTRODUÇÃO

A miogênese é um processo pré-natal influenciado por fatores genéticos e ambientais que se caracteriza pela formação do tecido muscular (Rehfeldt et al., 2000), por meio de mudanças no nível de expressão gênica e do fenótipo celular (Te Pas et al., 2005). O tamanho e o número das fibras musculares determinam a massa do músculo, uma vez que o potencial de crescimento do músculo esquelético depende do número de fibras formadas durante o período pré-natal e do grau de hipertrofia pós-natal das fibras musculares, sendo que o aumento no tamanho da fibra é limitado por fatores genéticos e fisiológicos (Rehfeldt et al., 2000).

A formação da fibra muscular acontece em duas ondas para formação de fibras musculares primárias e secundárias (Wigmore e Evans, 2002). Cada onda consiste da proliferação e fusão de mioblastos para formar novas fibras musculares (Te Pas et al., 2005). Enquanto a fibra muscular primária se forma *de novo*, ou seja, nos estágios iniciais de fusão do mioblasto (primeira onda de diferenciação), as fibras secundárias se formam usando as primárias como molde numa segunda onda de diferenciação (Rehfeldt et al., 2000; Te Pas et al., 2005), sendo estas a maioria das fibras do músculo esquelético (Beermann et al., 1978). Fatores externos como a nutrição e o número e o tamanho dos miotubos primários são fatores que afetam o número de fibras secundárias. Por outro lado, o número de miotubos primários é geneticamente programado (Maltin et al., 2001). Em suínos, as duas ondas de formação da fibra muscular possuem relativamente longos períodos de tempo, aproximadamente dos 30 aos 60 dias e dos 54 aos 90 dias de gestação (Wigmore e Stickland, 1983).

Estudos investigando o perfil de expressão gênica em suínos têm sido realizados com o objetivo de entender as mudanças na expressão de genes durante o crescimento e o desenvolvimento do músculo *longissimus dorsi*, usando-se amostras de diferentes raças de suínos em diferentes idades pré-

natais (Te Pas et al., 2005; Cagnazzo et al., 2006; Murani et al., 2007; Sollero et al., 2011; Zhao et al., 2011). A análise da expressão de miogenes durante períodos pré-natais, que compreendem as duas ondas de fusão de mioblastos, pode ser de grande importância para se entender as características bioquímicas do tecido que levam a diferenças na qualidade da carne e principalmente musculabilidade entre raças.

O estudo da expressão de miogenes comparando a raça local Piau e a linha comercial em períodos pré-natais por meio da técnica de qRT-PCR ainda não tinha sido realizado. Dessa forma, este estudo foi conduzido para analisar a expressão de miogenes em músculo *longissimus dorsi* em períodos pré-natais (21, 40, 70 e 90 dias de gestação ou dpc) nos grupos genéticos Piau e linha comercial (tipo Duroc, Large-White e Landrace) de suínos pela técnica de qRT-PCR, de forma a se compreender melhor as possíveis diferenças na expressão gênica durante a formação do músculo esquelético entre essas raças. Para isso, embriões inteiros aos 21 dpc e *longissimus dorsi* de fetos aos 40, 70 e 90 dpc das duas raças foram usados neste estudo.

Os somitos se formam aproximadamente dos 14 aos 22 dpc (Murani et al., 2007), sendo que aos 20 dpc somente células do somito são encontradas na região onde o músculo seria formado (Swatland e Cassens, 1973). A formação das fibras primárias ocorre aproximadamente aos 30 a 60 dpc e as fibras secundárias se formam aos 54 a 90 dpc (Wigmore e Stickland, 1983). Assim, as idades analisadas neste estudo permitem concluir sobre o processo de miogênese nas duas raças que diferem quanto à musculabilidade, tendo como informação a expressão gênica no período de formação dos somitos aos 21 dpc, de formação das fibras primárias aos 40 dpc e das fibras secundárias aos 70 e 90 dpc.

METODOLOGIA

Coleta do material biológico

Vinte e quatro porcas grávidas (três porcas por idade e para cada raça) de dois grupos genéticos de suínos: raça local Piau e linha comercial (fêmeas

tipo Landrace e Large-White inseminadas por macho tipo Duroc) da TOPIGS foram submetidas à cesariana. As coletas dos embriões e fetos foram efetuadas pelo método de cesariana de 3 marrãs grávidas de cada grupo genético de suínos em quatro idades pré-natais (21, 40, 70 e 90 dias de gestação/dpc) na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O embrião inteiro foi coletado aos 21 dpc e o músculo *Longissimus dorsi* (LD) foi coletado dos fetos aos 40, 70 e 90 dpc. Os procedimentos de obtenção dos embriões e fetos foram feitos de acordo com a lei de proteção dos animais aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV 85/2013).

As amostras coletadas foram imediatamente acondicionadas em tubo Falconer com 10 mL de *RNA holder* (BioAgency laboratórios, Brasil) e encaminhado ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia/DZO da Universidade Federal de Viçosa, para extração de RNA.

Após a chegada do material ao laboratório, as amostras foram armazenadas *overnight* à 4 °C e posteriormente transferidas para freezer -80 °C até o momento da extração do RNA.

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o protocolo com o reagente TRIzol (Life Technologies, EUA), segundo recomendações de Chomczynski e Sacchi (1987).

Antes de começar a extração, a bancada, bisturi, pinça e pedaços de papel alumínio foram limpos com *RNase exterminator* (BioAgency laboratórios), com o objetivo de evitar a contaminação e a degradação do RNA. Microtubos de 2 mL estéreis foram identificados e neles foram adicionados 750 µL de TRIzol (Life Technologies, EUA).

O embrião inteiro (21 dpc) ou parte do tecido LD (40, 70 e 90 dpc) armazenado no *RNA holder* (BioAgency laboratórios) foi retirado para ser pesado. O excesso de líquido foi drenado no papel alumínio antes da pesagem. O embrião inteiro foi usado na extração de RNA, enquanto que 100 mg de tecido LD foi pesado e fatiado com o uso de bisturi e pinça, sendo

posteriormente transferido para o microtubo previamente identificado e contendo o TRIzol (Life Technologies).

O embrião/tecido foi macerado por meio de um homogenizador automático por 1 min até que a amostra ficasse bem homogênea. Para cada extração foram usadas hastes de maceração limpas com *RNase exterminator* (BioAgency laboratórios).

Em seguida foram adicionados 730 µL de água ao homogeneizado, este foi invertido por 10 vezes e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e em seguida as amostras foram homogeneizadas e agitadas manualmente por inversão. Após a incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, seguiu-se a centrifugação à 10600 rpm por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa do material centrifugado foi recuperada e transferida para novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 600 µL de álcool isopropílico e os tubos foram invertidos por 10 vezes. Incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida as amostras foram centrifugadas à 10600 rpm por 10 minutos à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 1 mL de etanol 75% por duas vezes, centrifugando à 10600 rpm por 10 minutos à 4 °C. O *pellet* contendo o RNA foi secado à temperatura ambiente por 20 minutos e depois ressuspendido com 30 µL de água ultrapura.

Em seguida foi realizada a quantificação do RNA extraído no espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Alemanha), observando-se as razões A260/A280 entre 1.8 e 2.0 como controle de pureza e selecionando os RNAs com mais de 500 ng. A qualidade e a integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1%. O efluxo contendo o RNA total foi armazenado em freezer à -20 °C por 20 horas ou à -70 °C até o momento da síntese de cDNA.

Síntese de cDNA

Antes de realizar a etapa de transcrição reversa para síntese de cDNA, o RNA foi tratado com DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, EUA) para a remoção de DNA das amostras, segundo protocolo do fabricante.

Resumidamente, em um microtubo livre de RNase de 0,5 mL acondicionado em gelo foram adicionados 1 µg da amostra de RNA, 1 µL de tampão de reação 10X DNase I, 1 µL de DNase I, Amp Grade (1 U/ µL) e o volume foi completado para 10 µL. Os microtubos foram incubados a temperatura ambiente por 15 min. Para inativação da DNase I foram adicionados 1 µL de solução EDTA 25 mM à mistura de reação. Os microtubos foram aquecidos a 65°C por 10 min. Após essa etapa, as amostras de RNA ficaram prontas para serem usadas na transcrição reversa.

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit Go Script™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), segundo recomendações do fabricante.

Inicialmente, em um microtubo de 0,6 mL foram combinados 4 µL de RNA tratado com DNase I, 0,5 µg de primer oligo(dT)₁₅ e seu volume foi completado com água para 5 µL, sendo posteriormente incubado no termociclador a 70°C por 5 min. Depois o microtubo foi resfriado em gelo por 5 min e centrifugado por 10 segundos. Em seguida, ele foi mantido em gelo até a adição do mix contendo a transcriptase reversa. Para cada reação foram necessários 15 µL de mix da transcriptase reversa que foi composto por 4 µL de GoScript™ 5X Reaction Buffer; 1,2 µL de MgCl₂; 1 µL do PCR Nucleotide Mix; 0,5 µL do Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor; 1 µL do GoScript™ Reverse Transcriptase e o volume foi completado com H₂O para 15 µL. Este mix da transcriptase reversa foi adicionado ao microtubo contendo os 5 µL do mix de RNA e primer. Em seguida, a reação foi colocada em termociclador e aquecido a 25°C por 5 minutos para anelamento dos *primers*, a 42°C por uma hora para extensão dos *primers* e um passo final a 70°C por 15 minutos para inativação da transcriptase reversa.

As concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria no NanoVue™ plus (GE Healthcare) e o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso nas reações de qPCR.

