**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de
frango (*Gallus gallus*)**

Erik Amazonas de Almeida

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2007**

Erik Amazonas de Almeida
Médico Veterinário

Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)

Orientador:
Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Almeida, Erik Amazonas de

Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango
(*Gallus gallus*) / Erik Amazonas de Almeida. - - Piracicaba, 2007.
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Abate 2. Carnes e derivados – qualidade 3. Expressão gênica 4. Frangos de corte
I. Título

CDD 636.513

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Aos maiores mestres que a vida me deu.
Exemplos de luta e de conquista.
Exemplos de dedicação,
de amor, de superação.
Aos meus primeiros tutores
e exemplos de vida sempre.
Ao Gildo e à Ângela,
Pai e Mãe,
que sempre tornaram cada passo mais fácil
e cada caminho mais bonito e prazeroso,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela oportunidade a mim dispensados;

À FAPESP pela concessão da bolsa e pelo financiamento;

Aos tantos professores que tive na USP/ESALQ, dentre os quais destaco a Prof. Dra. Carmen Castillo, o Prof. José Fernando M. Menten, Prof. Eduardo Delgado, Prof. Antônio Figueira, Prof. Albino Luchiani Filho, Prof. Severino Alencar e, novamente, ao Prof. Luiz Coutinho, que juntos proporcionaram excelentes momentos de aprendizado e também de diversão;

À Aline e aos colegas do projeto temático de qualidade da carne de frango e aos nossos agregados pelas tantas horas de “estresse”, companheirismo, amizade e trabalho;

Ao Prof. Cláudio Mello pela grandiosa colaboração neste trabalho;

À Profa. Dra. Sônia Zingara e ao Rafael Heck, responsáveis pela construção das membranas de macroarranjo pelo Brazilian Clone Collection Center, em Jaboticabal, SP;

Ao amigo Millor, pelos muitos apoios laboratoriais e estatísticos e também pela amizade e pela parceria fora do laboratório;

À Nirlei, técnica do laboratório de Biotecnologia Animal e braço direito no meu trabalho;

Ao Forjão, também técnico do laboratório e um grande amigo e parceiro para as peripécias do mundo digital;

À Giovana, que sempre fez tudo para a gente não fazer nada, facilitando a vida de todo pós-graduando;

Aos amigos e colegas – mais amigos do que colegas, graças a Deus – do laboratório de Biotecnologia Animal: Millor, Helena, Marcel, Raquel, Lílian, Kerli, Priscilla, Érika, Ana Paula, Clarissa S., Clarissa B., Mateus, Karina, por fazerem o laboratório parecer uma casa;

À baita amiga Camila, que me mostrou o caminho para a psicologia, e por me aturar;

Às “Gurias da Vila Estudantil”, que se juntaram quase todas na “Casa das Oito Mulheres”: Nai, Tati, Flipper, Kerli, Priscilla, Esmerê, Roberta, Pisqui Filha, Brida e ocasionalmente Carla e aos amigos churrasqueiros Cleverson, Xôiu, Álvaro, Leandro, Luiz, Sinho, Élio, por nunca haver tempo ruim para um churrasquinho, mesmo que sob condições climáticas desfavoráveis, como o memorável “Churrasco da Enxurrada”;

Aos amigos Sinho e Élio, pessoas que jamais sairão do topo da minha lista de grandes amigos, por toda a história vivida e também pelas incontáveis e inacreditáveis histórias. Sim, a Faixa de Gaza fica mais perto do que se pensa...;

Aos amigos gaúchos que nunca vieram para Pira, mas estavam sempre presentes, mesmo quando ausentes;

À Loiva, Karine, Marcos e Matheus, por tudo o que passamos, pela forma como lidamos, superamos e crescemos. Pelos anos de convívio;

*Aos indígenas da tribo Guarani pela herança do uso da erva *Ilex paraguariensis*, fundamental nas horas de concentração;*

Ao Roger Waters, David Gilmour, Richard Wright, Nick Manson, Syd Barrett, Heitor Villa Lobos, Ludwig van Beethoven, Bruce Dickinson, Steve Howe, Yamandú Costa, entre tantos outros que me fizeram companhia nas longas noites solitárias de estudo e escrita;

Ao grande amor da minha vida, Gabriela Amazonas, a Gabi, que eu amo há tanto tempo e que hoje me faz completo, realizado e feliz. Por invadir meu mundo e inundar a minha vida com amor e felicidade;

À minha Mãe e ao meu Pai, Ângela e Gildo, por tudo. Tudo, mas tudo mesmo! Por pavimentar meu caminho sempre, sem medir esforços;

Agradeço!!!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Manejo pré-abate e qualidade da carne	12
2.2 Genética na produção animal	13
2.3 Genética e qualidade da carne	16
2.4 Identificando genes de interesse	19
2.5 Estudando a expressão gênica	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Parâmetros hematológicos.....	22
3.2 Avaliação de Qualidade de Carnes.....	23
3.2.1 Medição de cor	23
3.2.2 Capacidade de Retenção de água.....	23
3.2.3 Determinação de pH	24
3.3 Análise da expressão gênica.....	24
3.3.1 Confecção das membranas de macroarranjo de DNA.....	24
3.3.2 Normalização do macroarranjo usando sonda plasmidial (Overgo)	26
3.3.3 Visualização do resultado da normalização.....	27
3.3.4 Coleta de tecidos e extração de RNA total.....	28
3.3.5 Síntese da sonda de cDNA para análise em membranas de macroarranjo	28
3.3.6 Purificação das sondas marcadas.....	29
3.3.7 Hibridização das membranas de Macroarranjo com as sondas de cDNA.....	29
3.3.8 Escolha dos genes para PCR quantitativo em tempo real e síntese dos iniciadores.....	30
3.3.9 Otimização de PCR	31
3.3.10 Validação dos genes por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	33
3.3.11 Análise estatística da expressão gênica.	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Parâmetros hematológicos.....	36
4.2 Avaliação da Qualidade de Carne	37

4.2.1 Cor	37
4.2.2 pH	38
4.2.3 CRA	39
4.3 Expressão Gênica	40
4.3.1 Normalização das membranas com sonda plasmidial	40
4.3.2 Identificação de genes diferencialmente expressos de acordo com a condição pré-abate	41
4.3.3 Otimização das condições de PCR para amplificação dos genes	52
4.3.4 Validação de genes diferencialmente expressos por qRT-PCR	53
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

RESUMO

Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)

A produção de carne de frango no Brasil é um importante setor do agronegócio. O setor passou por décadas de aprimoramentos, culminando desde 2004, no mais alto posto de exportação de carne de frango e ocupando a terceira maior produção mundial. A expansão, conquista e manutenção de novos mercados está inevitavelmente relacionada com a qualidade da matéria-prima. Entre os fatores que influenciam a qualidade do produto final, encontra-se o estresse no manejo pré abate. O presente estudo objetivou estabelecer relações entre a qualidade da carne de frangos e a expressão gênica sob condições de estresse térmico. Para tal, frangos de corte de linhagens comerciais foram submetidos a estresse térmico e abatidos. A carne oriunda dessas aves teve suas propriedades funcionais mensuradas. Os genes expressos de forma diferenciada para a qualidade da carne foram identificados pelo método de arranjos de alta densidade (macroarranjos) e validados com o emprego de PCR quantitativo em tempo real. Para os parâmetros de qualidade de carne avaliados (pH, cor e capacidade de retenção de água), os animais estressados apresentaram peito mais escuro a 1 hora pós abate (valor de L* de 52,46 contra 55,00; $p<0,05$), menor valor de pH as 24h pós abate (5,82 contra 5,99; $p<0,05$) e maior capacidade de retenção de água a 1h pós abate (0,29 contra 0,22; $p<0,05$). O estudo de expressão gênica por macroarranjos de DNA evidenciou um total de 259 genes diferencialmente expressos entre os tratamentos. 149 desses genes apresentaram indução de expressão ($p<0,05$) nos animais submetidos ao estresse térmico. Alguns desses genes fazem parte da rede de proteínas responsáveis pelo metabolismo energético celular. Lactato desidrogenase A (LDHA), glicose fosfomutase e piruvato quinase são enzimas que atuam na degradação da glicose e demonstraram aumento da expressão sob condição de estresse térmico ($p<0,05$). Tal fato sugere que durante o estresse térmico, houve uma maior mobilização do glicogênio muscular, fornecendo maior aporte de glicose na célula muscular, acarretando em aumento da taxa glicolítica nesses animais. Outros genes tidos como induzidos pela condição de estresse térmico foram os genes de choque térmico HSP70 e 90 ($p<0,05$), evidenciando a atividade protetora de suas proteínas na atividade celular frente a condições de elevação da temperatura. Miostatina, Actina 3 e IGF II, proteínas envolvidas no desenvolvimento da musculatura esquelética se apresentaram igualmente elevadas pelas condições de estresse ($p<0,05$). 9 genes foram selecionados para validação por PCR quantitativo em tempo real. *Miostatina*, *Lactato desidrogenase A*, *HSP 70* e *HSP 90* foram selecionados com base nos resultados obtidos com as hibridizações. Além destes, outros 5 genes foram escolhidos com base na evidência biológica e do papel na resposta fisiológica ao estresse térmico e atividade glicolítica: *Glicogênio fosforilase*, *citrato sintase* e *lactato desidrogenase B*. *Miostatina*, *HSP 70* e *90* e *citrato sintase* apresentaram maiores níveis de expressão nos animais estressados ($p<0,05$). Já *Glicogênio fosforilase* teve sua expressão inibida com o estresse térmico ($p<0,05$). Esses achados sugerem importante papel do metabolismo energético durante condições de estresse térmico, além da possível influência que a temperatura exerce no desenvolvimento da musculatura esquelética.

Palavras-chave: Expressão gênica; Estresse térmico; *Gallus gallus*; Qualidade de carne

ABSTRACT

Influence of stress on gene expression and broiler meat quality

Brazilian broiler production yields a considerable amount of income for the nation. Brazil is currently the world's third broiler producer and the first chicken meat exporter, contributing with 41% of the whole world market. To reach new market frontiers it is inevitable the improvement of meat quality. Among the reasons that influences final products quality is the pre-slaughter stress. This study scoped establishing the relationships between meat quality and gene expression under thermal stressful conditions. Commercial broiler lines were submitted to high thermal stress prior to slaughter. Breast meat from these animals had their proprieties evaluated. Differentially expressed genes for stressed or non-stressed birds were investigated by macroarrays and further validated by qRT-PCR. Concerning to the meat attributes, breast meat from stressed birds was darker (L^* values of 52,46 against 55,00; $p < 0,05$), with lower pH at 24h postmortem (5,82 against 5,99; $p < 0,05$) and had greater water holding capacity 1h after slaughter (0,29 vs. 0,22; $p < 0,05$). Macroarray analysis revealed 259 differentially expressed genes between stressed and non-stressed control birds. From these, 149 were induced by heat stress ($p < 0,05$). Some of these induced genes play a role in carbohydrate metabolism such as lactate dehydrogenase A (LDHA), glucose phosphomutase and piruvate kinase. Such enzymes acts on degradation of glucose in order to provide energy to the muscle cells which has direct effect upon meat quality processing. These findings suggest great mobilization of muscle glycogen stores, offering opportunity of a not efficient muscle-to-meat conversion. Genes that responds to heat stress damage also were induced with heat exposure. That provides a sort of heat tolerance and ensures the birds' survival under heat conditions. Some muscle-related genes were also induced by heat stress. Myostatin, actin 3 and IGFII showed greater amounts of mRNA under this condition ($p < 0,05$). Among all genes differentially expressed, 9 were picked up for further studies with qRT-PCR. Myostatin, lactate dehydrogenase A and B, HSF1, HSF3, HSP70, HSP90, glycogen phosphorylase and citrate synthase were studied and only myostatin, HSP 70 and 90 confirmed the differentially expressed patterns between treatments ($p < 0,05$). Unlikely, glycogen phosphorylase appeared repressed in heat stressed animals ($p < 0,05$). These findings suggest an important role of energetic metabolism of birds at hot environments.

Keywords: *Gallus gallus*; Gene expression; Heat stress; Meat quality

1 INTRODUÇÃO

O Brasil atingiu, em 2004, a condição de terceiro maior produtor mundial de carne de frango e é o maior exportador desse produto (Associação Brasileira de Exportadores de Frango - ABEF, 2007). Essa condição tem sido mantida desde então, com aumento da participação brasileira na liderança do mercado mundial (ABEF, 2007), refletindo a importância do agronegócio do frango para a economia do país. Entretanto, para que o setor possa prosseguir seu desenvolvimento, torna-se cada vez mais necessário agregar valor aos produtos, quer seja pelo aumento do consumo de processados, como os marinados, quer seja pelo aumento das exportações.

Atualmente, com a crescente diversificação da produção industrial, novos produtos chegam aos consumidores, e estes passam a exigir mais qualidade no que consomem. Este panorama já é visível no mercado interno e efetivamente difundido entre os principais importadores de produtos avícolas brasileiros. Assim, para atender a essa demanda, a seleção genética das aves deve enfatizar, ainda mais, características relacionadas à qualidade da carne, como capacidade de retenção de água e a textura dos filés de peito (SAMS, 1999).

