

**MARGARETH EVANGELISTA BOTELHO**

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES REVELAM DIFERENÇAS  
TEMPORAIS NO PROCESSO MIOGÊNICO EM SUÍNOS DE DIFERENTES  
GRUPOS GENÉTICOS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016**

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

T

B748a  
2016 Botelho, Margareth Evangelista, 1990-  
Análises morfológicas e moleculares revelam diferenças  
temporais no processo miogênico em suínos de diferentes grupos  
genéticos / Margareth Evangelista Botelho. – Viçosa, MG, 2016.  
ix, 58f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.32-36.

1. Suíno - Genética. 2. Expressão gênica. 3. Miogênese.  
4. Porcos - Fetos. 5. Músculos - Fisiologia. 6. Músculos -  
Morfologia . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

**MARGARETH EVANGELISTA BOTELHO**

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES REVELAM DIFERENÇAS  
TEMPORAIS NO PROCESSO MIOGÊNICO EM SUÍNOS DE DIFERENTES  
GRUPOS GENÉTICOS**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2016

---

Marcio de Souza Duarte

---

Paulo Sávio Lopes

---

Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Orientador)

***"Não existem fatos eternos nem verdades absolutas."*** (F. W. Nietzsche)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe pelo exemplo de força, coragem e sabedoria, sempre me apoiando e me ensinado a ver o melhor da vida. Ao meu pai, que carinhosamente sempre fez o seu máximo e o melhor para não deixar desistir ao longo deste caminho. Aos meus irmãos e irmãs (Marta, Joelma, Adenilson, Heraldo e Fernando) por me ajudar ao longo dos meus estudos, tornando possível estar aqui. A minha “irmãzinha” Gabi, pelo apoio, companheirismo, diversões e paciência. A todos meus irmãos (Marta, Adelson, Everaldo, Joelma, Heraldo, Adenilson, Fernando e Gabi) e ao Reginaldo pelo carinho e conforto emocional que me fizeram suportar as dificuldades desta jornada.

Aos amigos de Viçosa, da UFV e do LABTEC pelos momentos de diversão, descontração e brincadeiras, vocês tornaram mais leve o percurso até aqui. Agradeço a Renata, Débora, Lucas, Marcio, Walmir, Alessandra e Taiane pelos ensinamentos, conselhos e paciência, vocês foram fundamentais ao meu desenvolvimento. Aos funcionários da GMS, sempre atenciosos e dispostos a ajudar no desenvolvimento das pesquisas.

À minha orientadora Simone e aos professores Paulo Sávio, Marcio e Fabyano pelos ensinamentos ao longo da minha vida acadêmica na UFV.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e financiamento de projeto de pesquisa.

Muito obrigada a todos!

## **BIOGRAFIA**

Margareth Evangelista Botelho, filha de José João Evangelista e Adília Evangelista Botelho, nasceu no dia 23 de janeiro de 1990 em Unaí, Minas Gerais. Graduou-se como bacharel Zootecnia em 2009, na Universidade Federal de Viçosa (UFV) no ano de 2014. Em março de 2014 ingressou no mestrado do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV.

## RESUMO

BOTELHO, Margareth Evangelista, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Análises morfológicas e moleculares revelam diferenças temporais no processo miogênico em suínos de diferentes grupos genéticos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães.

A massa muscular de um animal é o grande determinante da quantidade de carne produzida por ele e a maior parte do potencial de deposição muscular é determinado durante a miogênese fetal. Neste estudo foram avaliadas a morfologia muscular e a expressão de genes e proteínas em fetos aos 21 dias pós cobertura (dpc) e no músculo *Longissimus* de fetos suínos aos 40, 70 e 90 dpc a fim de verificar a existência de diferenças na miogênese fetal de suínos de dois grupos genéticos fenotipicamente divergentes. Ao todo 12 matrizes gestantes de suínos de linhagem Comercial (LC) e 12 da raça Piau (RP) foram abatidas aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc), três fêmeas de cada grupo genético por fase. Fetos inteiros aos 21 dpc e músculo *longissimus* de fetos aos 40, 70 e 90 dpc foram coletados para avaliação de expressão gênica e proteica e para análise morfológica. Fetos RP aos 21 dpc apresentaram expressão dos genes *DES* ( $P= 0,035$ ), *CALM1* ( $P= 0,093$ ) e *RYR2* ( $P= 0,088$ ) menor que os LC e não foram verificadas diferença na expressão das proteínas Troponina T ( $P= 1,000$ ) Calpaína 3 ( $P= 0,689$ ) e Desmina ( $P= 0,999$ ). Aos 40 dpc, o gene *RyR1* ( $P= 0,063$ ) e as proteínas Desmina ( $P< 0,001$ ) e Troponina T ( $P= 0,036$ ) foram mais expressos em fetos RP. Aos 70 dpc o número ( $P= 0,0298$ ) e porcentagem de miofibras primárias ( $P= 0,0072$ ) foram maiores em fetos LC que em fetos RP, já aos 90 dpc esta relação se inverteu e o número ( $P< 0,001$ ) e porcentagem ( $P< 0,001$ ) de miofibras primárias foram maiores em fetos RP. Aos 90 dpc também foram observadas maior expressão dos genes *ACTA2* ( $P= 0,024$ ), *CAPN3* ( $P= 0,061$ ), *HTR1D* ( $P= 0,027$ ) e *TNNT1* ( $P= 0,069$ ) em fetos LC e a expressão da Troponina T ( $P= 0,037$ ) e do gene *PPP3CA* ( $P= 0,061$ ) foram mais elevadas em fetos RP. Padrões na expressão gênica raça-específico ao longo do desenvolvimento muscular foram observados neste estudo. Embriões RP aos 21 dias apresentaram maior expressão do gene *RyR1* que aos 40 ( $P= 0,026$ ), 70 ( $P= 0,002$ ) e 90 ( $P< 0,001$ ) dpc e ainda, a expressão deste em fetos RP aos 40 dpc foi maior que aos 90 ( $P= 0,008$ ) dpc. A expressão do gene *RyR2* em embriões RP aos 21 dias menor que aos 70 ( $P= 0,003$ ) e aos 90 ( $P= 0,044$ ) dpc e

também a expressão do gene *TNNT1* aos 70 dias foi maior que aos 40 ( $P= 0,023$ ) e 90 ( $P= 0,036$ ) dpc. Em fetos LC foi verificada menor expressão do gene *HTR1D* aos 21 dias quando comparados aos 70 ( $P= 0,037$ ) e aos 90 ( $P= 0,021$ ) dpc e maior expressão do gene *PPP3CA* aos 21 dias comparando com 40 dpc ( $P= 0,026$ ). As variações raça-específicas observadas neste estudo mostram que as diferenças no fenótipo muscular de animais Piau e Comercial existem desde a vida intrauterina e que genes diferentes podem estar envolvidos com o controle dos processos de desenvolvimento muscular em cada raça, fazendo com que o fenótipo do músculo seja diferente antes mesmo do nascimento.

## ABSTRACT

BOTELHO, Margareth Evangelista, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Morphological and molecular analysis revealed temporal differences in myogenic process in pigs of different genetic groups.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Animal muscle mass is the major determinant of how much meat they can produce. The biggest part of muscle deposition potential is determined during fetal myogenesis. We evaluated muscle morphology, genes and proteins expression in swine fetuses at 21 days-post-coitus (dpc) and *Longissimus* muscle of swine fetuses at 40, 70 and 90 dpc. Our goal was evaluate differences in fetal myogenesis from two pig groups phenotypically divergent. Twelve pregnant sows of each Commercial line and Piau breed were slaughtered at 21, 40, 70 and 90 dpc. Complete fetuses at 21 dpc and *Longissimus* muscle of fetuses at 40, 70 and 90 dpc were used for gene and protein expressions and morphological analysis. Piau fetuses at 21 dpc showed less genes expression of *DES* ( $P= 0.035$ ), *CALM1* ( $P= 0.093$ ) and *RYR2* ( $P= 0.088$ ) comparing with commercial fetuses at 21 dpc. At 40 dpc, the *RyR1* ( $P= 0.063$ ) gene and Desmin ( $P< 0.001$ ) and Troponin T ( $P= 0.036$ ) proteins were higher expressed in Piau fetuses than Commercial fetuses. At 70 dpc the number ( $P= 0.0298$ ) and proportion ( $P= 0.0072$ ) of primary myofibers were higher in Commercial fetuses than Piau fetuses, however at 90 dpc the number ( $P< 0.001$ ) and proportion ( $P< 0.001$ ) of primary myofibers were higher in Piau fetuses. At 90 dpc were also observed increased expression of *ACTA2* ( $P= 0.024$ ), *CAPN3* ( $P= 0.061$ ), *HTR1D* ( $P= 0.027$ ) and *TNNT1* ( $P= 0.069$ ) genes in commercial fetuses and *PPP3CA* ( $P= 0.061$ ) gene in Piau fetuses. However, at 90 dpc, Piau fetuses also showed higher Troponin T expression ( $P= 0.037$ ) compared with commercial fetuses. Breed-specific patterns of gene expression in developing pig skeletal muscle were observed in this study. In Piau breed fetuses we observed higher *RyR1* gene expression at 21 dpc comparing with at 40 ( $P= 0.026$ ), 70 ( $P= 0.02$ ) and 90 ( $P< 0.001$ ) dpc while in 40 dpc fetuses this gene expression was higher than 90 dpc fetuses. At 21 dpc, Piau fetuses showed lower expression of *RyR2* gene than Piau fetuses at 70 ( $P= 0.003$ ) and 90 ( $P= 0.044$ ) dpc. Moreover the *TNNT1* gene expression at 70 dpc was higher than 40 ( $P= 0.023$ ) and 90 ( $P= 0.036$ ) dpc in Piau fetuses. Commercial line fetuses showed lower *HTR1D* gene expression at

21 dpc compared to 70 ( $P= 0.037$ ) and 90 ( $P= 0.021$ ) dpc. An increased expression of *PPP3CA* gene in Commercial fetuses at 21 days compared to commercial fetuses at 40 dpc ( $P= 0.026$ ) was observed. The breed-specific changes observed in this study have shown that differences in muscle fibers between Piau and Commercial pigs are due different genes provided during intrauterine life as well as may be involved in the control of muscle development processes in each genetic group, causing the phenotype muscle differences even before birth.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	2
<b>2.1. Desenvolvimento do músculo esquelético de suínos</b> .....	2
<b>2.2. Controle molecular do desenvolvimento muscular fetal</b> .....	3
<b>2.3. Miogênese e produção de carne em suíno</b> .....	7
<b>2.4. Grupos genéticos de suínos</b> .....	9
<b>3. Hipótese</b> .....	10
<b>4. Objetivos</b> .....	10
<b>4.1. Objetivo Geral</b> .....	10
<b>4.2. Objetivos Específicos</b> .....	10
<b>5. Material e Métodos</b> .....	11
<b>5.1. Obtenção das amostras</b> .....	11
<b>5.2. Análise do número de fibras musculares</b> .....	11
<b>5.3. Westen-blot</b> .....	12
<b>5.4. Extração de RNA e análise de expressão gênica</b> .....	13
<b>5.5. Seleção dos genes e desenho dos primers</b> .....	14
<b>5.6. Análise estatística</b> .....	18
<b>6. Resultados</b> .....	20
<b>6.1. Análise Histológica</b> .....	20
<b>6.2. Western-blot</b> .....	22
<b>6.3. Expressão gênica</b> .....	24
<b>7. Discussão</b> .....	27
<b>8. Conclusão</b> .....	31
<b>9. Referências</b> .....	32
Anexo I – Parecer CEUA-UFV .....	37
<b>Material Suplementar</b> .....	38

## 1. Introdução

A massa muscular de um animal é o grande determinante da quantidade de carne produzida por ele e a maior parte do potencial de deposição muscular é determinado durante a miogênese fetal. Devido à importância do músculo na produção de carne, é necessário entender os processos que regulam a formação e o desenvolvimento deste tecido e, portanto, estudos visando melhor compreensão dos processos de formação e desenvolvimento do tecido muscular esquelético são necessários.

O número de fibras é definido principalmente por fatores genéticos que influenciam no processo de miogênese pré-natal. O potencial de crescimento muscular pós-natal de um animal é altamente dependente do número de fibras geradas na fase pré-natal (ZHAO et al., 2011; REHFELDT et al., 2000), uma vez que o diâmetro da fibra é determinado genética e fisiologicamente (REHFELDT et al., 2000).

O controle do desenvolvimento muscular fetal é realizado por uma série de genes, incluindo alguns que não foram previamente associados à miogênese (SOLLERO et al., 2011) e muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de elucidar este processo (VERARDO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012; SOLLERO et al., 2011; ZHAO et al., 2011, CAGNAZZO et al., 2006). Entretanto, os genes envolvidos na formação e no desenvolvimento do tecido muscular, suas funções, interações e atuação ainda carecem de esclarecimento. Desta forma, a investigação de genes expressos durante a miogênese é fundamental para entender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento deste tecido. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar características morfológicas, expressão de genes e proteínas relacionados à miogênese no tecido muscular esquelético de fetos suínos de dois grupos genéticos divergentes durante o desenvolvimento pré-natal.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Desenvolvimento do músculo esquelético de suínos**

Em suínos, assim como na maioria dos mamíferos, a hiperplasia muscular ocorre principalmente na fase fetal e a diferenciação do mioblasto em fibra muscular ocorre em duas etapas. Primeiramente os mioblastos se proliferam estabelecendo uma grande população de células capazes de se diferenciar e expressar proteínas importantes no desenvolvimento do tecido muscular esquelético. Posteriormente, esta população de mioblastos sofre diferenciação originando as células musculares.

Uma onda primária de geração de fibra muscular ocorre entre 35 e 55 dias de gestação, seguida por uma segunda onda de geração que acontece entre 55 e 95 dias. Entre 30 a 35 dias do desenvolvimento embrionário os mioblastos diferenciados se fundem formando miotubos multinucleados e posteriormente as miofibras primárias (WIGMORE e STICKLAND, 1983). Por volta de 77 dias de desenvolvimento, durante a segunda fase de diferenciação, mioblastos fetais formam miofibras secundárias (WIGMORE e STICKLAND, 1983). Outro conjunto de mioblastos se diferencia em células satélites, capazes de fornecer mionúcleos durante o crescimento pós-natal (MOSS et al., 1971; SCHULTZ, 1974). O número total de fibras musculares de suíno geralmente é considerado definitivo por volta de 90-95 dias de gestação sendo que o nascimento ocorre em média após 114 dias de gestação.

Apesar do controle molecular do desenvolvimento muscular ser complexo e bastante delicado, é possível observar diferenças nos estágios de formação deste tecido dependendo da genética do animal (VERARDO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012; SOLLERO et al., 2011; CAGNAZZO et al., 2006; ZHAO et al., 2011; SOLLERO et al., 2011). Em suínos, a miogênese pode ocorrer em tempos diferenciados de acordo com genética dos animais. Além disso, as raças de suínos ou grupos genéticos divergentes em características musculares como musculosidade, tipos de fibra e de gordura total, podem apresentar distintos padrões de proliferação e diferenciação celular, bem como na formação da estrutura muscular durante o processo miogênico (REHFELDT et al., 2000). Por conseguinte, a comparação entre grupos genéticos divergentes pode fornecer informações importantes sobre os fatores genéticos responsáveis pela regulação da miogênese.

## 2.2. Controle molecular do desenvolvimento muscular fetal

A compreensão da dinâmica muscular durante o desenvolvimento e o crescimento do músculo entre raças diferentes depende do conhecimento acerca dos mecanismos que controlam estes processos (ZHAO et al., 2011). A miogênese é um processo bastante complexo que envolve a expressão coordenada de milhares de genes (SOLLERO et al., 2011) cujos mecanismos moleculares são conservados entre muitas espécies, incluindo aves e mamíferos.

Durante a formação do músculo estriado é necessária a expressão sincronizada de genes envolvidos na formação do sarcômero e das fibras contrácteis, bem como os genes que determinam a morfologia do músculo (JOHNSON et al., 2013). A desmina está associada ao comprometimento inicial dos somitos occipitais com linhagem miogênica em camundongo (YAMANE et al., 1997). Esta é uma proteína específica do músculo, codificada pelo gene *DES*, é componente do filamento intermediário do sarcômero e é expressa em todos os tipos de células musculares. Na miogênese o gene *DES* é expresso em mioblastos pré-fusão, miotubos multinucleados e miofibras das linhagens mioepiteliais (KAUFMAN e FOSTER, 1988; BABAI et al., 1990) e a inibição da transcrição do gene *DES* nestas células interfere na transcrição de fatores miogênicos (LI et al., 1993).

A divisão e motilidade celular assim como a geração de força contráctil são influenciadas por proteínas da família das actinas. O *ACTA2* codifica a isoforma  $\alpha$ -actina que é principalmente expressa no músculo liso, mas também pode ser expressa em mio-fibroblastos (RICHER et al., 2011; MILEWICZ et al., 2010). Os miofibroblastos são células contrácteis com características intermediárias entre fibroblastos e células musculares. Apresentam capacidade de produção de proteínas da matriz extracelular, de colágeno e enzimas que degradam a matriz extracelular (PAN et al., 2002).

Outro fator que influencia a fusão de mioblastos e retículo endo-sarcoplasmático (VAGE et al., 2011), afeta a atividade enzimática e controla a atividade contráctil muscular é a homeostase do cálcio no músculo. Nas células de mamíferos, os receptores de rianodina (*RYR*) codificam proteínas componentes dos canais de liberação de cálcio que atuam no controle desta homeostase. São conhecidas três isoformas tecido-específicas muito semelhantes estruturalmente, porém, com

algumas peculiaridades. Este tipo de receptor é expresso em células em diferenciação ou diferenciadas (AIREY et al., 1991) e, apesar da existência de isoformas tecido-específicas, pode haver expressão de mais de uma isoforma no tecido.

O gene *RyR1* codifica o receptor de rianodina sarcoplasmático do músculo esquelético, este atua na atividade dos canais de cálcio voltagem-dependentes. Este canal controla a liberação de cálcio luminal e é essencial para o desenvolvimento do músculo esquelético (MONNIER, 2003). Em ratos, a inativação do gene *RyR1* causa defeitos congênitos letais com grandes anomalias do músculo esquelético (TAKESHIMA et al., 1994). Em humanos, mutações no *RyR1* estão associadas à má formação muscular e problemas motores (MONNIER, 2003).

O gene *RyR2* também codifica uma proteína dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, tendo sido primeiramente descrito no músculo cardíaco. Este receptor pode ser inibido por interação com a Calmodulina (*CALM1* ou *CaM*) devido a existência de um sítio de cinco aminoácidos não conservados na região flanqueadora C-terminal (Yamaguchi et al., 2004). Calmodulinas mediam o controle de enzimas, canais iônicos, aquaporinas e outras proteínas  $Ca^{2+}$  dependentes por meio de um complexo Calmodulina- $Ca^{2+}$ . Problemas na regulação do *RyR2* pela *CALM1* estão associados com defeito na liberação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático. Alterações na expressão deste gene causa hipertrofia cardíaca e morte prematura em ratos (YAMAGUCHI et al., 2007).

Outro gene associado ao fluxo de cálcio celular é o *CACNA1S* que codifica a Subunidade Alpha 1S dos canais de cálcio voltagem dependente tipo L. Os canais de cálcio contendo a subunidade alfa-1S desempenham papel importante no acoplamento de excitação-contração do músculo esquelético e estão presentes na membrana da maior parte das células excitáveis para mediar o influxo de cálcio em resposta à despolarização (TULUC et al., 2009). Estes canais mediam a entrada de íons de cálcio nas células excitáveis e estão associados com: contração do músculo, liberação de neurotransmissores, expressão gênica, motilidade, divisão e morte celular.

Processos de remodelamento de anexos do citoesqueleto durante a fusão celular e motilidade celular, modificação proteolítica de moléculas em vias de transdução de sinal, degradação de enzimas e de substrato apoptótico ao longo do

ciclo celular e regulação da expressão de genes são modulados por calpaínas (*CAPN*). Estas endopeptidases são um grupo de proteases sensíveis ao cálcio expressas em mamíferos reguladas pela concentração de  $Ca^{2+}$ , por fosforilação de ativação e pela atividade da calpastatina (*CAST*). Ratos *CAPN3 knockout* apresentam deficiências na eficiência de miofibrilogenese, os mecanismos que ocorrem durante as etapas finais da diferenciação miogênica ficam comprometidos, os animais apresentam atrofia muscular e deficiências moderadas no crescimento (KRAMEROVA et al., 2006).