Seleção de genes e desenho de primers para o qRT-PCR

A partir dos dados de transcritos diferencialmente expressos de um experimento de RNAseq, comparando-se a linha comercial (tipo Landrace e

Large-White) e a raça local Piau (dados não publicados do Laboratório de Biotecnologia Animal), foi possível selecionar treze genes para terem a expressão avaliada por qRT-PCR. Estes genes demonstraram associação ao desenvolvimento do tecido muscular tendo-se como referência a ontologia gênica, identificação de vias metabólicas e também a partir da função que apresentaram. Este trabalho focou na análise de genes diferencialmente expressos entre raças porque eles representam candidatos primários para encontrar a fonte de variação na musculosidade e na qualidade da carne.

Informações sobre a ontologia gênica (GO - componente celular, função molecular e processo biológico) para os genes selecionados foram obtidas no programa ToppCluster (Kaimal et al., 2010). Os mapas de vias metabólicas do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foram obtidos por meio de uma análise no programa DAVID (Dennis et al., 2003; Huang et al., 2009). O programa Cytoscape (Shannon et al., 2003) foi usado para visualizar e editar os processos biológicos e funções moleculares e as vias gênicas identificadas nos programas ToppCluster e DAVID para os genes selecionados. Adicionalmente os genes tiveram suas funções investigadas por meio do banco de dados presente do *Gene Cards* (Safran et al., 2010), que fornece informação concisa sobre todos genes humanos conhecidos e preditos, além da informação sobre as ontologias gênicas que não foram obtidas pelo programa Toppcluster.

O programa utilizado para desenho dos *primers* foi o PrimerQuest (Owczarzy et al., 2008), fornecido pela Integrated DNA Technologies INC, a partir de sequências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do transcriptoma de *Sus scrofa* do GenBank (Benson et al., 2013). Somente a sequência de RSPO3 não estava disponível em suínos (*Sus scrofa*) e neste caso foi utilizada uma sequência homóloga em humanos (*Homo sapiens*). Os *primers* tiveram conteúdo GC maior que 40%, entre 18 a 24 nucleotídeos e o tamanho do fragmento amplificado (*amplicon*) foi de cerca de 100 nucleotídeos. Informações sobre os genes utilizados nas análises de qRT-PCR, incluindo o número de acesso da sequência do transcrito no GenBank, sequência de nucleotídeos dos *primers* desenhados e tamanho esperado do *amplicon* podem ser melhor visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Genes utilizados nas análises de qRT-PCR, número de acesso da sequência do transcrito no GenBank usada para desenho do par de *primers*, sequências de nucleotídeos dos *primers* correspondentes e tamanho do amplicon gerado.

Gene	Número de Acesso	Primers 5' → 3'	Tamanho do amplicon ¹
<i>CHD8</i>	XM_003482263.1	F: AGTGAGGACGAGAAGGAAGA R: GGGAATCCATCTTGGGACATAG	104
<i>CSRP3</i>	NM_001172368.1	F: CAGCAACCCTTCCAAGTTCA R: CATCACCTTCTCAGCAGCATAG	91
<i>EID2B</i>	XM_003127131.1	F: CGCCACTATCTGGAACACTAC R: CGCTGATATTCGGGCATCAAAC	122
<i>HIF1AN</i>	XM_003359328.1	F: GTACTGGTGGCATCACATAGAG R: CTGATGGGCTTTGAGAGGATATT	118
<i>IKBKB</i>	NM_001099935.1	F: GATGGCGACAGTCAGGAAAT R: TTGCAAACCACCGTCTTACT	107
<i>LEF1</i>	NM_001129967.1	F: CTATTGTAACGCCTCAGGTCAA R: TTGGCTCTTGCTCCTTTCTC	99
<i>MAP2K1</i>	NM_001143716.1	F: GGAGCTGGAGCTGATGTTT R: GTCGGCTGTCCATTCCATAA	110
<i>MRAS</i>	XM_003358570.2	F: GGTTCGATTTGATGCATTTGAGG R: TCCTTGGCACTGGTTTCTATG	96
<i>MYOG</i>	NM_001012406.1	F: CAGGCTCAAGAAGGTGAATGA R: GCACTCGATGTACTGGATGG	118
<i>RBM24</i>	XM_001925447.3	F: TACCTGCCCACTATGTCTATCC R: GCAGCTCCCGTGTAATCAAT	118
<i>RSPO3</i>	NM_032784.4	F: GAAACACGGGTCCGAGAAATA R: CCCTTCTGACACTTCTTCCTTT	110
<i>SOX7</i>	XM_003359052.1	F: TCTCCACTCCAACCTCCA R: TCATTGCGATCCATGTCCTC	120
<i>SUFU</i>	XM_001928912.4	F: GGAGCCCTCATTCCTCTTTG R: GCCATGTCACCTGTGATACTT	83
<i>ACTB</i> ²	XM_003124280.3	F: AAGATCAAGATCATCGCGCCTCCA R: ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT	108
<i>GAPDH</i> ²	NM_001206359.1	F: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT R: CATGTTTGTGATGGGCGTGAACAA	176
<i>HPRT1</i> ²	NM_001032376.2	F: GCTGACCTGCTGGATTACAT R: CTGGTCATTACAGTAGCTCTTCAG	101

CHD8 - chromodomain helicase DNA binding protein 8; *CSRP3* - cysteine and glycine-rich protein 3; *EID2B* - EP300 interacting inhibitor of differentiation 2B; *HIF1AN* - hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor; *IKBKB* - inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta; *LEF1* - lymphoid enhancer-binding factor 1; *MAP2K1* - mitogen-activated protein kinase kinase 1; *MRAS* - muscle RAS oncogene homolog; *MYOG* - myogenin (myogenic factor 4); *RBM24* - RNA binding motif protein 24; *RSPO3* - R-spondin 3; *SOX7* - SRY (sex determining region Y)-box 7; *SUFU* - suppressor of fused homolog; *ACTB* - beta actin; *GAPDH* - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *HPRT1* - hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.

1 Tamanho do amplicon em número de nucleotídeos 2 Controle endógeno

As reações de PCR e qRT-PCR foram realizadas usando RNA isolado de amostras individuais de tecidos de embrião ou feto diferentes das amostras de comercial e Piau usadas para o experimento de RNAseq. A linha comercial da TOPIGS usada neste estudo foi resultante da inseminação de fêmeas tipo Large-White e Landrace com o sêmen de machos tipo Duroc. Os *primers* tiveram suas amplificações testadas por PCR (*Polymerase chain reaction*) com temperatura de anelamento a 60°C no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

As reações de PCR e qRT-PCR foram realizadas usando RNA isolado de amostras individuais de tecidos de embrião ou feto diferentes das amostras de comercial e Piau usadas para o experimento de RNAseq. A linha comercial da TOPIGS usada neste estudo foi resultante da inseminação de fêmeas tipo Large-White e Landrace com o sêmen de machos tipo Duroc. Os *primers* tiveram suas amplificações testadas por PCR (*Polymerase chain reaction*) com temperatura de anelamento a 60°C no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). A PCR foi feita com o Kit Go Taq® Green Master Mix (Promega, EUA), segundo recomendações do fabricante. Para cada reação foram necessários 10 µL do Go Taq® Green Master Mix, 200nM de primer, a quantidade de 75 ng de pool de cDNA, o qual contém quantidades iguais de cDNA de cada tratamento, e o volume foi completado com H₂O para 15 µL. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 8% a 100V por 2 horas para se analisar a especificidade da reação e a presença de dímeros de *primers*.

Reação de qPCR em tempo real

As reações foram efetuadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems), utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente 5 µL de cDNA nas quantidades de 25, 75 ou 225 ng (ou água para o controle negativo) foi adicionado em cada poço da placa de reação. O mix de reação foi composto por 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2X, 100, 200 ou 400 nM de cada primer *upstream* e *downstream*, 0,15 µL de *CRX reference dye* e o volume foi completado com Nuclease-Free Water para 10 µL. Posteriormente

10 µL do mix de reação foi adicionado a cada poço contendo o cDNA (ou água para controle negativo).

As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Para os testes de eficiência, ao final dos 40 ciclos de amplificação um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60 a 94°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação. Este passo é essencial para se verificar se ocorreu a formação de dímeros de *primers* durante a amplificação.

A amplificação dos genes alvo e da referência endógena foi realizada em canaletas diferentes na mesma placa de reação. O experimento foi realizado com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas para cada tratamento (amostras considerando cada idade pré-natal e cada raça), sendo analisada em uma única placa de 96 poços. O coeficiente de variação até 5% dos valores de C_t (*cycle threshold*) das replicatas técnicas dentro de cada amostra foi considerado indicativo de precisão adequada e reprodutibilidade.

Cálculo da eficiência de amplificação

Para o cálculo da eficiência das reações com o gene de interesse e o gene referência, todas as reações foram feitas por meio de *pool* de cDNAs contendo as réplicas biológicas dos tratamentos, usando-se duas replicatas técnicas, em placas de 96 poços. A eficiência de cada reação foi obtida para se escolher a melhor combinação de cDNA e concentração de *primer* nas reações subseqüentes.

A partir dos dados obtidos, um gráfico de C_t (*cycle threshold*) *versus* o $\log_{10}$ da quantidade de cDNA utilizada (25, 75 e 225 ng) para as concentrações de 100, 200 e 400 nM de primer foi produzido. Foi utilizada regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação (Livak e Schmittgen, 2001). A partir do coeficiente angular obtido, o cálculo da eficiência foi realizado pela seguinte equação de Rasmussen (2001): $E = 10^{(-1 / \text{inclinação da reta})}$.