O frango de corte é um animal doméstico geneticamente aprimorado para rápido crescimento e deposição de tecido muscular. O desempenho produtivo dos frangos de corte atingiu índices impressionantes com os avanços genéticos e nutricionais aplicados a esses animais. Com tais avanços, voltados para crescimento acelerado, máxima deposição muscular, melhor utilização de nutrientes e conversão alimentar eficiente, o metabolismo dessas aves ficou mais acelerado (LAGANA, 2005). No entanto, sua capacidade termorreguladora parece ser deficiente para enfrentar condições de altas temperatura e umidade (LAGANA, 2005), o que mostra que os animais selecionados para alto desempenho não são tão adaptados ao ambiente em que vivem como eram seus antepassados (CLASSEN, 2000). Aves selecionadas para rápido crescimento e elevado acúmulo de massa muscular têm apresentado desenvolvimento ineficiente de tecido conjuntivo, aumentando a susceptibilidade a diversas miopatias (SWATLAND, 1995). Le Bihan-Duval et al. (1999) relatam uma tendência em se obter carne de coloração mais pálida oriunda de animais selecionados para ganho de peso e desenvolvimento de musculatura peitoral.

Os problemas decorrentes do aumento da susceptibilidade ao estresse térmico, por exemplo, ocasionaram o aparecimento de alterações na carne de frango, como a carne PSE (pálida, mole e exsudativa) e a carne conhecida como DFD (escura, dura e seca). O primeiro caso

ocorre quando a formação de ácido láctico resultante da glicólise anaeróbica, em um processo conhecido como conversão do músculo em carne, se dá de forma acelerada e prematura, ainda enquanto o músculo encontra-se em temperatura elevada (SWATLAND, 1995). Esse acúmulo de ácido láctico prematuramente resulta na queda acelerada do pH ocasionando a desnaturação de proteínas e o aparecimento do fenômeno PSE. Já a ocorrência de carne DFD está relacionada ao esgotamento das reversas energéticas (ATP armazenado na forma de glicogênio) do tecido muscular do animal momentos antes do abate (LUCHIARI FILHO, 2000). O pH final da carne permanece elevado devido à falta de formação de ácido láctico, uma vez que o substrato para sua formação não se fazia presente (SWATLAND, 1995). Ambos fenômenos – PSE e DFD – trazem sérios prejuízos para industrialização dos produtos cárneos, além de provocarem maior rejeição pelo consumidor, devido às alterações físico-químicas e organolépticas da carne obtida.

Qualidade conceituada com o enfoque no cliente implica mais que aspectos ligados a características da carcaça dos frangos, passando a se valorizar também as propriedades funcionais da carne oriunda dessas aves. Desse modo, pode-se obter produtos com melhor aceitação em termos de características sensoriais, como cor e textura. A conquista de mercados consumidores mais exigentes será possível na medida em que se aumentem ainda mais os investimentos em qualidade.

Tendo em vista o panorama da cadeia avícola brasileira, o presente trabalho buscou identificar genes que exercem influência nas características de qualidade de carne de frango, quando submetidas a situações de estresse térmico momentos antes do abate. Assim, novos métodos de melhoramento poderão ser abordados, tendo em vista incluir a qualidade da carne de frango e a resistência ao estresse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manejo pré-abate e qualidade da carne

Entre os principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos cárneos está o estresse das aves nas horas que antecedem o abate, no qual um correto manejo é decisivo para as etapas posteriores do processamento (KANNAN; MENCH, 1997). São pontos críticos para minimizar o estresse antes do abate a temperatura, o transporte e o manejo na chegada ao abatedouro, que devem ser conduzidos de forma mais confortável possível para as aves (OWENS et al., 2000; DEEB; CAHANER, 2001). Aves estressadas usam rapidamente suas reservas de glicogênio, o que pode resultar em seu esgotamento em vivo, impossibilitando a queda do pH pós-morte, ou ocasionar uma aceleração da glicólise logo após o abate gerando acúmulo de ácido lático no músculo, com conseqüente diminuição acelerada do pH (BARBUT, 1997; MCKEE; SAMS, 1998; VAN LAACK et al., 2000). Músculos que apresentam valores de pH menores que 5,8 em torno de 15 minutos após o abate, quando a carcaça ainda se encontra em temperaturas próximas da fisiológica, geralmente sofrem uma desnaturação parcial das proteínas que o compõem, resultando em uma carne com baixa capacidade de retenção de água e comprometida em suas propriedades funcionais, tornando-se de baixa qualidade para o processamento (BARBUT, 1998; TANKSON et al., 2001).

Este fenômeno é conhecido na literatura como PSE, das iniciais das palavras da língua inglesa *pale*, *soft* e *exudative*, cuja denominação pálida, flácida e exsudada reflete as características desta carne de baixa qualidade. No sentido de minimizar o estresse dos frangos, atualmente, nas principais empresas que operam no setor, procura-se respeitar um período de descanso para as aves, permitindo a elas a recuperação de suas reservas de glicogênio muscular para que estejam aptas a produzir carne de qualidade (GUARNIERI et al., 2002). Uma prática que vem sendo disseminada nas plataformas de recepção é a utilização da aspersão para banhar as aves, por um período em torno de 10 minutos, visando aliviar o estresse produzido pelo calor e pelo transporte (GUARNIERI et al., 2002).

Alguns trabalhos evidenciaram que a incidência de carne PSE é maior no verão, demonstrando a influência do calor para a ocorrência do fenômeno (MCCURDY et al., 1996; Bianchi et al., 2007). Segundo Woelfel; Sams (2001) a incidência de PSE pode chegar até a 50% do total de carne obtida dependendo do período do ano e do manejo.

Outro problema decorrente do estresse provocado pelo calor em aves é a ocorrência de carne DFD, do inglês *dark, firm and dry*, ou seja, escura, firme e seca. Tal carne apresenta uma coloração escura, com drástica redução na maciez. A ocorrência desse fenômeno está relacionada à depleção das reservas de glicogênio muscular enquanto o animal encontra-se ainda vivo (LUCHIARI FILHO, 2000). Com o esgotamento do conteúdo de glicogênio muscular, não ocorre acúmulo de ácido láctico no músculo pós-morte. Assim sendo, o pH final da carne permanecerá elevado, ficando bastante acima do ponto isoelétrico das principais proteínas musculares (actina, pI = 4,7; miosina, pI = 5,4) (BERG, 2001). Nessas condições, a capacidade dessas proteínas em reter água estará bastante elevada (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999), a ponto da água retida no músculo ser praticamente imobilizada, não permitindo seu extravasamento (ANADÓN, 2002). Desse modo, verifica-se que a condição de carne seca, usada para descrever o fenômeno, não é exatamente verdadeira se levarmos em consideração a quantidade de água retida pelo músculo. O grande conteúdo de água presente nesse tipo de carne é, por um lado, benéfica para processamentos posteriores (BERG, 2001) e, por outro, bastante prejudicial devido à rejeição da carne in natura pelos consumidores e também, graças ao pH próximo do fisiológico, por se constituir em um meio propício para o crescimento de organismos indesejáveis, reduzindo severamente a vida útil do alimento.

Bressan e Beraquet (2002) relatam diferenças de velocidade das reações de glicólise e nas taxas de declínio e amplitude do pH pós-morte entre frangos submetidos a diferentes temperaturas no período pré-abate. Os autores relatam que os animais mantidos em temperaturas mais elevadas responderam com maior velocidade das reações de glicólise. Já os valores de pH desses animais foram significativamente maiores do que os observados nos frangos mantidos em temperatura de conforto térmico. Supõe-se que os animais mantidos em conforto térmico tiveram baixo gasto energético com a termorregulação enquanto que nos animais mantidos sob alta temperatura, o consumo de energia foi elevado devido à necessidade de se aumentar a irrigação sanguínea periférica e a frequência respiratória, de forma a possibilitar a perda de calor.

2.2 Genética na produção animal

A produção animal tal qual a conhecemos hoje passou por profundas modificações e melhoramentos. Nutrição, bem-estar, sanidade e a genética possibilitaram avanços significativos na eficiência da cadeia produtiva. Os programas de melhoramento animal contribuíram sem dúvida para a redução do período entre o nascimento do animal e o retorno econômico ao criador

(produção de carne, ovos, leite, ninhada, etc.). A seleção genética baseia-se na escolha de reprodutores com potencial genético superior para características fenotípicas de interesse agropecuário. Tal escolha tem sido feita até hoje com base na avaliação fenotípica do desempenho produtivo dos animais. Isso implica numa avaliação grosseira da composição genética dos indivíduos e, ainda, na necessidade de um período maior para a avaliação das características, culminando no aumento do intervalo entre a tomada da decisão de seleção e o resultado efetivo na indústria (MCKAY et al., 2000).

Em vista disso, pesquisas têm sido feitas para a identificação dos genes diretamente relacionados com a característica de interesse, de modo a encontrar variantes gênicas (alelos) favoráveis à manifestação da característica desejada. Exemplos do uso de informações genéticas em animais domésticos têm sido amplamente relatados. Em suínos, uma mutação em um gene que regula a concentração de cálcio em células musculares, o gene do receptor tipo 1 da rianodina, quando em homozigose, confere ao animal uma maior sensibilidade a situações de estresse, podendo resultar na formação de uma carne de cor pálida, macia e exsudativa (FUJII et al., 1991). No entanto, esses mesmos animais apresentam maior taxa de desenvolvimento muscular do que os não portadores da mutação. O desenvolvimento de um diagnóstico molecular, identificando de forma precisa os animais portadores da mutação, permitiu um rápido avanço na erradicação da síndrome em algumas linhas e no uso controlado dos benefícios dessa mutação nos plantéis suínos.

Em bovinos e camundongos, mutações no gene da miostatina, acarretando em redução ou perda de sua função, provocam alterações no desenvolvimento muscular e resulta em adultos com maior número de fibras musculares e maior deposição de músculo na carcaça (MCPHERRON; LEE, 1997; GROBET, 1997). A miostatina atua como potente inibidor da proliferação e diferenciação de células musculares. Uma vez que a mutação inativa a proteína, o controle miogênico feito pela miostatina não será mais realizado, conferindo um fenótipo de musculatura dupla aos animais portadores da mutação, semelhante aos animais que possuem elevada expressão de folistatina, o inibidor de miostatina (LEE; MCPHERRON, 2001) (Figura 1). Em adição, um polimorfismo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) na região do íntron 2 do gene da Leptina e um marcador molecular, do tipo microsatélite, próximo a esse mesmo gene, foram associados, respectivamente, a um maior peso ao primeiro parto em vacas Brangus-Ibagé e aumento no tempo de intervalo entre partos (ALMEIDA et al., 2003).

Vários grupos têm encontrado associações significativas entre polimorfismos genéticos e características de interesse econômico em frangos de corte. Variações nos genes dos fatores transformantes de crescimento β (TGF- β) 2, 3 e 4 foram associadas com características como peso corporal, ganho de peso médio diário, conteúdo mineral ósseo e peso de gordura abdominal (LI et al., 2003). Hocking & Burt (2003) demonstraram a existência de *loci* para características quantitativas (QTLs) em dez cromossomos da galinha. Os QTL's encontrados influenciam peso corporal e gordura em uma população resultante do cruzamento de linhagens de corte e postura. De modo similar, de Koning et al. (2003) encontraram QTLs influenciando características de crescimento no cromossomo 4 da galinha.

Figura 1 – Fenótipo de musculatura dupla em camundongos (A) e bovinos (B) devido à ausência de atividade de miostatina

No Brasil, a Embrapa Suínos e Aves e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) iniciaram estudos em conjunto na área de genômica de aves em 1999, com o objetivo de mapear novos QTLs e confirmar algumas regiões já associadas a características de produção em outras populações. Para esse estudo foi desenvolvida uma população F_2 específica para estudos genômicos, resultante do cruzamento recíproco de linhagens divergentes de frangos de corte e de postura, que vêm sendo utilizadas para identificar marcadores associados a características de crescimento, consumo e composição de carcaça (LEDUR et al., 2000 a, b; ZANELLA et al., 2000). Resultados já obtidos por este grupo em relação ao mapeamento de QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5 identificaram 4

regiões nos cromossomos 1, 3 e 4 associadas ao peso vivo aos 35, 41 e 42 dias de idade (NONES et al., 2003; RUY et al., 2003; BARON et al., 2003). Os resultados referentes ao cromossomo 1 revelaram um QTL para ganho de peso e conversão alimentar dos 35 aos 41 dias (NONES et al., 2003) e peso da gordura abdominal (NONES et al., 2004). Esta região de QTL (entre 153 e 210cM) coincide com a região em que foi mapeado o gene do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), mapeado a 172cM (SCHMID et al., 2000). Esta proteína está envolvida no crescimento corporal (ENGERT et al., 1996) e pode, portanto, ser o causador do efeito do QTL identificado.