O filamento fino do sarcômero é responsável pela resposta a flutuações na concentração de cálcio intracelular. Este complexo é composto por quatro subunidades: a troponina C (*TNNC*), a qual se liga o cálcio, a troponina T (*TNNT*), que se liga a tropomiosina (*TPM*) e troponina 1 (*TNN1*), que é uma sub-unidade inibitória (Parmacek e Solaro, 2004) proteínas contrácteis do músculo em geral apresentam uma série de isoformas, estão constantemente em desenvolvimento e remodelação dinâmica durante a embriogênese (CAMPOS et al., 2010). Uma das isoformas da proteína troponina T é codificada pelo gene *TNNT1*, esta isoforma é uma subunidade proteica esquelética lenta do filamento fino sarcomérico do músculo estriado.

Outros componentes do sarcômero e reguladoras da função muscular são proteínas Miosina C de ligação (*MYBPC*), localizadas no meio da Banda A do sarcômero em músculos cardíacos e esqueléticos. As *MyBPC*'s têm funções estruturais e de regulação dentro do sarcômero, além de papel de ativação no relaxamento e alongamento muscular (Marston et al., 2009). Existem três isoformas conhecidas (*MyBPC* 1, 2 e 3) que, são codificadas por genes diferentes, no entanto, compartilham características arquitetônicas comuns (KNÖLL, 2010). Apesar de as isoformas serem tecido-específicas, nos primeiros estágios de diferenciação é possível observar expressão de mais de uma isoforma em vários tecidos (TAJSHARGHI et al., 2010.). A *MyBPC3* é a isoforma cardíaca e defeitos na sua expressão estão associados com cardiomiopatias em humanos (Marston et al., 2009). A expressão desordenada desta isoforma em músculo esquelético é associada a miopatias esqueléticas, fibras musculares anormais, sarcômeros desorganizados e redução na espessura de filamentos de miosina (TAJSHARGHI et al., 2010).

A contração muscular global e a atividade cardíaca são controladas por atividades de proteína enzimáticas cálcio dependente, dentre elas as quinases da

cadeia leve de miosina (*MYLK*) que atuam por meio de fosforilação da serina N terminal de cadeias leve de miosina. Além da contração muscular, estão envolvidas no controle de células endoteliais e da permeabilidade vascular, iniciação do crescimento, liberação de neurotransmissores no sistema nervoso simpático e apoptose de fibroblastos (SHEN et al., 2015). A *MYLK2* é exclusivamente expressa no músculo estriado.

O gene *HTR1D* codifica uma espécie de neuro-receptor de serotonina que atua na superfície celular. Receptores de serotonina têm sido associados principalmente a distúrbios comportamentais em humanos (Brown et al., 2007; Bergen et al., 2003) e cães (Vage et al., 2010). No entanto Enjin et al. (2012), estudando este neuro-receptor em rato, demonstraram que o *HTR1D* pode estar presente em axônios periféricos do sistema nervoso muscular e que os fusos musculares podem ter a capacidade de sintetizar a serotonina. Mostraram também que camundongo *5-HTR1D knockout* apresentam diminuição da amplitude do reflexo sináptico e coordenação motora alterada.

O gene *PPP3CA* (identificado anteriormente por *CALNA*) codifica uma proteína da família calcineurina, a calcineurina A. É uma proteína fosfatase regulada por *CALM1* (identificado anteriormente calcineurin B) que desempenha um papel importante na transdução de sinal celular (WANG et al., 1996). Dentre as funções atribuídas ao *PPP3CA*, são citadas por Chiocco et al. (2011): regulação da fosforilação da dinamina pré-sináptica; fosforegulação pós-sináptica via de ações proteínas *scaffolding* e regulação de moduladores de transcrição e fatores de transcrição.

Em cultivo de células C2C12, Semsarian et al. (1999), demonstraram que hipertrofia é suprimida por inibidores de *PPP3CA* e também que a expressão estável do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*) células do músculo esquelético, mobiliza o cálcio intracelular e ativa a fosfatase calcineurina /calmodulina dependente (*PPP3CA*). Por outro lado, Song et al. (2009) relatam a participação deste gene na modulação da sinalização e proliferação celular endotelial feto-placentária de ovinos mediadas por *VEGF* e *FGF2*. Por outro lado, avaliando a adaptação do músculo esquelético ao exercício em cavalos puro-sangue Eivers et al. (2011) observaram que a expressão do gene *PPP3CA* aumenta 4 horas após exercício, indicando um papel deste gene na recuperação muscular adaptativa.

Os receptores de acetilcolina do tipo muscular de mamífero são glicoproteínas transmembranares pentaméricas com duas subunidades alfa, uma beta, uma delta, e uma subunidade épsilon (no músculo esquelético adulto) ou gama (no músculo fetal e desnervado). Podem ser de 4 tipos diferentes, dentre eles o *CHRND* (Receptor Colinérgico, nicotínico tipo Delta) e o *CHRNA3* (Receptor Colinérgico, nicotínico, Gamma) ambos do tecido muscular. Após a ligação da acetilcolina, estes receptores sofrem uma grande alteração de conformação, que afeta todas as subunidades e conduz a abertura de canais condutores de íons através da membrana plasmática.

### **2.3. Miogênese e produção de carne em suíno**

O potencial de crescimento muscular é geralmente associado a características determinadas na miogênese pré-natal (REHFELDT et al., 2000), uma vez que a deposição muscular de um animal depende principalmente do número de fibras musculares formadas nesta fase. Ao se comparar o crescimento muscular entre animais de raças não selecionadas e selecionadas da mesma espécie fica evidente a influência da seleção de animais para produção de carne na miogênese pré-natal (ZHAO et al., 2011). Principalmente porque as taxas de proliferação celular contribuem para a formação de grandes números de fibras musculares (REHFELDT et al., 2000) e conseqüentemente maior quantidade de tecido muscular depositada na fase pós-natal.

Em vista disso, Cagnazzo et al. (2006) em um estudo comparando os níveis de expressão do transcriptoma do tecido muscular em diferentes estágios do desenvolvimento pré-natal de dois grupos contrastantes, identificaram que a miogênese se inicia de forma precoce em Duroc e tardia em Pietrain. Esta constatação foi possível pois os autores observaram que os níveis de expressão de genes relacionados tanto à proliferação e diferenciação de mioblastos quanto à genes estruturais foram maiores em embriões de Duroc com idades entre 14 e 35 dias quando comparados aos de Pietrain na mesma fase. No entanto, a partir de 49 dias esta relação se inverte e animais Pietrain passaram a apresentar maior expressão de genes miogênicos. Segundo estes autores, a formação retardada das fibras musculares em Pietrain pode resultar na formação de uma grande quantidade de

células satélites e, assim aumentando a capacidade hipertrófica do músculo, o que explicaria a maior massa muscular apresentada pelo Pietrain adulto em relação ao Duroc.

Sollero et al. (2011) estudaram perfis de expressão gênica do músculo *Longissimus dorsi* de cruzados Yorkshire–Landrace e Piau, raça brasileira com alto teor de gordura, nas idades pré-natais de 40 e 70 dias. Os resultados revelaram um grande número de genes diferencialmente expressos tanto entre raças quanto entre os estágios pré-natais. No geral, os perfis de Yorkshire–Landrace e Piau foram similares, apesar de padrões de expressão gênica raça-específicos terem sido identificados. Além disso, fetos de Piau aos 70 dias de gestação apresentaram maior abundância de transcritos, sugerindo que a miogênese em Yorkshire–Landrace possa ser tardia em relação a Piau.

Zhao et al. (2011) compararam o desenvolvimento muscular entre Landrace e Lantang, raça chinesa caracterizada por alto conteúdo de gordura intramuscular. Estes autores identificaram que aos 35 dias de gestação os fetos Landrace apresentaram expressão elevada de genes ligados a inibição miogênica e a promoção da proliferação de mioblastos. Em contrapartida, os mesmos genes apresentaram maior expressão em fetos de 49 dias em Lantang. Esta diferença de expressão gênica tem potencial para resultar em diferenciação muscular tardia e conseqüentemente em maior número de fibras em Landrace que em Lantang.

Sabe-se que o número de fibras que define a musculatura pós-natal é determinado principalmente por fatores genéticos com potencial para influenciar na miogênese e também é de amplo conhecimento que a massa muscular do animal adulto apresenta correlações positivas fortes com o diâmetro das fibras e com a quantidade de fibras musculares determinadas na fase pré-natal (REHFELDT et al., 2000). Desta forma, é possível perceber que animais com maior número de fibras musculares são os alvos mais prováveis da seleção genética voltada para deposição muscular. No entanto, é possível que em raças de suínos Comerciais selecionadas para produção de carne, a seleção para o número e tamanho das fibras estejam nos limites de suas respostas correlacionadas e, portanto, novas estratégias devem ser aplicadas para atingir progressos na seleção (REHFELDT et al., 2000). Tais fatos ressaltam a necessidade de estudos sobre o desenvolvimento das características

fenotípicas musculares divergentes em suínos a fim de acrescentar estas informações em programas de melhoramento.

#### **2.4. Grupos genéticos de suínos**

Large White é a raça mais utilizada na indústria suína moderna. É caracterizada por alta produtividade de carne magra, baixo conteúdo de gordura e alto ganho de peso diário (DAMON et al., 2012). Pietrain e Duroc são divergentes para conteúdo de carne magra e gordura, e apresentam grandes diferenças em relação à qualidade da carne. Pietrain possui maior musculatura e maior hipertrofia das fibras musculares, enquanto, o Duroc apresenta menor massa muscular e produz carne de melhor qualidade ((MURÁNI et al., 2007; Davoli et al., 2011). Outra raça comercial muito utilizada é Landrace caracterizada principalmente por alta porcentagem de carne magra e rápido crescimento muscular (ZHAO et al., 2011). Por outro lado, a raça local Piau caracteriza-se por lenta taxa de crescimento e grande deposição de gordura (SOLLERO et al., 2009; SOLLERO et al., 2011).

O interesse no estudo dos animais da raça Piau deve-se ao fato destes possuírem como principais características, rusticidade, forte resistência a doenças e adaptabilidade a baixas condições de manejo e alimentação (LOPES et al., 2002). Vários trabalhos já relataram diferenças genéticas e fenotípicas entre a raça local Piau e suínos de linhagem Comercial (VERONEZE et al. 2014, VERARDO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012; SOLLERO et al., 2011; SERÃO et al. 2011, SOLLERO et al. 2009; GUIMARÃES & LOPES, 2001) e isto sugere que o estudo simultâneo de parâmetros genéticos/moleculares destes dois grupos pode auxiliar eficientemente na compreensão dos processos biológicos envolvidos na formação do tecido muscular esquelético.

### **3. Hipótese**

Existem diferenças no processo miogênico de suínos de linhagem Comercial e da raça local Piau.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar características morfológicas, expressão de genes e proteínas relacionados à miogênese no tecido muscular esquelético de fetos suínos de dois grupos genéticos divergentes em quatro idades pré-natais.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

- 4.2.1.** Comparar a expressão de genes miogênicos entre suínos Piau e em suínos de linhagem Comercial aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc).
- 4.2.2.** Avaliar a existência de diferenças morfológicas entre os grupos genéticos ao longo das idades gestacionais (40, 70 e 90 dpc).
- 4.2.3.** Quantificar a expressão de proteínas relacionadas a miogênese ao longo das quatro idades gestacionais em ambos os grupos genéticos.
- 4.2.4.** Associar os níveis de expressão gênica aos níveis de expressão proteica e às características estruturais observadas.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Obtenção das amostras**

O experimento de campo foi realizado na Granja de Melhoramento de Suínos da Universidade Federal de Viçosa de acordo com a proposta aprovada pelo CEUA-UFV protocolo nº85/2013.

Ao todo 12 matrizes suínas de linhagem Comercial (LC) (Landrace x Large White x Pietrain) e 12 da raça Piau (RP) gestantes foram abatidas, três fêmeas de cada grupo genético foram usadas aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc). Os abates foram realizados por insensibilização elétrica e secção da jugular. O útero gravídico foi retirado e o músculo *Longissimus* de três fetos por matriz aos 40, 70 e 90 dpc e dois fetos íntegros por fêmea aos 21 dpc foram coletados. Das amostras de músculo fetal de 40, 70 e 90 dpc coletadas, um feto por matriz, foram fixadas em formalina 10% tamponada (pH7,4) por 24 h e depois armazenadas em álcool 70% até análise histológica. As demais amostras foram armazenadas em RNA-Holder e estocadas para uso em análises de expressão gênica e proteica. Foram utilizados fetos diferentes para análises histológica, proteica e expressão gênica devido as limitações do tamanho da amostra biológica.

### **5.2. Análise do número de fibras musculares**

Avaliação do número de fibras musculares aos 40, 70 e 90 dpc foi realizada para caracterizar a miogênese fetal em ambos os grupos genéticos (GG). Amostras de músculo de três fetos provenientes de três diferentes porcas, em cada fase e grupo genético foram fixadas em formalina 10% tamponada (pH 7,4) por 24 horas, posteriormente desidratadas em álcool e incluídas em resina. Cortes histológicos com 3 µm de espessura foram feitos, um a cada 10 cortes sequenciais foi selecionado para montagem da lâmina histológica. Cada lâmina foi montada com, no mínimo, seis cortes. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina e as lamínulas montadas utilizando resina sintética Entellan® (Merck).

As fotomicrografias dos cortes foram obtidas utilizando-se foto-microscópio EVOS® xl (AMG, WA, USA) e ampliação de 400X. Imagens de no mínimo seis campos de visualização diferente foram obtidas, sendo uma em cada corte histológico. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ® (NIH, USA, disponível em <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Foram contados os núcleos de miofibras – primárias e secundárias – (NM) e os núcleos de miofibras primárias (NMP) nas idades de 40, 70 e 90 dpc. Foi estimada a porcentagem de miofibras primárias ( $100 \cdot \text{NMP}/\text{NM}$ ).

### **5.3. Westen-blot**

Para a avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao processo miogênico fetal foram utilizadas três amostras de músculo de feto suíno por fase gestacional por grupo genético, sendo os fetos provenientes de matrizes diferentes. Amostras de tecido armazenada em RNA Holder foram processadas e para cada proteína foi feito um gel por idade contendo extrato proteico de todos os fetos da mesma fase gestacional e, adicionalmente, o de um animal adulto, não pertencente ao experimento e com concentração conhecida para ser usado como amostra normalizadora.

Amostras de 100 mg de tecido, uma por feto, foram utilizadas para a avaliação da expressão proteica. O excesso de Holder foi drenado em papel estéril, cada amostra foi fragmentada e macerada manualmente e posteriormente homogeneizada individualmente em 1 mL tampão de lise {7M ureia, 2 M tioureia, 4% (p/v) 3-colamidopropil-3-dimethylammonio-1-propanossulfonato (CHAPS); 1% (p/v), ditioneitol (DTT); 2% (v/v) de IPG buffer, 10 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF)}. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 30 minutos e os sobrenadantes contendo solução proteica foram recuperados. A concentração de proteína foi quantificada através da metodologia de Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) e as soluções foram armazenadas a -80 °C.

Géis de SDS-PAGE 10% foram carregados com 80 µg e submetidos a corrente de 25 miliAmperes para a separação das proteínas de acordo com o peso molecular.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com solução de bloqueio (BSA a 3% p / v em TBST) durante 1 h a temperatura

ambiente, com agitação suave. As membranas foram então incubadas com um dos seguintes anticorpos primários para Calpaína (Sigma-Aldrich®, #12335); Desmina (Sigma-Aldrich®, #13346); Troponina T (Sigma-Aldrich®, #171409) produzidos em camundongo (*Mus musculus*).

Os anticorpos primários foram incubados em solução de bloqueio diluído 1: 1000 por no mínimo 16 h a 4 °C com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes a temperatura ambiente com TBST e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase produzido em cabra (anticorpo anti-IgG de camundongo – Sigma-Aldrich®, A2554) diluído 1: 5000, durante 1 h a temperatura ambiente com agitação suave. Após incubação, com anticorpo secundário membranas foram lavadas 3 vezes (5 min cada) com TBST, reveladas com substrato ECL Clarity™ (Bio-Rad, Hercules, CA) e as imagens capturadas com o scanner Blot c-Digit®. As intensidades das bandas foram quantificadas em unidades arbitrárias utilizando-se Image Studio (Licor Biosciences). Em cada membrana os dados foram normalizados dividindo-se os valores observados em cada amostra pelo valor da amostra normalizadora.

#### **5.4. Extração de RNA e análise de expressão gênica**

Para a avaliação da expressão gênica foram utilizados 3 animais por grupo genético e idade gestacional, provenientes de matrizes diferentes. O RNA total das amostras foi extraído utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA total foi estimada no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare), enquanto qualidade e integridade foram determinadas em gel de agarose 1%.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, 2 µg de RNA total foram tratados com DNase I Amplification Grade (Invitrogen) e posteriormente submetidos à transcrição reversa com o kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Após a síntese, a concentração do cDNA foi estimada pelo espectrofotômetro Nanovue. A análise de qPCR em tempo real foi realizada em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), conforme instruções do fabricante.

A concentração de uso de cada par de primer foi otimizada e as amplificações dos genes alvo e controle endógeno para cada amostra foram realizadas em duplicatas (LIVAK E SCHMITTIGEN, 2001). Valores de Ct superiores a 35 ciclos foram considerados como expressão não detectável pela técnica de RT-qPCR.

Foi calculada a abundância de transcritos em relação ao endógeno pelo método do  $2^{-\Delta Ct}$  adaptado de Livak e Schmittigen (2001). Os valores obtidos foram utilizados para a elaboração de heat-map utilizando o software Hierarchical Clustering Explorer 3.5 (HCE 3.5) (disponível em <http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/hce.html>) no qual os genes foram agrupados de acordo com os perfis de expressão considerando o coeficiente de correlação de Pearson mínimo de 0,5. As diferenças na expressão relativa dos genes entre os GG e entre os períodos gestacionais foi estimada por meio do método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK E SCHMITTIGEN, 2001).

### **5.5. Seleção dos genes e desenho dos primers**

Estudos prévios, ainda não publicados, realizados pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) identificaram, por meio da técnica de RNA-seq, uma série de genes diferencialmente expressos entre a raça Piau e uma linhagem Comercial (Landrace x Large White x Pietrain) nos referidos dias pós cobertura. Destes, foram selecionados 17 genes relacionados ao processo miogênico com base em estudo de rede de ontologia gênica realizado no software Cytoscape ([www.cytoscape.org/](http://www.cytoscape.org/)) utilizando o plugin ClueGO+CluePedia.

Os critérios de elaboração das redes foram o *default* pelo software, alterando somente a especificidade da relação entre os genes e o processo biológico para acima de médio (Medium), e o mínimo de cinco e máximo de onze genes ligados ao processo biológico. O *P-valor* para o método de correção de Bonferroni e para o limiar de corte Kappa-Score foram definidos em 0,5. Na rede de ontologia gênica de processos biológicos (Figura 1) estão destacados em tons de marrom escuro os principais processos biológicos que os genes em estudo estão envolvidos.

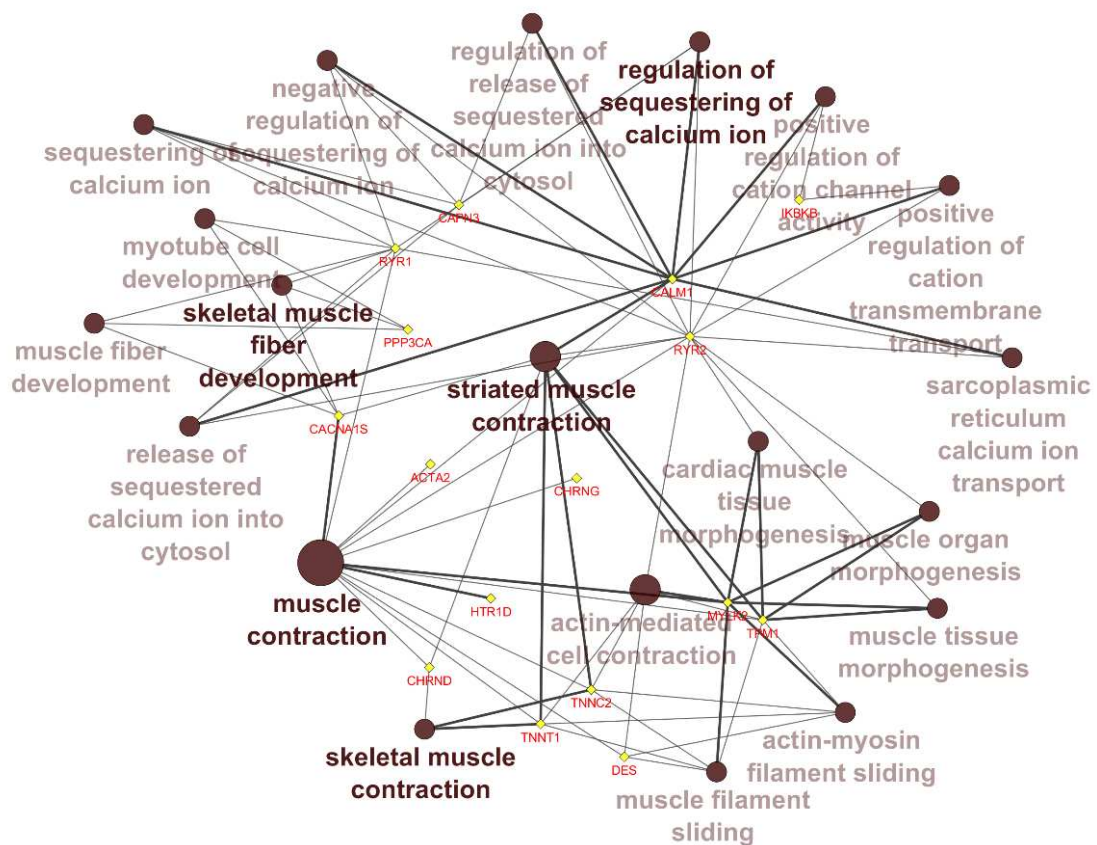


Figura 1- Rede ontologia gênica de processos biológicos contendo os genes em estudo (losangos amarelos) e as ontologias gênicas (GO's) (círculos marrons) em que eles estão envolvidos. Tons mais escuros nas arestas e nomes das GO's indicam relação importante e forte entre os genes e os processos em destaque.

