

A SUPLEMENTAÇÃO MATERNA DE ÁCIDO GUANIDINOACÉTICO DURANTE O TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO EM MARRÁS AFETA A MIOGÊNESE FETAL

GUSTAVO DE AMORIM RODRIGUES¹, ELISA O. FRANK¹, BIANCA Q. LOPES¹, VINÍCIUS M. HORA¹, BRUNA KAROLAYNE I. A. BEM¹, JÚLIO V. T. SOBREIRO¹, LORENA O. SOUZA¹, MARIA CLARA M. ESTEVES¹, DANTE T. VALENTE JÚNIOR¹, CAROLINE B. SILVA¹, CLODOALDO F. T. TARDOCCI¹, ALYSSON SARAIVA¹.

¹Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa

Contato: gustavo.a.rodrigues@ufv.br / Apresentador: GUSTAVO DE AMORIM RODRIGUES

Resumo: Este estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito da suplementação do ácido guanidinoacético (GAA) em nulíparas, no terço final da gestação, como possível modulador molecular no desenvolvimento muscular da progênie. Foram utilizadas 20 porcas nulíparas, híbridas comerciais, suplementadas dos 75 dias aos 114 dias de gestação, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições e 2 dietas: dieta controle (CON) ou CON + 0,1% de GAA. A porca foi considerada a unidade experimental. Após o parto, três leitões de cada leitegada (leve, médio e pesado) foram abatidos e amostras do músculo *longissimus dorsi* foram coletadas para análise de expressão gênica. Os leitões provenientes das fêmeas alimentadas com a dieta GAA apresentaram maior expressão de mRNA de IGF1R e MYOG. Foram observadas interações (dieta x peso ao nascimento) nos níveis de mRNA dos genes IGF-1, MYOD e Myf5. Em conclusão, a suplementação com 0,1% de GAA para porcas nulíparas, dos 75 aos 114 dias de gestação, influencia os mecanismos moleculares relacionados à miogênese fetal, aumentando a expressão de mRNA dos fatores reguladores miogênicos Myf5, MYOD e MYOG e do IGF-1 e IGF1R no *longissimus dorsi* dos leitões. Sendo esses efeitos observados, principalmente, em leitões leves e pesados.

Palavras-Chaves: Expressão gênica; crescimento pré-natal; desenvolvimento muscular; nutrigenômica

MATERNAL GUANIDINOACETIC ACID SUPPLEMENTATION DURING THE LAST THIRD OF GESTATION IN GILTS AFFECTS FOETAL MYOGENESIS

Abstract: This study aimed to investigate the effect of guanidinoacetic acid (GAA) supplementation in nulliparous sows in the last third of pregnancy as a possible mechanism of molecular action on the muscular development of the progeny. Twenty commercial hybrid nulliparous sows were used, from 75 days to 114 days of gestation. The sows were distributed in a completely randomized design, with ten replications and two dietary treatments (control or control diet + 0.1% GAA). Each sow was considered an experimental unit. After farrowing, three piglets from each litter (light, medium and heavy) were slaughtered and *longissimus dorsi* muscle samples were collected for gene expression analysis. Piglets from sows fed GAA diet showed higher expression of IGF1R and MYOG mRNA. Interactions (diet x birth weight) were observed in the mRNA levels of the IGF-1, MYOD and Myf5 genes. In conclusion, supplementation with 0.1% GAA for nulliparous sows, from 75 to 114 days of gestation, influenced the molecular mechanisms related to fetal myogenesis, increasing the mRNA expression of myogenic regulatory factors Myf5, MYOD and MYOG and IGF -1 and IGF1R in the *longissimus dorsi* of piglets. These effects were mainly observed in light and heavy piglets.

Keywords: Gene expression; pre-natal growth; muscle development; nutrigenomics

Introdução: O ácido guanidinoacético (GAA) é um derivado endógeno dos aminoácidos glicina e arginina e atua como precursor direto da creatina (6). Quando utilizado como suplemento nutricional, o GAA aumenta a disponibilidade de creatina, componente chave no metabolismo energético da célula muscular, além de atuar como composto poupador de arginina, a qual favorece o crescimento e o desenvolvimento embrionário e fetal (3). Sendo assim, o GAA torna-se uma importante estratégia na nutrição de fêmeas no terço final da gestação, especialmente para porcas nulíparas. Pois, pode maximizar a eficiência uteroplacentária e modular positivamente a expressão de genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento muscular da progênie, influenciando o peso ao nascimento e a uniformidade dos leitões (6). Portanto, este estudo foi realizado para investigar o efeito da suplementação do GAA em nulíparas, no terço final da gestação, como possível modulador molecular no desenvolvimento muscular da progênie.

Material e Métodos: Foram utilizadas vinte nulíparas, híbridas comerciais (185,43 ± 6,94 kg), dos 75 dias de gestação até o parto. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições e 2 dietas: controle (CON), formulada para atender as exigências nutricionais de porcas em gestação (5) ou CON suplementada com 0,1% de GAA, fornecidas de forma restrita (2,5 kg/dia), duas vezes ao dia. Ao final do parto, três leitões de cada porca foram insensibilizados e abatidos para coleta do músculo *longissimus dorsi*, sendo eles: o leitão com menor peso ao nascimento (PN) (PN <800g foram excluídos), o leitão com PN mais próximo da média da respectiva leitegada (médio) e o leitão com o maior PN (2). Posteriormente, foi realizada a extração do RNA total a partir de 50mg do músculo pelo método fenol-clorofórmio. A concentração do RNA foi estimada usando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-2000C e a sua integridade foi avaliada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. O DNA complementar foi sintetizado por meio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription e as reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System. Os genes alvos analisados foram: IGF-1, IGF1R, IGF2, IGF2R, MYOG, MYOD, MRF4, MYF5 e MSTN. Como normalizador, foi utilizado o gene GAPDH. O cálculo dos níveis de expressão relativa foi realizado de acordo com o método 2^{-ΔΔCt} (1). Os dados foram analisados utilizando o software R e o valor de P < 0,05 foi considerado para indicar significância estatística.