2.3 Genética e qualidade da carne

A intensa seleção genética das últimas décadas resultou em aves com alto desempenho para as características zootécnicas de produção e carcaça, como ganho de peso, conversão alimentar e deposição de tecido muscular, mas que apresentam, eventualmente, novas desordens fisiológicas, como ascite e maior acúmulo de gordura, acarretando diminuição da aceitação pelo consumidor, além de perdas econômicas diretas por morte ou redução do rendimento no processamento (ANTHONY, 1998; MCKAY et al., 2000).

Novos problemas de qualidade de carne começaram a surgir nos últimos anos e vêm sendo cada vez mais motivos de preocupação de toda a cadeia produtiva. Atualmente, os animais altamente eficientes em termos de produtividade têm demonstrado uma maior susceptibilidade a certas enfermidades e menor resistência aos fatores estressantes (CLASSEN, 2000). Animais com desenvolvimento muscular acelerado podem ter alterações na velocidade da glicólise, o que pode acarretar em alterações nas características de qualidade da carne (BRESSAN; BERAQUET, 2002).

Grande parte dessas alterações pode ser relacionada com a aceleração do metabolismo ocorrido devido ao aumento da exigência metabólica dos animais selecionados para a produção de carne. A energia no tecido muscular é armazenada na forma de adenosina trifosfato (ATP), creatina fosfato, e glicogênio. Esse último constitui-se na maior reserva energética do músculo (SWATLAND, 1995). Em processos fisiológicos, com disponibilidade de oxigênio, a degradação do glicogênio se dá através da glicólise aeróbica, na qual o ácido pirúvico produzido adentra o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, formando, em última instância, CO₂ e H₂O e liberando energia na forma de ATP. Já em condições de falta de oxigenação (como o período *postmortem*), a

degradação do glicogênio muscular ocorre via glicólise anaeróbica e leva à formação de ácido láctico a partir do piruvato, reduzindo o pH muscular. Essa redução é necessária para uma correta maturação da carne, no processo denominado conversão do músculo em carne. Entretanto, muitas vezes o animal apresenta seu metabolismo acelerado a ponto de comprometer a maturação da carne, uma vez que a queda do pH pode acontecer muito rapidamente após o abate do animal. Isso pode acontecer como resultado da exposição de animais de alta taxa metabólica a situações estressantes, como muitas vezes ocorre nas situações pré-abate.

Os dois principais problemas envolvendo qualidade da carne de frango são conhecidos pelas siglas PSE e DFD. Ambos têm reflexos diretos em 3 dos principais parâmetros de avaliação de qualidade da carne: pH, cor e capacidade de retenção de água.

Após o abate, o músculo continua suas reações até que sejam esgotadas todas suas reservas energéticas. Uma vez abatido, o suprimento de oxigênio para as células é interrompido e a degradação das fontes energéticas passa a ser de forma anaeróbica. Dessa forma, o glicogênio muscular é degradado via glicólise anaeróbica, resultando na formação de ácido láctico. Isso faz com que o valor de pH muscular diminua com o decorrer das horas que se seguem ao abate. Essa queda se dá geralmente de valores iniciais de pH em torno de 7,2 até valores finais ao redor de 5,8. Quando a queda de pH é muito acentuada, chegando a valores abaixo de 5,8, em menos de 4 horas de maturação, ocorre a formação de uma carne tipo PSE (figura 2), com coloração pálida, baixa capacidade de retenção de água e flácida (SOUZA, 2006). O contrário pode ocorrer e a carne adquirir um aspecto escuro, com grande retenção de água e dura, conhecida como carne DFD (escura, dura e seca). Tal condição ocorre quando não há a diminuição do pH final da carne, permanecendo em valores acima de 6,2 (SOUZA, 2006). Carnes com características DFD têm sua vida útil bastante comprometida por apresentar um ambiente altamente favorável para o desenvolvimento de microrganismos.

A amplitude e velocidade da redução de pH influenciam as características de cor e capacidade de retenção de água. A cor da carne do frango é tida como um dos fatores de qualidade mais importantes para o consumidor (ALLEN et al, 1998; FLETCHER, 1999). É ela quem determina a compra ou não do produto (FLETCHER, 1999), sendo associada com o frescor e a boa qualidade da carne. A cor da carne reflete a quantidade e o estado químico do pigmento mioglobina. Esse pigmento muscular é formado por uma porção protéica denominada globina e uma porção não protéica denominada grupo heme (DUKES, 1996). Esse grupamento heme

possui um átomo de ferro que é responsável por ligar oxigênio e suprir o tecido muscular com este elemento. O estado químico da mioglobina depende da valência do íon ferro (SOUZA, 2006). Quando o íon ferro se encontra no estado reduzido (ferroso, Fe^{+2}), ele pode se ligar a uma molécula de água ou de oxigênio molecular. Quando o íon Fe^{+2} combina-se com a água, a mioglobina torna-se desoximioglobina e adquire uma coloração vermelho-escura, de baixa luminosidade (como nas carnes embaladas a vácuo), mas quando o íon Fe^{+2} se liga ao oxigênio, a mioglobina transforma-se em oximioglobina, de coloração vermelho cereja. Por outro lado, quando o íon ferro do grupo heme se oxida ao estado férrico (Fe^{+3}) sob baixa tensão de oxigênio, a mioglobina se transforma em metamioglobina, de coloração marrom, indesejável do ponto de vista comercial.

Figura 2 – Declínio do pH durante 24 horas para carcaças DFD, normal e PSE. Fonte: Judge et al., (1989)

O rápido declínio do pH no músculo sob alta temperatura (logo após o abate) leva a um aumento na desnaturação de proteínas musculares (DRANSFIELD; SOSNISCKI, 1999; MOLETTE et al., 2003). A dispersão de luz de um músculo é diretamente proporcional ao grau de desnaturação protéica (ANADÓN, 2002). Quanto maior a desnaturação de suas proteínas, menos luz consegue ser transmitida por entre as fibras musculares, acabando por se dispersar. A luz, quando dispersa, não é capaz de irradiar as mioglobinas contidas dentro do citoplasma das células musculares (o sarcolema), conferindo assim uma tonalidade pálida à carne.

O pH ainda influencia a capacidade de retenção de água da carne, uma das principais características de rendimento no processamento do produto e de maciez da carne. Offer e Knight (1998) afirmam que a queda de pH pós-morte altera a composição celular e extracelular das

miofibrilas, reduzindo a capacidade de reter água nas proteínas musculares. Isso é uma consequência da desnaturação protéica, especialmente da miosina, citada anteriormente. Uma vez desnaturada, a proteína perde suas características físico-químicas e, conseqüentemente, a eficiência de ligação com moléculas de água torna-se bastante prejudicada.

2.4 Identificando genes de interesse

A maioria das características de importância econômica, como crescimento, fertilidade e resistência, é influenciada por diversos genes, cada um contribuindo com um pequeno efeito (BURT; HOCKING, 2002). Várias estratégias podem ser utilizadas para a identificação desses genes. O uso de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma ou em cromossomos específicos permite a busca por regiões nos cromossomos que controlam características quantitativas (QTL's) sem a necessidade de conhecimento prévio da função fisiológica de genes (PLASTOW, 2003). Além disso, a utilização desta estratégia tem um elevado poder para determinar regiões no genoma que possam explicar as grandes diferenças fenotípicas entre raças ou linhagens (PLASTOW, 2003). Tal método auxilia a determinação de genes que possam estar influenciando uma característica, seja por comparação com regiões homólogas de outras espécies, seja pela proximidade física de um dado gene com a região ocupada pelo QTL encontrado no genoma estudado (ZHAO et al., 2003).

Por sua vez, o estudo de genes candidatos (LI et al., 2003), utiliza informações prévias da função fisiológica de genes já identificados e conhecidos, como os de humanos e camundongos (ANDERSSON; GEORGES, 2004), visando identificar mutações específicas em genes homólogos de outras espécies (MARTINEZ; MACHADO, 2001). Para tanto, estes genes são seqüenciados e os polimorfismos detectados são então associados com a característica de interesse através de análise estatística apropriada (LEDUR, 2001; PLASTOW, 2003). Tal procedimento possui um grande poder estatístico, permitindo a análise a partir de um menor número de famílias e indivíduos, além de ter uma grande aplicabilidade: uma vez tendo sido encontrado o polimorfismo causal, o gene candidato pode ser imediatamente utilizado para programas de seleção assistida por marcadores na população testada. Ainda, alguns genes podem ser considerados como genes candidatos tanto pela função fisiológica como pela posição, quando esse gene encontra-se em uma região na qual um QTL já tenha sido identificado, gerando fortes indícios de que este gene esteja explicando o efeito do QTL (ZHAO et al., 2003). A vantagem

desse método é que pode reduzir custos e tempo, mas tem a desvantagem de exigir conhecimento prévio do gene.

Outra forma poderosa para a determinação de genes e redes metabólicas envolvidas no desenvolvimento de uma dada característica fisiológica é o estudo do padrão de expressão gênica dos indivíduos. Métodos como os arranjos de DNA de alta densidade (macro e microarranjos) possibilitam a investigação simultânea do comportamento de milhares de genes frente a situações específicas (LEDGER et al., 2004). Essa metodologia baseia-se na construção de grids de DNA complementar a uma sequência específica de RNA e na hibridização de moléculas de cDNA sintetizadas a partir da população de RNA mensageiro de um tecido a esse grid, ou arranjo de DNA (BUTTE, 2002). O cDNA é marcado radioativamente (macroarranjo) ou por fluoróforos (microarranjo) e, uma vez hibridizado ao DNA contido nos arranjos, fica imobilizado, emitindo sinal que pode ser captado por filmes radiográficos ou detectores de fluorescência. O sinal captado é então transformado em imagens digitais para a quantificação da magnitude de expressão de cada vez, baseado na intensidade de sinal detectado. Uma vez que milhares de genes estão presentes nesses arranjos, tal procedimento permite uma investigação global de como o organismo está recrutando seu maquinário genético para lidar frente a situações fisiopatológicas, como por exemplo, lactação, crescimento, adaptação ao estresse. Além disso, essa metodologia permite a identificação de complexas redes metabólicas envolvendo diversas características e situações.

2.5 Estudando a expressão gênica

A hipótese de que organismos com características fenotípicas diferentes apresentam padrões distintos de expressão de genes relacionados com estas características é bem aceita e comprovada. Muitas das diferenças existentes entre indivíduos de uma mesma espécie se baseiam na diferença de uso do seu arsenal genético. É sobre essa teoria que se fundamenta o estudo de expressão diferencial de genes. Para se estudar a diferença de expressão gênica entre indivíduos pode-se lançar mão de uma infinidade de técnicas, como o sequenciamento das etiquetas de sequências expressas (ADAMS et al., 1991), a análise serial da expressão gênica (VELCULESCU et al., 1995), *display* diferencial (LIANG; PARDEE, 1992), amplificação quantitativa em tempo real de transcritos (qRT-PCR) (RAJEEVAN et al., 2001) e os arranjos de alta densidade (SCHENA et al., 1995). Esta última metodologia tornou-se uma das principais

formas de se conseguir um levantamento global do padrão de expressão de inúmeros genes simultaneamente (BUTTE, 2002). Recentemente, o uso desta estratégia permitiu identificar genes expressos em diversos tecidos de frango, fornecendo agora um banco de dados para o genoma do frango (BURNSIDE et al., 2005).

O estudo de expressão gênica pela metodologia de arranjos de alta densidade é feito pelo princípio de complementaridade dos ácidos nucleicos e engloba duas abordagens semelhantes: micro e macroarranjo. A diferença básica entre ambas metodologias reside na plataforma na qual o material biológico (cDNA) é imobilizado (lâminas de vidro ou plástico em microarranjos e membranas de náilon nos macroarranjos), na forma de marcação da sonda (fluorescência no micro e radioatividade no macroarranjo) e no número de genes analisados simultaneamente (mais de 50.000 no micro e até 5.000 no macroarranjo) (FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). No caso dos macroarranjos o cDNA obtido a partir de colônias de bactérias, plasmídeos ou produtos de PCR é imobilizado em uma membrana de náilon (FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). Após uma extração de RNA das células de interesse, é sintetizado o cDNA a partir da população de RNA mensageiro, ou seja, a partir da população de genes transcritos pela célula naquele determinado momento. O cDNA é feito com uma marcação radioativa (^{33}P) que, ao hibridizar com o cDNA presente na membrana, pode ser detectado pela sensibilização de filmes radiográficos. O resultado de intensidade de emissão do sinal de cada transcrito hibridizado é quantificado em computador com uso de softwares específicos.

A estratégia de arranjos de DNA pode identificar vias metabólicas associadas a características de interesse. As informações de expressão gênica são fundamentais na compreensão dos eventos fisiológicos envolvidos nos mais diversos processos, como no estresse, por exemplo. Com o conhecimento dos genes que demonstram diferenças no padrão de expressão entre indivíduos fenotipicamente diferentes, podemos considerar alguns desses genes como candidatos para a investigação de mutações que expliquem *per se* a característica fenotípica de interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Ovos férteis das linhagens Cobb 500 e Ross 308 foram incubados no Depto. de Genética da ESALQ e tiveram o nascimento programado para o mesmo dia em que três linhas parentais seriam fornecidas pela Agrocere Ross Melhoramento Genético de Aves. Foram alojadas 250 aves de cada material genético, provenientes de três linhas parentais cedidas pela Agrocere (A, B e C) e de duas linhagens comerciais (Cobb 500 e Ross 308), em galpão experimental do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, no período de 12/05/05 a 24/06/05.