As sequências dos miogenes selecionados foram recuperadas no banco de dados de Suínos (*Sus scrofa*) no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e usadas para desenhar os *primers* (Tabela 1) na plataforma Integrated DNA Technologies (IDT) no software Primer Quest (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). Também foram desenhados um par de *primer* para os possíveis endógenos ( $\beta$ -ACT, GAPDH e HPRT1).

Tabela 1-Genes selecionados para validação utilizando a técnica de RT-qPCR

	Genes	ID NCBI		Sequência do <i>Primer</i>
Actin, alpha 2, smooth muscle	<i>ACTA2</i>	NM_001164650.1	F R	GGGAGAAGATGACCCAGATTATG TACGTCCAGAGGCGTAGAG
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	<i>CACNA1S</i>	XM_003357669.3	F R	CATCATCCTCATCGCCTTCTT CGCAGTTCTTATACTCGGTCTC
Calmodulin 1	<i>CALM1</i>	NM_001244210.1	F R	CTTTGCTGCTGGTCCTTAGA CCCGAGGTATTTGGAGATGTT
Calpain 3	<i>CAPN3</i>	NM_214171.1	F R	CTACGAGGTTCCCAAAGAGATG ACCTCCCGCATGTTAATGTAG
Calpastatin	<i>CAST</i>	NM_214067.1	F R	GACACTATCCCGCCTGAATATAG GGCAGCTTCAGGTTTCTTTG
Cholinergic receptor, nicotinic, delta (Muscle)	<i>CHRND</i>	XM_005672281.1	F R	GCAATGGAATGCAGGAGAATTT AGGAGCCGTCATTGTTGTT
Cholinergic receptor, nicotinic, gamma (muscle)	<i>CHRNA3</i>	XM_003133731.1	F R	GTGCCACTCATCAGCAAGTA GAGCGCAGAGATACGTTGAG
Desmin	<i>DES</i>	NM_001001535.1	F R	CAAGCAGGAGATGATGGAGTATC CCTCATCAGGGAATCGTTAGTG
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D, G protein-coupled	<i>HTR1D</i>	NM_214158.1	F R	CAGGGCTCATGAAGAGATATCAG GCAACAGAGATGGGATGTAGAA
Myosin binding protein C, cardiac	<i>MyBPC3</i>	NM_000256.3	F R	TCACCGTCTTGGAGCATTAC CTGTCACTAAAGCCAACCATATTC
Myosin light chain kinase 2	<i>MYLK2</i>	XM_003134383.3	F R	GTTGAGAGGATTGTGGATGAG GTGCAGAACCTCATCTTGT
Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme	<i>PPP3CA</i>	NM_214128.1	F R	GAGATGCTGGTGAATGTCC TCCTTATCACCTCCTTCCG
Ryanodine receptor 1	<i>RYR1</i>	NM_001001534.1	F R	GGTGATGGGCATCTTTGG CTCCTCCTCCTCTTCTTCC
Ryanodine receptor 2 (cardiac)	<i>RYR2</i>	XM_001924768.5	F R	GCCTGGATATGCTCCTTGTTAT GTCCCGCGTATAAGTTCTTTCT

Troponin C type 2 (fast)	<i>TNNC2</i>	NM_001001862.1	F	CGAGGAACTGGCTGAGATTT
			R	TCGTTGTTCTTGTCTCCATCTT
Troponin T type 1 (skeletal, slow)	<i>TNNT1</i>	XM_005655966.1	F	TGGTCAAGGCAGAACAGAAG
			R	CCCATGTGGTCGATATTCAGAG
Tropomyosin 1 (alpha)	<i>TPM1</i>	NM_001097483.2	F	CAACTGGTTGAGGAAGAGC
			R	CCTCTCTCACTCTCATCTGC
Actin $\beta$	<i>ACT-<math>\beta</math>*</i>	XM_003124280.3	F	CTTCTAGGCGGACTGTTAGTTG
			R	AGCCATGCCAATCTCATCTC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH*</i>	NM_001206359.1	F	GCAAGTGGACATTGTCGCCATCA
			R	AGCTTCCCATTCTCAGCCTGACT
Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	<i>HPRT1*</i>	NM_001032376.2	F	CCAGTCAACGGGCGATATAA
			R	GACCAAGGAAAGCAAGGTTTG

\*Possíveis controles endógenos.

Foi realizada amplificação dos possíveis genes endógenos em amostras de todos os tratamentos para definição dos padrões de amplificação e dos cts (*Threshold Cycle*). Os dados de Cts foram usados na avaliação da estabilidade de expressão destes genes ao longo dos tratamentos. As estabilidades foram avaliadas segundo as metodologias BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004), Genorm (Vandesompele et al., 2002) e Método comparativo do delta-Ct (Silver et al., 2006) simultaneamente, todas disponíveis na plataforma online Leonxie database (<http://www.leonxie.com/referencegene.php> : acesso 18/03/2015). O gene *GAPDH* foi o mais estável e, portanto, usado nas análises de expressão relativa.

## 5.6. Análise estatística

Nas análises de expressão gênica foi utilizado delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x4: dois grupos genéticos (RP e LC) e quatro períodos pré-natais (21, 40, 70 e 90 dpc). Os dados de RT-qPCR foram analisados segundo o modelo linear misto apresentado na equação 1.

$$Y_{ijkl} = I_{jk} + G_{jk} + IG_{ijk} + D_{jkl} + B_{ijkl} + e_{ijkl} \quad (\text{equação 1})$$

em que:

$Y_{ijkl}$  é o nível de expressão do gene  $i$  apresentado pelo animal  $l$ , na idade gestacional  $j$  (21, 40, 70 e 90 dpc) do grupo genético  $k$  (LC ou RP);

$I_{ij}$  é o efeito da idade gestacional  $j$  no nível de expressão do gene  $i$ ;

$G_{ik}$  é o efeito do grupo genético  $k$  no nível de expressão do gene  $i$ ;

$IG_{ijk}$  é o efeito da interação entre idade gestacional  $j$  e grupo genético  $k$  no nível de expressão do gene  $i$ ;

$B_{ijkl}$  é o efeito aleatório do animal  $l$ , no nível de expressão do gene  $i$  na idade gestacional  $j$  e no grupo genético  $k$ ;

$D_{ijkl}$  é o efeito aleatório amostra-específica (comuns aos genes alvo e referência),

$$D_{ijkl} \sim N(0, \sigma_D^2);$$

$e_{ijkl}$  é o efeito residual,  $e_{ijkl} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

As análises estatísticas dos  $\Delta$ cts foram realizadas no software SAS<sup>®</sup> 9.3 por meio da macro QPCR\_MIXED (STEIBEL et al., 2009). As diferenças entre os tratamentos foram estimadas por meio da análise do  $\Delta\Delta$ Ct (LIVAK E SCHMITTIGEN, 2001) e avaliadas usando o teste t de Student com  $\alpha=0,05$ . Posteriormente, a diferença na expressão relativa dos genes (fold change) entre os GG ou entre as fases gestacionais foram estimadas por meio do método do  $2^{-\Delta\Delta$ ct adaptado de Livak e Schmittigen (2001)

Na análise histológica foi utilizado delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x3: dois GG (RP e LC) e três períodos pré-natais (40, 70 e 90 dpc) pois aos 21 dpc ainda não ocorreu a formação de fibras musculares. Na análise de expressão proteica foi utilizado delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x4: dois GG (RP e LC) e quatro períodos pré-natais (21, 40, 70 e 90 dpc). Os dados histológicos e de expressão proteica normalizados foram analisados segundo o modelo estatístico apresentado na equação 2:

$$Y_{ijk} = I_j + G_k + IG_{jk} + e_{ijk} \quad (\text{equação 2})$$

em que:

$Y_{ijk}$  é o valor observado no animal i, na idade gestacional j do grupo genético k;

$I_j$  é o efeito da idade gestacional j;

$G_k$  é o efeito do grupo genético k;

$IG_{jk}$  é o efeito da interação entre idade gestacional j e grupo genético k;

$e_{ijk}$  é efeito residual,  $e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$ .

A normalidade dos dados de quantificação proteica e histológicos foram testados pelo teste de Shapiro-Wilk à 5% de probabilidade. Apenas o número de miofibras seguiu distribuição normal. Visando atender a suposição de normalidade requerida para a análise de variância (ANOVA), os dados de número de miofibras primárias, a porcentagem de miofibras primárias e a expressão normalizada das proteínas foram transformados utilizando a transformação BOXCOX do pacote MASS no software R. Após o pré-requisito de normalidade atendido os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste Tukey à 5% probabilidade.

## 6. Resultados

### 6.1. Análise Histológica

Não foi verificada interação significativa entre número de dpc e grupo genético ( $P= 0,298$ ) para o número de miofibras e também não foram observadas diferenças entre os grupos genéticos (GG) ( $P= 0,757$ ), entre as idades 40 dpc e 70 dpc ( $P= 0,081$ ), 40 dpc e 90 dpc ( $P= 0,990$ ) e 70 dpc e 90 dpc ( $P= 0,060$ ).

Foi observada interação significativa para os fatores estudados em dados transformados (BOXCOX) do número de miofibras primárias ( $P < 0,001$ ) e porcentagem de miofibras primárias ( $P < 0,001$ ). Foi verificado que aos 40 dpc os GG apresentam o mesmo número de miofibras primárias ( $P= 0,998$ ; Tabela 2) e a mesma porcentagem de fibras primárias ( $P= 0,801$ ; Tabela 3). Já aos 70 dpc o número de miofibras primárias foi maior em fetos de linhagem Comercial (LC) ( $P= 0,029$ ; Tabela 2), assim como a porcentagem de miofibras primárias ( $P= 0,007$ ; Tabela 3). Por outro lado, fetos da raça Piau (RP) aos 90 dpc apresentaram maior número de miofibras primárias ( $P < 0,001$ ; Tabela 2) e a porcentagem de miofibras primárias ( $P < 0,001$ ; Tabela 3). Também foi verificado que o número de miofibras primárias e a porcentagem de miofibras primárias decresce ao longo da gestação para ambos os GG (Figura 3).

Tabela 2- Média de miofibras primárias e erro padrão da média em fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau (RP) aos 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc).

DPC	Comercial	Piau	<i>P-value</i>
40	84,44 ( $\pm 7,74$ )	78,11 ( $\pm 5,41$ )	0,801
70	33,94 ( $\pm 3,08$ )	26,67 ( $\pm 4,78$ )	0,029
90	5,66 ( $\pm 0,56$ )	15,89 ( $\pm 4,26$ )	<0,001

Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3- Porcentagem de miofibras primárias e erro padrão da média em fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau (RP) aos 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc).

DPC	Comercial	Piau	<i>P-value</i>
40	29,00 ( $\pm 0,67$ )	27,33 ( $\pm 2,22$ )	0,941
70	11,33 ( $\pm 0,89$ )	8,33 ( $\pm 0,89$ )	0,07
90	2,00 ( $\pm 0,01$ )	6,33 ( $\pm 2,22$ )	<0,001

Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

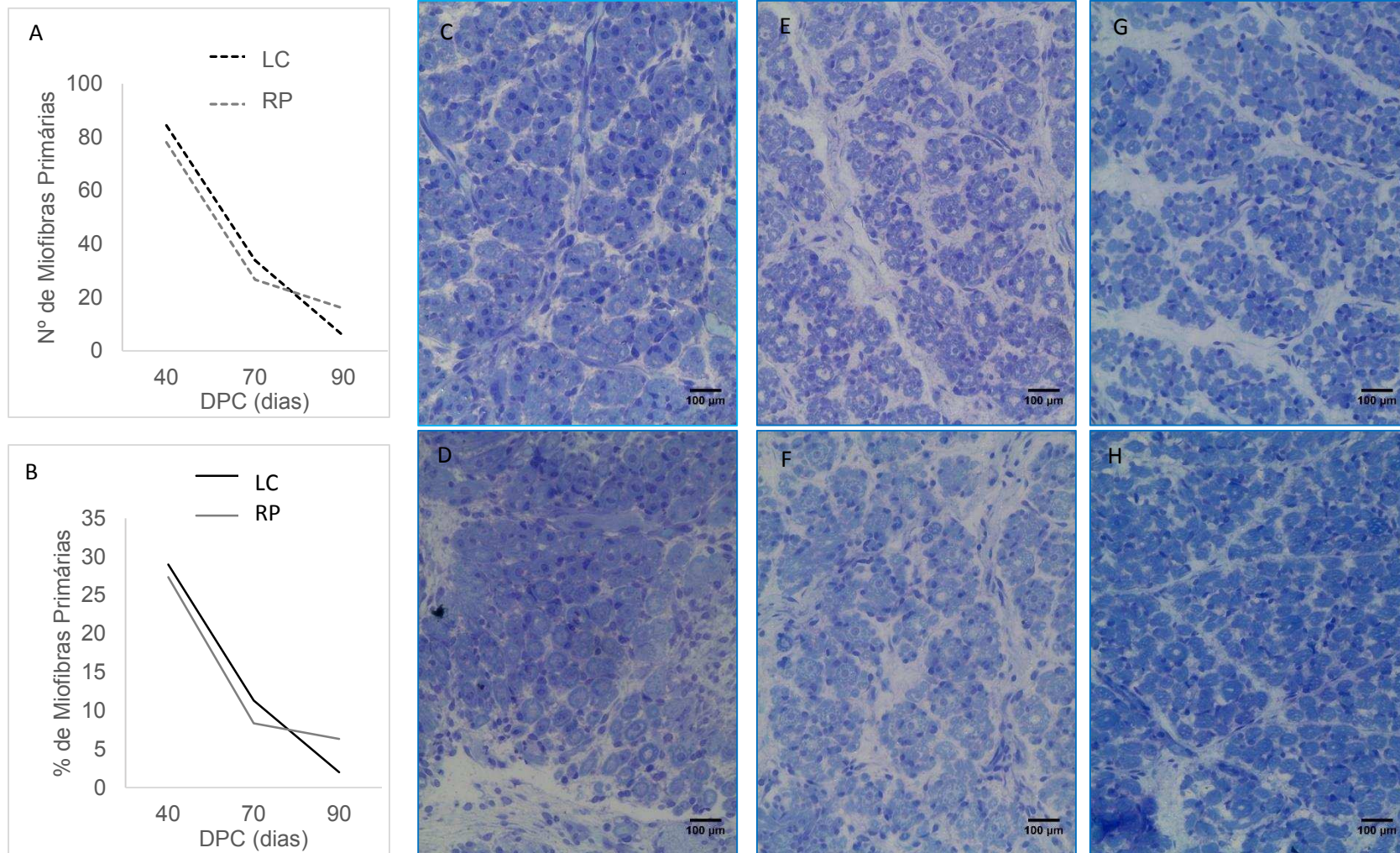


Figura 3- Variação do número (A) e porcentagem (B) de miofibras primárias em fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau (RP) aos 40, 70 e 90 dias pós cobertura (DPC); Fotos Histológicas de músculo de feto da LC aos 40 (C), 70 (E) e 90 DPC (G) e da RP aos 40 (D), 70 (F) e 90 DPC (H) coradas com Azul de Toluidina e aumento de 400 vezes.

## 6.2. Western-blot

Foi verificada interação significativa entre o número de dpc e a genética para abundância de Desmina ( $P < 0,0001$ ). Aos 40 dpc foi verificado maior nível de Desmina em fetos RP ( $P < 0,0001$ ) em relação a fetos LC, o mesmo não foi observado aos 21 ( $P = 0,999$ ), 70 ( $P = 0,999$ ) e 90 ( $P = 0,999$ ) dpc (Figura 4).

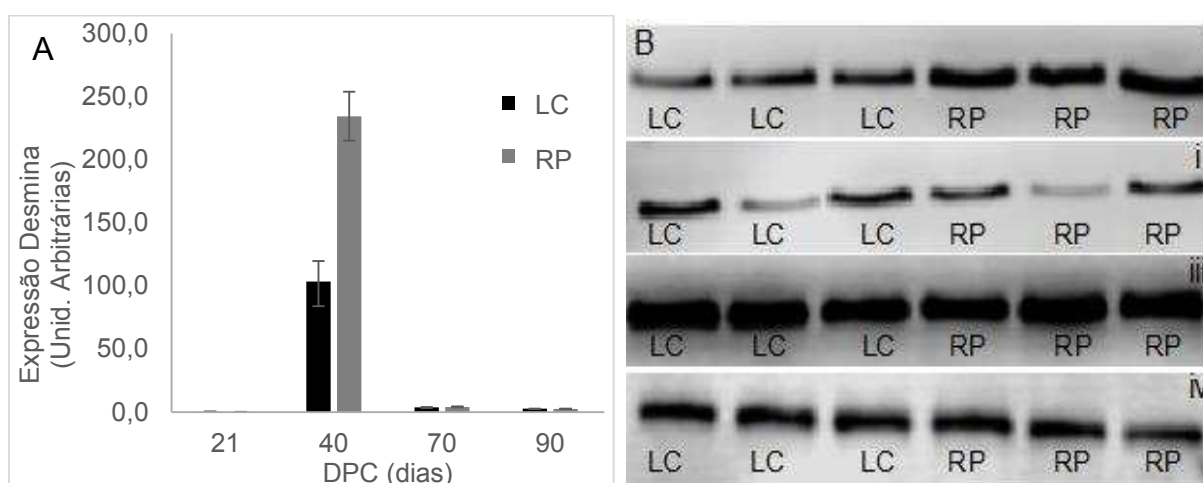


Figura 4- A: Expressão de Desmina em tecido muscular de fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau (RP) aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc). B: Imagem dos Western-blot destacando as bandas de Desmina quantificadas em embriões aos 21 (i) e fetos aos 40 (ii), 70 (iii) e 90 (iv) dpc.

Não foi verificado efeito de interação entre o número dpc e grupo genético para a abundância da proteína Calpaína ( $P = 0,13188$ ). A abundância da Calpaína em fetos aos 70 dpc foi maior que aos 21 dpc ( $P = 0,019$ ), que aos 40 dpc ( $P < 0,001$ ) e que aos 90 dpc ( $P = 0,002$ ). Não foram verificadas diferenças entre os GG ( $P = 0,689$ ) (Figura 5).

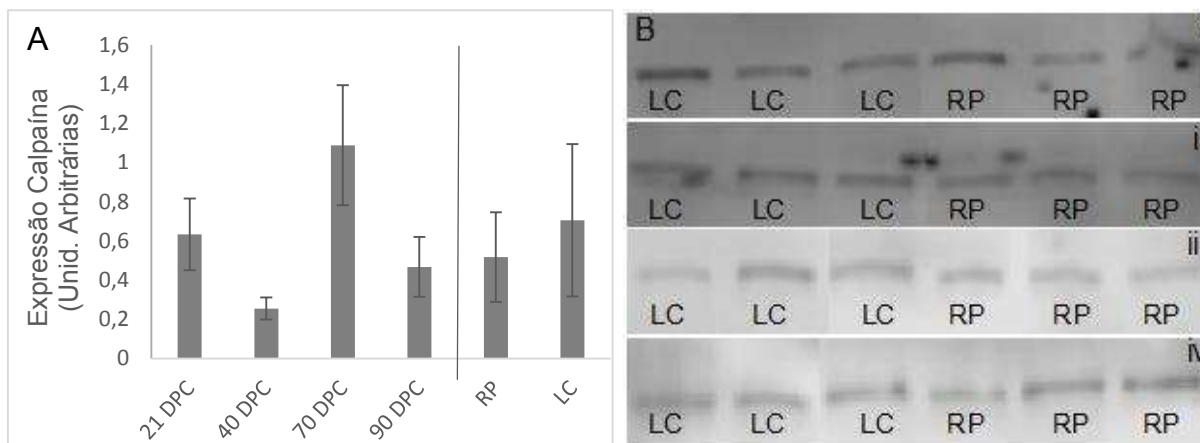


Figura 5- A: Expressão de Calpaína em tecido muscular de fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau (RP) aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc). B: Imagem dos Western-blot destacando as bandas de Calpaína quantificadas em embriões aos 21 (i) e fetos aos 40 (ii), 70 (iii) e 90 (iv) dpc.