As eficiências entre 80 a 100% para cada gene alvo e para o controle endógeno foram consideradas adequadas, assim a diluição de cDNA e a

concentração de *primer* que apresentaram maior eficiência foram escolhidas para serem usadas nas reações de qPCR finais (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado do teste de eficiência para os genes de interesse e controles endógenos testados.

	Gene	Temperatura (°C)	Concentração de primer (nM)	Quantidade de cDNA (ng)	Eficiência (%)
Genes de interesse	<i>CHD8</i>	61	100	25	95
	<i>CSRP3</i>	60	200	71	89
	<i>EID2B</i>	60	200	25	88
	<i>HIF1AN</i>	60	100	25	88
	<i>IKBKB</i>	61	200	25	99
	<i>LEF1</i>	60	200	75	99
	<i>MAP2K1</i>	60	200	75	99
	<i>MRAS</i>	60	200	25	81
	<i>MYOG</i>	61	100	25	93
	<i>RBM24</i>	61	100	25	99
	<i>RSPO3</i>	60	100	75	00
	<i>SOX7</i>	61	200	225	82
	<i>SUFU</i>	60	200	75	91
Controles endógenos	<i>ACTB</i>	61	100	75	93
	<i>GAPDH</i>	60	100	75	88
		61	100	75	95
	<i>HPRT1</i>	60	100	75	100

Para os genes referências testados, sua adequação para o uso no qRT-PCR foi investigada por meio do programa NormFinder (Andersen et al., 2004), uma vez que o controle endógeno não deve apresentar variação no nível de expressão ao longo das idades pré-natais. Para isso, os valores de C_t para um gene particular foram normalizados com o valor de C_t com maior expressão (valor de C_t mínimo) para aquele gene. Os valores de C_t normalizados foram calculados segundo a seguinte equação (McCulloch et al., 2012):

$$Q = E^{(\min C_t - C_t \text{ da amostra})}, \text{ onde:}$$

Q = valor de C_t normalizado para um dado gene na amostra atual;

E = Eficiência de amplificação calculado (variando de 1 a 2, sendo que $100\% = 2$);

$\min C_t$ = valor de C_t mínimo para um gene entre todas as amostras e;

C_t da amostra = o valor de C_t do gene para a amostra atual.

O gene GAPDH apresentou o menor valor de estabilidade, sendo, por isso, o mais estável (Figura 1). Assim, o GAPDH foi usado na normalização dos

resultados de expressão dos genes de interesse nas análises estatísticas neste estudo.

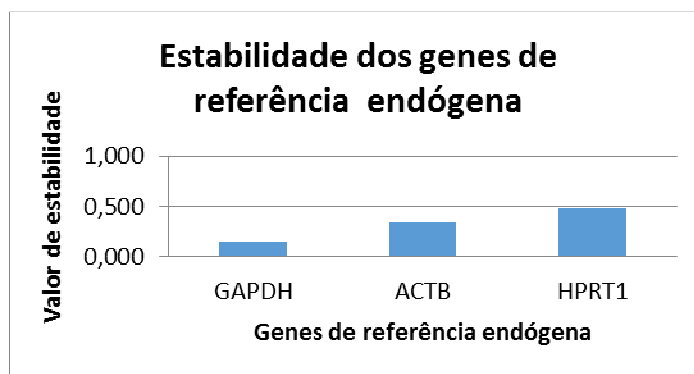


Figura 1: Estabilidade dos genes endógenos ao longo dos tratamentos ensaiados. Os valores estimados são os seguintes para *ACTB*: 0,337; *GAPDH*: 0,149; e *HPRT1*: 0,484.

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (raças) x 4 (idades pré-natais), com 3 repetições biológicas e 2 repetições técnicas por tratamento.

Usando um nível de significância de 5%, a ANOVA foi realizada de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_{(ij)l} + D_{ijk} + (RIG)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que:

Y_{ijkl} é o nível de expressão do gene k no animal l da raça i na idade j , $i=1$ ou 2 (raça Piau ou linha Comercial, respectivamente) e $j=1, 2, 3$ ou 4 (21, 40, 70 ou 90 dpc, respectivamente); μ é a constante geral; $A_{(ij)l}$ é o efeito aleatório do animal l dentro da raça i na idade j , $A_{(ij)l} \sim N(0, \sigma^2_A)$; D_{ijk} é o efeito aleatório amostra-específico (comum aos dois genes), $D_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_D)$; $(RIG)_{ijk}$ é o efeito da interação entre a raça i e idade j no gene k ; ε_{ijkl} é o erro aleatório, $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2_e)$.

O modelo apresentado foi ajustado aos dados por meio do macro %QPCR_MIXED no SAS, baseado em modelos mistos lineares (Steibel et al.,

2009). A significância das estimativas dos contrastes gerados foi avaliada por meio do teste *t* de Student. Além disso, as estimativas dos contrastes (*estimate*) geradas correspondem ao $\Delta\Delta C_t$, os quais foram usados para a estimar a expressão relativa (*foldchange*) por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Adicionalmente, o conjunto de valores de expressão gênica correspondentes aos valores de ΔC_t (C_t gene alvo – C_t gene referência) nos dois grupos genéticos e nos 4 períodos pré-natais foram usados para agrupamento hierárquico, baseando-se no método de ligação completa com a correlação de Pearson como distância usando-se o programa *Hierarchical Clustering Explorer* (Seo e Shneiderman, 2002).

RESULTADOS

Para entender as funções dos 13 genes selecionados, informações sobre as ontologias gênicas de componente celular, função molecular e processo biológico, juntamente com as vias metabólicas em que os genes estavam incluídos foram obtidos, o que incluiu os genes em redes metabólicas funcionais relevantes para o desenvolvimento muscular (Figura 2). Essas redes são de contração do músculo esquelético, desenvolvimento da estrutura muscular, desenvolvimento do embrião, desenvolvimento do órgão, desenvolvimento do órgão muscular, diferenciação muscular, fibra contrátil, movimento músculo-esquelético, processo do sistema muscular e vias de sinalização HEDGEHOG, MAPK e WNT. Adicionalmente, a função desses genes está descrita na Tabela 3 usando a atribuição dos termos de ontologia gênica e vias metabólicas.

A qRT-PCR foi realizada usando-se treze genes ao longo de quatro períodos (idades pré-natais). Após a análise estatística pela ANOVA, verificou-se que dois genes (*MAP2K1* e *RBM24*) apresentaram significância pelo teste F ($P < 0,05$) para o fator idade, não possuindo interação significativa para a interação raça*idade. Os resultados das análises estatísticas pelo teste *t* de Student para os contrastes do desdobramento do fator idade para estes genes estão nas Tabelas Suplementares 1 e 2 para *MAP2K1* e *RBM24*, respectivamente. As estimativas das expressões relativas (*foldchange*) para cada contraste de comparação dois a dois das idades foram usados para

construir os gráficos da Figura 3, onde é possível identificar os contrastes significantes e inferir em qual idade ocorreu maior expressão do gene. Ao se comparar a expressão de *MAP2K1* ao longo das idades, este gene apresentou uma maior expressão aos 40 dpc (período de formação de fibras primárias) e 70 dpc (período de formação de fibras secundárias). *RBM24* apresentou uma maior expressão aos 40 (período de formação de fibras primárias), 70 e 90 dpc (períodos de formação de fibras secundárias).

Além disso, verificou-se que quatro genes (*CSRP3*, *MRAS*, *LEF1* e *MYOG*) apresentaram significância pelo teste F ($P < 0.05$) para a interação raça*idade. Os resultados das análises estatísticas pelo teste *t* de Student para os contrastes desses genes estão nas Tabelas Suplementares 3 a 6. As estimativas das expressões relativas (*foldchange*) para cada contraste de comparação dois a dois das idades foram usados para construir os gráficos da Figura 4 (desdobramento raça*idade para comercial e Piau), onde é possível identificar os contrastes significantes ($P < 0,05$) e inferir em qual idade ocorreu maior expressão do gene.

Sete genes (*CHD8*, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB*, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU*) não apresentaram significância pelo teste F ($P > 0,05$), o que indica que a expressão é constante ao longo das idades e igual nas duas raças.

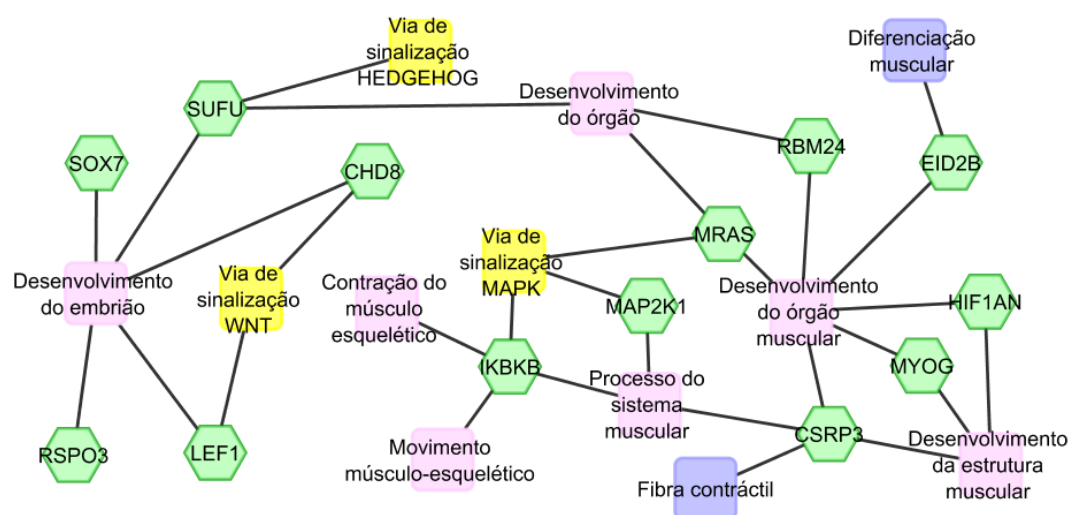


Figura 2: Redes gênicas funcionais e suas interações. Ela descreve o relacionamento entre 13 miogenes (●) com os processos biológicos (■) e funções moleculares (■) identificadas pelo programa Toppcluster e as vias metabólicas identificadas pelo programa DAVID (■).