As aves foram criadas em lotes mistos em 25 boxes até os 42 dias de idade, sendo feitas retiradas de frangos aos 40, 41 e 42 dias de idade para a condução dos ensaios em câmara climática sob condição de alto estresse, conforme descrito a seguir.

Foram utilizados 80 machos com peso vivo representativo do peso médio do material genético, sendo 6 de cada linhagem destinados ao abate em condição termoneutra, . As 50 aves restantes foram pesadas e colocadas em caixas comuns de transporte (10 aves por caixa e uma caixa por linhagem) e submetidas à condição de alto estresse térmico (35°C e 85% UR), durante duas horas, em câmara climática do Núcleo de Pesquisa em Ambiência (NUPEA) da ESALQ/USP.

Após os 120 minutos de exposição ao estresse, 6 aves de cada linhagem foram abatidas para avaliação da qualidade de carne do peito e coleta de tecido muscular para as análises de expressão gênica.

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso de efeito único (tempo de estresse) com 6 repetições, considerando-se a ave como unidade experimental. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o SAS (2005) através do procedimento GLM (General Linear Models), obtendo-se a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.1 Parâmetros hematológicos

A coleta de sangue das aves foi realizada através de punção da veia da asa com tubo *Vacuumtainer* contendo anticoagulante. Foi realizada a coleta de sangue das aves de cada linhagem não submetidas e submetidas ao estresse térmico. Devido a perdas de amostras, um total de 41 amostras foi obtido. A obtenção das amostras foi dentro da câmara climática. Para determinação do valor de hematócrito foi utilizado sangue total. Após esta determinação, o

sangue foi centrifugado para obtenção de plasma, utilizado para avaliação da atividade de creatina quinase.

A determinação da atividade da creatina quinase sanguínea foi realizada utilizando um kit comercial (CK-NAC método cinético - UV, marca Laborlab). A leitura de CK foi realizada no Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal – ESALQ, utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu UV 1601 PC) no comprimento de onda de 340 nm.

3.2 Avaliação de Qualidade de Carnes

Para as análises laboratoriais de qualidade de carne, foi utilizado o corte do peito, músculo *Pectoralis major*, como a unidade amostral. Após a etapa da sangria (180 segundos), as aves foram escaldadas a 60°C, depenadas e os peitos retirados da carcaça. Os cortes foram acondicionados em embalagens plásticas e caixas térmicas com gelo e transportados ao Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ, onde foram realizadas as medições de cor, pH e análise de capacidade de retenção de água (CRA).

Foram analisadas 30 aves no tratamento controle, sendo 6 aves de cada linhagem: A, B e C (parentais), D e E (comerciais), após o estresse de 2 horas.

3.2.1 Medição de cor

A análise instrumental de cor foi feita em três períodos: 15 minutos, 60 minutos e 24 horas após o abate e a cor do músculo foi expressa com base nas coordenadas de luminosidade (L*), vermelho (a*), e amarelo (b*) do sistema CIELab, medidos em espectrofotômetro (MiniScan XE Plus, Hunter Lab) conectado no computador. Neste trabalho, o valor de luminosidade foi levado em consideração para a avaliação do atributo cor e determinação da qualidade da carne. Maiores valores para essa medida correspondem a uma coloração mais branca.

3.2.2 Capacidade de Retenção de água

As medições de CRA foram feitas em 2 horários: 1 hora e 24 horas após o abate, utilizando-se o método por prensa, realizado segundo descrito por Grau & Hamm (1953) e modificado por Hofmann et. al. (1982). Amostras de aproximadamente 0,5 g do músculo foram colocadas em dois papéis de filtro e prensadas em placas plexiglass. O conjunto foi submetido a

uma prensa hidráulica operando com uma pressão de 500 lb.pol⁻², durante 2 minutos. Após a prensagem, mediu-se a área da amostra prensada (A), bem como a área total (T) e, com o auxílio de um planímetro, calculou-se o valor = A/T para cada amostra.

3.2.3 Determinação de pH

As medições de pH foram feitas em 3 horários: 15 minutos, 1 hora e 24 horas após o abate, com eletrodo de penetração, em quatro pontos diferentes do músculo Pectoralis major, dois na parte superior e dois na parte inferior, de cada uma das amostras. O aparelho utilizado foi um potenciômetro de punção (Oakton, pH 300, série 35618).

3.3 Análise da expressão gênica

3.3.1 Confeccção das membranas de macroarranjo de DNA

As membranas de DNA de alta densidade foram confeccionadas pelo Brazilian Clone Collection Center (BCCC) da Universidade do Estado de São Paulo Unesp/Jaboticabal a partir de uma coleção de clones de bactérias desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP/ESALQ). Foram impressos 4150 clones na membrana. Cada clone contém uma EST de um gene específico. A transferência das colônias de bactérias para as membranas de náilon foi feita pelo robô Q-Bot (Genetix). Foram utilizadas 12 placas de 384 poços, contendo um clone em cada poço para a confecção das membranas. Entretanto, no momento de remoção da tampa da placa de número 9 houve uma falha no robô, perdendo-se, assim, os clones referentes àquela membrana. A figura 3 mostra a disposição dos clones nas membranas. Cada membrana foi dividida em 384 quadrantes, cada um contendo 24 clones dispostos em arranjos de 5x5. O ponto central, indicado pela letra G, não foi utilizado para impressão dos clones, bem como os pontos indicados pelo número 9, devido à falha ocorrida no momento de transferência dos clones dessa placa, totalizando 8300 pontos na membrana. Cada número dentro dos quadrantes se refere à placa de origem do clone. Cada quadrante refere-se à posição do clone dentro da placa de 384 poços. De forma resumida, todos os clones pertencentes aos poços A1 das placas foram posicionados em duplicata dentro do quadrante A1 das membranas, conforme figura 3.

Figura 3 – Posição dos clones dentro de cada quadrante da membrana. O quadrante destacado representa todos os clones da posição A1 de todas as placas de 384 poços.

As membranas foram primeiramente umedecidas em meio líquido CG (Cicle-Grow – BIO 101) suplementado com 0,5% de ampicilina. As membranas foram posicionadas sobre papel filtro Whatman 3M, umedecidas no mesmo meio. Após posicionar as membranas no robô Q-Bot, iniciou-se a transferência dos clones para as membranas. O robô introduz seu braço mecânico com 384 pinos no interior dos poços das placas, levando os clones para as suas respectivas posições na membrana. Após uma leve pressão por 10 milisegundos os clones são impressos na membrana e o robô inicia a impressão dos clones da próxima placa a ser adicionada à membrana. Entre uma placa e outra, os pinos de impressão são esterilizados em solução de água sanitária, seguida de lavagem com água Milli-Q e etanol absoluto. Após a secagem com um jato de ar, os pinos estavam prontos para imprimirem os clones da placa seguinte. Após o término da impressão, as membranas foram incubadas a 37°C durante 8 horas para o crescimento de cada colônia de clones. Após o crescimento das colônias, as membranas foram dispostas em sobre

papel Whatman 3M umedecido em solução desnaturante (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) durante 4 minutos em temperatura ambiente. Trocou-se o papel Whatman por outro fresco, umedecido na mesma solução desnaturante e levado a banho-maria a 95°C por 4 minutos. Após, as membranas foram transferidas para um papel filtro Whatman umedecido em solução neutralizante (NaCl 1,5M e Tris 1M, pH 7,0), durante 4 minutos. As membranas foram então posicionadas em papel filtro seco durante 4 minutos. Após a secagem, as membranas foram transferidas para uma solução de proteinase K (NaCl 5M; Tris 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0; 10X Sarcosil; 1,5% proteinase K). As colônias foram submersas nessa solução durante 1 hora em agitador orbital a 50 RPM a 37°C. Com auxílio de duas folhas de papel filtro, removeu-se o excesso da solução. O DNA plasmidial contido nos clones foi fixado à membrana usando-se o aparelho Ultraviolet Crosslinker (CL-508), sendo expostos a uma radiação de 120 J.cm⁻² durante 30 segundos.

3.3.2 Normalização do macroarranjo usando sonda plasmidial (Overgo)

Uma vez que o crescimento das colônias bacterianas foi diretamente na membrana faz-se necessário determinar a quantidade de DNA contido em cada ponto da membrana. Para tanto, foi utilizado o método conhecido como Overgo, que consiste na detecção de regiões de DNA por meio de sondas de oligonucleotídeos. Devido ao fato de que todos os clones continham um mesmo gene de resistência a ampicilina, os óligos utilizados para a síntese da sonda plasmidial foram sintetizados com base na sequência desse gene. As sondas marcadas radioativamente foram usadas para detectar a intensidade de sinal emitido em cada um dos pontos das membranas. O resultado dessa detecção foi utilizado posteriormente para normalizar os macroarranjos de acordo com a quantidade inicial de DNA presente na membrana.

Para a síntese da sonda plasmidial e marcação com $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (GE HEALTHCARE), utilizou-se uma solução de 10 μM dos óligos, que foi incubada a 80°C por 5 minutos, seguida por 37°C por 10 minutos e refrigerada imediatamente em gelo. Para uma reação com volume final de 10 μL , 10 μM de óligos foi misturada a 1 g BSA (albumina sérica bovina, GIBCO-BRL), 2 μL de solução OLB – composto por 10 μL de solução A (Tris 1,25 M; MgCl_2 1,5 mM; 18 μL β -mercaptoetanol; 15 μL d(ATG)TP 100 μM), 25 μL de solução B (2 M Hepes-NaOH) e 15 μL de solução C (Tris 3 mM; EDTA 0,2 mM) – 50 μCi de $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP e 2U de enzima Klenow DNA polimerase I (INVITROGEN). A reação ocorreu em temperatura ambiente durante 1 hora. O volume final, após a síntese, foi ajustado para 50 μL para purificação da sonda em coluna

Sephadex G-50 (GE HEALTHCARE) para a remoção dos nucleotídeos α^{33} -dCTP não incorporados à sonda.

As membranas foram pré-hibridizadas para a redução de sinal resíduo (*background*). As membranas foram lavadas com solução 0,5% de lauril sulfato de sódio (SDS) fervente por 5 minutos em agitação lenta. Para o Overgo, todas as membranas foram lavadas, pré-hibridizadas e hibridizadas em um mesmo recipiente, separadas por redes de filtro. A pré-hibridização ocorreu em solução de 1 g de BSA (GIBCO-BRL), 200 μ L de EDTA 0,5M, pH 8,0; 7 g de SDS e 50mL de Na_2HPO_4 1M para cada 100 mL de solução. A solução foi aquecida a 58°C e adicionada às membranas; as quais foram incubadas em banho-maria a 58°C e 60 rpm (Maxi-Shake, HETO) durante 4 horas. Ao fim dessa etapa de pré-hibridização, realizou-se a hibridização das sondas plasmidiais. Substituiu-se a solução de pré-hibridização pela solução de hibridização, que tinha a mesma composição da primeira, porém acrescida da sonda plasmidial previamente desnaturada a 94°C durante 10 minutos. As membranas foram então incubadas a 58°C em banho-maria a 60 rpm durante 20 horas.

3.3.3 Visualização do resultado da normalização

Após o descarte da solução de hibridização, as membranas foram lavadas para remoção do excesso de sonda não hibridizada presente nas membranas. A lavagem foi realizada com 3 soluções de diferentes estringências. Cada lavagem foi repetida com nova solução, sempre a 58°C durante 15 minutos. Primeiramente, lavou-se com solução 2X SSC (citrato de sódio salino) e 0,1% de SDS. A segunda lavagem foi em solução 1,5X SSC e 0,1% de SDS, seguida de lavagem final com solução 0,5X SSC e 0,1 % de SDS.

Após lavadas, as membranas foram dispostas em cassetes apropriados com os pontos voltados para o *Imaging Plate* (IP, KODAK) por 72 horas. As imagens foram digitalizadas a partir do IP pelo aparelho STORM 860 (GE HEALTHCARE). A análise das imagens foi feita com auxílio do programa *ArrayVision Evaluation 8.0* (IMAGING RESEARCH, 2003). O valor das leituras dos sinais e os valores do resíduo de fundo foram utilizados posteriormente na análise estatística.