Foi verificada interação significativa entre o número de dpc e a genética para a abundância de Troponina T ( $P= 0,01283$ ). Foi verificado maior nível de proteína Troponina T em fetos RP aos 40 ( $P= 0,036$ ) e aos 90 dpc ( $P= 0,037$ ) enquanto que não foi verificada diferenças entre os GG 70 dpc ( $P= 0,999$ ). Fetos aos 21 dpc não apresentaram níveis detectáveis de Troponina T (Figura 6).

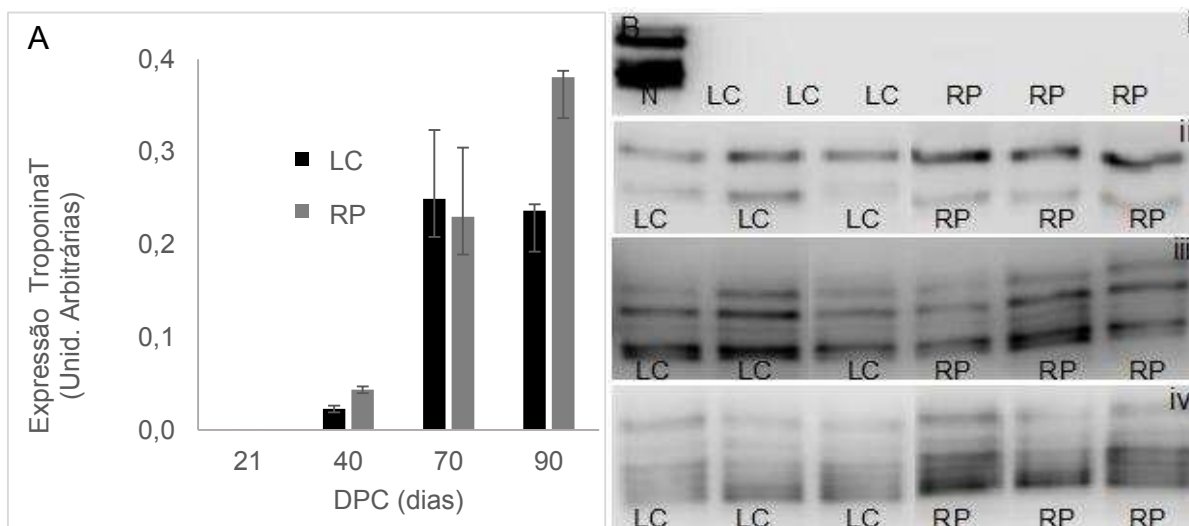


Figura 6- A: Expressão proteica de Troponina T em músculo de fetos de linhagem Comercial (LC) e da raça Piau aos 21, 40, 70 e 90 dias pós cobertura (dpc). B: Imagem dos Western blot destacando a amostra normalizadora (N) e a ausência de bandas de Troponina T em embriões aos 21dpc (i), e as bandas de Troponina T quantificadas em fetos aos 40 (ii), 70 (iii) e 90 (iv) dpc.

### 6.3. Expressão gênica

Os genes que tiveram seus níveis de expressão avaliados neste trabalho estão relacionados principalmente às Ontologias Gênicas (GO) associadas ao desenvolvimento e à função muscular em geral.

Na análise de expressão gênica por RT-qPCR foi verificado que aos 21 dpc embriões LC expressaram mais o gene *DES* ( $P= 0,035$ ) que embriões RP. Aos 90 dpc, fetos LC também apresentaram maior expressão dos genes *ACTA2* ( $P= 0,024$ ) e o gene *HTR1D* ( $P= 0,027$ ). Por outro lado, aos 70 dpc, fetos RP expressaram mais o gene *RYR1* ( $P= 0,045$ ). Aos 70 dpc não foi detectado expressão dos genes *MyBPC3* em fetos RP e *PPP3CA* em fetos LC. Aos 90 dpc não foi detectado expressão do gene *MyBPC3* em ambas os GG (Tabela 4).

Tabela 4- Fold change (FC) dos genes entre embriões/fetos Comercial e Piau aos 21, 40, 70 e 90 dias pós concepção (dpc).

Gene	21dpc		40dpc		70dpc		90dpc	
	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
ACTA2	19,70	0,255	-0,97	0,991	3,32	0,641	397,72	0,024
CALM1	13,67	0,094	2,52	0,491	2,21	0,555	4,17	0,314
CAPN3	18,18	0,146	3,51	0,517	1,72	0,779	45,59	0,061
DES	12,38	0,035	-1,01	0,992	-1,14	0,903	3,30	0,290
HTR1D	1,77	0,781	5,95	0,389	3,09	0,583	138,40	0,026
MYBPC3	27,32	0,177	1,66	0,831	-	-	-	-
PPP3CA	1,01	0,988	-3,92	0,163	-	-	-7,05	0,061
RYR1	-13,36	0,167	-27,88	0,062	-52,18	0,045	-1,81	0,731
RYR2	19,09	0,088	2,43	0,591	1,73	0,739	9,02	0,198
TNNT1	3,00	0,395	2,49	0,478	-1,21	0,880	11,55	0,069

Valores de FC negativos: número de vezes fetos Piau expressaram mais o gene que fetos Comercial, valores positivos: número de vezes fetos Comercial expressaram mais o gene que fetos Piau.

Ainda foram observadas expressões mais elevadas dos genes: *CALM1* ( $P= 0,093$ ) e *RYR2* ( $P= 0,088$ ) em fetos LC aos 21 dpc; *RYR1* ( $P= 0,063$ ) em fetos RP aos 40 dpc; *CAPN3* ( $P= 0,061$ ) e *TNNT1* ( $P= 0,069$ ) em fetos LC e *PPP3CA* ( $P= 0,061$ ) em fetos RP aos 90 dpc (Tabela 4).

Em fetos RP, a expressão do gene *ACTA2* foi maior aos 70 dpc quando comparados aos 21 ( $P= 0,041$ ) e aos 90 dpc ( $P= 0,015$ ) (Tabela 4 - Anexo II). Já na

LC não foi verificada diferença de expressão desse gene entre os períodos (Tabela Suplementar 2).

A expressão do gene *RyR1* em fetos RP aos 21 dias foi maior que a expressão aos 40 ( $P= 0,026$ ), aos 70 ( $P= 0,002$ ) e aos 90 ( $P< 0,001$ ) dpc e ainda, a expressão deste aos 40 dpc foi maior que aos 90 dpc ( $P= 0,008$ ). Já fetos LC aos 21 dias apresentaram maior expressão que aos 40 ( $P= 0,021$ ), 70( $P< 0,001$ ) e 90 ( $P= 0,001$ ) dpc (Tabela Suplementar 2 e 3).

A expressão do gene *RyR2* em fetos RP aos 21 dias foi menor que aos 70 ( $P= 0,003$ ) e aos 90 dpc ( $P= 0,044$ ). A expressão do gene *TNNT1* em fetos RP aos 70 dias foi maior que aos 40 ( $P= 0,023$ ) e que aos 90 ( $P= 0,036$ ) dpc. Em animais LC não foram verificadas diferenças na expressão destes genes entre os períodos em estudo (Tabela Suplementar 2 e 3).

Em fetos LC foi verificada menor expressão do gene *HTR1D* 21 dias quando comparados aos 70 ( $P= 0,037$ ) e aos 90 ( $P= 0,021$ ) dpc, também foi verificado maior expressão do gene *PPP3CA* aos 21 dias comparando com 40 dpc ( $P= 0,026$ ). Ambos os genes não apresentaram diferenças de expressão ao longo da gestação em fetos RP (Tabela Suplementar 2 e 3).

Não foram observados efeito da genética, do período gestacional e nem da interação entre os dois fatores na expressão dos genes *CACNA1S*, *CAST*, *CHRND* e *MYLK2*. E não foi observado efeito da genética na expressão dos genes *TNNC2* ( $P= 0,1772$ ), *TPM1* ( $P= 0,0968$ ) e *CHRNG* ( $P= 0,755$ ) (Tabela Suplementar 1).

No agrupamento hierárquico dos perfis de expressão gênica cada gene em cada grupo genético foi considerado individualmente e foram formados cinco grupos com padrão de expressão semelhante, considerando um coeficiente de correlação de Pearson mínimo de 0,5 (Figura 7). Os clusters C1 e C2 são compostos por genes ligados à estrutura da fibra muscular, em C1 estão principalmente perfis de expressão gênica de fetos RP, estes genes apresentam expressão relativa reduzida aos 21 dpc, levemente aumentada aos 40 dpc, mais elevada aos 70 dpc e volta a ser reduzida aos 90 dpc. Por outro lado, em C2 estão os mesmos genes que em C1, porém com perfis de expressão principalmente de fetos LC, estes genes apresentam expressão reduzida aos 21 e 40 dpc e elevada aos 70 e 90 dpc.

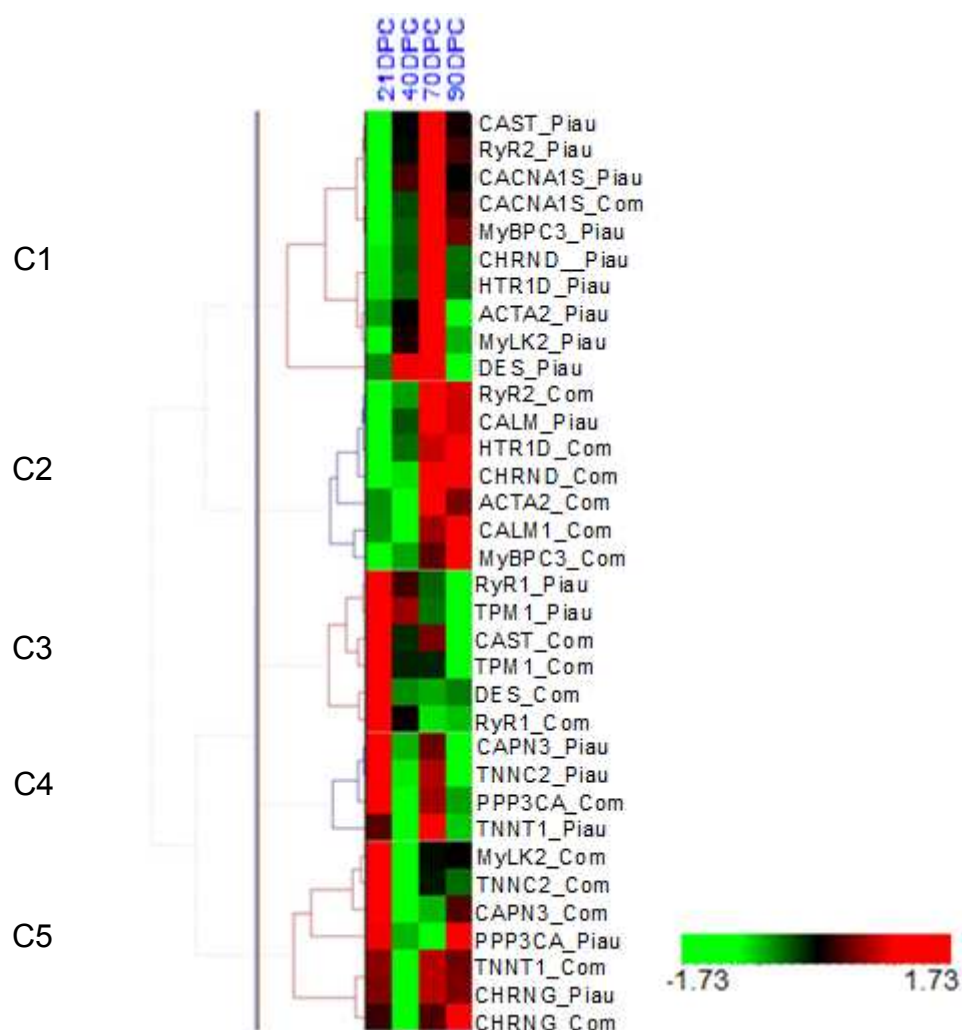


Figura 7- Heat-map dos níveis de expressão gênica em embriões e fetos de linhagem Comercial (Com) e da raça Piau (Piau) ao longo dos períodos de 21, 40 70 e 90 dias pós cobertura (DPC) mostrando cinco Custers (C1 a C5) de perfil de expressão semelhante. Valor médio de expressão (relativa ao endógeno) igual a zero foi designado em preto; aumento da expressão em vermelho e expressão reduzida em verde.

Os clusters C3, C4 e C5 são compostos por genes que codificam componentes da fibra muscular, mas que desempenham algum papel na diferenciação celular. No C3 estão os genes cuja expressão é elevada aos 21 dpc e reduzida aos 70 e 90 dpc, sendo os perfis de expressão gênicas de ambos os GG. No C4 estão os genes cuja expressão é elevada aos 21 e 70 dpc e reduzida aos 40 e 90 dpc e estes perfis são principalmente de fetos LC. No Cluster C5 estão os genes cuja expressão é reduzida aos 40 dpc e elevada aos 21, 70 e 90 dpc, sendo estes perfis observados principalmente em fetos RP.

## 7. Discussão

Neste estudo foram avaliadas a expressão de genes e proteínas em embriões aos 21 dias pós cobertura (dpc) e no músculo *Longissimus* de fetos suínos aos 40, 70 e 90 dpc, adicionalmente foram avaliadas a morfologia muscular de fetos aos 40,70 e 90 dpc. Estes períodos englobam os estágios de formação de miotubos, primeira e segunda ondas de formação da fibra muscular em suínos (WIGMORE e STICKLAND, 1983). Grupos genéticos (GG) divergentes em musculosidade e componentes musculares foram usados a fim de ampliar o conhecimento acerca do processo miogênico fetal em suínos.

No agrupamento hierárquico de acordo com os níveis de expressão gênica ao longo dos períodos avaliados é possível perceber que a expressão de cinco genes em ambos os GG foram agrupados no mesmo Cluster, considerando a similaridade na expressão destes entre os dois GG. As expressões de alguns genes diferiram entre os GG ao longo das fases em estudo, embora muitas semelhanças tenham sido verificadas. Vários trabalhos têm demonstrado que suínos divergentes fenotipicamente quanto a deposição de carne e/ou gordura na carcaça, podem apresentar padrões raça-específicos de expressão gênica ao longo do desenvolvimento do músculo esquelético (VERARDO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012; SOLLERO et al., 2011; ZHAO et al., 2011, CAGNAZZO et al., 2006). Isto sugere que variações na expressão gênica são responsáveis por definir o fenótipo dos indivíduos e pequenas alterações genéticas, nos níveis ou no momento da expressão gênica podem influenciar e direcionar o desenvolvimento dos tecidos modulando assim a formação muscular.

Neste trabalho, embriões da raça Piau (RP) aos 21 dpc apresentaram menor expressão dos genes *DES*, *CALM1* e *RYSR2* menor que os de linhagem Comercial (LC) e não foram verificadas diferença da expressão das proteínas Desmina, Calpaína e Troponina T. Em cultivo de células BC3H1 e C2C12, ambas de camundongo, Airey et al. (1991) mostraram que níveis detectáveis dos receptores de rianodina (*RyR*'s) são verificados somente após a indução da diferenciação celular para linhagem miogênica, enquanto a Desmina é indispensável para a diferenciação inicial de células do músculo esquelético e liso (WEITZER et al., 1995). Os resultados aqui descritos

indicam que aos 21 dpc já ocorreu o comprometimento celular inicial com a linhagem miogênica e a diferenciação dos miócitos em miotubos está ocorrendo de forma diferenciada entre fetos LC e RP, sugerindo que as diferenças fenotípicas observadas na musculatura pós-natal dos dois GG existem desde o início da miogênese; possivelmente desde o comprometimento e a diferenciação inicial das células para a linhagem miogênica.

A fase que apresentou menores diferenças na expressão gênica entre os GG foi aos 40 dpc, quando apenas o gene *RyR1* e as proteínas Desmina e Troponina T foram mais expressos em fetos RP e não foram observadas diferenças no número e na porcentagem de miofibras primárias. Neste período, está ocorrendo principalmente a diferenciação dos miotubulos em miofibras primárias e com menor intensidade a diferenciação de miofibras primárias em secundárias (WIGMORE e STICKLAND, 1983). As expressões gênica e proteica aqui observadas reforçam a referência anterior e mostra que, apesar de não terem sido verificadas diferenças no número de miofibras primárias, nesta fase os dois GG apresentam diferenças moleculares no controle das ondas miogênicas, visto que o gene *RyR1* e as proteínas Desmina e Troponina T estão associadas aos processos de formação e desenvolvimento do retículo sarcoplasmático.

Aos 70 dpc o número e a porcentagem de miofibras primárias foram maiores em fetos LC que em fetos RP, já aos 90 dpc esta relação se inverte e é observado maior número e porcentagem de miofibras primárias em fetos RP. Aos 90 dpc também foram observadas diferenças na expressão de genes relacionados à estrutura muscular (*ACTA2*, *CAPN3*, *HTR1D* e *TNNT1*), sendo estes mais expressos em fetos LC que em fetos RP, no entanto a expressão da proteína Troponina T e do gene *PPP3CA* foram mais elevadas em RP. Zhao et al. (2015) relatam níveis de expressão fase específica de genes relacionados com o desenvolvimento muscular para regular os mecanismos miogênicos e também mencionam a inibição da proliferação de mioblastos entre 70 e 90 dpc enquanto as fibras secundárias estão sendo formadas. Possivelmente, as diferenças aqui observadas são devidas aos GG apresentarem tempos de desenvolvimento muscular diferenciados; enquanto fetos LC apresentam maior hipertrofia muscular, fetos RP ainda estão em processos de diferenciação miofibrar.

Os resultados aqui obtidos indicam diferenças no tempo de formação muscular de fetos RP e LC e, no período descrito como final da segunda onda miogênica (90 dpc), ambos os GG parecem finalizar a formação muscular. Além disso, fetos LC apresentam maior expressão dos genes *ACTA2*, *CAPN3*, *HTR1D* e *TNNT1*, favoráveis a hipertrofia muscular, no entanto os fetos RP apresentam maior expressão do gene *PPP3CA*, relacionado a regulação da hipertrofia e diferenciação celular miogênica, estando aparentemente com o processo miogênico atrasados em relação aos fetos LC. Esta hipótese está coerente com Zhao et al. (2011), que, em trabalho com a raça local chinesa não melhorada geneticamente Lantang e com a raça Landrace, demonstraram existir diferenças nos tempos de formação e desenvolvimento da estrutura muscular de suínos melhorados e não melhorados geneticamente e isto resultando em menor massa muscular na raça não melhorada.

Também foram observados neste estudo padrões de expressão raça-específicos ao longo do desenvolvimento muscular e alguns genes diferentes entre os GG apresentaram comportamento similar ao longo das fases avaliadas. Alguns miogenes associados à diferenciação apresentaram redução da expressão aos 40 dpc e/ou aumento aos 70 dpc, quando comparada aos demais períodos em estudo, porém com comportamento diferenciado entre RP ou LC, conforme pode ser observado nos clusters C4 e C5 do *heat-map*. Zhao et al. (2015) relataram que mudanças morfológicas no músculo de fetos suínos das raças Tongcheng (raça local chinesa não melhorada geneticamente) e Yorkshire ocorrem entre 40 e 105 dpc e fibras primárias e secundárias são moldadas durante este período. É possível que os fenótipos divergentes dos GG aqui avaliados estejam associados a genes respondendo a diferentes estímulos temporais de diferenciação e de desenvolvimento do tecido muscular.

Também foram observados que genes ligados à estrutura muscular apresentam padrões de expressão diferentes entre os GG e apresentam expressão mais elevada aos 70 dpc ou aos 70 e 90 dpc dependendo do GG, conforme pode ser observado nos clusters C1 e C2 do *heat-map*, corroborando que o desenvolvimento muscular ocorre em tempos diferentes e também que existem diferenças no controle molecular da miogênese fetal dos GG avaliados.