Tabela 3: Vias metabólicas e ontologias gênicas para os genes representados na rede gênica.

Gene	Via metabólica	Ontologias Gênicas		
		Componente Celular	Função Molecular	Processo Biológico
<i>CHD8</i>	WNT signaling pathway	Lumen nuclear	Ligação a histona e ao DNA	Desenvolvimento do embrião
<i>CSRP3</i>	-	Citoesqueleto	Fibra contrátil	Desenvolvimento do órgão muscular/ Desenvolvimento da estrutura muscular/ Processo do Sistema muscular
<i>EID2B</i>	-	Núcleo	Diferenciação muscular	Desenvolvimento do órgão muscular
<i>HIF1AN</i>	-	Núcleo/Citosol	Ligação à proteína	Desenvolvimento do órgão muscular/ Desenvolvimento da estrutura muscular
<i>IKBKB</i>	MAPK signaling pathway	Núcleo/Citosol	Ligação à proteína	Processo do sistema muscular/ Movimento músculo-esquelético/ Contração do músculo esquelético
<i>LEF1</i>	WNT signaling pathway	Núcleo	Ligação a cromatina e ao DNA	Desenvolvimento do embrião
<i>MAP2K1</i>	MAPK signaling pathway	Citoesqueleto/ Citosol/ núcleo	Atividade proteína kinase	Processo do sistema muscular
<i>MRAS</i>	MAPK signaling pathway	Intracelular	Atividade GTPase/ ligação ao nucleotídeo	Desenvolvimento do órgão muscular/ Desenvolvimento do órgão
<i>MYOG</i>	-	Núcleo	Ligação a cromatina e ao DNA	Desenvolvimento do órgão muscular/ Desenvolvimento da estrutura muscular
<i>RBM24</i>	-	Núcleo/ citoplasma	Ligação ao Nucleotídeo	Desenvolvimento do órgão muscular/ Desenvolvimento do órgão
<i>RSPO3</i>	-	Região extracelular	Ligação ao receptor	Desenvolvimento do embrião
<i>SOX7</i>	-	Núcleo/ citoplasma	Ligação ao ácido nucléico	Desenvolvimento do embrião
<i>SUFU</i>	HEDGEHOG signaling pathway	Núcleo/ citoplasma	Atividade de corepressor da transcrição	Desenvolvimento do embrião/ Desenvolvimento do órgão

Ao se comparar dois períodos de idade para Comercial (Figura 4), *CSRP3* apresentou uma maior expressão durante as duas ondas de fusão dos mioblastos para originar fibras primárias (40 dpc) e secundárias (70 e 90 dpc). *LEF1* apresentou uma maior expressão aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos) e 40 dpc (período de formação das fibras primárias). *MRAS* apresentou uma maior expressão aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos) e 40 dpc (período de formação das fibras primárias). *MYOG* apresentou uma maior expressão aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias), 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias).

Ao se comparar dois períodos de idade para Piau (Figura 4), *CSRP3* apresentou uma maior expressão durante as duas ondas de fusão dos mioblastos para originar fibras primárias (40 dpc) e secundárias (70 e 90 dpc). *LEF1* apresentou uma maior expressão aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos). *MRAS* apresentou pico aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos) e 40 dpc (período de formação das fibras primárias). *MYOG* apresentou uma maior expressão aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias), 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias).

Adicionalmente, o padrão de expressão para cada gene foi representado por agrupamento hierárquico que descreve o nível de expressão para cada gene e, assim, foi possível avaliar melhor as diferenças entre os períodos analisados (21, 40, 70 e 90 dpc) durante o crescimento do embrião e feto.

O agrupamento hierárquico baseado nos valores de expressão (ΔC_i) nos quatro períodos agrupou os genes em quatro grupos separados (Figura 5). O grupo 1 contém os genes *CSRP3*, *MAP2K1*, *MYOG*, *RBM24* para as duas raças e *SUFU* e *SOX7* somente para Piau. O grupo 2 contém os genes *MRAS* e *RSPO3* para as duas raças e *HIF1AN*, *SUFU*, *CHD8*, *EID2B* somente para comercial. O grupo 3 contém o gene *SOX7* para as duas raças e *IKBKB* somente para comercial. E o grupo 4 possui o gene *LEF1* para as duas raças e *CHD8*, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB* somente para Piau.

Em Comercial (Figura 5), *MAP2K1* e *RBM24* apresentaram expressão similar entre raças e, em comercial, *MAP2K1* apresentou alta expressão em todos os períodos com uma maior expressão aos 40 (período de formação das fibras primárias) e 70 dpc (período de formação das fibras secundárias). Já *RBM24* apresentou baixa expressão aos 21 dpc e alta expressão aos 40 dpc

(período de formação das fibras primárias) e 70-90 dpc (período de formação das fibras secundárias). *CSRP3*, *LEF1*, *MRAS* e *MYOG* apresentaram significância para a interação raça*idade, sendo que *CSRP3* apresentou alta expressão ao longo dos períodos, com maior expressão durante as duas ondas de fusão dos mioblastos para originar fibras primárias e secundárias (40 a 90 dpc). *LEF1* apresentou alta expressão aos 21 (período de proliferação dos somitos) e 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e baixa expressão aos 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias). *MRAS* apresentou expressão nula aos 21 dpc, alta aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e baixa aos 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias), sendo que a expressão aos 21 e 40 dpc não difere estatisticamente pelo teste *t* de Student. *MYOG* apresentou baixa expressão aos 21 dpc e expressão nula aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e alta aos 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias), sendo que a expressão aos 40, 70 e 90 dpc não difere estatisticamente pelo teste *t* de Student. A expressão de *CHD8*, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB*, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU* não apresentaram diferença estatística pelo teste *t* de Student, porém *CHD8* apresentou expressão nula aos 21 dpc, alta aos 40 dpc e baixa aos 70 e 90 dpc. *EID2B*, *IKBKB* e *SUFU* apresentaram baixa expressão em todos os períodos. *HIF1AN* apresentou alta expressão aos 21 e 40 dpc, nula aos 70 dpc e baixa aos 90 dpc. *RSPO3* apresentou alta expressão aos 21 a 70 dpc e nula aos 90 dpc. *SOX7* apresentou baixa expressão aos 21 e 70 dpc e nula aos 40 e 90 dpc.

Em Piau (Figura 5), *MAP2K1* e *RBM24* apresentaram expressão similar entre raças e, em Piau, *MAP2K1* apresentou alta expressão em todos os períodos com uma maior expressão aos 40 (período de formação das fibras primárias) e 70 dpc (período de formação das fibras secundárias). Já *RBM24* apresentou baixa expressão aos 21 dpc e alta expressão aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e 70-90 dpc (período de formação das fibras secundárias). *CSRP3*, *LEF1* e *MRAS* e *MYOG* apresentaram significância para a interação raça*idade, sendo que *CSRP3* apresentou alta expressão aos longos dos períodos, com maior expressão durante as duas ondas de fusão dos mioblastos para originar fibras primárias e secundárias (40 a 90 dpc). *LEF1* apresentou alta expressão aos 21 dpc (período de proliferação dos somitos) e baixa expressão aos 40 a 90 dpc (período de formação de fibras primárias e

secundárias). *MRAS* apresentou expressão nula aos 21 dpc, alta aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e baixa aos 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias), sendo que a expressão aos 21 e 40 dpc não difere estatisticamente pelo teste *t* de Student. *MYOG* apresentou baixa expressão aos 21 dpc e nula aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias) e alta aos 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias), sendo que a expressão aos 40, 70 e 90 dpc não difere estatisticamente pelo teste *t* de Student. A expressão *CHD8*, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB*, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU* não apresentaram diferença estatística pelo teste *t* de student, porém *CHD8* apresentou alta expressão aos 21 dpc e baixa aos 40 a 90 dpc. *EID2B* e *SUFU* apresentaram baixa expressão em todos os períodos. *HIF1AN* apresentou alta expressão aos 21 e 40 dpc, nula aos 70 dpc e baixa aos 90 dpc. *IKBKB* apresentou expressão nula aos 21 dpc e baixa aos 40 a 90 dpc. *RSPO3* apresentou alta expressão aos 21, 40 e 90 dpc e nula aos 70 dpc. *SOX7* apresentou baixa expressão aos 21 e 70 dpc e nula aos 40 e 90 dpc.