Resultado e Discussão: O desenvolvimento muscular pré-natal é regulado por uma gama de fatores, tais como os fatores reguladores da miogênese, os MRFs (Myf5, MRF4, MYOD e MYOG), os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2) e a miostatina (4). Contudo, esses fatores apresentam sensibilidade a diferentes variáveis, como: ordem de parto, genótipo, eficiência placentária, entre outros os quais podem afetar o desenvolvimento muscular fetal (4). A suplementação de fêmeas nulíparas com GAA aumentou a expressão ($P < 0.001$) de mRNA do IGF1R no músculo esquelético dos leitões recém-nascidos. Além disso, o GAA teve influência sobre a expressão de mRNA do IGF-1 e do Myf5 nos leitões leves e pesados (Dieta x PN; $P = 0.001$ e $0,019$) em relação ao CON. A ativação do IGF-1, bem como do seu receptor, está envolvida na diferenciação e hipertrofia das células musculares principalmente pela via PI3K/Akt/mTOR (7). Houve interação entre dieta e PN ($P = 0,024$) na expressão de mRNA do MYOD, onde houve um maior nível da expressão desse gene nos leitões pesados. Os leitões das porcas suplementadas com GAA apresentaram maiores níveis ($P = 0,008$) de expressão do MYOG em relação ao grupo CON, sendo este efeito mais acentuado em leitões leves ($P = 0,018$). Estes resultados são interessantes, pois a via do IGF pode regular a expressão de genes da família MRF, em particular o MYOD e o MYOG, genes relacionados à fusão e diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras, coerente com o observado nesse estudo (7).

Tabela 1: Efeito da suplementação de GAA em marrãs na expressão relativa de genes no músculo *longissimus dorsi* de leitões leves, médios e pesados ¹.

Gene	CON	GAA			EPM	P-valor ²		
		Leve	Médio	Pesado		Dieta	PN	Dieta x PN
<i>IGF1</i>	1,00 ^{Bb}	1,83 ^{Aa}	1,05 ^{Bb}	1,53 ^{Aa}	0,073	<0,001	0,012	0,001
<i>IGF1R</i>	1,00 ^B	1,24 ^A	1,16 ^A	1,28 ^A	0,072	<0,001	0,790	0,789
<i>IGF2</i>	1,00	1,03	0,88	1,05	0,048	0,820	0,297	0,297
<i>IGF2R</i>	1,00	1,12	0,99	1,12	0,049	0,104	0,485	0,485
<i>MYOG</i>	1,00 ^{Bb}	1,31 ^{Aa}	1,05 ^{Ab}	1,07 ^{Ab}	0,065	0,008	0,018	0,128
<i>MYOD</i>	1,00 ^{Bb}	1,13 ^{Ab}	1,82 ^{Ab}	2,56 ^{Aa}	0,129	<0,001	0,003	0,024
<i>MRF4</i>	1,00	0,94	0,94	1,12	0,053	0,150	0,112	0,355
<i>MYF5</i>	1,00 ^{Bb}	1,24 ^{Aa}	0,95 ^{Bb}	1,25 ^{Aa}	0,056	<0,001	0,025	0,019
<i>MSTN</i>	1,00	1,10	1,08	1,23	0,070	0,062	0,402	0,670

¹Os dados de expressão relativa foram obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), dentro de seu respectivo grupo (Leve, Médio e Pesado), onde $\Delta\Delta Ct = (C_{\text{alvo}} - C_{\text{GAPDH}}) \text{ grupo GAA} - (C_{\text{alvo}} - C_{\text{GAPDH}}) \text{ grupo CON (controle)}$.

²Valores de probabilidade para os efeitos Dieta, PN (peso ao nascimento) e interações Dieta x PN.

^{A, B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem ($p < 0,05$) entre si pelo teste F.

^{a, b} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Conclusão: A suplementação com 0,1% de GAA para porcas nulíparas, dos 75 aos 114 dias de gestação, influencia os mecanismos moleculares relacionados à miogênese fetal, aumentando a expressão do mRNA dos fatores reguladores miogênicos Myf5, MYOD e MYOG e do IGF-1 e do seu receptor (IGF1R) no *longissimus dorsi* dos leitões. Sendo esses efeitos observados, principalmente, em leitões leves e pesados.

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Ciência Animal (INCTCA) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas: (1) Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, v. 25, p.402-408. 2001. (2) Madsen, J. G.; Pardo, C.; Kreuzer, M.; Beel, G. Impact of dietary L-arginine supply during early gestation on myofiber development in newborn pigs exposed to intra-uterine crowding. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.8:58, p.01-12, 2017. (3) Mendonça, I. B.; Watanabe, P. H.; Silva, B. A. N. Dietary supplementation of guanidinoacetic acid for sows and their progenies: Performance, blood parameters and economic viability at nursery phase. *Livestock Science*. 227, 2019. (4) Rodrigues, G. A.; Valente Júnior, D. T.; Soares, M. H. et al. L-arginine supplementation for nulliparous sows during the last third of gestation. 11, 3476, 2021. (5) Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Hannas, M.I.; et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 488, 2017. (6) Yan, Z.; Yan, Z.; Liu, S. et al. Regulative Mechanism of Guanidinoacetic Acid on Skeletal Muscle Development and Its Application Prospects in Animal Husbandry: A Review. *Frontiers in Nutrition*. 8, 714567, 2021. (7) Zanou, N.; Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.70, p.4117-4130, 2013.