A expressão do gene *RyR1* aos 21 dpc foi mais elevada que nos demais períodos em ambos os GG enquanto que, apenas embriões RP aos 21 dpc

apresentaram diferenças temporais na expressão do *RyR2*. Por outro lado, foram verificadas diferenças entre os GG na expressão destes aos 21, 40 e 70 dpc. Em cultivo de células de linhagem muscular, *RyR*'s são fracamente expressos quando as células não estão diferenciadas, mas após a diferenciação para células musculares, a expressão é elevada (Bennett et al., 1996). Também existe alteração no padrão de expressão da isoforma dos receptores: *RyR1* e *RyR2* expressos em células não diferenciadas e apenas *RyR1* em células em diferenciação e diferenciadas (Bennett et al., 1996). A isoforma 1 dos receptores de rianodina está associada com células em diferenciação para linhagem muscular. Aparentemente aos 21 dpc ambos os GG apresentam maior atividade de diferenciação que as demais fases e os resultados obtidos indicam que fetos RP e LC apresentam diferentes níveis de diferenciação celular aos 21, 40 e 70 dpc.

## 8. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que existem genes diferencialmente expressos entre os grupos genéticos e entre o número de dias pós cobertura (dpc) estudados. Alguns genes diferencialmente expressos indicam a existência de diferenças nos processos miogênicos dos dois grupos aos 21 e aos 40 dpc, as diferenças ficam mais evidentes à medida que os fetos desenvolvem. Aos 70 dpc, apesar de poucos genes serem diferencialmente expressos entre os grupos genéticos, é possível observar diferença no número e na porcentagem de miofibrilas primária, sendo estes maiores em fetos Comercial. Aos 90 dpc voltam a existir diferenças de expressão gênica; genes estruturais associados à hipertrofia são mais expressos em fetos Comercial e estes apresentam menor número e na porcentagem de miofibrilas primária quando comparados aos fetos RP.

Existem diferenças entre os grupos genéticos na expressão proteica aos 40 e aos 90 dpc. Aos 90 dpc fetos Piau apresentam maior número e porcentagem de miofibrilas primárias e, conseqüentemente maior expressão de Troponina T.

Portanto, as variações raça-específicas observadas neste estudo mostram que as diferenças no fenótipo muscular de animais dos grupos genéticos Piau e Comercial existem desde a vida intrauterina e que genes diferentes podem estar envolvidos com o controle temporal dos processos de desenvolvimento muscular em cada raça, fazendo com que o fenótipo do músculo seja diferente antes mesmo do nascimento.

## 9. Referências

- Airey, J. A.; Baring, M. D.; Sutko, J.L. Ryanodine receptor protein is expressed during differentiation in the muscle cell lines BC3H1 and C2C12. **Developmental Biology**. v. 148, 1:365-374, 1991
- Andersen, C. L.; Jensen, J. L.; Orntoft T.F. 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 Research** 64:5245-5250, 2004.
- Babai, F., Musevi-Aghdam, J., Schurch, W., Royal., A., and Gabbiani, G. Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos. I. **Skeletal Muscle. Differentiation** 44:132–142, 1990
- Bell, G. W.; Lewitter, F. Visualizing networks. **Methods Enzymol**, 411:408-21, 2006.
- Bergen A. W.; van den Bree M. B. M.; Yeager, M.; Welch, R.; Ganjei, J. K.; Haque, K.; Bacanu, S.; Berrettini, W. H.; Grice, D. E.; Goldman, D.; Bulik C.M.; Klump, K.; Fichter, M.; Halmi, K.; Kaplan, A.; Strober, M.; Treasure, J.; Woodside, B.; Kaye, W. H. Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33–36 linkage region: serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. **Molecular Psychiatry**. 8, 397–406, 2003.
- Brown, K. M. O.; Bujac, S. R.; Mann, E. T.; Campbell, D. A.; Stubbins, M. J.; Blundell, J. E. Further Evidence of Association of OPRD1 & HTR1D Polymorphisms with Susceptibility to Anorexia Nervosa. **Biological Psychiatry**. V. 61- 3, p. 367–373, 2007.
- Cagnazzo, M.; te Pas, M. F. W.; Priem, J.; de Wit, A. A. C.; Pool, M. H.; Davoli, R.; Russo, V. Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics, **J Anim Sci**, v. 84, n. 1, p. 1-10, 2006.
- Chiocco, M. J.; Zhu, X.; Walther, D.; Pletnikova, O.; Troncoso, J. C.; Uhl, G. R.; Liu, Q. R. Fine Mapping of Calcineurin (PPP3CA) Gene Reveals Novel Alternative Splicing Patterns, Association of 5'UTR Trinucleotide Repeat With Addiction Vulnerability, and Differential Isoform Expression in Alzheimer's Disease. **National Institutes of health**, 45(11): 1809–1826, 2010
- Campos, Y.; Qiu, X.; Zanuteli, E.; Moshiach, S.; Vergani, N.; Bongiovanni, A.; Harris A. J.; d'Azzo, A. Ozz-E3 Ubiquitin Ligase Targets Sarcomeric Embryonic Myosin Heavy Chain during Muscle Development. **PLoS ONE** 5(3): e9866, 2010
- Damon, M.; Wyszynska-Koko, J.; Vincent, A.; Héroult, F.; Leuret, B. Comparison of muscle transcriptome between pigs with divergent meat quality phenotypes identifies genes related to muscle metabolism and structure. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33763, 2012.
- Davoli, R.; Braglia. S.; Russo, V.; Varona, L.; te Pas, M. F. Expression profiling of functional genes in prenatal skeletal muscle tissue in Duroc and Pietrain pigs. **J Anim Breed Genet**, v. 128, n. 1, p. 15-27, 2011.

Eivers, S. S.; McGivney, B. A.; Gu, J.; MacHugh, D. E.; Katz, L. M.; Hill, E. W.; PGC-1a encoded by the PPARGC1A gene regulates oxidative energy metabolism in equine skeletal muscle during exercise. **Animal Genetics**, 43, 153–162, 2011.

Enjin, A.; Leão, K. E.; Mikulovic, S.; Le Merre, P. ; Tourtellotte, W. G.; Kullander, K. Sensorimotor function is modulated by the serotonin receptor 1d, a novel marker for gamma motor neurons. **Mol Cell Neurosci.**; 49(3): 322–332, 2012.

Foreign Agricultural Service/USDA Office of GlobalAnalysis, (2011) (available at: livestock\_arc.asp; último acesso 8 dezembro 2012.

Ge, H.; Walhout, A. J.; Vidal, M. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. **Trends Genet**, 19:551-60, 2003.

Guimarães S.E.F.; Lopes P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**. 15(3), 27-28, 2001.

Johnson, A. N.; Mokalled, M. H.; Valera, J. M.; Poss, K. D.; Olson, E. N.; Post-transcriptional regulation of myotube elongation and myogenesis by Hoi Polloi . **Development** 140, 3645-3656, 2013.

Kaufman, S. and Foster, R. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:9606– 9610, 1988.

Knöll, R. Myosin binding protein C: implications for signal-transduction. **J Muscle Res Cell Motil**, 33:31–42, 2012.

Kramerova, I.; Kudryashova, E.; Wu, B. Spencer M. J.; Regulation of the M-Cadherin–Catenin Complex by Calpain 3 during Terminal Stages of Myogenic Differentiation **Molecular And Cellular Biology**, p. 8437–8447, 2006.

Livack, k. J.; Schmittgen, t. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **Method. Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

Li, H. and Capetanaki, Y. Regulation of the mouse desmin gene: Transactivation by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. **Nucleic Acids Res**. 21:335–343, 1993.

Li, H., Choudhary, S.K., Milner, D.J., Munir, M.I., Kuisk, I.R., and Capetanaki, Y. (1994) Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. **J Cell Biol.**, 124(5):827-41, 1994.

Lopes, P. S.; Guimarães, S. E. F.; Pires, A. V.; Soares, M. A. M.; Carmo, F. M. da S.; Guimarães, M. F. M.; Gomide, L. A. de M.; Benevenuto Júnior, A. A. Performance, carcass yield and meat quality traits of F2 crosses between Brazilian native and commercial pigs for QTL mapping. Proceedings of the **7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, p. 1-4, 2002.

Lotia, S.; Montojo, J.; Dong, Y.; Bader, G. D; Pico, A. R. BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE. V. 29 n°. 10, p. 1350–1351, 2013.

Marston, S.; Copeland, O.; Jacques, A. Livesey, K.; Tsang, V.; McKenna, W. J.; Jalilzadeh, S.; Carballo, S.; Redwood, C.; Watkins, H. Evidence From Human

Myectomy Samples That MYBPC3 Mutations Cause Hypertrophic Cardiomyopathy Through Haploinsufficiency. **Cardiovascular Science**, 105:219-222, 2009.

Milewicz DM, Ostergaard JR, Ala-Kokko LM, Khan N, Grange DK, Mendoza-Londono R, Bradley TJ, Olney AH, Ades L, Maher JF, Guo D, Buja LM, Kim D, Hyland JC, Regalado ES. De novo ACTA2 mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle dysfunction. **Am J Med Genet Part A** 152:2437–2443, 2010

Monnier, N; Ferreira, A; Marty, I; Labarre-Vila, A; Mezin, P; Lunardi, J. A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR1 is associated with multi-minicore disease congenital myopathy with ophthalmoplegia. **Human Molecular Genetics**, Vol. 12, No. 10 1171–1178, 2003.

Moss, F. P.; LEBLOND, C. P. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. **Anat Rec**, v. 170, n. 4, p. 421-35, 1971.

Muráni, E.; Murániová, M.; Ponsuksili, S.; Schellander K.; Wimmers, K. Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity. **BMC Dev Biol**, v. 7, p. 109, 2007.

Nascimento C.S.; J.O. Peixoto, L.L. Verardo, C.F. Campos, M.M.C. Weller, V.R. Faria, M.E. Botelho, M.F. Martins, M.A. Machado, F.F. Silva, P.S. Lopes and S.E.F. Guimarães. Transcript profiling of expressed sequence tags from semimembranosus muscle of commercial and naturalized pig breeds, **Genetics and Molecular Research**, 2012.

Pan, D.; Zhe, X; Jakkaraju, S.; Taylor, G. A.; Schuger, L. P311 induces a TGF- $\beta$ 1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype. **J. Clin. Invest.** 110:1349–1358, 2002.

Parmacek, M. S.; Solaro, R. J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. **Prog Cardiovasc Dis.**, 47(3):159-76, 2004.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**. 26:509-515, 2004.

Richer, J.; Milewicz, D.M. ; Gow, R.; Nanassy, J. de; Maharajh, G.; Miller, E.; Oppenheimer, L.; Weiler, G.; O'Connor, M. R179H Mutation in ACTA2 Expanding the Phenotype to Include Prune-Belly Sequence and Skin Manifestations. **American Journal of Medical Genetics**, 158A:664–668, 2011.

Rehfeldt C.; Fiedler I.; Dietl G.; Ender K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, 66, 177–188, 2000.

SAS Institute Inc. SAS/STAT ® 9.2 User's Guide, 2nd ed. Cary, NC, 2009.

Schultz, E. A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. **Anat Rec**, v. 180, n. 4, p. 589-95, 1974.

Semsarian, S.; Wu, M. J.; Ju, Y. K.; Marciniak, T.; Yeoh, T.; Allen, D. G.; Harvey, R. P.; Graham, R. M. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup> dependent calcineurin signalling pathway. **Nature** 400, 576-581, 1999.

Serão, N.V.; Veroneze, R.; Ribeiro, A. M; Verardo, L. L.; Braccini Neto, J.; Gasparino, E.; Campos, C. F.; Lopes, P. S.; Guimarães, S. E. Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. **J. Anim. Breed. Genet.** v. 128, p. 28–34, 2011.

Silver N.; Best S.; Jiang J.; Thein S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, 7:33, 2006.

Shen, K.; Ramirez, B.; Mapes, B.; Shen, G. R.; Gokhale, V.; Brown, M. E.; Santarsiero, B.; Ishii, Y.; Dudek, S. M.; Wang, T.; Garcia, J. G. Structure-Function Analysis of the Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase (nmMLCK) Isoform by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling: Influence of MYLK Variants. **PLoS One**. V. 10(6), 2015.

Song, Y.; Wang, K.; Chen, D.; Magness, R. R.; Zheng, Z. Suppression of Protein Phosphatase 2 Differentially Modulates VEGF- and FGF2-Induced Signaling in Ovine Fetoplacental Artery Endothelial Cells. **Placenta**, 30(10): 907–913, 2009.

Sollero B.P.; Guimarães S.E.F.; Rilington V.D.; Tempelman R.J.; Raney N.E.; Steibel J.P.; Guimarães J.D.; Lopes P.S.; Lopes M.S.; Ernst C.W. Transcriptional profiling during foetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire–Landrace cross-bred pigs. **Anim. Genet.**; 42, 600–612, 2011.

Sollero, B. P.; Paiva, S.R.; Faria, D.A.; Guimarães, S.E.F.; Castro, S.T.R.; Egito, A.A.; Albuquerque, M.S.M.; Piovezan, U.; Bertani, G.R.; Mariante, A. da S.; Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, 123.1: 8-15, 2009.

Steibel, J. P.; Poletto, R.; Coussens, P. M.; Rosa, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, 94: 146-152, 2009.

Tajsharghi, H.; Leren, T. P.; Abdul-Hussein, S.; Tulinius, M.; Brunvand, L.; Dahl, H.M.; Oldfors, A. Unexpected myopathy associated with a mutation in MYBPC3 and misplacement of the cardiac myosin binding protein C. **J Med Genet.** Aug;47(8):575-7, 2010. in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858127>

Takeshima, H., Lino, M., Takekura, H., Nishio, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H. and Noda, T. () Excitation–contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. **Nature**, 369, 556–559, 1994.

Tuluc, P.; Molenda, N.; Schlick, B.; Obermair, G. J.; Flucher, B. E.; Jurkat-Rott, K. A CaV1.1 Ca<sup>2+</sup> Channel Splice Variant with High Conductance and Voltage-Sensitivity Alters EC Coupling in Developing Skeletal Muscle. **Biophysical Journal**, V. 96, p. 35–44, 2009.

Vage, J.; Wade, C.; Biage, T.; Fatjó, J.; Amat, M.; Lindblad-Tho, K.; Lingaas, F. Association of dopamine- and serotonin-related genes with canine aggression. **Genes, Brain and Behavior** 9: 372–37, 2010.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology Research**, 0034, 2002.

Verardo L.L.; C.S. Nascimento, F.F. Silva, E. Gasparino, M.F.Martins, E. Toriyama, V.R. Faria, M.E. Botelho, K.A. Costa<sup>1</sup>, P.S. Lopes & S.E.F. Guimarães (2012) Identification and validation of differentially expressed genes from pig skeletal muscle. **J. Anim. Breed. Genet.**; 2012.

Wang, M. G.; Yi, H.; Guerine, D.; Klee, C. B.; McBride, O. W. Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively.. *Cytogen Cell Gent* 72, 236-241. 1996

Weitzer, G.; Milner, D. J.; Kim, J. U.; Bradley, A.; Capetanaki, Y. Cytoskeletal Control of Myogenesis: A Desmin Null Mutation Blocks the Myogenic Pathway during Embryonic Stem Cell Differentiation. **Developmental Biology**, v. 172, p. 422–439 1995

Wigmore, P. M.; Stickland, N. C. Muscle development in large and small pig fetuses. **J Anat**, v. 137 (Pt 2), p. 235-45, 1983.

Yamane, A; Mayo, M. L.; Bringas Jr., P.; Chen, L.; Huynh, M.; Thai, K.; Shum, L.; Slavkin, A. C. TGF- $\alpha$ , EGF, and Their Cognate EGF Receptor are Co-Expressed With Desmin During Embryonic, Fetal, and Neonatal Myogenesis in Mouse Tongue Developmen. **Developmental Dynamics** 209:353–366, 1997.

Yamaguchi, N.; Xu, L.; Evans, K. E.; Pasek, D. A.; Meissner, G. Different Regions in Skeletal and Cardiac Muscle Ryanodine Receptors Are Involved in Transducing the Functional Effects of Calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, No. 35, Issue of August 27, pp. 36433–36439, 2004

Yamaguchi, N.; Takahashi, N.; Xu, L.; Smithies, O.; Meissner, G. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca<sup>2+</sup> release channel **J Clin Invest**. May 1; 117(5): 1344–1353, 2007.

ZHAO, X.; Mo, D.; Li A.; Gong, W.; Xiao, S.; Zhang, Y.; Qin, L.; Niu, Y.; Guo, Y.; Liu, X.; Cong, P.; He, Z.; Wang, C.; Li, J.; Chen, Y. Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19774, 2011.

Zhao, Y.; Li, J.; Liu, H.; Xi, Y.; Xue, M.; Liu, W.; Zhuang, Z.; Lei, M.; Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs. **BMC Genomics** v.16, p. 377, 2015

## Anexo I – Parecer CEUA-UFV

Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa-  
CEUA-UFV

### **CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 85/2013, intitulado “Validação de genes diferencialmente expressos por RT-qPCR em quatro idades pré-natais em suínos de diferentes linhas genéticas: raça Piau e linha comercial”, coordenado pela professora Simone Eliza Facioni Guimarães do Departamento de Zootecnia, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 05/06/2014, com validade de 12 meses.

### **CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 85/2013, named “ Validation of differentially expressed genes by RT-qPCR in four prenatal ages in pigs from different genetic lines: Piau breed and comercial line ”, is in agreement with the a ctual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on June 05, 2014 valid for 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca  
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

# **Material Suplementar**

Tabela Suplementar 1- Análise de Variância dados RT-qPCR para os genes sem Interação significativa entre os fatores Genética e número de dias pós cobertura (DPC)

Gene	Fatos	G. L.	F-Value	p-Value
CACNA1S	Genética	1	1,17	0,2958
	DPC	3	1,57	0,2176
	Genética*DPC	7	1	0,4482
CAST	Genética	1	1,24	0,2822
	DPC	3	0,36	0,7844
	Genética*DPC	7	0,61	0,7455
CHRND	Genética	1	2,36	0,1371
	DPC	3	1,96	0,1324
	Genética*DPC	7	1,39	0,2271
CHRNA1	Genética	1	0,1	0,755
	DPC	3	4,52	0,0101
	Genética*DPC	7	2,06	0,0773
MYLK2	Genética	1	1,84	0,1946
	DPC	3	0,34	0,8137
	Genética*DPC	7	0,73	0,6479
TNNC2	Genética	1	1,99	0,1772
	DPC	3	3,49	0,0276
	Genética*DPC	7	1,92	0,0968
TPM1	Genética	1	1,17	0,2861
	DPC	3	3,23	0,0264
	Genética*DPC	7	1,8	0,0973

G.L.: graus de liberdade de cada categoria; nível de significância  $\alpha=0,05$

Tabela Suplementar 2- Fold change (FC) dos genes entre os períodos de 21, 40 70 e 90 dias pós concepção (dpc) fetos Comercial.

Comparação	21-40 dpc		21-70 dpc		21-90 dpc		40-70 dpc		40-90 dpc		70-90 dpc	
	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC t	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t
ACTA2	3,99	0,591	-42,86	0,1549	-7,91	0,434	-171,06	0,051	-31,55	0,189	5,42	0,513
CALM1	1,59	0,730	-2,25	0,546	-3,43	0,364	-3,57	0,349	-5,44	0,219	-1,53	0,751
CAPN3	51,82	0,053	30,29	0,091	6,06	0,356	-1,71	0,780	-8,55	0,275	-5,00	0,409
DES	5,94	0,122	6,53	0,105	5,69	0,1311	1,10	0,931	-1,04	0,969	-1,15	0,900
HTR1D	-7,55	0,331	-96,59	0,037	-172,03	0,021	-12,78	0,224	-22,78	0,140	-1,78	0,778
MYBPC3	-3,45	0,604	-42,39	0,129	-	-	-12,29	0,300	-	-	-	-
PPP3CA	12,12	0,026	-	-	6,70	0,050	-	-	-1,81	0,538	-	-
RYR1	97,35	0,021	1514,16	<0,001	1026,42	<0,001	15,55	0,136	10,54	0,152	-1,48	0,810
RYR2	-2,46	0,586	-24,21	0,067	-16,86	0,1015	-9,84	0,178	-6,85	0,253	1,44	0,826
TNNT1	6,69	0,150	-1,16	0,907	1,09	0,947	-7,76	0,122	-6,15	0,167	1,26	0,855

Valores de FC negativos: número de vezes o gene foi mais expresso no primeiro período; valores positivos: número de vezes que o gene foi mais expresso no segundo período da comparação.