3.3.4 Coleta de tecidos e extração de RNA total

Imediatamente após o abate, foram coletadas amostras de tecido muscular peitoral (*pectoralis major*) de 10 frangos de corte da Linhagem Ross 308. O material coletado foi colocado em tubos devidamente identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen) para posterior síntese de cDNA e análise da expressão gênica. Aproximadamente 500 mg de tecido peitoral de 6 animais submetidos ao estresse térmico e 4 animais abatidos em condições termoneturas foi macerado em nitrogênio líquido e imediatamente em colocado em um tubo contendo Trizol[®] (1mL.mg de tecido⁻¹), no qual ficou incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de vigorosa agitação. As amostras foram, então, mantidas em temperatura ambiente durante 3 minutos, seguindo-se a centrifugação a 11000 x g por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo microtubo contendo 500 µL de isopropanol. Os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos para então serem centrifugados a 11000 x g a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, adicionou-se 1 mL de etanol 75%, agitando-se posteriormente. Centrifugou-se por mais 5 minutos a 7500 x g, descartando-se novamente o sobrenadante. O *pellet* foi deixado secar em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos, conforme necessidade. As amostras foi ressuspendidas em H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a extração o material foi quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância sob comprimento de onda a 260nm, e a avaliando-se a pureza do material pela relação A260/A280, para verificação da possível contaminação com proteína. A integridade do material extraído foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1% em voltagem de 5 V.cm⁻¹.

3.3.5 Síntese da sonda de cDNA para análise em membranas de macroarranjo

A sonda de cDNA foi sintetizada a partir de 30 µg de RNA total extraído a partir de amostras de tecido de músculo peitoral, utilizando-se o protocolo descrito em Schummer et al. (1999) modificado. Em um microtubo, misturou-se 30 µg de RNA total (em um volume de 6 µL) e 156 pmol (1,5 µL de 100 µM solução estoque) de iniciador Oligo(dT₁₈V). A solução foi aquecida a 75°C por 10 minutos, e logo após foi colocada no gelo. Adicionou-se à reação 5 µL *First Strand Buffer* (5x, BRL), 2,5 µL DTT (100mM), 2,0 µL RNAGuard, 2,5 µL de nucleotídeos ATG (10mM cada), 5 µL do nucleotídeo citosina marcado radioativamente α³³P-dCTP (50 µCi).

A reação foi aquecida a 42°C antes de adicionar a enzima Transcriptase reversa Superscript II. Foram adicionados 1,25 µL de Superscript Reverse Transcriptase II (BRL, 200U/µL) à reação e incubado a 42°C durante 20 minutos. Adicionou-se, então, 1,25 µL de nucleotídeo citosina não marcado radioativamente (dCTP 10mM). A reação ocorreu em temperatura de 42°C durante 60 minutos. Para cessar a reação, foi adicionado 1µL de Poly-A (2µg.µL⁻¹) e aplicou-se uma temperatura de 94°C por 5 minutos. Após essa desnaturação, acrescentou-se 1,4 µL de NaOH 5M e levou-se à banho a 37°C durante 15 minutos. 1,8 µL de HCl 4M e 7,0 µL de Tris-HCl 1M, pH 7,5 foram adicionados à reação.

3.3.6 Purificação das sondas marcadas

Após a marcação das sondas de cDNA com P33, assim como a sonda de DNA plasmidial, há a necessidade de se remover o material radioativo e os nucleotídeos não incorporados à fita de cDNA, a fim de que seja assegurado que o material a ser hibridizado nas membranas correspondam unicamente ao cDNA obtido. Para isso, Ajustou-se o volume final total para 50 µL com H₂O ultrapura (Mili-Q). Antes de ser purificada, cada sonda foi contada no cintilador para medir o nível de emissão de radioatividade. Para cada amostra a ser purificada, uma coluna G-50 (Pharmacia) foi preparada invertando-a até que sua resina ficasse homogênea. A coluna foi posicionada em um microtubo e submetida a centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o microtubo, colocando-se um microtubo novo para coletar a amostra da sonda de cDNA purificada. As sondas foram adicionadas delicadamente no topo da resina, tomando-se o cuidado de não perfurá-la. Procedeu-se, então a centrifugação a 3000 rpm durante 2 min. O material coletado representa a sonda de cDNA marcada radioativamente e livre de impurezas. Cada sonda foi novamente contada no cintilador para verificar a eficiência da incorporação dos nucleotídeos marcados radioativamente.

3.3.7 Hibridização das membranas de Macroarranjo com as sondas de cDNA

O processo de hibridização das membranas de macroarranjo com as sondas de cDNA foi realizado de maneira similar ao procedimento realizado para a hibridização da sonda plasmidial (*Overgo*). Primeiramente fez-se uma pré-hibridização para reduzir o sinal inespecífico de fundo, e após a síntese da sonda de cDNA foi realizada a hibridização propriamente dita. Ambas etapas ocorreram em cilindros de hibridização de 30 x 3,5 cm. Para a pré-hibridização, foram utilizados 10 mL de solução contendo 2,5 mL de SSC 20X; 0,2 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5; 5 mL de

Formamida deionizada (GIBCO-BRL); 1 mL de Denhardt's 100X (Invitrogen); 1 mL de SDS 10% e 0,1 mL de DNA de esperma de salmão (10mg/mL, GE HEALTHCARE). As membranas foram banhadas nessa solução em forno de hibridização (Isoterm, Fisher Scientific) a 42°C durante 2h.

Ao final da pré-hibridização, descartou-se a solução de pré-hibridização e iniciou-se a hibridização propriamente dita. Foram empregados 10 mL de uma solução composta por: 2,5 mL de SSC 20X; 0,2 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5; 5 mL de formamida deionizada; 0,2 mL de Denhardt's 100X (Invitrogen); 1 mL de SDS 10% e 0,1 mL de esperma de salmão. A solução foi pré-aquecida a 42°C e acrescida da sonda de cDNA previamente desnaturada a 94°C durante 3 minutos. As membranas foram hibridizadas durante 20 horas em forno de hibridização a 42°C. Ao final desse período, procedeu-se às lavagens da membrana de forma semelhante às lavagens quando da normalização com sonda plasmidial.

Após lavadas, as membranas foram expostas ao *Imaging Plate* (IP, KODAK) por 72 horas, em cassetes apropriados. As imagens foram digitalizadas pelo aparelho STORM 860 (GE HEALTHCARE) e o resultado foi analisado com o programa *ArrayVision Evaluation 8.0* (IMAGING RESEARCH, 2003).

3.3.8 Escolha dos genes para PCR quantitativo em tempo real e síntese dos iniciadores

Para escolha dos genes estudados na análise de expressão por meio da RT-PCR quantitativa em tempo real (*Real-Time quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), foram levadas em consideração informações sobre a função biológica das proteínas de interesse. Buscou-se por genes potencialmente envolvidos na resposta ao estresse térmico e/ou proteínas integrantes de rotas metabólicas sabidamente envolvidas no desenvolvimento de alterações na qualidade da carne de frango após exposição a estresse térmico, como, por exemplo, vias de degradação de substratos energéticos, tais como o glicogênio. Além disso, outros quatro genes foram escolhidos tendo como base a expressão diferencial observada entre os tratamentos estressado e não estressado nas membranas de macroarranjo. Os genes escolhidos são descritos na tabela 1.

Após a definição dos genes a serem analisados, os pares de iniciadores para cada gene foram desenhados com base na sequência de RNA mensageiro disponível no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e uso do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). A qualidade de cada um dos

iniciadores selecionados foi verificada com auxílio do programa Netprimer (disponível pelo endereço eletrônico <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>), a fim de assegurar que os iniciadores utilizados permitam uma amplificação específica, condição fundamental para a análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real. Além disso, os iniciadores foram submetidos a alinhamento de seqüências curtas pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a fim de confirmar a posição dos iniciadores em relação à seqüência do gene, além de verificar a especificidade dos mesmos com o cDNA de *Gallus gallus*.

Tabela 1 – Genes selecionados para análise de expressão por RT-PCR quantitativo em tempo real

Nome do Gene	Seqüência do iniciador (5'→3')	Função
Heat shock factor protein 1 (HSF1)	F: TGTGGCTGATTCTTGGCTTT R: GAGGGAGACAGAGGGGTTTC	Resposta a choque térmico
Heat shock factor protein 3 (HSF3)	F: CGGAAGATGGAAATGGAGAG R: TCAGGAAGCAGGAGAGGAGA	Resposta a choque térmico
Heat shock protein 70kDa (HSP70)	F: ATTCTTGCCTGGGTGTCTTC R: GATGGTGTGGTGGGGTTC	Resposta a choque térmico
Heat shock protein 90kDa (HSP90)	F: TGAAACACTGAGGCAGAAAGG R: AAAGCCAGAGGACAGGAGAG	Resposta a choque térmico
Glicogênio Fosforilase	F: CTGGAGGTGGAACAAGGAAC R: GGACAGAGGGGTCAAGCA	Degradação de glicogênio
Citrato Sintase	F: GCCTCTACCTCACCATCCACA R: CAGCCACAGCAGCACCTC	Formação de citrato
Lactato desidrogenase A	F: CCGTCAGCAAGAAGGAGAAA R: TCAGGGAGACACCAGCAAC	Formação de lactato
Lactato desidrogenase B	F: TGCTCTGGTTGATGTTTGG R: GACGACTCTCCCCCTCTTG	Degradação de lactato
Miostatina	F: AGTAGCGATGGCTCTTTGGA R: CTGGGAATGTGACAGCAAGA	Inibição da diferenciação muscular
Proteína Ribossomal Mitocondrial S30 (MRPS30)	F: GCCACACCCAGTTTCATCTT R: GAGTCACGTCTGCTTCATTCC	Gene constitutivo

3.3.9 Otimização de PCR

Foi feita uma reação de PCR para todos os iniciadores com gradiente de temperatura de pareamento dos iniciadores para verificar a melhor condição de amplificação de cada gene individualmente. O gradiente de temperatura variou de 58 a 62°C. A condição da reação para o PCR com gradiente de temperatura para cada amostra é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições de PCR inicial (pré-otimização)

Reagentes	Concentração da solução estoque	Concentração na reação	Volume por amostra
H ₂ O			q.s.p 12,5 µL
Tampão	10x	1x	1,25 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,375 µL
Iniciador F	10 pmol/µL	2 pmol/µL	1,25 µL
Iniciador R	10 pmol/µL	2 pmol/µL	1,25 µL
DNTP	10 mM	0,25 mM	0,50 µL
Taq DNA Polimerase	1,5 U/µL	0,75 U	0,50 µL
cDNA	25 ng/µL	25 ng	1,00 µL

A amplificação ocorreu por meio de ciclos de PCR constituídos por uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 min, 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, pareamento dos iniciadores (58,0-62,0°C) por 30s e extensão da fita de DNA a 72°C durante 30s. A esse ciclo seguiu-se uma etapa de extensão final a 72°C durante 10min, finalizando a reação de amplificação a 10°C.

Diversos genes puderam ter suas condições ótimas de amplificação definidos com esse teste de gradiente de temperatura. Os poucos genes que precisaram de melhorias na amplificação foram posteriormente otimizados, com ajustes na concentração de MgCl₂. As condições de amplificação e de temperatura de pareamento de iniciadores estão sintetizadas na tabela 3.

Tabela 3 – Condições de PCR para cada gene, após otimização

Gene	Condições PCR (volume final = 25 µL; volumes em µL)									
	H ₂ O	Tampão 10X	MgCl ₂ (50mM)	dNTP (10mM)	Iniciador F (10pmol/µL)	Iniciador R (10pmol/µL)	Taq DNA Polimerase (5U/µL)	cDNA	Temperatura pareamento iniciadores	Tamanho fragmento amplificado
HSF1	13,0	2,5	0,50	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	61°C	228 pb
HSF3	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	60°C	195 pb
HSP70	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	158 pb
HSP90	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	100 pb
Glicogênio Fosforilase	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	117 pb
Citrato Sintase	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	62°C	170 pb
LDH-A	12,75	2,5	0,75	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	61°C	341 pb
LDH-B	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	176 pb
Miostatina	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	427 pb
MRPS30	12,5	2,5	1,0	1,0	2,5	2,5	1,0	2,0	59°C	174 pb

3.3.10 Validação dos genes por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a validação dos genes diferencialmente expressos, foi utilizada a metodologia da transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Tal metodologia permite a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica entre os diferentes indivíduos e tratamentos.

Após a otimização das condições de PCR, as amostras de cDNA foram utilizadas para as reações de amplificação comparativa em tempo real. O estudo foi feito em capilares de vidro em equipamento *Light Cycler* (ROCHE). Para a detecção da quantidade de DNA sintetizado a cada ciclo, foi utilizado o fluorímetro *SYBR green*. A reação ocorreu em volume final de 20 μ L contendo 1 μ L de cDNA, 0,8 μ L de $MgCl_2$ 25mM, 0,25 μ L de BSA (20mg/mL, ROCHE), 0,4 μ L de dNTP mix (10mM), 4 μ L de SYBR mix (para 50 μ L: 25 μ L Buffer *Taq Polimerase* 10X, 6,25 μ L de DMSO e 0,5 μ L de *SYBR green* 10000X em DMSO), 1,5 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (INVITROGEN) e 10 pmol dos iniciadores específicos. As condições de PCR em tempo real foram de 10 minutos de pré-incubação à 95°C, seguido de 60 ciclos de três etapas consistindo em desnaturação durante 10 segundos à 95°C, pareamento dos iniciadores em temperatura e duração variando de acordo com o gene, e finalmente um período de extensão de 10 segundos à 72°C. A temperatura e a duração da etapa de pareamento dos iniciadores foi de 7 segundos para todos os genes, exceto para a miostatina, que foi de 10 segundos, e a temperatura de pareamento foi de 59°C para os genes HSP70, HSP90, glicogênio fosforilase, LDH-B, miostatina e o gene controle MRPS30, 60°C para os genes HSF3, 61°C para HSF1 e LDH-A e 62°C para citrato sintase.