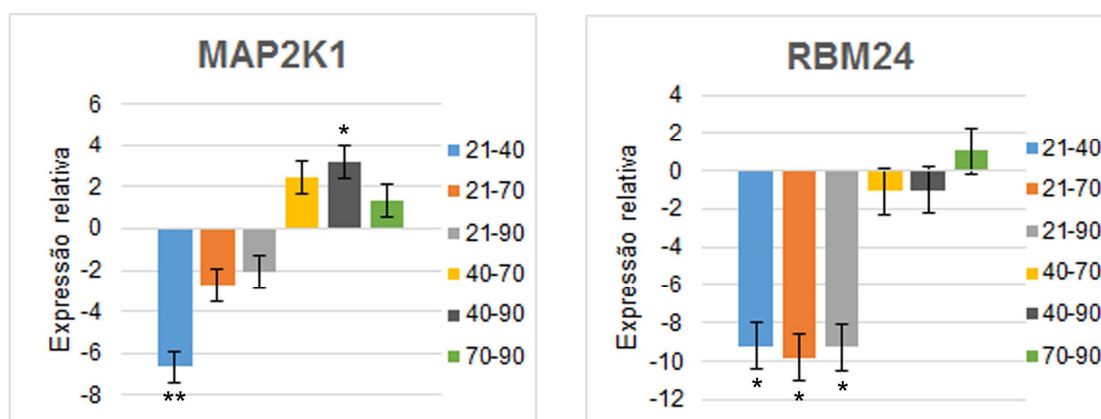


Figura 3: Estimativas das expressões relativas para cada contraste de comparação dois a dois das idades (21, 40, 70 e 90 dpc) para o gene *MAP2K1* e *RBM24*. Estes genes apresentaram significância para o fator Idade (ANOVA) pelo teste F a 0,05% de probabilidade ($P < 0,05$), sem significância para a interação raça*idade (ANOVA). Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste, enquanto que barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator. Os asteriscos indicam contrastes significantes pelo teste *t* de student (* indica $P < 0,05$ e ** indica $P < 0,01$).

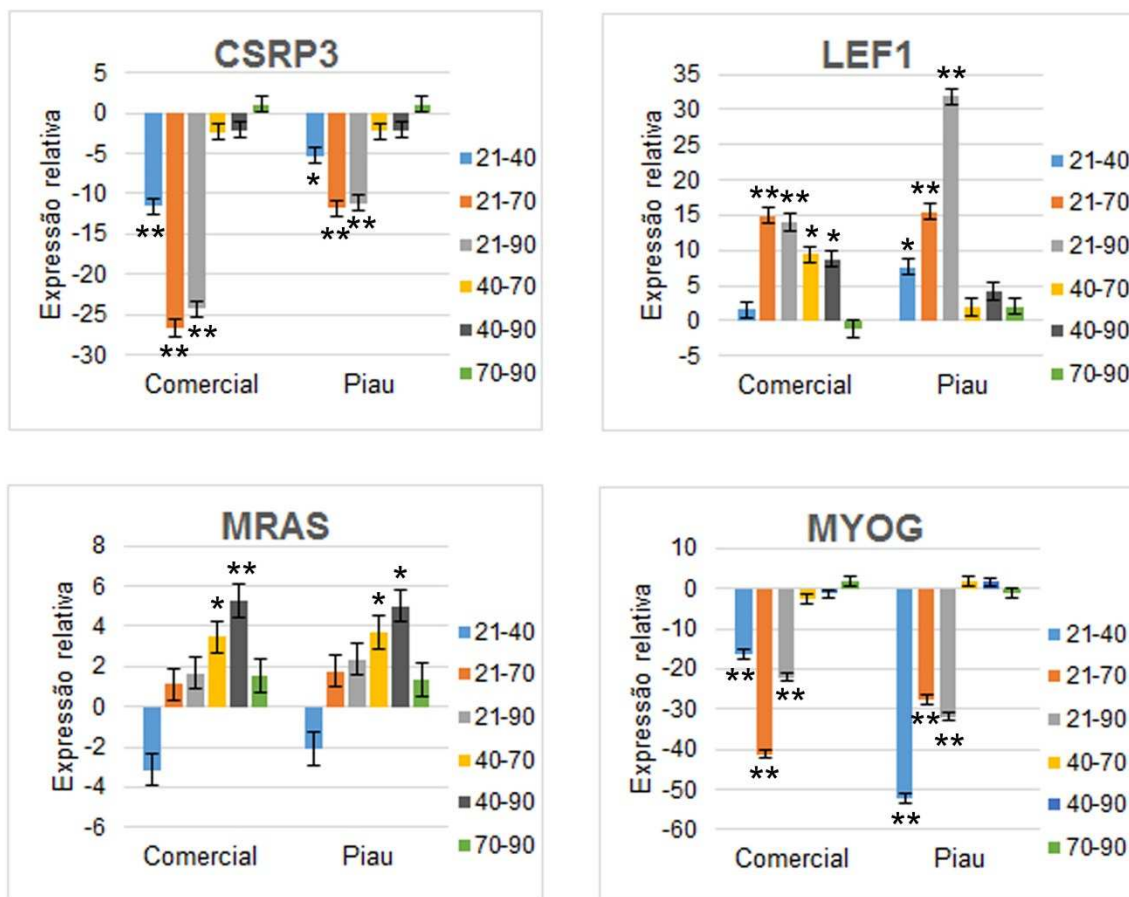


Figura 4: Estimativas das expressões relativas dos genes *CSRP3*, *LEF1*, *MRAS* e *MYOG* para contrastes entre dois períodos das idades pré-natais (21, 40, 70 e 90 dpc) do desdobramento da interação raça*idade (ANOVA) para a linha Comercial e raça local Piau. Estes genes apresentaram interação significativa pelo teste F a 0,05% de probabilidade ($P < 0,05$). Barras acima da origem indicam maior expressão no primeiro fator do contraste, enquanto que barras abaixo da origem indicam maior expressão no segundo fator. Os asteriscos indicam contrastes significantes pelo teste *t* de student (*indica $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

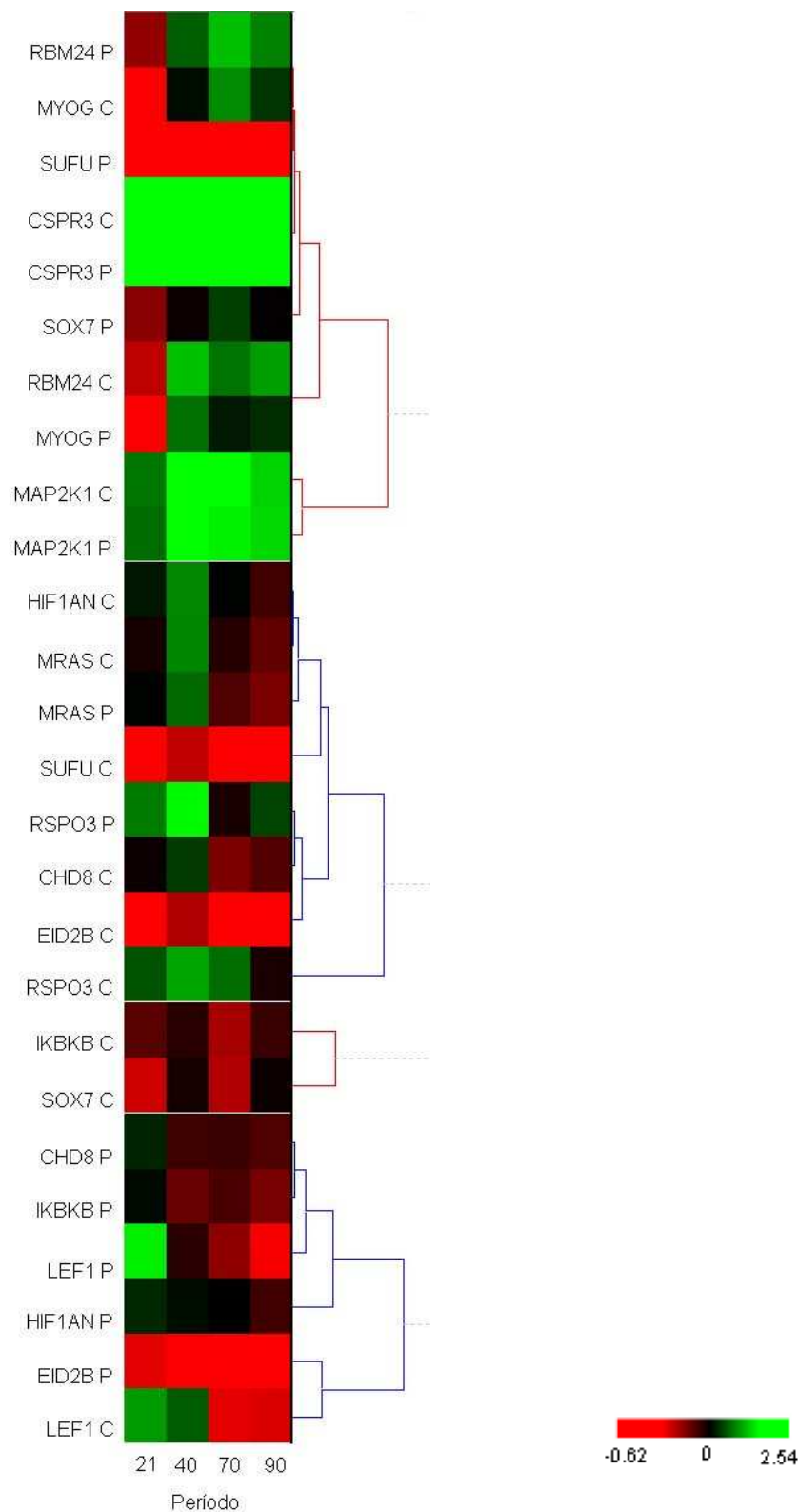


Figura 5: Cluster hierárquico com os níveis de expressão dos miogenes, em relação às quatro idades pré-natais (21, 40, 70 e 90 dias) para as duas linhas genéticas (C: Comercial e P: Piau). Um valor médio de expressão igual a zero está em preto; verde significa expressão aumentada; e em vermelho expressão reduzida.