Tabela Suplementar 3- - Fold change (FC) dos genes entre os períodos de 21, 40 70 e 90 dias pós concepção (dpc) fetos da raça Piau

Comparação	21-40 dpc		21-70 dpc		21-90 dpc		40-70 dpc		40-90 dpc		70-90 dpc	
	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t	FC	Pr> t
ACTA2	-4,80	0,534	-254,27	0,041	2,55	0,698	-52,92	0,134	12,27	0,305	649,28	0,015
CALM1	-3,42	0,415	-13,93	0,091	-11,26	0,129	-4,08	0,302	-3,30	0,397	1,24	0,878
CAPN3	10,02	0,242	2,86	0,587	15,20	0,170	-3,50	0,518	1,52	0,829	5,31	0,392
DES	-2,11	0,504	-2,17	0,488	1,52	0,707	-1,03	0,979	3,20	0,303	3,29	0,291
HTR1D	-2,24	0,694	-55,26	0,064	-2,20	0,701	-24,62	0,131	1,02	0,991	25,14	0,129
MYBPC3	-56,71	0,104	-	-	-1373,84	0,007	-	-	-	-	-	-
PPP3CA	3,06	0,185	4,30	0,121	-1,07	0,947	1,41	0,700	-3,26	0,234	-4,58	0,158
RYR1	45,65	0,026	387,73	0,002	7562,78	<,001	8,31	0,258	162,12	0,008	19,51	0,147
RYR2	-19,30	0,087	-266,72	0,003	-35,66	0,044	-13,82	0,125	-1,85	0,712	7,48	0,237
TNNT1	5,56	0,191	-4,21	0,269	4,19	0,270	-23,41	0,023	-1,32	0,825	17,64	0,036

Valores de FC negativos: número de vezes o gene foi mais expresso no primeiro período; valores positivos: número de vezes que o gene foi mais expresso no segundo período da comparação.

## Output SAS: análise de expressão gene ACTA2

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
					Error				
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	C	21	31.3168	2.1325		16	14.69	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	C	40	27.8190	2.1325		16	13.04	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	C	70	33.8785	2.1325		16	15.89	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	C	90	31.9442	2.1325		16	14.98	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	P	21	32.6420	2.1325		16	15.31	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	P	40	30.2007	2.1325		16	14.16	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	P	70	32.3125	2.1325		16	15.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	ACTA2	P	90	28.5538	2.1325		16	13.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.6873	2.0613		16	11.01	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	21.9015	2.0613		16	10.62	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.6983	2.0613		16	9.56	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.3315	2.0613		16	9.86	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.1967	2.0613		16	13.68	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.0075	2.0613		16	11.65	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	19.9927	2.0613		16	9.70	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.7815	2.0613		16	12.02	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	16	151.46	<.0001

### Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error				
Genetics:C-P geneACTA2	3.4023	1.9708		16	1.73	0.1035
DPC:21-40 geneACTA2	0.4821	2.7871		16	0.17	0.8648
DPC:21-70 geneACTA2	-6.7126	2.7871		16	-2.41	0.0284
DPC:21-90 geneACTA2	-1.1551	2.7871		16	-0.41	0.6841
DPC:40-70 geneACTA2	-7.1947	2.7871		16	-2.58	0.0201
DPC:40-90 geneACTA2	-1.6372	2.7871		16	-0.59	0.5651
DPC:70-90 geneACTA2	5.5575	2.7871		16	1.99	0.0635
Genetics:C-P DPC=21 gene:ACTA2	4.1842	3.9416		16	1.06	0.3042
Genetics:C-P DPC=40 gene:ACTA2	-0.2757	3.9416		16	-0.07	0.9451
Genetics:C-P DPC=70 gene:ACTA2	1.8603	3.9416		16	0.47	0.6433
Genetics:C-P DPC=90 gene:ACTA2	7.8403	3.9416		16	1.99	0.0641
DPC:21-40 Genetics=C gene:ACTA2	2.7120	3.9416		16	0.69	0.5013
DPC:21-70 Genetics=C gene:ACTA2	-5.5507	3.9416		16	-1.41	0.1782
DPC:21-90 Genetics=C gene:ACTA2	-2.9832	3.9416		16	-0.76	0.4601
DPC:40-70 Genetics=C gene:ACTA2	-8.2627	3.9416		16	-2.10	0.0523
DPC:40-90 Genetics=C gene:ACTA2	-5.6952	3.9416		16	-1.44	0.1678
DPC:70-90 Genetics=C gene:ACTA2	2.5675	3.9416		16	0.65	0.5240
DPC:21-40 Genetics=P gene:ACTA2	-1.7478	3.9416		16	-0.44	0.6634
DPC:21-70 Genetics=P gene:ACTA2	-7.8745	3.9416		16	-2.00	0.0630
DPC:21-90 Genetics=P gene:ACTA2	0.6730	3.9416		16	0.17	0.8666
DPC:40-70 Genetics=P gene:ACTA2	-6.1267	3.9416		16	-1.55	0.1397
DPC:40-90 Genetics=P gene:ACTA2	2.4208	3.9416		16	0.61	0.5477
DPC:70-90 Genetics=P gene:ACTA2	8.5475	3.9416		16	2.17	0.0455

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneACTA2	1	16	2.98	0.1035
DPC geneACTA2	3	30	2.83	0.0551
Genetics*DPC geneACTA2	7	34	1.97	0.0883

## Output SAS: análise de expressão gene CACNA1S

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
					Error				
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	C	21	30.4285	0.5800		16	52.47	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	C	40	30.5637	0.5800		16	52.70	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	C	70	29.8052	0.5800		16	51.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	C	90	29.4322	0.5800		16	50.75	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	P	21	31.8830	0.5800		16	54.97	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	P	40	31.9978	0.5800		16	55.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	P	70	30.2468	0.5800		16	52.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CACNA1S	P	90	32.2050	0.5800		16	55.53	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.6873	2.0707		16	10.96	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	21.9015	2.0707		16	10.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.6983	2.0707		16	9.51	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.3315	2.0707		16	9.82	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.0798	2.0707		16	13.56	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.0075	2.0707		16	11.59	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	19.9927	2.0707		16	9.65	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.8845	2.0707		16	12.02	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	16	1414.50	<.0001

### Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error				
Genetics:C-P geneCACNA1S	1.5607	1.4440		16	1.08	0.2958
DPC:21-40 geneCACNA1S	-2.5541	2.0421		16	-1.25	0.2290
DPC:21-70 geneCACNA1S	-4.4083	2.0421		16	-2.16	0.0464
DPC:21-90 geneCACNA1S	-2.4384	2.0421		16	-1.19	0.2499
DPC:40-70 geneCACNA1S	-1.8543	2.0421		16	-0.91	0.3774
DPC:40-90 geneCACNA1S	0.1157	2.0421		16	0.06	0.9555
DPC:70-90 geneCACNA1S	1.9699	2.0421		16	0.96	0.3491
Genetics:C-P DPC=21 gene:CACNA1S	3.9380	2.8880		16	1.36	0.1916
Genetics:C-P DPC=40 gene:CACNA1S	0.6718	2.8880		16	0.23	0.8190
Genetics:C-P DPC=70 gene:CACNA1S	-0.1473	2.8880		16	-0.05	0.9599
Genetics:C-P DPC=90 gene:CACNA1S	1.7802	2.8880		16	0.62	0.5463
DPC:21-40 Genetics=C gene:CACNA1S	-0.9210	2.8880		16	-0.32	0.7539
DPC:21-70 Genetics=C gene:CACNA1S	-2.3657	2.8880		16	-0.82	0.4247
DPC:21-90 Genetics=C gene:CACNA1S	-1.3595	2.8880		16	-0.47	0.6442
DPC:40-70 Genetics=C gene:CACNA1S	-1.4447	2.8880		16	-0.50	0.6237
DPC:40-90 Genetics=C gene:CACNA1S	-0.4385	2.8880		16	-0.15	0.8812
DPC:70-90 Genetics=C gene:CACNA1S	1.0062	2.8880		16	0.35	0.7321
DPC:21-40 Genetics=P gene:CACNA1S	-4.1872	2.8880		16	-1.45	0.1664
DPC:21-70 Genetics=P gene:CACNA1S	-6.4510	2.8880		16	-2.23	0.0401
DPC:21-90 Genetics=P gene:CACNA1S	-3.5173	2.8880		16	-1.22	0.2409
DPC:40-70 Genetics=P gene:CACNA1S	-2.2638	2.8880		16	-0.78	0.4446
DPC:40-90 Genetics=P gene:CACNA1S	0.6698	2.8880		16	0.23	0.8195
DPC:70-90 Genetics=P gene:CACNA1S	2.9337	2.8880		16	1.02	0.3248

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCACNA1S	1	16	1.17	0.2958
DPC geneCACNA1S	3	30	1.57	0.2176
Genetics*DPC geneCACNA1S	7	34	1.00	0.4482

**Output SAS: análise de expressão gene CALM1**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	CALM1	C	21	31.2718	1.0645	16	29.38	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	C	40	29.7105	1.0645	16	27.91	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	C	70	29.9868	1.0645	16	28.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	C	90	31.2740	1.0620	15.9	29.45	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	P	21	33.0733	1.0645	16	31.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	P	40	31.2868	1.0645	16	29.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	P	70	28.8645	1.0645	16	27.11	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CALM1	P	90	31.5635	1.0645	16	29.65	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.6898	1.8389	27.2	12.34	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	21.9040	1.8389	27.2	11.91	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	20.3460	1.8389	27.2	11.06	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	21.1040	1.8389	27.2	11.48	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.6630	1.8389	27.2	15.59	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.8165	1.8389	27.2	13.50	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.3660	1.8389	27.2	11.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.3508	1.8389	27.2	13.24	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	32.2	431.44	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error	DF			
Genetics:C-P geneCALM1	2.4019	1.0828	16	2.22	0.0413	
DPC:21-40 geneCALM1	-0.6423	1.5315	16	-0.42	0.6805	
DPC:21-70 geneCALM1	-2.5735	1.5315	16	-1.68	0.1123	
DPC:21-90 geneCALM1	-2.1951	1.5311	16	-1.43	0.1709	
DPC:40-70 geneCALM1	-1.9313	1.5315	16	-1.26	0.2254	
DPC:40-90 geneCALM1	-1.5529	1.5311	16	-1.01	0.3255	
DPC:70-90 geneCALM1	0.3784	1.5311	16	0.25	0.8080	
Genetics:C-P DPC=21 gene:CALM1	4.1717	2.1659	16	1.93	0.0720	
Genetics:C-P DPC=40 gene:CALM1	1.3362	2.1659	16	0.62	0.5460	
Genetics:C-P DPC=70 gene:CALM1	1.1423	2.1659	16	0.53	0.6051	
Genetics:C-P DPC=90 gene:CALM1	2.9573	2.1646	16	1.37	0.1908	
DPC:21-40 Genetics=C gene:CALM1	0.7755	2.1659	16	0.36	0.7250	
DPC:21-70 Genetics=C gene:CALM1	-1.0588	2.1659	16	-0.49	0.6316	
DPC:21-90 Genetics=C gene:CALM1	-1.5880	2.1646	16	-0.73	0.4738	
DPC:40-70 Genetics=C gene:CALM1	-1.8343	2.1659	16	-0.85	0.4095	
DPC:40-90 Genetics=C gene:CALM1	-2.3635	2.1646	16	-1.09	0.2911	
DPC:70-90 Genetics=C gene:CALM1	-0.5291	2.1646	16	-0.24	0.8100	
DPC:21-40 Genetics=P gene:CALM1	-2.0600	2.1659	16	-0.95	0.3557	
DPC:21-70 Genetics=P gene:CALM1	-4.0882	2.1659	16	-1.89	0.0773	
DPC:21-90 Genetics=P gene:CALM1	-2.8023	2.1659	16	-1.29	0.2141	
DPC:40-70 Genetics=P gene:CALM1	-2.0282	2.1659	16	-0.94	0.3630	
DPC:40-90 Genetics=P gene:CALM1	-0.7423	2.1659	16	-0.34	0.7362	
DPC:70-90 Genetics=P gene:CALM1	1.2858	2.1659	16	0.59	0.5610	

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCALM1	1	16	4.92	0.0413
DPC geneCALM1	3	30	1.29	0.2961
Genetics*DPC geneCALM1	7	34	1.44	0.2206

## Output SAS: análise de expressão gene CAPN3

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard		DF	t Value	Pr >  t
				Estimate	Error			
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	C	21	30.7198	0.8562	16.1	35.88	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	C	40	26.3405	0.8562	16.1	30.76	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	C	70	23.1835	0.8562	16.1	27.08	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	C	90	27.3415	0.8562	16.1	31.93	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	P	21	32.5132	0.8562	16.1	37.97	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	P	40	25.0137	0.8562	16.1	29.21	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	P	70	23.1277	0.8562	16.1	27.01	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAPN3	P	90	25.4852	0.8562	16.1	29.76	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21.9962	2.0577	20.2	10.69	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	23.3123	2.0577	20.2	11.33	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.3805	2.0577	20.2	9.42	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	21.2177	2.0577	20.2	10.31	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27.9737	2.0577	20.2	13.59	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23.7988	2.0577	20.2	11.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.1062	2.0577	20.2	9.77	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.8718	2.0577	20.2	12.09	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	23.6	494.28	<.0001

### Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error				
Genetics:C-P geneCAPN3	3.0724	1.3697		16.1	2.24	0.0393
DPC:21-40 geneCAPN3	4.5101	1.9371		16.1	2.33	0.0332
DPC:21-70 geneCAPN3	3.2193	1.9371		16.1	1.66	0.1158
DPC:21-90 geneCAPN3	3.2630	1.9371		16.1	1.68	0.1113
DPC:40-70 geneCAPN3	-1.2907	1.9371		16.1	-0.67	0.5146
DPC:40-90 geneCAPN3	-1.2471	1.9371		16.1	-0.64	0.5288
DPC:70-90 geneCAPN3	0.04367	1.9371		16.1	0.02	0.9823
Genetics:C-P DPC=21 gene:CAPN3	4.1842	2.7395		16.1	1.53	0.1460
Genetics:C-P DPC=40 gene:CAPN3	1.8133	2.7395		16.1	0.66	0.5174
Genetics:C-P DPC=70 gene:CAPN3	0.7815	2.7395		16.1	0.29	0.7791
Genetics:C-P DPC=90 gene:CAPN3	5.5105	2.7395		16.1	2.01	0.0613
DPC:21-40 Genetics=C gene:CAPN3	5.6955	2.7395		16.1	2.08	0.0539
DPC:21-70 Genetics=C gene:CAPN3	4.9207	2.7395		16.1	1.80	0.0912
DPC:21-90 Genetics=C gene:CAPN3	2.5998	2.7395		16.1	0.95	0.3566
DPC:40-70 Genetics=C gene:CAPN3	-0.7748	2.7395		16.1	-0.28	0.7809
DPC:40-90 Genetics=C gene:CAPN3	-3.0957	2.7395		16.1	-1.13	0.2750
DPC:70-90 Genetics=C gene:CAPN3	-2.3208	2.7395		16.1	-0.85	0.4093
DPC:21-40 Genetics=P gene:CAPN3	3.3247	2.7395		16.1	1.21	0.2424
DPC:21-70 Genetics=P gene:CAPN3	1.5180	2.7395		16.1	0.55	0.5871
DPC:21-90 Genetics=P gene:CAPN3	3.9262	2.7395		16.1	1.43	0.1709
DPC:40-70 Genetics=P gene:CAPN3	-1.8067	2.7395		16.1	-0.66	0.5189
DPC:40-90 Genetics=P gene:CAPN3	0.6015	2.7395		16.1	0.22	0.8290
DPC:70-90 Genetics=P gene:CAPN3	2.4082	2.7395		16.1	0.88	0.3923

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCAPN3	1	16.1	5.03	0.0393
DPC geneCAPN3	3	30.3	1.98	0.1380
Genetics*DPC geneCAPN3	7	34.3	1.83	0.1122

**Output SAS: análise de expressão gene Gene CAST**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	CAST	C	21	27.9072	1.0903	16	25.60	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	C	40	28.0352	1.0903	16	25.71	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	C	70	24.6500	1.0903	16	22.61	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	C	90	24.7732	1.0903	16	22.72	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	P	21	29.6675	1.0903	16	27.21	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	P	40	27.3043	1.0903	16	25.04	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	P	70	25.2993	1.0903	16	23.20	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CAST	P	90	28.4605	1.0903	16	26.10	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21.9962	2.0216	25.6	10.88	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	23.3123	2.0216	25.6	11.53	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.3805	2.0216	25.6	9.59	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	21.2177	2.0216	25.6	10.50	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27.9737	2.0216	25.6	13.84	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23.7988	2.0216	25.6	11.77	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.1062	2.0216	25.6	9.95	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.8718	2.0216	25.6	12.30	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	31.5	309.70	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error	DF			
Genetics:C-P geneCAST	1.3694	1.2305	16	1.11	0.2822	
DPC:21-40 geneCAST	-0.3117	1.7402	16	-0.18	0.8601	
DPC:21-70 geneCAST	-1.4289	1.7402	16	-0.82	0.4236	
DPC:21-90 geneCAST	0.2303	1.7402	16	0.13	0.8963	
DPC:40-70 geneCAST	-1.1172	1.7402	16	-0.64	0.5300	
DPC:40-90 geneCAST	0.5421	1.7402	16	0.31	0.7594	
DPC:70-90 geneCAST	1.6592	1.7402	16	0.95	0.3545	
Genetics:C-P DPC=21 gene:CAST	4.2172	2.4610	16	1.71	0.1059	
Genetics:C-P DPC=40 gene:CAST	1.2173	2.4610	16	0.49	0.6276	
Genetics:C-P DPC=70 gene:CAST	0.07633	2.4610	16	0.03	0.9756	
Genetics:C-P DPC=90 gene:CAST	-0.03317	2.4610	16	-0.01	0.9894	
DPC:21-40 Genetics=C gene:CAST	1.1882	2.4610	16	0.48	0.6358	
DPC:21-70 Genetics=C gene:CAST	0.6415	2.4610	16	0.26	0.7977	
DPC:21-90 Genetics=C gene:CAST	2.3555	2.4610	16	0.96	0.3527	
DPC:40-70 Genetics=C gene:CAST	-0.5467	2.4610	16	-0.22	0.8270	
DPC:40-90 Genetics=C gene:CAST	1.1673	2.4610	16	0.47	0.6417	
DPC:70-90 Genetics=C gene:CAST	1.7140	2.4610	16	0.70	0.4961	
DPC:21-40 Genetics=P gene:CAST	-1.8117	2.4610	16	-0.74	0.4723	
DPC:21-70 Genetics=P gene:CAST	-3.4993	2.4610	16	-1.42	0.1742	
DPC:21-90 Genetics=P gene:CAST	-1.8948	2.4610	16	-0.77	0.4525	
DPC:40-70 Genetics=P gene:CAST	-1.6877	2.4610	16	-0.69	0.5027	
DPC:40-90 Genetics=P gene:CAST	-0.08317	2.4610	16	-0.03	0.9735	
DPC:70-90 Genetics=P gene:CAST	1.6045	2.4610	16	0.65	0.5237	

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCAST	1	16	1.24	0.2822
DPC geneCAST	3	30.1	0.36	0.7844
Genetics*DPC geneCAST	7	34.1	0.61	0.7455

## Output SAS: análise de expressão gene CHRND

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard		DF	t Value	Pr >  t
				Estimate	Error			
GENE*Genetics*DPC	CHRND	C	21	30.9788	0.6405	16	48.37	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	C	40	30.5738	0.6405	16	47.74	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	C	70	32.3692	0.6405	16	50.54	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	C	90	32.8175	0.6405	16	51.24	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	P	21	34.6128	0.6405	16	54.04	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	P	40	31.9410	0.6405	16	49.87	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	P	70	31.7577	0.6405	16	49.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRND	P	90	31.6357	0.6405	16	49.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.6898	1.8932	16	11.98	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	21.9040	1.8932	16	11.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	20.3460	1.8932	16	10.75	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.7263	1.8932	16	10.95	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.7340	1.8932	16	15.18	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.8165	1.8932	16	13.11	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.0310	1.8932	16	10.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.3508	1.8932	16	12.86	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	16	1331.04	<.0001

### Estimates

Label	Standard		DF	t Value	Pr >  t
	Estimate	Error			
Genetics:C-P geneCHRND	2.2646	1.4132	19.6	1.60	0.1251
DPC:21-40 geneCHRND	-0.8132	1.9986	19.6	-0.41	0.6885
DPC:21-70 geneCHRND	-4.7910	1.9986	19.6	-2.40	0.0266
DPC:21-90 geneCHRND	-2.6041	1.9986	19.6	-1.30	0.2077
DPC:40-70 geneCHRND	-3.9777	1.9986	19.6	-1.99	0.0607
DPC:40-90 geneCHRND	-1.7908	1.9986	19.6	-0.90	0.3811
DPC:70-90 geneCHRND	2.1869	1.9986	19.6	1.09	0.2871
Genetics:C-P DPC=21 gene:CHRND	2.4102	2.8265	19.6	0.85	0.4041
Genetics:C-P DPC=40 gene:CHRND	1.5453	2.8265	19.6	0.55	0.5907
Genetics:C-P DPC=70 gene:CHRND	0.2965	2.8265	19.6	0.10	0.9175
Genetics:C-P DPC=90 gene:CHRND	4.8063	2.8265	19.6	1.70	0.1048
DPC:21-40 Genetics=C gene:CHRND	-0.3808	2.8265	19.6	-0.13	0.8942
DPC:21-70 Genetics=C gene:CHRND	-3.7342	2.8265	19.6	-1.32	0.2017
DPC:21-90 Genetics=C gene:CHRND	-3.8022	2.8265	19.6	-1.35	0.1939
DPC:40-70 Genetics=C gene:CHRND	-3.3533	2.8265	19.6	-1.19	0.2496
DPC:40-90 Genetics=C gene:CHRND	-3.4213	2.8265	19.6	-1.21	0.2405
DPC:70-90 Genetics=C gene:CHRND	-0.06800	2.8265	19.6	-0.02	0.9810
DPC:21-40 Genetics=P gene:CHRND	-1.2457	2.8265	19.6	-0.44	0.6642
DPC:21-70 Genetics=P gene:CHRND	-5.8478	2.8265	19.6	-2.07	0.0520
DPC:21-90 Genetics=P gene:CHRND	-1.4060	2.8265	19.6	-0.50	0.6244
DPC:40-70 Genetics=P gene:CHRND	-4.6022	2.8265	19.6	-1.63	0.1194
DPC:40-90 Genetics=P gene:CHRND	-0.1603	2.8265	19.6	-0.06	0.9553
DPC:70-90 Genetics=P gene:CHRND	4.4418	2.8265	19.6	1.57	0.1321