Cada reação foi acompanhada e analisada diretamente em computador e, após o término, uma curva de *melting* foi gerada para cada par de iniciadores. Essa curva nos permitiu verificar a especificidade da amplificação, garantindo que o produto amplificado e analisado consiste unicamente do fragmento do gene de interesse.

O método de quantificação relativa dos genes foi o descrito por Livak e Schmittgen (2001), sendo o gene MRPS30 utilizado como gene constitutivo referencial. Esse método depende unicamente da diferença de ciclos de amplificação no qual a quantidade de produto formado ultrapassa um limiar pré-estabelecido (C_t) entre os genes avaliados e um gene de referência. O ΔC_t é calculado conforme a eq. (1).

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{ref})_{trat\ 1} - (Ct_{alvo} - Ct_{ref})_{trat\ 2} \quad (1)$$

Em que:

$(Ct_{alvo} - Ct_{ref})_{trat\ 1}$ reflete a diferença de Ct entre o gene alvo e o gene de referência para o tratamento 1 e $(Ct_{alvo} - Ct_{ref})_{trat\ 2}$ é a diferença de Ct entre o gene alvo e o gene de referência para o tratamento 2. Ct indica o ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassou o limiar basal pré-definido.

3.3.11 Análise estatística da expressão gênica.

Os resultados de expressão gênica oriundos do estudo de macroarranjos foram analisados com auxílio do programa SAS versão 8.0 (2002). Os valores dos sinais emitidos por cada ponto hibridizado nos macroarranjos foram seguindo um modelo de dois estágios (WOLFINGER et al., 2001). Esse modelo ajusta o sinal obtido para o modelo de normalização, levando em consideração a correção necessária para efeitos de membrana, animal, tratamento e gene. Para isso utilizou-se análise da variância e modelo de efeitos fixos. O segundo estágio do modelo ajusta os resíduos para o modelo gene-específico. Desse modo, no primeiro estágio os dados foram normalizados, segundo a eq. (2):

$$y_{iklm} = \mu + G_i + T_j + M_k + Q_{(k)l} + e_{ijklm} \quad (2)$$

Em que:

y_{iklm} é o logaritmo natural da intensidade de sinal emitido; μ é a constante associada a cada observação; G_i é o efeito do gene i ; T_j é o efeito do tratamento j ; M_k é o efeito aleatório da membrana k ; $Q_{(k)l}$ é o efeito do quadrante l da membrana k ; e_{ijklm} é o erro associado à observação.

No segundo estágio são ajustados os efeitos dos genes a partir dos resíduos obtidos pelo ajuste do modelo de normalização, segundo a eq. (3):

$$r_{gijk} = G_g + T_{(g)i} + M_{(gi)j} + e_{gijk} \quad (3)$$

Em que:

r_{gijk} é o resíduo da normalização; G_g é o efeito do gene g ; $T_{(g)i}$ é o efeito do tratamento i sobre o gene g ; $M_{(gi)j}$ é o efeito da membrana j no tratamento i e gene g ; e e_{gijk} é o erro associado à observação.

Os resultados de expressão relativa referentes ao estudo de qRT-PCR foram analisados empregando-se procedimento General Linear Model (GLM) do SAS 8.0, obtendo uma análise de variância, com teste de F a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros hematológicos

Não foi encontrada modificação dos valores de hematócrito nas aves após submissão ao estresse térmico (estressadas – ET; não stressadas – NET), independentemente da linhagem analisada (Tabela 4). Estes resultados corroboram com análises descritas na literatura que não identificaram mudanças nos valores de hematócrito em aves submetidas a estresse térmico agudo (SANDERCOCK et al., 2001). A linhagem A apresentou uma leitura de hematócrito menor ($P<0,05$) que a linhagem B Cobb 500.

Tabela 4 – Valores médios de Hematócrito $\pm$ erro padrão para as linhagens A, B, C, Cobb e Ross

Linhagem	Não estressados	Estressados	Médias (n=12)
A	28,92 $\pm$ 0,37	29,25 $\pm$ 0,82	29,08 ^c $\pm$ 0,43
B	30,58 $\pm$ 0,89	32,16 $\pm$ 0,71	31,37 ^a $\pm$ 0,59
C	29,33 $\pm$ 0,31	30,16 $\pm$ 0,36	29,75 ^{bc} $\pm$ 0,25
Cobb 500	31,30 $\pm$ 0,93	30,50 $\pm$ 0,57	30,90 ^{ab} $\pm$ 0,53
Ross 308	29,67 $\pm$ 0,28	29,75 $\pm$ 0,56	29,70 ^{bc} $\pm$ 0,29
Médias (n=60)	29,91 $\pm$ 0,29	30,36 $\pm$ 0,32	

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$).

Em relação à atividade da Creatina quinase (CK), não houve efeito do estresse térmico para a linhagem Ross 308 e para as linhas parentais A, B e C (Tabela 5). A atividade da CK plasmática tem sido utilizada como parâmetro para verificação de mudança na permeabilidade do sarcolema das fibras musculares, fenômeno comum em condições de estresse térmico. Os animais da linhagem Cobb 500 apresentaram maior atividade depois de submetidos às condições de estresse térmico, significando que esta linhagem apresenta fibras musculares susceptíveis ao efeito do estresse térmico.

Tabela 5 – Valores médios de atividade de CK (Unidades Internacionais arbitrarias) $\pm$ erro padrão para as linhagens A, B e C, Cobb e Ross

Linhagem	Não estressados	Estressados	Médias (n=12)
A	1188,2 $\pm$ 137,8	994,2 $\pm$ 146,7	1091,2 ^A $\pm$ 100,3
B	1304,5 $\pm$ 224,1	1351,8 $\pm$ 180,1	1328,1 ^A $\pm$ 140,2
C	2083,7 $\pm$ 297,0	1485,8 $\pm$ 263,6	1784,8 ^B $\pm$ 209,7
Cobb 500	1120,4 ^a $\pm$ 102,9	1479,2 ^b $\pm$ 120,5	1299,8 ^A $\pm$ 95,7
Ross 308	1185,0 $\pm$ 187,7	1426,7 $\pm$ 232,3	1305,8 ^A $\pm$ 146,9
Médias (n=60)	1376,3 $\pm$ 109,8	1347,5 $\pm$ 92,8	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$), entre os tratamentos. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$), entre linhagens.

Houve também uma maior atividade CK para a linhagem C ($p<0,05$), comparada às demais linhagens, que não diferiram entre si. Os valores médios são similares aos encontrados em situação de estresse térmico agudo (SANDERCOCK, 2001).

Uma maior quantidade de proteína CK muscular foi apontada como excelente marcador de atrofia muscular por desuso (CROS et al., 1999). Na verdade, isso implica em uma adaptação das fibras musculares para apresentarem características de fibras rápidas. Portanto, o resultado superior encontrado na linhagem C pode ser devido ao maior porte das aves desta linha, relacionado com pressão de seleção para crescimento da musculatura peitoral, que é formada em sua maioria de fibras rápidas (brancas).

4.2 Avaliação da Qualidade de Carne

4.2.1 Cor

De maneira geral, em todas as linhagens, as aves não estressadas apresentaram leituras de L^* distribuídas em patamares mais altos em relação à distribuição dos valores encontrados para peito das aves estressadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores das médias do valor de $L^* \pm$ erro padrão entre as linhagens nas diferentes condições pré-abate e tempo de leitura após o abate

Linhagem	Não estressados			Estressados		
	15 min	60 min	24 h	15 min	60 min	24 h
A	55,09 $\pm$ 0,82	55,79 $\pm$ 0,83	58,27 $\pm$ 0,77	52,17 $\pm$ 0,47	51,92 $\pm$ 0,81	58,68 $\pm$ 0,83
B	54,47 $\pm$ 0,76	54,41 $\pm$ 0,59	59,56 $\pm$ 1,25	52,13 $\pm$ 1,01	51,21 $\pm$ 0,76	56,91 $\pm$ 0,48
C	55,92 $\pm$ 1,22	56,75 $\pm$ 0,76	60,53 $\pm$ 1,49	54,64 $\pm$ 0,85	54,31 $\pm$ 0,72	59,95 $\pm$ 0,92
Cobb	54,69 $\pm$ 0,62	55,76 $\pm$ 0,65	59,14 $\pm$ 1,17	51,88 $\pm$ 0,35	52,13 $\pm$ 0,12	58,67 $\pm$ 0,60
Ross	54,6 $\pm$ 0,92	55,75 $\pm$ 0,71	59,27 $\pm$ 0,62	51,49 $\pm$ 1,47	51,53 $\pm$ 1,39	56,78 $\pm$ 1,27
Média (n=60)	55,00 ^{aB} $\pm$ 0,38	55,69 ^{aB} $\pm$ 0,32	59,35 ^{aA} $\pm$ 0,47	52,46 ^{bB} $\pm$ 0,43	52,22 ^{bB} $\pm$ 0,41	58,20 ^{aA} $\pm$ 0,41

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$), entre os tratamentos.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$), entre os tempos de análise.

Nas leituras efetuadas 24 horas após o abate, os valores de L^* aumentaram significativamente ($P<0.0001$), não permitindo verificar diferenças entre as linhagens, uma vez que os valores se estabilizaram.

Houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre carne proveniente de animais estressados e não estressados nos tempos de medição de 15min e 1 hora, sendo que as aves não estressadas obtiveram valores de L^* mais altos (Tabela 6).

Os resultados de cor 24 h são semelhantes a outros previamente descritos na literatura. Debut et al. (2003) relatam nenhuma diferença de cor a 24h pós abate na carne do peito de frangos abatidos sob condições ótimas ou após 2 horas de transporte ou 2 horas de stress térmico agudo (35°C). Os autores relatam diferenças significativas somente na sobrecoxa desses animais, que apresentaram coloração mais pálida em aves abatidas sob condições estressantes. Le Bihan-Duval et al. (2003), em estudos com perus, obtiveram resultados semelhantes, com variações de coloração somente na sobrecoxa e não na musculatura peitoral. Esses resultados sugerem uma maior sensibilidade a variações de qualidade pela sobrecoxa do que a carne de peito de frango. Por outro lado, Bianchi et al. (2007), estudando frangos de corte abatidos em diferentes épocas do ano (verão e inverno), encontraram maior incidência de carne de peito pálida em animais abatidos no verão, o que contraria os resultados obtidos no presente trabalho. Uma possível explicação para essa contradição é a condição de criação a que foram submetidos os animais. Nota-se que temperaturas elevadas durante toda a criação das aves têm maior impacto na palidez da carne de peito em relação ao estresse térmico agudo pré-abate.

4.2.2 pH

O estresse térmico imposto às aves influenciou apenas o valor de pH de 24 horas após o abate (Tabela 7). Os animais submetidos ao estresse demonstraram pH mais baixo em relação aos não estressados ($p < 0,05$). Foi também verificada uma diferença significativa entre o pH obtido em diferentes intervalos de tempo após o abate, demonstrando uma redução do pH da carne à medida que passa o tempo de maturação (Tabela 7).

Com 1 hora *post mortem* a queda nos valores de pH não foi suficiente para ser significativa (Tabela 7) entre os tratamentos. A redução aqui observada é condizente com uma redução normal do pH, no processo de transformação do músculo em carne, não havendo influência do estresse até 1 hora após o abate.

Tabela 7 – Valores médios das medidas de pH $\pm$ erro padrão entre as linhagens em diferentes condições pré-abate e tempos de leitura após o abate

Linhagem	pH					
	Não estressados			Estressados		
	15 min	1 h	24 h	15 min	1 h	24 h
A	6,63 $\pm$ 0,10	6,40 $\pm$ 0,14	6,06 $\pm$ 0,07	6,65 $\pm$ 0,09	6,32 $\pm$ 0,04	5,80 $\pm$ 0,04
B	6,76 $\pm$ 0,09	6,46 $\pm$ 0,06	5,89 $\pm$ 0,12	6,61 $\pm$ 0,05	6,36 $\pm$ 0,07	5,87 $\pm$ 0,04
C	6,61 $\pm$ 0,08	6,35 $\pm$ 0,13	6,04 $\pm$ 0,07	6,58 $\pm$ 0,12	6,31 $\pm$ 0,06	5,86 $\pm$ 0,04
Cobb	6,53 $\pm$ 0,08	6,42 $\pm$ 0,14	6,01 $\pm$ 0,09	6,71 $\pm$ 0,13	6,37 $\pm$ 0,13	5,72 $\pm$ 0,02
Ross	6,49 ^{aa} $\pm$ 0,14	6,27 ^{aa} $\pm$ 0,11	5,97 ^{ab} $\pm$ 0,08	6,59 ^{aa} $\pm$ 0,10	6,35 ^{ab} $\pm$ 0,10	5,84 ^{bc} $\pm$ 0,04
Média (n=60)	6,60 ^{aa} $\pm$ 0,05	6,38 ^{ab} $\pm$ 0,05	6,00 ^{ac} $\pm$ 0,04	6,63 ^{aa} $\pm$ 0,04	6,34 ^{ab} $\pm$ 0,03	5,82 ^{bc} $\pm$ 0,02

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os tratamentos. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os tempos de análise.