DISCUSSÃO

Neste estudo, 13 genes envolvidos em redes gênicas importantes para o desenvolvimento do tecido muscular e sua estrutura tiveram a expressão analisada por meio da técnica de qRT-PCR em embriões aos 21 dpc e fetos aos 40, 70 e 90 dpc de suínos comercial (tipo Duroc) e Piau. No período de 21 dpc ocorre a formação dos somitos, enquanto que aos 40 dpc ocorre a formação de fibras primárias e a 70 e 90 dpc ocorre a formação das fibras secundárias. Dessa forma, a análise da expressão de miogenes nas idades analisadas neste estudo permitem concluir sobre o processo de miogênese nas duas raças que diferem quanto à musculosidade.

Suínos da raça Piau nunca participaram de um programa de melhoramento animal e, por isso, espera-se que animais desta raça apresentem um alto nível de gordura do que animais da linha comercial (Serao et al., 2011), que apresentam maior quantidade de músculo.

A massa muscular é influenciada pelo número e tamanho das fibras musculares, que é o principal constituinte do músculo (Rehfeldt et al., 2000) e, por isso, este trabalho focou na avaliação da expressão de genes envolvidos com a formação das células da linhagem miogênica nos períodos analisados, uma vez que a expressão diferencial observada entre grupos genéticos e entre períodos poderiam explicar as diferenças de musculosidade entre as duas raças.

O desenvolvimento do músculo é um processo biológico complexo, sendo regulado por inúmeros genes que se interagem e uma série de vias de transdução de sinal (Zhao et al., 2011). A atividade dos fatores de regulação miogênica (MRFs) são controlados tanto por vias regulatórias que ativam ou inibem a sua atividade, e fatores adicionais são também prováveis de estarem envolvidos em muitos dos circuitos de transcrição que controlam a miogênese (Kong et al., 1997).

MAP2K1 mostrou ter alta expressão em comercial e Piau, com maior expressão durante a formação das fibras primárias (40 dpc) e das fibras secundárias (70 dpc). Este gene pertence à via de sinalização MAPK e está relacionado ao processo biológico de processo do sistema muscular. A via de sinalização MAPK é importante uma vez que pode ativar fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação (Keren et al., 2006) como MEF2A,

MEF2C e MYOD (Wu et al., 2000), podendo acelerar a diferenciação de mioblastos (Lechner et al., 1996). MAP2K1 pode tanto inibir quanto ativar a miogênese, dependendo do estágio de desenvolvimento (Jo et al., 2009). Este gene pode atuar negativamente no controle da proliferação de mioblastos, por meio da supressão da atividade de MYOD nos estágios iniciais da miogênese (Perry et al., 2001). Entretanto, posteriormente a presença de MAP2K1 no núcleo de mioblastos proliferantes pode ter um papel estimulatório na diferenciação muscular (Jo et al., 2009). Assim, nossos resultados indicam que aos 40 e 70 dpc MAP2K1 possa ter um papel estimulatório na diferenciação dos mioblastos em miotubos nas duas raças.

RBM24 mostrou ter a mesma expressão em comercial e Piau, sendo que aos 21 dpc a expressão foi baixa e, posteriormente, alta durante a formação das fibras primárias (40 dpc) e das fibras secundárias (70 e 90 dpc). *RBM24* está envolvido com o processo biológico de desenvolvimento do órgão muscular e desenvolvimento do órgão. *RMB24* é um gene que interage com o mRNA da *MYOG*, regulando sua estabilidade e expressão por meio de uma via regulatória pós-transcricional (Jin et al., 2010), além de também promover a diferenciação miogênica por meio do controle do ciclo celular (Miyamoto et al., 2009). Este resultado confirma que *RBM24* seja necessário para a estabilidade e expressão do mRNA da *MYOG*, promovendo a formação das fibras primárias e secundárias nas duas raças.

CSRP3 apresentou alta expressão em todos os períodos, sendo que ocorreu uma maior expressão durante os períodos de formação das fibras primárias (40 dpc) e secundárias (70 e 90 dpc) em comercial e Piau. Este gene está relacionado com a função molecular de fibra contrátil e aos processos biológicos de processo do sistema muscular, desenvolvimento da estrutura e do órgão muscular. *CSRP3* é um regulador positivo que promove a diferenciação miogênica de mioblastos, sendo primeiramente expresso e acumulado no núcleo quando há a formação e crescimento de miotubos (Arber et al., 1994). Os resultados indicam que a expressão de *CSRP3* seja mais intensificada durante as duas ondas de diferenciação de mioblastos nas duas raças e atue na formação das miofibras primárias e secundárias.

LEF1 apresentou alta expressão nos estágios iniciais da embriogênese aos 21 e 40 dpc em comercial e 21 dpc em Piau, sendo que nos períodos posteriores a expressão é baixa. Este gene está incluído na via de sinalização

WNT e relacionado ao processo biológico de desenvolvimento do embrião. A via WNT é importante, uma vez que ela pode controlar a expressão de fatores de regulação miogênica (MRFs) como *MYF5* e *MYOD*, influenciando a sobrevivência e a diferenciação miogênica (Cossu e Borello, 1999; von Maltzahn et al., 2012). LEF1 pode induzir a progressão do ciclo celular, diferenciação celular e apoptose por meio da ativação da transcrição de *E2F1* (Zhou et al., 2008). Os resultados indicam que *LEF1* seja mais importante nos estágios iniciais do desenvolvimento muscular, principalmente aos 21 dpc em que há formação e proliferação de somitos. O pico de expressão adicional aos 40 dpc em comercial indica que LEF1 possa estar relacionado a uma maior proliferação e fusão de mioblastos, que possivelmente é responsável pelo maior número de fibras primárias em suínos comercial, uma vez que neste período ocorre a formação de miofibras primárias.

MRAS apresentou maior expressão durante o período de formação e proliferação dos somitos (21 dpc) e formação de fibras primárias (40 dpc), sendo que nos períodos subsequentes a expressão é baixa. Este gene está relacionado ao processo biológico de desenvolvimento do órgão muscular e do órgão e pertence à via de sinalização MAPK. *MRAS* é um regulador negativo do processo de diferenciação dos mioblastos durante a miogênese (Yokoyama et al., 2007). Assim, sugerimos que este gene tenha sua função mais intensificada aos 21 e 40 dpc, possivelmente controlando a formação e proliferação de somitos e a diferenciação dos mioblastos em fibras primárias. De fato, este gene pode regular negativamente a expressão ou função dos fatores de transcrição específicos do músculo como *MYOD* e da família *MEF2* (Lassar et al., 1989; Winter e Arnold, 2000; Tortorella et al., 2001), que são essenciais nos períodos iniciais da miogênese controlando a formação de mioblastos e sua fusão para originar miotubos primários nas duas raças. Isso indica que a diferenciação de mioblastos em miotubos envolve um balanço de genes que ativam e inibem o processo.

MYOG apresentou expressão baixa aos 21 dpc e maior expressão durante os períodos de formação das fibras primárias (40 dpc) e secundárias (70 e 90 dpc) em comercial e Piau. Este gene está relacionado com o processo biológico de desenvolvimento da estrutura muscular e de desenvolvimento do órgão muscular. *MYOG* é um MRF importante na diferenciação muscular, sendo necessário para a formação de miotubos multinucleados (Keren et al.,

2006; Kollias e McDermott, 2008). Os resultados confirmam a importância deste fator de transcrição no processo de diferenciação miogênica para a formação de fibras primárias e secundárias.

CHD8, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB*, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU* apresentaram a expressão constante ao longo das idades e nas duas raças. Estudos adicionais a nível de proteína serão necessários para melhor inferir sobre o papel desses genes na miogênese em comercial e Piau, uma vez que não foi possível identificar expressão diferencial ao longo das idades nas duas raças, mas pode ocorrer diferenças na quantidade sintetizada de proteína.

CHD8, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU* estão relacionados ao processo biológico de desenvolvimento do embrião. *CHD8* pertence a via de sinalização WNT. Este gene pode atuar como regulador negativo da atividade transcricional de vários genes induzidos pela ativação da via de sinalização WNT / β -catenina (Nishiyama et al., 2012), além de poder prevenir a apoptose (Nishiyama et al., 2009). *RSPO3* é um regulador positivo da miogênese no músculo esquelético por meio da ativação da via de sinalização WNT / β -catenina, sendo também um sinal para a indução da expressão de *MYF5* (Han et al., 2011). *SOX7* é um regulador negativo da via de sinalização WNT / β -catenina (Chan et al., 2012), podendo funcionar como um gene supressor de tumor (Takash et al., 2001). *SUFU* está relacionado também ao processo biológico de desenvolvimento do órgão e está incluído na via de sinalização HEDGEHOG. Este gene participa como regulador negativo da via de sinalização HEDGEHOG, por meio da supressão da atividade e função dos fatores de transcrição GLI (Ding et al., 1999), que podem aumentar a expressão de genes específicos do músculo como *MYOD* (Voronova et al., 2013). Esta via é importante uma vez que está envolvida na proliferação celular, diferenciação e modelamento do tecido (Heretsch et al., 2010), além de especificar padrões de crescimento celular e diferenciação (Ingham e McMahon, 2001).