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCHRND	1	19.6	2.57	0.1251
DPC geneCHRND	3	37.2	2.26	0.0973
Genetics*DPC geneCHRND	7	42.3	1.53	0.1833

**Output SAS: análise de expressão gene CHRNG**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard		DF	t Value	Pr >  t
				Estimate	Error			
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	C	21	29.0008	1.2282	16	23.61	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	C	40	24.2665	1.2282	16	19.76	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	C	70	26.5657	1.2282	16	21.63	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	C	90	29.1600	1.2282	16	23.74	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	P	21	33.8340	1.2282	16	27.55	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	P	40	26.5283	1.2282	16	21.60	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	P	70	27.8155	1.2282	16	22.65	<.0001
GENE*Genetics*DPC	CHRNG	P	90	32.3090	1.2282	16	26.31	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.2132	2.2847	25.4	9.72	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	22.5918	2.2847	25.4	9.89	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.5757	2.2847	25.4	8.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.0525	2.2847	25.4	8.78	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.1082	2.2847	25.4	12.30	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.5112	2.2847	25.4	10.73	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.5450	2.2847	25.4	8.99	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	25.5092	2.2847	25.4	11.16	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	31.1	278.72	<.0001

Estimates

Label	Standard		DF	t Value	Pr >  t
	Estimate	Error			
Genetics:C-P geneCHRNG	0.6866	1.3911	16	0.49	0.6283
DPC:21-40 geneCHRNG	4.4108	1.9672	16	2.24	0.0394
DPC:21-70 geneCHRNG	-0.8735	1.9672	16	-0.44	0.6630
DPC:21-90 geneCHRNG	-1.6969	1.9672	16	-0.86	0.4011
DPC:40-70 geneCHRNG	-5.2843	1.9672	16	-2.69	0.0162
DPC:40-90 geneCHRNG	-6.1077	1.9672	16	-3.10	0.0068
DPC:70-90 geneCHRNG	-0.8234	1.9672	16	-0.42	0.6811
Genetics:C-P DPC=21 gene:CHRNG	1.0618	2.7821	16	0.38	0.7077
Genetics:C-P DPC=40 gene:CHRNG	-0.3425	2.7821	16	-0.12	0.9036
Genetics:C-P DPC=70 gene:CHRNG	-0.2805	2.7821	16	-0.10	0.9209
Genetics:C-P DPC=90 gene:CHRNG	2.3077	2.7821	16	0.83	0.4190
DPC:21-40 Genetics=C gene:CHRNG	5.1130	2.7821	16	1.84	0.0847
DPC:21-70 Genetics=C gene:CHRNG	-0.2023	2.7821	16	-0.07	0.9429
DPC:21-90 Genetics=C gene:CHRNG	-2.3198	2.7821	16	-0.83	0.4166
DPC:40-70 Genetics=C gene:CHRNG	-5.3153	2.7821	16	-1.91	0.0741
DPC:40-90 Genetics=C gene:CHRNG	-7.4328	2.7821	16	-2.67	0.0167
DPC:70-90 Genetics=C gene:CHRNG	-2.1175	2.7821	16	-0.76	0.4576
DPC:21-40 Genetics=P gene:CHRNG	3.7087	2.7821	16	1.33	0.2011
DPC:21-70 Genetics=P gene:CHRNG	-1.5447	2.7821	16	-0.56	0.5864
DPC:21-90 Genetics=P gene:CHRNG	-1.0740	2.7821	16	-0.39	0.7045
DPC:40-70 Genetics=P gene:CHRNG	-5.2533	2.7821	16	-1.89	0.0772
DPC:40-90 Genetics=P gene:CHRNG	-4.7827	2.7821	16	-1.72	0.1048
DPC:70-90 Genetics=P gene:CHRNG	0.4707	2.7821	16	0.17	0.8678

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneCHRNG	1	16	0.24	0.6283
DPC geneCHRNG	3	30.1	3.83	0.0195
Genetics*DPC geneCHRNG	7	34.1	1.77	0.1268

**Output SAS: análise de expressão gene DES**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
					Error				
GENE*Genetics*DPC	DES	C	21	29.0273	1.4503		16	20.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	C	40	25.6178	1.4503		16	17.66	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	C	70	23.3470	1.4503		16	16.10	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	C	90	23.9857	1.4503		16	16.54	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	P	21	31.3795	1.4503		16	21.64	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	P	40	28.3797	1.4503		16	19.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	P	70	24.1585	1.4503		16	16.66	<.0001
GENE*Genetics*DPC	DES	P	90	27.6997	1.4503		16	19.10	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21.8092	1.8139		29.5	12.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	20.9692	1.8139		29.5	11.56	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	18.8363	1.8139		29.5	10.38	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	19.2755	1.8139		29.5	10.63	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27.7915	1.8139		29.5	15.32	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23.7152	1.8139		29.5	13.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	19.4532	1.8139		29.5	10.72	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.7128	1.8139		29.5	13.62	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	21.9	179.07	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error				
Genetics:C-P geneDES	1.2857	0.7881		16	1.63	0.1223
DPC:21-40 geneDES	0.7465	1.1146		16	0.67	0.5126
DPC:21-70 geneDES	0.7951	1.1146		16	0.71	0.4859
DPC:21-90 geneDES	1.5546	1.1146		16	1.39	0.1821
DPC:40-70 geneDES	0.04858	1.1146		16	0.04	0.9658
DPC:40-90 geneDES	0.8081	1.1146		16	0.73	0.4789
DPC:70-90 geneDES	0.7595	1.1146		16	0.68	0.5053
Genetics:C-P DPC=21 gene:DES	3.6302	1.5762		16	2.30	0.0350
Genetics:C-P DPC=40 gene:DES	-0.01583	1.5762		16	-0.01	0.9921
Genetics:C-P DPC=70 gene:DES	-0.1947	1.5762		16	-0.12	0.9032
Genetics:C-P DPC=90 gene:DES	1.7233	1.5762		16	1.09	0.2904
DPC:21-40 Genetics=C gene:DES	2.5695	1.5762		16	1.63	0.1226
DPC:21-70 Genetics=C gene:DES	2.7075	1.5762		16	1.72	0.1051
DPC:21-90 Genetics=C gene:DES	2.5080	1.5762		16	1.59	0.1311
DPC:40-70 Genetics=C gene:DES	0.1380	1.5762		16	0.09	0.9313
DPC:40-90 Genetics=C gene:DES	-0.06150	1.5762		16	-0.04	0.9694
DPC:70-90 Genetics=C gene:DES	-0.1995	1.5762		16	-0.13	0.9009
DPC:21-40 Genetics=P gene:DES	-1.0765	1.5762		16	-0.68	0.5044
DPC:21-70 Genetics=P gene:DES	-1.1173	1.5762		16	-0.71	0.4886
DPC:21-90 Genetics=P gene:DES	0.6012	1.5762		16	0.38	0.7079
DPC:40-70 Genetics=P gene:DES	-0.04083	1.5762		16	-0.03	0.9797
DPC:40-90 Genetics=P gene:DES	1.6777	1.5762		16	1.06	0.3030
DPC:70-90 Genetics=P gene:DES	1.7185	1.5762		16	1.09	0.2917

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneDES	1	16	2.66	0.1223
DPC geneDES	3	30	0.65	0.5897
Genetics*DPC geneDES	7	34	1.21	0.3247

**Output SAS: análise de expressão gene HTR1D**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard		DF	t Value	Pr >  t
				Estimate	Error			
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21.8092	2.1261	18.2	10.26	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	20.9692	2.1261	18.2	9.86	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	18.8363	2.1261	18.2	8.86	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	19.2755	2.1261	18.2	9.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27.7915	2.1261	18.2	13.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23.7152	2.1261	18.2	11.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	19.4532	2.1261	18.2	9.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.7128	2.1261	18.2	11.62	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	C	21	26.9863	0.6480	16.1	41.64	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	C	40	29.0633	0.6480	16.1	44.85	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	C	70	30.6068	0.6480	16.1	47.23	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	C	90	31.8792	0.6480	16.1	49.19	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	P	21	32.1462	0.6480	16.1	49.61	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	P	40	29.2362	0.6480	16.1	45.12	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	P	70	29.5960	0.6480	16.1	45.67	<.0001
GENE*Genetics*DPC	HTR1D	P	90	30.2038	0.6480	16.1	46.61	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	19.3	1073.96	<.0001

Estimates

Label	Standard		DF	t Value	Pr >  t
	Estimate	Error			
Genetics:C-P geneHTR1D	3.0340	1.4559	16.1	2.08	0.0535
DPC:21-40 geneHTR1D	-2.0417	2.0589	16.1	-0.99	0.3361
DPC:21-70 geneHTR1D	-6.1908	2.0589	16.1	-3.01	0.0083
DPC:21-90 geneHTR1D	-4.2814	2.0589	16.1	-2.08	0.0539
DPC:40-70 geneHTR1D	-4.1491	2.0589	16.1	-2.02	0.0609
DPC:40-90 geneHTR1D	-2.2398	2.0589	16.1	-1.09	0.2927
DPC:70-90 geneHTR1D	1.9093	2.0589	16.1	0.93	0.3674
Genetics:C-P DPC=21 gene:HTR1D	0.8225	2.9117	16.1	0.28	0.7812
Genetics:C-P DPC=40 gene:HTR1D	2.5732	2.9117	16.1	0.88	0.3899
Genetics:C-P DPC=70 gene:HTR1D	1.6277	2.9117	16.1	0.56	0.5839
Genetics:C-P DPC=90 gene:HTR1D	7.1127	2.9117	16.1	2.44	0.0265
DPC:21-40 Genetics=C gene:HTR1D	-2.9170	2.9117	16.1	-1.00	0.3313
DPC:21-70 Genetics=C gene:HTR1D	-6.5933	2.9117	16.1	-2.26	0.0377
DPC:21-90 Genetics=C gene:HTR1D	-7.4265	2.9117	16.1	-2.55	0.0213
DPC:40-70 Genetics=C gene:HTR1D	-3.6763	2.9117	16.1	-1.26	0.2247
DPC:40-90 Genetics=C gene:HTR1D	-4.5095	2.9117	16.1	-1.55	0.1409
DPC:70-90 Genetics=C gene:HTR1D	-0.8332	2.9117	16.1	-0.29	0.7784
DPC:21-40 Genetics=P gene:HTR1D	-1.1663	2.9117	16.1	-0.40	0.6940
DPC:21-70 Genetics=P gene:HTR1D	-5.7882	2.9117	16.1	-1.99	0.0641
DPC:21-90 Genetics=P gene:HTR1D	-1.1363	2.9117	16.1	-0.39	0.7015
DPC:40-70 Genetics=P gene:HTR1D	-4.6218	2.9117	16.1	-1.59	0.1319
DPC:40-90 Genetics=P gene:HTR1D	0.03000	2.9117	16.1	0.01	0.9919
DPC:70-90 Genetics=P gene:HTR1D	4.6518	2.9117	16.1	1.60	0.1296

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneHTR1D	1	16.1	4.34	0.0535
DPC geneHTR1D	3	30.2	3.41	0.0300
Genetics*DPC geneHTR1D	7	34.2	2.48	0.0358

## Output SAS: análise de expressão gene MyBPC3

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
					Error				
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21.9962	2.2447		16	9.80	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	23.3123	2.2447		16	10.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.3805	2.2447		16	8.63	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	21.2177	2.2447		16	9.45	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27.9737	2.2447		16	12.46	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23.7988	2.2447		16	10.60	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.1062	2.2447		16	8.96	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.8718	2.2447		16	11.08	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	C	21	30.3912	0.9730		16	31.23	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	C	40	33.4935	0.9730		16	34.42	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	C	70	33.1810	0.9730		16	34.10	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	C	90	38.9175	0.9730		16	40.00	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	P	21	31.5970	0.9730		16	32.47	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	P	40	33.2477	0.9730		16	34.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	P	70	38.9920	0.9730		16	40.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MyBPC3	P	90	38.9192	0.9730		16	40.00	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	16	679.91	<.0001

### Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error				
Genetics:C-P geneMYBPC3	1.0178	1.6914		16	0.60	0.5558
DPC:21-40 geneMYBPC3	-3.8058	2.3920		16	-1.59	0.1312
DPC:21-70 geneMYBPC3	-10.3340	2.3920		16	-4.32	0.0005
DPC:21-90 geneMYBPC3	-9.8644	2.3920		16	-4.12	0.0008
DPC:40-70 geneMYBPC3	-6.5282	2.3920		16	-2.73	0.0149
DPC:40-90 geneMYBPC3	-6.0586	2.3920		16	-2.53	0.0222
DPC:70-90 geneMYBPC3	0.4696	2.3920		16	0.20	0.8468
Genetics:C-P DPC=21 gene:MYBPC3	4.7717	3.3829		16	1.41	0.1775
Genetics:C-P DPC=40 gene:MYBPC3	0.7323	3.3829		16	0.22	0.8313
Genetics:C-P DPC=70 gene:MYBPC3	-5.0853	3.3829		16	-1.50	0.1523
Genetics:C-P DPC=90 gene:MYBPC3	3.6525	3.3829		16	1.08	0.2963
DPC:21-40 Genetics=C gene:MYBPC3	-1.7862	3.3829		16	-0.53	0.6047
DPC:21-70 Genetics=C gene:MYBPC3	-5.4055	3.3829		16	-1.60	0.1296
DPC:21-90 Genetics=C gene:MYBPC3	-9.3048	3.3829		16	-2.75	0.0142
DPC:40-70 Genetics=C gene:MYBPC3	-3.6193	3.3829		16	-1.07	0.3005
DPC:40-90 Genetics=C gene:MYBPC3	-7.5187	3.3829		16	-2.22	0.0410
DPC:70-90 Genetics=C gene:MYBPC3	-3.8993	3.3829		16	-1.15	0.2660
DPC:21-40 Genetics=P gene:MYBPC3	-5.8255	3.3829		16	-1.72	0.1043
DPC:21-70 Genetics=P gene:MYBPC3	-15.2625	3.3829		16	-4.51	0.0004
DPC:21-90 Genetics=P gene:MYBPC3	-10.4240	3.3829		16	-3.08	0.0072
DPC:40-70 Genetics=P gene:MYBPC3	-9.4370	3.3829		16	-2.79	0.0131
DPC:40-90 Genetics=P gene:MYBPC3	-4.5985	3.3829		16	-1.36	0.1929
DPC:70-90 Genetics=P gene:MYBPC3	4.8385	3.3829		16	1.43	0.1719

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneMYBPC3	1	16	0.36	0.5558
DPC geneMYBPC3	3	30	8.68	0.0003
Genetics*DPC geneMYBPC3	7	34	4.50	0.0012

## Output SAS: análise de expressão gene MYLK2

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard				
				Estimate	Error	DF	t Value	Pr >  t
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.2132	2.0017	21.1	11.10	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	22.5918	2.0017	21.1	11.29	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.5757	2.0017	21.1	9.78	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.0525	2.0017	21.1	10.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.1082	2.0017	21.1	14.04	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.5112	2.0017	21.1	12.25	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.5450	2.0017	21.1	10.26	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	25.5092	2.0017	21.1	12.74	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	C	21	33.0657	0.8790	16	37.62	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	C	40	30.6710	0.8790	16	34.89	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	C	70	28.9942	0.8790	16	32.99	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	C	90	29.5283	0.8790	16	33.59	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	P	21	34.0937	0.8790	16	38.79	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	P	40	32.3585	0.8790	16	36.81	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	P	70	30.3998	0.8790	16	34.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	MYLK2	P	90	32.2395	0.8790	16	36.68	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	25.4	642.92	<.0001

### Estimates

Label	Standard				
	Estimate	Error	DF	t Value	Pr >  t
Genetics:C-P geneMYLK2	1.8520	1.3185	16	1.40	0.1793
DPC:21-40 geneMYLK2	0.4558	1.8647	16	0.24	0.8100
DPC:21-70 geneMYLK2	-1.2177	1.8647	16	-0.65	0.5230
DPC:21-90 geneMYLK2	0.3159	1.8647	16	0.17	0.8676
DPC:40-70 geneMYLK2	-1.6734	1.8647	16	-0.90	0.3828
DPC:40-90 geneMYLK2	-0.1398	1.8647	16	-0.07	0.9412
DPC:70-90 geneMYLK2	1.5336	1.8647	16	0.82	0.4229
Genetics:C-P DPC=21 gene:MYLK2	4.8670	2.6370	16	1.85	0.0835
Genetics:C-P DPC=40 gene:MYLK2	0.2318	2.6370	16	0.09	0.9310
Genetics:C-P DPC=70 gene:MYLK2	-0.4363	2.6370	16	-0.17	0.8707
Genetics:C-P DPC=90 gene:MYLK2	2.7455	2.6370	16	1.04	0.3133
DPC:21-40 Genetics=C gene:MYLK2	2.7733	2.6370	16	1.05	0.3086
DPC:21-70 Genetics=C gene:MYLK2	1.4340	2.6370	16	0.54	0.5941
DPC:21-90 Genetics=C gene:MYLK2	1.3767	2.6370	16	0.52	0.6088
DPC:40-70 Genetics=C gene:MYLK2	-1.3393	2.6370	16	-0.51	0.6185
DPC:40-90 Genetics=C gene:MYLK2	-1.3967	2.6370	16	-0.53	0.6036
DPC:70-90 Genetics=C gene:MYLK2	-0.05733	2.6370	16	-0.02	0.9829
DPC:21-40 Genetics=P gene:MYLK2	-1.8618	2.6370	16	-0.71	0.4903
DPC:21-70 Genetics=P gene:MYLK2	-3.8693	2.6370	16	-1.47	0.1617
DPC:21-90 Genetics=P gene:MYLK2	-0.7448	2.6370	16	-0.28	0.7812
DPC:40-70 Genetics=P gene:MYLK2	-2.0075	2.6370	16	-0.76	0.4576
DPC:40-90 Genetics=P gene:MYLK2	1.1170	2.6370	16	0.42	0.6775
DPC:70-90 Genetics=P gene:MYLK2	3.1245	2.6370	16	1.18	0.2534

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneMYLK2	1	16	1.97	0.1793
DPC geneMYLK2	3	30	0.33	0.8010
Genetics*DPC geneMYLK2	7	34	0.79	0.6010