Não foi observada diferença de pH entre as linhagens ($p < 0,05$). Também não houve nenhum pH típico de carne PSE, que normalmente ocorre quando se atinge valores de pH abaixo de 5,8 muito rapidamente (SOUZA, 2006).

4.2.3 CRA

O valor da CRA foi expresso como a razão entre a área da amostra prensada sobre a área total formada pelo exsudado. Assim, quanto maior o valor desta razão, maior a capacidade de retenção de água.

Conforme verificado na tabela 8, houve diferença estatística entre os valores de CRA obtidos para as aves NET e ET, quando o atributo foi avaliado 1h *post mortem*. Porém, após 24h, os valores médios de CRA não se mostraram estatisticamente diferentes.

Na análise de 1h após o abate, os valores de CRA foram maiores nas aves estressadas (0,29) do que nas aves do tratamento não estressadas (0,22). Os dados obtidos são contrários aos indicados na literatura (Woelfel et al., 2002), que verifica usualmente uma tendência de redução da capacidade de retenção de água em carne oriunda de animais estressados antes ao abate. Entretanto, levando-se em conta a característica de carne levemente mais escura a 1h apresentada pelos animais estressados, o resultado de CRA elevado condiz com a noção de que a queda de pH durante as primeiras etapas de maturação da carne não resultou em desnaturação das proteínas miofibrilares.

Tabela 8 – Valores médios de CRA $\pm$ erro padrão para os diferentes tratamentos e períodos de análise

Linhagem	CRA			
	Não estressados		Estressados	
	1h	24h	1h	24h
A	0,25 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,004	0,35 $\pm$ 0,026	0,25 $\pm$ 0,014
B	0,22 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,006	0,24 $\pm$ 0,013	0,22 $\pm$ 0,008
C	0,21 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,003	0,23 $\pm$ 0,009	0,21 $\pm$ 0,005
Cobb	0,23 $\pm$ 0,006	0,23 $\pm$ 0,007	0,32 $\pm$ 0,023	0,27 $\pm$ 0,012
Ross	0,20 $\pm$ 0,008	0,26 $\pm$ 0,013	0,30 $\pm$ 0,020	0,24 $\pm$ 0,013
Média (n=60)	0,22 ^{bA} $\pm$ 0,005	0,24 ^{aA} $\pm$ 0,016	0,29 ^{aA} $\pm$ 0,012	0,24 ^{aB} $\pm$ 0,006

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os tratamentos.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os tempos de análise.

4.3 Expressão Gênica

4.3.1 Normalização das membranas com sonda plasmidial

Como descrito anteriormente, os macroarranjos utilizados nesse trabalho foram oriundos do crescimento de clones de bactérias diretamente sobre a membrana. Uma vez que o crescimento bacteriano não se dá de modo uniforme e homogêneo, uma diferença entre a quantidade de material biológico presente em cada ponto, no final da confecção das membranas, é esperada.

A fim de se eliminar a influência de diferentes quantidades de DNA contido em cada ponto da membrana sobre o resultado de expressão gênica, uma sonda de DNA plasmidial comum a todos os clones foi utilizada para verificar a quantidade de DNA impressa em cada ponto das membranas.

A imagem da hibridização com sonda plasmidial revelou sensíveis diferenças entre os pontos. A figura 4 ilustra uma hibridização com sonda de DNA plasmidial e a diferença visual na intensidade de sinal emitido de cada ponto.

A normalização das membranas pela hibridização da sonda de DNA plasmidial permitiu, assim, verificar a quantidade de DNA impresso em cada ponto de cada uma das membranas. Isso foi fundamental para que pudéssemos corrigir diferenças de intensidade de sinal radiográfico devidas a maior quantidade de DNA contida na membrana.

Os valores obtidos da intensidade de sinal de cada um dos pontos correspondentes a clones específicos foram utilizados para uma correção dos valores obtidos posteriormente na quantificação da expressão dos genes de interesse.

Figura 4 – Hibridização com sonda plasmidial (*Overgo*) para posterior normalização dos resultados de expressão gênica. Cada ponto representa um gene

4.3.2 Identificação de genes diferencialmente expressos de acordo com a condição pré-abate

A condição pré-abate é de fundamental importância para a determinação da característica da carne a ser produzida. Condições que resultem em elevação dos níveis de estresse nos animais pode ocasionar severas modificações no conjunto de proteínas expressas, possibilitando alterações bioquímicas de grande impacto no tecido. Muitas rotas metabólicas podem ser alteradas em condições como exposição a temperaturas elevadas.

O resultado das hibridizações dos macroarranjos evidenciou um total de 259 genes diferencialmente expressos entre os diferentes tratamentos. Desses, 149 genes foram induzidos nos animais submetidos ao estresse térmico. A tabela 9 mostra a relação de genes diferencialmente expressos, sendo os valores positivos para a coluna *Estim.* os genes com indução de expressão pelo estresse térmico. Dentre a população de genes tidos como diferencialmente expressos, podemos identificar algumas rotas metabólicas de interesse que podem elucidar alguns aspectos da alteração de qualidade da carne.

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continua)

	Clone	GenBank	Gene	Estim.	StdErr
1	GGEZLB1015B07	AAA48974.1	"Myosin heavy chain, nonmuscle (Cellular myosin heavy chain) (NMMHC)	5.14	1.22
2	GGEZCB1027H06		"Chain A, Deoxyribonuclease I Complex With Actin"	4.83	0.69
3	GGEZCB1006A03		Glycosyltransferase	4.81	1.21
4	GGEZEB1029F11		No Hit	4.08	1.07
5	FM1001B1		IGFI - GGEZFM1001B1.g	4.00	1.25
6	GGEZSM1016E12		No Hit	3.96	1.32
7	GGEZEB1018H10		No Hit	3.94	1.65
8	GGEZEB1030G03		hypothetical protein [Macaca fascicularis]	3.93	1.16
9	GGEZLB1007D07		DNA directed RNA polymerase II polypeptide J [Homo sapiens]	3.89	1.15
10	GGEZCB1030D01		cytochrome c oxidase subunit I [Coturnix japonica]	3.86	0.73
11	GGEZCB1020F05	CO504263	similar to 60S ribosomal protein L34 [Mus musculus]	3.84	0.74
12	GGEZSM1015F02		COQ5 coenzyme Q5 homolog, methyltransferase (S. cerevisiae) [Gallus gallus]	3.62	1.22
13	GGEZEB1014C04		CRY2: Cryptochrome 2 (photolyase-like)	3.59	0.89
14	GGEZLB1019D09		protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	3.46	1.04
15	GGEZEB1005H10		similar to hypothetical protein MGC33608 [Homo sapiens]	3.46	1.08
16	GGEZCB1015F03		"Phosphoglucomutase (Glucose phosphomutase) (PGM)	3.42	1.01
17	GGEZEM1001B09		No Hit	3.40	0.63
18	GGEZCB1025G01		actin 3 - fruit fly (Drosophila melanogaster) (fragments)	3.38	0.77
19	GGEZEB1007G10	CO505778	BZW1 protein [Homo sapiens] basic leucine zipper and W2 domains 1	3.37	0.88
20	GGEZEM1003H08	CD763264	pleiotrophin; osteoblastic cell factor; heparin-binding brain mitogen; heparin-binding growth factor 8	3.36	1.21
21	GGEZEB2019D08		"troponin T- Tnt-4", skeletal muscle, isoform 4 - chicken	3.17	1.15
22	GGEZLB1021A06	CD764846	Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2 [RAMP2]	3.15	1.26

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)					
	Clone	GenBank	Gene	Estim.	StdErr
23	GGEZEB1001B01	CO506247	LOC416357 hypothetical LOC416357 [Gallus gallus]	3.10	0.93
24	GGEZEB1009E03		No Hit	3.09	1.22
25	GGEZEB1027C08		No Hit	3.04	1.14
26	GGEZEB1019H10		No Hit	2.95	1.03
27	FM1001B04		IGFII - GGEZFM1001B4.g	2.93	1.01
28	GGEZEB1005H06	CO505429	similar to RIKEN cDNA 1300012C15 [Rattus norvegicus]	2.88	0.70
29	GGEZCB1019D04	CO504387	APAF1 interacting protein	2.85	0.61
30	GGEZLB1013D02	CD764397	similar to Werner syndrome	2.81	0.96
31	GGEZLB1003G07	CD763633	Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha) (SM22-alpha)	2.81	0.69
32	FM1001A10		Myostatine	2.78	1.04
33	GGEZLB1016A01	CD764448	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 [H. sapiens]	2.77	1.18
34	GGEZEB1013E07		No Hit	2.71	0.88
35	GGEZCB1020F04	CO504262	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	2.69	0.34
36	GGEZCB1004G09	CO503371	a-actin	2.66	0.65
37	GGEZEB2011F12	CO507109	signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein)	2.65	1.11
38	GGEZCB1019H03		No Hit	2.64	0.82
39	GGEZEB2018H04		No Hit	2.64	1.14
40	GGEZSM1014G04	CD761782	small acidic protein; likely ortholog of mouse small acidic protein [Homo sapiens]	2.60	0.86
41	GGEZEB2003A07		No Hit	2.59	0.87
42	GGEZCB1020C01	CO504230	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein [Mus musculus]	2.57	1.06
43	CP1001B11		No Hit	2.54	0.71
44	GGEZSM1030E10		LOC427504 similar to zinc finger protein basoenuclin [Gallus gallus]	2.53	1.06
45	GGEZEB1026C04		No Hit	2.53	0.73
46	GGEZCB1019E08		No Hit	2.49	0.68
47	GGEZCB1006F09		No Hit	2.47	0.90
48	GGEZCB1031H04	CO503976	TNRC6 protein [Homo sapiens]	2.46	0.67
49	GGEZCB1019C06	CO504383	similar to ubiquitin specific protease 33 isoform 3; pVHL-interacting deubiquitinating enzyme 1	2.45	0.89
50	GGEZEB2017C11		No Hit	2.45	1.04
51	GGEZEB2019B03	CO507217	similar to Zinc finger protein 469	2.45	0.95
52	GGEZEB1020D11		No Hit	2.44	0.89
53	GGEZLB1019F07		GGEZLB1019F07.g	2.41	0.93
54	GGEZCB1029C12	CO502896	Chain A, Polylysine	2.41	0.64

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)					
	Clone	GenBank	Gene	Estim.	StdErr
55	GGEZCB1014D07		No Hit	2.41	0.84
56	GGEZEB1019A12	CO506028	RW1 protein	2.40	0.84
57	GGEZEB1019B10		No Hit	2.39	0.39
58	GGEZCB1025G05	CO504343	hypothetical protein LOC771553 [Gallus gallus]	2.38	0.61
59	GGEZSM1018E11		No Hit	2.38	0.87
60	GGEZSM1011A11		No Hit	2.37	0.98
61	GGEZEB1005C04		No Hit	2.34	0.74
62	GGEZEB2011A08	CO507051	hypothetical protein [Homo sapiens]	2.33	0.59
63	GGEZCB1020F10	CO504267	Zinc-finger protein ubi-d4 (Requiem) (Apoptosis response)	2.32	0.93
64	GGEZEB2001C06		No Hit	2.28	0.68
65	GGEZCB1014E07		Troponin T type 3 (skeletal, fast) [Gallus gallus]	2.27	0.48
66	GGEZEB1030B12	CO505136	TGFB-induced factor homeobox 1	2.26	0.78
67	GGEZEB1025A07	CO505050	NADH dehydrogenase (ubiquinone)	2.26	0.84
68	GGEZSM1012G12		No Hit - GGEZSM1012G12.g	2.24	0.95
69	GGEZEB1019D07		pyruvate kinase, muscle	2.24	0.83
70	GGEZEB2012A06	CO507435	Rasa3 protein [Mus musculus]	2.24	0.94
71	GGEZCB1022E06		Solute carrier family 25, member 5; 2F1; adenine nucleotide translocator 2 (fibroblast) [Homo sapiens]	2.23	0.63
72	GGEZEB1026D09	CO505226	similar to KIAA1217 protein	2.20	0.76
73	GGEZEM1004H10	CD763347	TTL tubulin tyrosine ligase [Gallus gallus]	2.18	0.77
74	GGEZLB1017B02	CD764548	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	2.17	0.62
75	GGEZCB1007C06	CO503476	unnamed protein product [Homo sapiens]	2.14	0.88
76	GGEZEM1004B04	CD763277	influenza virus NS1A binding protein	2.14	0.90
77	GGEZEB1007E05	CO505755	"Nonspecific lipid-transfer protein, mitochondrial precursor (NSL-TP) (Sterol carrier protein 2) (SCP-2)	2.12	0.83
78	GGEZCB1003E09		No Hit	2.11	0.83
79	GGEZEB1037F02	CO505014	GCN5-like protein [Lapemis hardwickii]	2.11	0.63
80	GGEZEB1012A05		No Hit	2.10	0.79
81	GGEZEB1009B04		TPT1 tumor protein, translationally-controlled 1 [Gallus gallus]	2.08	0.65
82	GGEZSM1007E12	CD761239	similar to SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3 [Rattus norvegicus]	2.06	0.68
83	GGEZEB2005H06		No Hit	2.04	0.81
84	GGEZCB1004B10	J02579	heat shock protein 70 [Gallus gallus]	2.04	0.88
85	GGEZSM1005C06	CD761062	Ephrin-B1 precursor (CEK5 ligand) (CEL5-L) gb AAC07986.1 ephrin-B1 [Gallus gallus]	2.02	0.85