EID2B e *HIF1AN* estão envolvidos com o processo biológico de desenvolvimento do órgão muscular. *EID2B* também está relacionado ao processo biológico de diferenciação muscular e é um gene que possui a capacidade de impedir a diferenciação de mioblastos em miotubos (Sasajima et al., 2005). *HIF1AN* está também envolvido com o processo biológico de desenvolvimento da estrutura muscular. *HIF1AN* está envolvido também no processo biológico de desenvolvimento do órgão muscular. Este gene atua na

regulação negativa da apoptose (Yan et al., 2011), além de ser importante para a diferenciação dos mioblastos, sendo um fator de transcrição crucial na regulação da miogênese (Li et al., 2007) . Já foi detectado em um estudo que a expressão do mRNA *HIF1AN* permanece constante durante a miogênese (Wagatsuma et al., 2011).

IKBKB participa da via de sinalização MAPK e está relacionado aos processos biológicos como contração do músculo esquelético, processo do sistema muscular e movimento músculo-esquelético. Este gene é um regulador negativo do processo de diferenciação dos mioblastos durante a miogênese (Bakkar et al., 2008).

Dessa forma, nossos resultados indicam que o gene *LEF1* seja candidato primário para se explicar a diferença de musculabilidade entre comercial e Piau, uma vez que sua expressão nas duas raças leva possivelmente a maior fusão de mioblastos em comercial em relação a Piau. *LEF1* apresentou maior expressão aos 40 dpc em comercial, período crítico para a proliferação e fusão de mioblastos durante a primeira onda de formação das fibras musculares. Assim, o maior número de fibras formadas em comercial em relação a Piau é responsável pela maior musculabilidade observada em comercial no período pós-natal, uma vez que o potencial de crescimento do músculo esquelético depende do número de fibras formadas durante o período pré-natal e do grau de hipertrofia pós-natal das fibras musculares (Rehfeldt et al., 2000).

Assim, a informação contida neste estudo pode ser útil para entender os mecanismos bioquímicos durante a formação do tecido muscular em suínos comercial (tipo Duroc, Landrace e Large-White) e Piau. O presente estudo fornece nova fonte de informação com genes cuja expressão por qRT-PCR em suínos ainda não tinha sido realizada, podendo ser útil para entender os mecanismos moleculares durante o processo de miogênese e que levam a diferenças entre linhas genéticas quanto à musculabilidade.

CONCLUSÕES

A expressão de *CHD8*, *EID2B*, *HIF1AN*, *IKBKB*, *RSPO3*, *SOX7* e *SUFU* é constante ao longo das idades e igual nas duas raças.

CSRP3 apresentou uma maior expressão durante as duas ondas de fusão dos mioblastos para originar fibras primárias (40 dpc) e secundárias (70 e 90 dpc) nas duas raças.

MRAS apresentou maior expressão aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos) e 40 dpc (período de formação das fibras primárias).

MYOG apresentou uma maior expressão aos 40 dpc (período de formação das fibras primárias), 70 e 90 dpc (período de formação das fibras secundárias).

LEF1 apresentou uma maior expressão aos 21 dpc (período de formação e proliferação dos somitos) nas duas raças e um pico adicional de maior expressão aos 40 dpc (período de formação de fibras primárias) em comercial.

O gene *LEF1* é candidato primário para se explicar a diferença de musculabilidade entre comercial e Piau, uma vez que a expressão leva possivelmente a maior fusão de mioblastos para formar mais fibras primárias em comercial em relação a Piau.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64: 5245-5250.
- Arber S, Halder G and Caroni P (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79: 221-231.
- Bakkar N, Wang J, Ladner KJ, Wang H, et al. (2008). IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *J. Cell Biol.* 180: 787-802.
- Beermann DH, Cassens RG and Hausman GJ (1978). A Second Look at Fiber Type Differentiation in Porcine Skeletal Muscle. *J. Anim. Sci.* 46: 125-132.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, et al. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41: D36-42.

- Cagnazzo M, te Pas MF, Priem J, de Wit AA, et al. (2006). Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *J. Anim. Sci.* 84: 1-10.
- Chan DW, Mak CS, Leung TH, Chan KK, et al. (2012). Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt/b-catenin signaling in endometrial cancer. *Oncotarget* 3: 1546-1556.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Cossu G and Borello U (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18: 6867-6872.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, et al. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4: P3.
- Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, et al. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.* 9: 1119-1122.
- Han XH, Jin YR, Seto M and Yoon JK (2011). A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 286: 10649-10659.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L and Giannis A (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 6613-6624.
- Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4: 44-57.
- Ingham PW and McMahon AP (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087.
- Jin D, Hidaka K, Shirai M and Morisaki T (2010). RNA-binding motif protein 24 regulates myogenin expression and promotes myogenic differentiation. *Genes Cells* 15: 1158-1167.
- Jo C, Jang BG and Jo SA (2009). MEK1 plays contrary stage-specific roles in skeletal myogenic differentiation. *Cell. Signal.* 21: 1910-1917.

- Kaimal V, Bardes EE, Tabar SC, Jegga AG, et al. (2010). ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. *Nucleic Acids Res.* 38: W96-102.
- Keren A, Tamir Y and Bengal E (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 224-230.
- Kollias HD and McDermott JC (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104: 579-587.
- Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ and Konieczny SF (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4750-4760.
- Lassar AB, Thayer MJ, Overell RW and Weintraub H (1989). Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell* 58: 659-667.
- Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, et al. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 4355-4359.
- Li X, Zhu L, Chen X and Fan M (2007). Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts. *Med. Hypotheses* 69: 629-636.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Maltin CA, Delday MI, Sinclair KD, Steven J, et al. (2001). Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction* 122: 359-374.
- McCulloch RS, Ashwell MS, O'Nan AT and Mente PL (2012). Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 3: 36.
- Miyamoto S, Hidaka K, Jin D and Morisaki T (2009). RNA-binding proteins Rbm38 and Rbm24 regulate myogenic differentiation via p21-dependent and -independent regulatory pathways. *Genes Cells* 14: 1241-1252.

- Murani E, Muraniová M, Ponsuksili S, Schellander K, et al. (2007). Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. *BMC Dev. Biol.* 7: 109.
- Nishiyama M, Oshikawa K, Tsukada Y, Nakagawa T, et al. (2009). CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 11: 172-182.
- Nishiyama M, Skoultschi AI and Nakayama KI (2012). Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt-beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 32: 501-512.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, et al. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 36: W163-169.
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. (Meuer S, Wittwer C and Nakagawara K, eds.). Springer, Heidelberg, 21-34.
- Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G and Ender K (2000). Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livest. Prod. Sci.* 66: 177-188.
- Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, et al. (2010). GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database* 2010: baq020.
- Sasajima Y, Tanaka H, Miyake S and Yuasa Y (2005). A novel EID family member, EID-3, inhibits differentiation and forms a homodimer or heterodimer with EID-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 969-975.
- Seo J and Shneiderman B (2002). Interactively Exploring Hierarchical Clustering Results. *Computer* 35: 80-86.
- Serao NV, Veroneze R, Ribeiro AM, Verardo LL, et al. (2011). Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 28-34.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13: 2498-2504.

- Sollero BP, Guimaraes SE, Rilmington VD, Tempelman RJ, et al. (2011). Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. *Anim. Genet.* 42: 600-612.
- Steibel JP, Poletto R, Coussens PM and Rosa GJ (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94: 146-152.
- Swatland HJ and Cassens RG (1973). Prenatal development, histochemistry and innervation of porcine muscle. *J. Anim. Sci.* 36: 343-354.
- Takash W, Cañizares J, Bonneaud N, Poulat F, et al. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res.* 29: 4274-4283.
- Te Pas MF, De Wit AA, Priem J, Cagnazzo M, et al. (2005). Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26: 157-165.
- Tortorella LL, Milasincic DJ and Pilch PF (2001). Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 13709-13717.
- von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF and Rudnicki MA (2012). Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol.* 22: 602-609.
- Voronova A, Coyne E, Al Madhoun A, Fair JV, et al. (2013). Hedgehog signaling regulates MyoD expression and activity. *J. Biol. Chem.* 288: 4389-4404.
- Wagatsuma A, Kotake N and Yamada S (2011). Spatial and temporal expression of hypoxia-inducible factor-1alpha during myogenesis in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* 347: 145-155.
- Wigmore PM and Evans DJ (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 216: 175-232.
- Wigmore PM and Stickland NC (1983). Muscle development in large and small pig fetuses. *J. Anat.* 137 (Pt 2): 235-245.

- Winter B and Arnold HH (2000). Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23: 4211-4220.
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, et al. (2000). p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3951-3964.
- Yan B, Kong M and Chen YH (2011). Prevention of apoptosis by the interaction between FIH1 and Bax. *Mol. Cell. Biochem.* 348: 1-9.
- Yokoyama T, Takano K, Yoshida A, Katada F, et al. (2007). DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* 177: 781-793.
- Zhao X, Mo D, Li A, Gong W, et al. (2011). Comparative Analyses by Sequencing of Transcriptomes during Skeletal Muscle Development between Pig Breeds Differing in Muscle Growth Rate and Fatness. *PLoS ONE* 6: e19774.
- Zhou F, Zhang L, Gong K, Lu G, et al. (2008). LEF-1 activates the transcription of E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 149-153.

Tabela Suplementar 1: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro do fator idade para o gene MAP2K1.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
idade:1-2 geneMAP2K1	2,73475	-6,6564	0,772039	3,54	0,002711
idade:1-3 geneMAP2K1	1,458083	-2,7474	0,772039	1,89	0,077211
idade:1-4 geneMAP2K1	1,06125	-2,0867	0,772039	1,37	0,188201
idade:2-3 geneMAP2K1	-1,27667	2,4228	0,772039	-1,64	0,117685
idade:2-4 geneMAP2K1	-1,6735	3,1899	0,772039	-2,16	0,045615
idade:3-4 geneMAP2K1	-0,39683	1,3166	0,772039	-0,5	0,614273

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).