**Output SAS: análise de expressão gene PPP3CA**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	23.6857	1.8094	16.3	13.09	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	27.5122	1.8094	16.3	15.21	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	31.3295	1.8016	16	17.39	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	30.2133	1.7753	15.1	17.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	21.7151	1.7862	15.5	12.16	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	22.2193	1.7862	15.5	12.44	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	23.2010	1.8094	16.3	12.82	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	29.4557	1.8094	16.3	16.28	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	C	21	30.3924	1.6487	15.4	18.43	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	C	40	29.1940	1.6740	16.4	17.44	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	C	70	37.1687	1.6740	16.4	22.20	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	C	90	33.9067	1.6811	16.7	20.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	P	21	28.2330	1.6463	15.3	17.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	P	40	26.9317	1.6504	15.5	16.32	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	P	70	27.6891	1.6504	15.5	16.78	<.0001
GENE*Genetics*DPC	PPP3CA	P	90	34.6848	1.6722	16.3	20.74	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	15.2	180.80	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
		Error	DF		
Genetics:C-P genePPP3CA	-0.7566	0.9940	14.6	-0.76	0.4586
DPC:21-40 genePPP3CA	3.4152	1.3963	14.2	2.45	0.0280
DPC:21-70 genePPP3CA	1.4487	1.4014	14.5	1.03	0.3182
DPC:21-90 genePPP3CA	2.1511	1.4015	14.5	1.53	0.1464
DPC:40-70 genePPP3CA	-1.9665	1.4100	14.8	-1.39	0.1837
DPC:40-90 genePPP3CA	-1.2641	1.4101	14.8	-0.90	0.3843
DPC:70-90 genePPP3CA	0.7024	1.4151	15	0.50	0.6268
Genetics:C-P DPC=21 gene:PPP3CA	0.1887	1.9624	13.9	0.10	0.9248
Genetics:C-P DPC=40 gene:PPP3CA	-3.0306	1.9869	14.6	-1.53	0.1486
Genetics:C-P DPC=70 gene:PPP3CA	1.3511	2.0011	15	0.68	0.5098
Genetics:C-P DPC=90 gene:PPP3CA	-1.5357	2.0013	15	-0.77	0.4548
DPC:21-40 Genetics=C gene:PPP3CA	5.0248	2.0064	15.2	2.50	0.0241
DPC:21-70 Genetics=C gene:PPP3CA	0.8675	1.9997	15	0.43	0.6706
DPC:21-90 Genetics=C gene:PPP3CA	3.0133	1.9818	14.5	1.52	0.1499
DPC:40-70 Genetics=C gene:PPP3CA	-4.1573	2.0206	15.6	-2.06	0.0567
DPC:40-90 Genetics=C gene:PPP3CA	-2.0115	2.0029	15.1	-1.00	0.3311
DPC:70-90 Genetics=C gene:PPP3CA	2.1458	1.9962	14.9	1.07	0.2995
DPC:21-40 Genetics=P gene:PPP3CA	1.8055	1.9424	13.3	0.93	0.3692
DPC:21-70 Genetics=P gene:PPP3CA	2.0298	1.9638	13.9	1.03	0.3189
DPC:21-90 Genetics=P gene:PPP3CA	1.2888	1.9821	14.4	0.65	0.5258
DPC:40-70 Genetics=P gene:PPP3CA	0.2243	1.9671	14	0.11	0.9108
DPC:40-90 Genetics=P gene:PPP3CA	-0.5167	1.9853	14.5	-0.26	0.7983
DPC:70-90 Genetics=P gene:PPP3CA	-0.7410	2.0063	15.2	-0.37	0.7170

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics genePPP3CA	1	14.6	0.58	0.4586
DPC genePPP3CA	3	27.2	2.08	0.1261
Genetics*DPC genePPP3CA	7	30.8	1.35	0.2630

## Output SAS: análise de expressão gene RYR1

### Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard				
				Estimate	Error	DF	t Value	Pr >  t
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	23.6857	1.6604	24	14.26	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	27.5122	1.6604	24	16.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	31.3606	1.6521	23.6	18.98	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	30.2132	1.6237	22	18.61	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	21.7072	1.6355	22.6	13.27	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	22.2059	1.6355	22.6	13.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	23.2010	1.6604	24	13.97	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	29.4557	1.6604	24	17.74	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	C	21	26.5870	1.0136	16.6	26.23	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	C	40	25.0020	1.0136	16.6	24.67	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	C	70	23.6475	1.0136	16.6	23.33	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	C	90	23.0528	0.9912	15.1	23.26	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	P	21	28.4487	1.0136	16.6	28.07	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	P	40	23.3305	1.0136	16.6	23.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	P	70	21.2435	1.0136	16.6	20.96	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR1	P	90	23.2123	1.0136	16.6	22.90	<.0001

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	33.7	309.23	<.0001

### Estimates

Label	Estimate	Standard				Pr >  t
		Error	DF	t Value		
Genetics:C-P geneRyR1	-3.5369	1.0412	16.6	-3.40	0.0035	
DPC:21-40 geneRyR1	5.5142	1.4737	16.6	3.74	0.0017	
DPC:21-70 geneRyR1	9.6567	1.4783	16.8	6.53	<.0001	
DPC:21-90 geneRyR1	11.5233	1.4666	16.3	7.86	<.0001	
DPC:40-70 geneRyR1	4.1425	1.4783	16.8	2.80	0.0123	
DPC:40-90 geneRyR1	6.0091	1.4666	16.3	4.10	0.0008	
DPC:70-90 geneRyR1	1.8666	1.4712	16.5	1.27	0.2221	
Genetics:C-P DPC=21 gene:RyR1	-3.8402	2.0841	16.6	-1.84	0.0833	
Genetics:C-P DPC=40 gene:RyR1	-3.6348	2.0841	16.6	-1.74	0.0996	
Genetics:C-P DPC=70 gene:RyR1	-5.7556	2.0971	17.1	-2.74	0.0138	
Genetics:C-P DPC=90 gene:RyR1	-0.9171	2.0640	16	-0.44	0.6627	
DPC:21-40 Genetics=C gene:RyR1	5.4115	2.1037	17.3	2.57	0.0196	
DPC:21-70 Genetics=C gene:RyR1	10.6144	2.0971	17.1	5.06	<.0001	
DPC:21-90 Genetics=C gene:RyR1	10.0618	2.0640	16	4.87	0.0002	
DPC:40-70 Genetics=C gene:RyR1	5.2029	2.0971	17.1	2.48	0.0238	
DPC:40-90 Genetics=C gene:RyR1	4.6503	2.0640	16	2.25	0.0386	
DPC:70-90 Genetics=C gene:RyR1	-0.5526	2.0573	15.8	-0.27	0.7917	
DPC:21-40 Genetics=P gene:RyR1	5.6169	2.0643	16	2.72	0.0151	
DPC:21-70 Genetics=P gene:RyR1	8.6990	2.0841	16.6	4.17	0.0007	
DPC:21-90 Genetics=P gene:RyR1	12.9848	2.0841	16.6	6.23	<.0001	
DPC:40-70 Genetics=P gene:RyR1	3.0821	2.0841	16.6	1.48	0.1579	
DPC:40-90 Genetics=P gene:RyR1	7.3680	2.0841	16.6	3.54	0.0026	
DPC:70-90 Genetics=P gene:RyR1	4.2858	2.1037	17.3	2.04	0.0573	

### Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneRyR1	1	16.6	11.54	0.0035
DPC geneRyR1	3	31.2	24.14	<.0001
Genetics*DPC geneRyR1	7	35.3	12.49	<.0001

**Output SAS: análise de expressão gene RYR2**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.6898	1.7175	19.1	13.21	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	21.9040	1.7175	19.1	12.75	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	20.3460	1.7175	19.1	11.85	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.5830	1.7175	19.1	11.98	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	29.3553	1.7175	19.1	17.09	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.9850	1.7175	19.1	14.55	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.3660	1.7175	19.1	11.86	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24.6182	1.7175	19.1	14.33	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	C	21	29.8328	0.6194	16	48.16	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	C	40	30.3458	0.6194	16	48.99	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	C	70	32.0867	0.6194	16	51.80	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	C	90	31.8015	0.6194	16	51.34	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	P	21	32.2043	0.6194	16	51.99	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	P	40	32.1438	0.6194	16	51.89	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	P	70	31.3137	0.6194	16	50.55	<.0001
GENE*Genetics*DPC	RyR2	P	90	32.6345	0.6194	16	52.69	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	21.2	1300.71	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error	DF			
Genetics:C-P geneRyR2	2.3930	1.1628	16	2.06	0.0562	
DPC:21-40 geneRyR2	-2.8043	1.6445	16	-1.71	0.1074	
DPC:21-70 geneRyR2	-6.3482	1.6445	16	-3.86	0.0014	
DPC:21-90 geneRyR2	-4.6214	1.6445	16	-2.81	0.0126	
DPC:40-70 geneRyR2	-3.5438	1.6445	16	-2.15	0.0467	
DPC:40-90 geneRyR2	-1.8171	1.6445	16	-1.10	0.2855	
DPC:70-90 geneRyR2	1.7268	1.6445	16	1.05	0.3093	
Genetics:C-P DPC=21 gene:RyR2	4.2940	2.3257	16	1.85	0.0834	
Genetics:C-P DPC=40 gene:RyR2	1.2830	2.3257	16	0.55	0.5888	
Genetics:C-P DPC=70 gene:RyR2	0.7930	2.3257	16	0.34	0.7375	
Genetics:C-P DPC=90 gene:RyR2	3.2022	2.3257	16	1.38	0.1875	
DPC:21-40 Genetics=C gene:RyR2	-1.2988	2.3257	16	-0.56	0.5842	
DPC:21-70 Genetics=C gene:RyR2	-4.5977	2.3257	16	-1.98	0.0655	
DPC:21-90 Genetics=C gene:RyR2	-4.0755	2.3257	16	-1.75	0.0988	
DPC:40-70 Genetics=C gene:RyR2	-3.2988	2.3257	16	-1.42	0.1752	
DPC:40-90 Genetics=C gene:RyR2	-2.7767	2.3257	16	-1.19	0.2499	
DPC:70-90 Genetics=C gene:RyR2	0.5222	2.3257	16	0.22	0.8252	
DPC:21-40 Genetics=P gene:RyR2	-4.3098	2.3257	16	-1.85	0.0824	
DPC:21-70 Genetics=P gene:RyR2	-8.0987	2.3257	16	-3.48	0.0031	
DPC:21-90 Genetics=P gene:RyR2	-5.1673	2.3257	16	-2.22	0.0410	
DPC:40-70 Genetics=P gene:RyR2	-3.7888	2.3257	16	-1.63	0.1228	
DPC:40-90 Genetics=P gene:RyR2	-0.8575	2.3257	16	-0.37	0.7172	
DPC:70-90 Genetics=P gene:RyR2	2.9313	2.3257	16	1.26	0.2256	

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneRyR2	1	16	4.24	0.0562
DPC geneRyR2	3	30	5.45	0.0041
Genetics*DPC geneRyR2	7	34.1	3.15	0.0112

**Output SAS: análise de expressão gene TNNC2**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	22.2132	2.1044	22.1	10.56	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	22.5918	2.1044	22.1	10.74	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	19.5757	2.1044	22.1	9.30	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	20.0525	2.1044	22.1	9.53	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	28.1082	2.1044	22.1	13.36	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	24.5112	2.1044	22.1	11.65	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	20.5450	2.1044	22.1	9.76	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	25.5092	2.1044	22.1	12.12	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	C	21	22.9085	0.8754	16	26.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	C	40	16.8307	0.8754	16	19.23	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	C	70	16.2552	0.8754	16	18.57	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	C	90	15.9257	0.8754	16	18.19	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	P	21	27.1187	0.8754	16	30.98	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	P	40	17.2252	0.8754	16	19.68	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	P	70	17.0712	0.8754	16	19.50	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TNNC2	P	90	18.0317	0.8754	16	20.60	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	24.7	246.17	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error	DF			
Genetics:C-P geneTNNC2	1.6784	1.3595	16	1.23	0.2348	
DPC:21-40 geneTNNC2	6.3765	1.9226	16	3.32	0.0044	
DPC:21-70 geneTNNC2	3.2501	1.9226	16	1.69	0.1103	
DPC:21-90 geneTNNC2	5.6551	1.9226	16	2.94	0.0096	
DPC:40-70 geneTNNC2	-3.1264	1.9226	16	-1.63	0.1235	
DPC:40-90 geneTNNC2	-0.7214	1.9226	16	-0.38	0.7124	
DPC:70-90 geneTNNC2	2.4050	1.9226	16	1.25	0.2290	
Genetics:C-P DPC=21 gene:TNNC2	1.6848	2.7190	16	0.62	0.5442	
Genetics:C-P DPC=40 gene:TNNC2	1.5248	2.7190	16	0.56	0.5827	
Genetics:C-P DPC=70 gene:TNNC2	0.1533	2.7190	16	0.06	0.9557	
Genetics:C-P DPC=90 gene:TNNC2	3.3507	2.7190	16	1.23	0.2356	
DPC:21-40 Genetics=C gene:TNNC2	6.4565	2.7190	16	2.37	0.0304	
DPC:21-70 Genetics=C gene:TNNC2	4.0158	2.7190	16	1.48	0.1591	
DPC:21-90 Genetics=C gene:TNNC2	4.8222	2.7190	16	1.77	0.0952	
DPC:40-70 Genetics=C gene:TNNC2	-2.4407	2.7190	16	-0.90	0.3827	
DPC:40-90 Genetics=C gene:TNNC2	-1.6343	2.7190	16	-0.60	0.5562	
DPC:70-90 Genetics=C gene:TNNC2	0.8063	2.7190	16	0.30	0.7706	
DPC:21-40 Genetics=P gene:TNNC2	6.2965	2.7190	16	2.32	0.0342	
DPC:21-70 Genetics=P gene:TNNC2	2.4843	2.7190	16	0.91	0.3744	
DPC:21-90 Genetics=P gene:TNNC2	6.4880	2.7190	16	2.39	0.0297	
DPC:40-70 Genetics=P gene:TNNC2	-3.8122	2.7190	16	-1.40	0.1800	
DPC:40-90 Genetics=P gene:TNNC2	0.1915	2.7190	16	0.07	0.9447	
DPC:70-90 Genetics=P gene:TNNC2	4.0037	2.7190	16	1.47	0.1603	

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneTNNC2	1	16	1.52	0.2348
DPC geneTNNC2	3	30	4.48	0.0103
Genetics*DPC geneTNNC2	7	34	2.24	0.0554

**Output SAS: análise de expressão gene TNNT1**

Solution for Fixed Effects

Effect	GENE	Genetics	DPC	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
					Error	DF		
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	21,8092	1,7214	31,4	12,67	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	20,9692	1,7214	31,4	12,18	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	18,8363	1,7214	31,4	10,94	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	19,2755	1,7214	31,4	11,20	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	27,7915	1,7214	31,4	16,14	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	23,7152	1,7214	31,4	13,78	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	19,4532	1,7214	31,4	11,30	<,0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	24,7128	1,7214	31,4	14,36	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	C	21	21,8968	1,1646	16	18,80	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	C	40	18,3150	1,1646	16	15,73	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	C	70	19,1373	1,1646	16	16,43	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	C	90	19,2412	1,1646	16	16,52	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	P	21	26,2955	1,1646	16	22,58	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	P	40	19,7448	1,1646	16	16,95	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	P	70	20,0318	1,1646	16	17,20	<,0001
GENE*Genetics*DPC	TNNT1	P	90	21,1483	1,1646	16	18,16	<,0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	29	162,13	<,0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		DF	t Value	Pr >  t
		Error	DF			
Genetics:C-P geneTNNT1	1,5381	0,9068	16	1,70	0,1092	
DPC:21-40 geneTNNT1	2,6081	1,2824	16	2,03	0,0589	
DPC:21-70 geneTNNT1	-1,1440	1,2824	16	-0,89	0,3856	
DPC:21-90 geneTNNT1	1,0952	1,2824	16	0,85	0,4057	
DPC:40-70 geneTNNT1	-3,7521	1,2824	16	-2,93	0,0099	
DPC:40-90 geneTNNT1	-1,5128	1,2824	16	-1,18	0,2554	
DPC:70-90 geneTNNT1	2,2392	1,2824	16	1,75	0,0999	
Genetics:C-P DPC=21 gene:TNNT1	1,5837	1,8135	16	0,87	0,3954	
Genetics:C-P DPC=40 gene:TNNT1	1,3162	1,8135	16	0,73	0,4785	
Genetics:C-P DPC=70 gene:TNNT1	-0,2777	1,8135	16	-0,15	0,8802	
Genetics:C-P DPC=90 gene:TNNT1	3,5302	1,8135	16	1,95	0,0694	
DPC:21-40 Genetics=C gene:TNNT1	2,7418	1,8135	16	1,51	0,1501	
DPC:21-70 Genetics=C gene:TNNT1	-0,2133	1,8135	16	-0,12	0,9078	
DPC:21-90 Genetics=C gene:TNNT1	0,1220	1,8135	16	0,07	0,9472	
DPC:40-70 Genetics=C gene:TNNT1	-2,9552	1,8135	16	-1,63	0,1227	
DPC:40-90 Genetics=C gene:TNNT1	-2,6198	1,8135	16	-1,44	0,1679	
DPC:70-90 Genetics=C gene:TNNT1	0,3353	1,8135	16	0,18	0,8556	
DPC:21-40 Genetics=P gene:TNNT1	2,4743	1,8135	16	1,36	0,1913	
DPC:21-70 Genetics=P gene:TNNT1	-2,0747	1,8135	16	-1,14	0,2695	
DPC:21-90 Genetics=P gene:TNNT1	2,0685	1,8135	16	1,14	0,2708	
DPC:40-70 Genetics=P gene:TNNT1	-4,5490	1,8135	16	-2,51	0,0233	
DPC:40-90 Genetics=P gene:TNNT1	-0,4058	1,8135	16	-0,22	0,8258	
DPC:70-90 Genetics=P gene:TNNT1	4,1432	1,8135	16	2,28	0,0363	

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneTNNT1	1	16	2,88	0,1092
DPC geneTNNT1	3	30	3,11	0,0410
Genetics*DPC geneTNNT1	7	34	2,06	0,0753

**Output SAS: análise de expressão gene TPM1**

Effect	GENE	Genetics	DPC	Standard		DF	t Value	Pr >  t
				Estimate	Error			
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	21	23.6857	1.6759	18.1	14.13	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	40	27.5122	1.6759	18.1	16.42	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	70	31.4591	1.6647	17.6	18.90	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	C	90	30.2133	1.6314	16.3	18.52	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	21	21.6850	1.6435	16.8	13.19	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	40	22.2117	1.6435	16.8	13.51	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	70	23.2010	1.6759	18.1	13.84	<.0001
GENE*Genetics*DPC	GAPDH	P	90	29.4557	1.6759	18.1	17.58	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	C	21	21.2692	1.6339	15.3	13.02	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	C	40	24.4926	1.6403	15.6	14.93	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	C	70	25.1908	1.6548	16.1	15.22	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	C	90	23.3025	1.6538	16.1	14.09	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	P	21	21.5873	1.6727	16.7	12.91	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	P	40	20.3223	1.6727	16.7	12.15	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	P	70	18.4897	1.6549	16.1	11.17	<.0001
GENE*Genetics*DPC	TPM1	P	90	22.2566	1.6282	15.1	13.67	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
GENE*Genetics*DPC	16	14.6	135.61	<.0001

Estimates

Label	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t
		Error	DF		
Genetics:C-P geneTPM1	-1.1794	0.4894	14.5	-2.41	0.0298
DPC:21-40 geneTPM1	1.1974	0.6971	14.9	1.72	0.1066
DPC:21-70 geneTPM1	4.2327	0.7088	15.9	5.97	<.0001
DPC:21-90 geneTPM1	5.7978	0.6711	12.8	8.64	<.0001
DPC:40-70 geneTPM1	3.0353	0.7125	16.3	4.26	0.0006
DPC:40-90 geneTPM1	4.6004	0.6750	13.1	6.82	<.0001
DPC:70-90 geneTPM1	1.5651	0.6871	14.1	2.28	0.0388
Genetics:C-P DPC=21 gene:TPM1	-2.3188	0.9805	14.5	-2.36	0.0324
Genetics:C-P DPC=40 gene:TPM1	-1.1302	0.9912	15.3	-1.14	0.2718
Genetics:C-P DPC=70 gene:TPM1	-1.5570	1.0238	17.3	-1.52	0.1463
Genetics:C-P DPC=90 gene:TPM1	0.2884	0.9166	11.2	0.31	0.7588
DPC:21-40 Genetics=C gene:TPM1	0.6031	0.9805	14.6	0.62	0.5480
DPC:21-70 Genetics=C gene:TPM1	3.8518	0.9894	15.1	3.89	0.0014
DPC:21-90 Genetics=C gene:TPM1	4.4942	0.9267	11.4	4.85	0.0005
DPC:40-70 Genetics=C gene:TPM1	3.2488	1.0000	15.9	3.25	0.0051
DPC:40-90 Genetics=C gene:TPM1	3.8911	0.9380	12.1	4.15	0.0013
DPC:70-90 Genetics=C gene:TPM1	0.6424	0.9473	12.6	0.68	0.5100
DPC:21-40 Genetics=P gene:TPM1	1.7917	0.9913	15.2	1.81	0.0905
DPC:21-70 Genetics=P gene:TPM1	4.6136	1.0152	16.7	4.54	0.0003
DPC:21-90 Genetics=P gene:TPM1	7.1014	0.9710	14.3	7.31	<.0001
DPC:40-70 Genetics=P gene:TPM1	2.8219	1.0152	16.7	2.78	0.0130
DPC:40-90 Genetics=P gene:TPM1	5.3097	0.9710	14.3	5.47	<.0001
DPC:70-90 Genetics=P gene:TPM1	2.4878	0.9954	15.7	2.50	0.0239

Contrasts

Label	Num Den		F Value	Pr > F
	DF	DF		
Genetics geneTPM1	1	14.5	5.81	0.0298
DPC geneTPM1	3	26.5	31.18	<.0001
Genetics*DPC geneTPM1	7	29.9	14.63	<.0001