Tabela Suplementar 2: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro do fator idade para o gene RBM24.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
idade:1-2 geneRBM24	3,200917	-9,1954	1,229486	2,6	0,019205
idade:1-3 geneRBM24	3,293083	-9,8020	1,229486	2,68	0,016484
idade:1-4 geneRBM24	3,213917	-9,2787	1,229486	2,61	0,018797
idade:2-3 geneRBM24	0,092167	-1,0660	1,229486	0,07	0,941173
idade:2-4 geneRBM24	0,013	-1,0091	1,229486	0,01	0,991694
idade:3-4 geneRBM24	-0,07917	1,0564	1,229486	-0,05	0,949457

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).

Tabela Suplementar 3: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro de um fator, raça ou idade, fixado para cada nível do outro fator (raça ou idade) para o gene CSRP3.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
raca:1-2 idade=1 gene:CSRP3	0,7640	-1,6982	1,0168	0,75	0,4633
raca:1-2 idade=2 gene:CSRP3	-0,3587	1,2822	1,0168	-0,34	0,7289
raca:1-2 idade=3 gene:CSRP3	-0,4090	1,3278	1,0168	-0,39	0,6928
raca:1-2 idade=4 gene:CSRP3	-0,3568	1,2806	1,0168	-0,34	0,7302
idade:1-2 raca=1 gene:CSRP3	3,5285	-11,5394	1,0168	3,47	0,0032
idade:1-3 raca=1 gene:CSRP3	4,7358	-26,6457	1,0168	4,66	0,0003
idade:1-4 raca=1 gene:CSRP3	4,6013	-24,2739	1,0168	4,53	0,0003
idade:2-3 raca=1 gene:CSRP3	1,2073	-2,3091	1,0168	1,19	0,2524
idade:2-4 raca=1 gene:CSRP3	1,0728	-2,1036	1,0168	1,06	0,3070
idade:3-4 raca=1 gene:CSRP3	-0,1345	1,0977	1,0168	-0,12	0,8964
idade:1-2 raca=2 gene:CSRP3	2,4058	-5,2994	1,0168	2,37	0,0309
idade:1-3 raca=2 gene:CSRP3	3,5628	-11,8173	1,0168	3,5	0,0029
idade:1-4 raca=2 gene:CSRP3	3,4805	-11,1618	1,0168	3,42	0,0035
idade:2-3 raca=2 gene:CSRP3	1,1570	-2,2299	1,0168	1,14	0,2719
idade:2-4 raca=2 gene:CSRP3	1,0747	-2,1062	1,0168	1,06	0,3062
idade:3-4 raca=2 gene:CSRP3	-0,0823	1,0587	1,0168	-0,07	0,9365

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).

Tabela Suplementar 4: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro de um fator, raça ou idade, fixado para cada nível do outro fator (raça ou idade) para o gene LEF1.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
raca:1-2 idade=1 gene:LEF1	0,8983	-1,8639	1,1956	0,75	0,4634
raca:1-2 idade=2 gene:LEF1	-1,3808	2,6042	1,1956	-1,14	0,2651
raca:1-2 idade=3 gene:LEF1	0,8450	-1,7963	1,1956	0,71	0,4899
raca:1-2 idade=4 gene:LEF1	-0,2932	1,2253	1,1956	-0,24	0,8094
idade:1-2 raca=1 gene:LEF1	-0,6610	1,5812	1,1956	-0,54	0,5880
idade:1-3 raca=1 gene:LEF1	-3,9005	14,9337	1,1956	-3,25	0,0049
idade:1-4 raca=1 gene:LEF1	-3,8023	13,9514	1,1956	-3,17	0,0058
idade:2-3 raca=1 gene:LEF1	-3,2395	9,4447	1,1956	-2,7	0,0155
idade:2-4 raca=1 gene:LEF1	-3,1413	8,8234	1,1956	-2,62	0,0183
idade:3-4 raca=1 gene:LEF1	0,0982	-1,0704	1,1956	0,08	0,9356
idade:1-2 raca=2 gene:LEF1	-2,9402	7,6750	1,1956	-2,45	0,0257
idade:1-3 raca=2 gene:LEF1	-3,9538	15,4961	1,1956	-3,3	0,0045
idade:1-4 raca=2 gene:LEF1	-4,9938	31,8635	1,1956	-4,17	0,0007
idade:2-3 raca=2 gene:LEF1	-1,0137	2,0190	1,1956	-0,84	0,4091
idade:2-4 raca=2 gene:LEF1	-2,0537	4,1516	1,1956	-1,71	0,1052
idade:3-4 raca=2 gene:LEF1	-1,0400	2,0562	1,1956	-0,86	0,3973

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).

Tabela Suplementar 5: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro de um fator, raça ou idade, fixado para cada nível do outro fator (raça ou idade) para o gene MRAS.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
raca:1-2 idade=1 gene:MRAS	0,2525	-1,1913	0,8054	0,31	0,7579
raca:1-2 idade=2 gene:MRAS	-0,3168	1,2456	0,8054	-0,38	0,6992
raca:1-2 idade=3 gene:MRAS	-0,4230	1,3407	0,8054	-0,52	0,6066
raca:1-2 idade=4 gene:MRAS	-0,2445	1,1847	0,8054	-0,29	0,7653
idade:1-2 raca=1 gene:MRAS	1,6478	-3,1336	0,8054	2,05	0,0575
idade:1-3 raca=1 gene:MRAS	-0,1403	1,1022	0,8054	-0,16	0,8639
idade:1-4 raca=1 gene:MRAS	-0,7488	1,6804	0,8054	-0,92	0,3663
idade:2-3 raca=1 gene:MRAS	-1,7882	3,4538	0,8054	-2,21	0,0412
idade:2-4 raca=1 gene:MRAS	-2,3967	5,2659	0,8054	-2,97	0,0089
idade:3-4 raca=1 gene:MRAS	-0,6085	1,5247	0,8054	-0,75	0,4609
idade:1-2 raca=2 gene:MRAS	1,0785	-2,1118	0,8054	1,34	0,1992
idade:1-3 raca=2 gene:MRAS	-0,8158	1,7603	0,8054	-1	0,3261
idade:1-4 raca=2 gene:MRAS	-1,2458	2,3716	0,8054	-1,54	0,1414
idade:2-3 raca=2 gene:MRAS	-1,8943	3,7175	0,8054	-2,34	0,0318
idade:2-4 raca=2 gene:MRAS	-2,3243	5,0083	0,8054	-2,88	0,0107
idade:3-4 raca=2 gene:MRAS	-0,4300	1,3472	0,8054	-0,52	0,6007

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).

Tabela Suplementar 6: Resultados das análises estatísticas para cada contraste entre tratamentos incluindo a comparação dois a dois dentro de um fator, raça ou idade, fixado para cada nível do outro fator (raça ou idade) para o gene MYOG.

Contraste	Estimate	Foldchange	Erro padrão	t-value	P-value
raca:1-2 idade=1 gene:MYOG	-0,6065	1,5226	1,1351	-0,52	0,6004
raca:1-2 idade=2 gene:MYOG	1,0668	-2,0948	1,1351	0,94	0,3612
raca:1-2 idade=3 gene:MYOG	-1,1790	2,2642	1,1351	-1,03	0,3143
raca:1-2 idade=4 gene:MYOG	-0,0743	1,0529	1,1351	-0,06	0,9486
idade:1-2 raca=1 gene:MYOG	4,0293	-16,3286	1,1351	3,55	0,0026
idade:1-3 raca=1 gene:MYOG	5,3647	-41,2027	1,1351	4,73	0,0002
idade:1-4 raca=1 gene:MYOG	4,4592	-21,9960	1,1351	3,93	0,0012
idade:2-3 raca=1 gene:MYOG	1,3353	-2,5233	1,1351	1,18	0,2565
idade:2-4 raca=1 gene:MYOG	0,4298	-1,3471	1,1351	0,38	0,7099
idade:3-4 raca=1 gene:MYOG	-0,9055	1,8732	1,1351	-0,79	0,4366
idade:1-2 raca=2 gene:MYOG	5,7027	-52,0803	1,1351	5,02	0,0001
idade:1-3 raca=2 gene:MYOG	4,7922	-27,7068	1,1351	4,22	0,0006
idade:1-4 raca=2 gene:MYOG	4,9913	-31,8083	1,1351	4,4	0,0004
idade:2-3 raca=2 gene:MYOG	-0,9105	1,8797	1,1351	-0,79	0,4341
idade:2-4 raca=2 gene:MYOG	-0,7113	1,6373	1,1351	-0,62	0,5396
idade:3-4 raca=2 gene:MYOG	0,1992	-1,1480	1,1351	0,18	0,8629

Idade:1 = 21 d, 2 = 40 d, 3 = 70 d, 4 = 90 d Raça:1 = Comercial, 2 = Piau
Valores em negrito foram estatisticamente significantes com P-valor menor que 0,05.
Um *foldchange* positivo (expressão relativa) significa alta expressão do primeiro nível relativo ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para cada nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).
Um *foldchange* negativo (expressão relativa) significa baixa expressão no primeiro nível em relação ao segundo nível da comparação dois a dois dentro de um fator (idade pré-natal ou raça) fixado para o outro nível dentro do outro fator (idade pré-natal ou raça).