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
86	GGEZCB1005B02	CO503087	unnamed protein product [Homo sapiens]	2.02 0.47
87	GGEZCB1014A01		No Hit	2.02 0.74
88	GGEZCB1023B10		similar to actin, alpha, cardiac [Rattus norvegicus]"	2.01 0.43
89	GGEZCB1020D08	CO504245	mahogunin, ring finger 1	1.98 0.70
90	GGEZCB1019D01		No Hit	1.98 0.54
91	GGEZEB1002F05		No Hit	1.97 0.82
92	GGEZEB1019F06		No Hit	1.94 0.84
93	GGEZEB1001H01		No Hit	1.94 0.65
94	GGEZCB1028F09		similar to 40S ribosomal protein S28 [Rattus norvegicus]	1.91 0.50
95	GGEZCB1014A05		myeloid leukemia factor 2 homolog; EST C77284; Myelodysplasia-myeloid leukemia factor 2 [Mus musculus]	1.88 0.51
96	GGEZCB1004H10	CO503380	troponin T, skeletal muscle, isoform 1 - troponin T type 3 (skeletal, fast)	1.88 0.42
97	GGEZCB1020G09		multiple ankyrin repeats single KH domain protein isoform 2 [Homo sapiens]	1.88 0.62
98	GGEZCB1014F03		No Hit	1.86 0.64
99	GGEZEB2002H02		No Hit	1.83 0.68
100	GGEZLB1004C04		Similar to cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) [Xenopus laevis]	1.83 0.65
101	GGEZEM1003H04		similar to p57kip2 [Rattus norvegicus]	1.80 0.74
102	GGEZEB2005F06		hypothetical protein [Homo sapiens]	1.76 0.69
103	GGEZCB1008B11		hypothetical protein MBNC051602 [Mesorhizobium sp. BNC1]	1.76 0.45
104	GGEZEB1014B05		Similar to ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) [Xenopus laevis]	1.76 0.71
105	GGEZEB1013A07		pro-pol-dUTPase polypeptide - murine endogenous retrovirus ERV-L	1.75 0.43
106	GGEZEB1001G02		No Hit	1.74 0.66
107	GGEZCB1019A01	CO504358	heat shock protein 90 - chicken	1.72 0.69
108	GGEZCB1023D08		No Hit	1.70 0.37
109	GGEZCB1009C02		Pros26.4-prov protein [Xenopus laevis]	1.69 0.38
110	GGEZCB1004D07		Homo sapiens GA binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kDa	1.68 0.50
111	GGEZLB1003F11		potential nuclear protein C5ORF5; GAP-like protein [Homo sapiens]	1.68 0.66
112	GGEZEB1019H01		similar to epsilon isoform of 14-3-3 protein [Homo sapiens]	1.67 0.71
113	GGEZCB1016G09		eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	1.67 0.71

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
114	GGEZLB1010A05		"RIO kinase 1 isoform 1; AD034 protein [Homo sapiens]	1.66 0.68
115	CP1002F11		No Hit	1.63 0.62
116	GGEZCB1019D11		ALPHA CRYSTALLIN B CHAIN	1.63 0.58
117	GGEZCB1027G01		similar to RIKEN cDNA 0610009I16 [Rattus norvegicus]	1.62 0.42
118	GGEZEB1014F11		Unknown (protein for MGC:8749) [Homo sapiens]	1.62 0.61
119	GGEZCB1016B03		No Hit	1.60 0.38
120	GGEZCB1022D05		No Hit	1.60 0.64
121	GGEZEB1020A11		cell division cycle associated 8 [Homo sapiens]	1.56 0.51
122	GGEZCB1022F11		CPEB-associated factor Maskin (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-associated factor Maskin)	1.55 0.62
123	GGEZEB2011C07		similar to cytochrome P450 2P1 [Rattus norvegicus]	1.54 0.38
124	GGEZCB1014A03		peroxisome proliferator-activated receptor binding protein; PPARG binding protein; thyroid receptor interacting protein 2	1.53 0.52
125	GGEZCB1019G03		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Gallus gallus]	1.51 0.35
126	GGEZEB2005D04		No Hit	1.51 0.56
127	GGEZCB1011D11		Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta [Bos taurus]	1.50 0.53
128	GGEZEB2014C05		"adipocyte transcription factor, AEBP1 - human	1.49 0.45
129	GGEZEB2004F10		Similar to integral membrane protein 2A [Xenopus laevis]	1.46 0.41
130	GGEZEB2004C12		No Hit	1.44 0.61
131	GGEZEB1005B01		unknown [Gallus gallus]	1.41 0.51
132	GGEZEB2014G06		KIAA0072 [Homo sapiens]	1.40 0.57
133	GGEZCB1014E01		Aldolase A fructose-bisphosphate [Rattus norvegicus]	1.39 0.48
134	GGEZCB1025H02		KIAA0068 [Homo sapiens]	1.38 0.50
135	GGEZCB1023F06	CO504468	Rps3a-prov protein [Xenopus laevis]	1.35 0.43
136	GGEZEB2013F06	CO507024	Gene hipotético	1.33 0.53
137	GGEZCB1016A11	CO504078	"Troponin T, fast skeletal muscle	1.32 0.54
138	GGEZCB1030A01	CO504909	L-lactate dehydrogenase (chicken) [LDHA]	1.31 0.50
139	GGEZEB2006B06	CO507655	ATP synthase F0 subunit 6 [Gallus gallus]	1.23 0.51
140	GGEZCB1010E07		FLJ31306 protein [Homo sapiens]	1.22 0.35
141	GGEZCB1023F10	CO504472	MTA1 like1 [Homo sapiens]	1.19 0.34
142	GGEZCB1023G01	CO504475	myb-induced myeloid protein 1 (mim-1) precursor - chicken	1.12 0.43
143	GGEZCB1019E12	CO504400	No Hit	1.02 0.36
144	GGEZCB1007D01	CO503483	"myosin heavy chain, fast skeletal muscle, adult [validated] - chicken	0.94 0.37
145	GGEZCB1028B05	CO503692	Similar to ribosomal protein L23 [Homo sapiens]	0.80 0.34
146	GGEZCB1014C03	CO503398	"butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase 1 (gamma-butyrobetaine hydroxylase) [Mus musculus]	0.79 0.26
147	GGEZEB1005A04	CO505364	Unknown (protein for IMAGE:4396587) [Homo sapiens]	0.65 0.23
148	GGEZSM1001C07	CD760819	polyubiquitin with 3 Ub domains [Cryptosporidium parvum]	-0.96 0.22

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
149	GGEZCB1010D08	CO503854	aconitase precursor [Gallus gallus]	-1.09 0.32
150	GGEZEB1019B05	CO506033	No Hit	-1.27 0.55
151	GGEZCB1027E12	CO504541	nebulin [Homo sapiens]	-1.35 0.58
152	GGEZSM1008C01	CD761293	Chain G, Cytochrome Bc1 Complex From Chicken	-1.36 0.43
153	GGEZSM1014E12	CD761767	No Hit	-1.37 0.52
154	GGEZSM1030B11	CD762931	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta); chaperonin containing t-complex polypeptide 1, eta subunit [Homo sapiens]	-1.40 0.44
155	GGEZCB1032H02	CO503066	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1-alpha subunit [Gallus gallus]	-1.42 0.55
156	GGEZCB1032G06	CO503062	similar to Lactoylglutathione lyase (Methylglyoxalase) (Aldoketomutase) (Glyoxalase I) (Glx I) (Ketone-aldehyde mutase) (S-D-lactoylglutathione methylglyoxal lyase) [Rattus norvegicus]	-1.47 0.59
157	GGEZEB2018A02		"tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, eta polypeptide; 14-3-3 eta [Homo sapiens]	-1.48 0.64
158	GGEZSM1016E05	No Hit	-1.57	0.67
159	GGEZEB2002A10		No Hit	-1.59 0.58
160	GGEZEB2019C10		mammary tumor-associated protein INT6 [Homo sapiens]	-1.64 0.61
161	GGEZCB1013D09	CO504732	microsomal glutathione S-transferase 3; microsomal glutathione S-transferase III; microsomal GST-3 [human]	-1.69 0.59
162	GGEZSM1030E05	CD762960	No Hit	-1.70 0.64
163	GGEZEB1002C06	CO505589	RNA-binding protein HuA [Gallus gallus]	-1.72 0.64
164	GGEZCB1011G10	CO503673	similar to Potential phospholipid-transporting ATPase ID (ATPase class I type 8B member 2) [Rattus norvegicus]	-1.72 0.69
165	GGEZEB1037B03	CO504973	No Hit	-1.79 0.60
166	GGEZSM1004B02	CD760976	TIM50L protein [Homo sapiens]	-1.81 0.74
167	GGEZCB1027C03	CO504512	unnamed protein product [Mus musculus]	-1.81 0.66
168	GGEZLB1027C03		No Hit	-1.82 0.77
169	GGEZEB1014A11		"myosin alkali light chain 6, smooth muscle form - chicken"	-1.82 0.73
170	GGEZEB2002H07	CO507582	No Hit	-1.86 0.75
171	GGEZSM1012F08	CD761605	prickle-like 1 [Homo sapiens]	-1.86 0.38
172	GGEZSM1013E07	CD761679	nbla10363 [Homo sapiens]	-1.86 0.73
173	GGEZLB1003F01	CD763616	"Plasma glutathione peroxidase precursor (GSHPx-P) mouse	-1.89 0.80
174	GGEZSM1030G06		ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 3 [Mus musculus]	-1.90 0.73
175	GGEZSM1017D01		No Hit	-1.95 0.84
176	GGEZEB2018A01		ribosomal protein L18a; 60S ribosomal protein L18a [Homo sapiens]	-1.96 0.84
177	GGEZEB2017G11		No Hit	-1.97 0.71
178	GGEZEB1016C11	CO505304	No Hit	-1.97 0.67
179	GGEZEB2017A02	CO507704	Ribosomal protein L10a (RPL10A)	-1.98 0.35
180	GGEZEB1027G09	CO506229	No Hit	-2.03 0.88

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
181	GGEZEB2017H06	CO507747	No Hit	-2.04 0.76
182	GGEZLB1008D03	CD763984	40S ribosomal protein S26-2 [Ictalurus punctatus]	-2.04 0.80
183	GGEZSM1019D01	CD761997	HoxB5 [Latimeria menadoensis]	-2.08 0.90
184	GGEZSM1002C08	CD760907	No Hit	-2.12 0.70
185	GGEZEB2004E09	CO506728	No Hit	-2.15 0.69
186	GGEZCB1007A10	CO503456	hypothetical protein [Homo sapiens]	-2.19 0.87
187	GGEZLB1003F03	CD763618	HEMK homolog 7kb [Homo sapiens]	-2.19 0.84
188	GGEZSM1007B01	CD761195	similar to poly(rC) binding protein 4 [Rattus norvegicus]	-2.20 0.58
189	GGEZCB1010G12	CO503888	Fragile X mental retardation syndrome related protein 1 [human]	-2.20 0.95
190	GGEZEB1017E05	CO506331	hypothetical protein FLJ21308 [Homo sapiens]	-2.20 0.91
191	GGEZLB1029F01	CD765407	No Hit	-2.22 0.83
192	GGEZLB1002E12	CD763524	phospholipase A2, activating protein [Rattus norvegicus]	-2.22 0.92
193	GGEZLB1025F01	CD765130	No Hit	-2.23 0.89
194	GGEZEB2003C06	CO507152	No Hit	-2.24 0.84
195	GGEZLB1010A09	CD764127	reverse transcriptase, pol-like - chicken	-2.25 0.67
196	GGEZLB1019E01	CD764725	Histone H5 [Gallus gallus]	-2.26 0.68
197	GGEZEB2019G09		Surf5b [Gallus gallus]	-2.26 0.55
198	GGEZEB1016A03	CO505275	No Hit	-2.27 0.59
199	GGEZSM1014C06	CD761740	No Hit	-2.28 0.71
200	GGEZLB1028D06	CD765330	No Hit	-2.29 0.95
201	GGEZEB2003E08	CO507175	No Hit	-2.30 0.93
202	GGEZEB2001F01	CO506802	INSIG-1 membrane protein [Cricetulus griseus]	-2.30 0.87
203	GGEZCB1027A01	CO504493	succinyl-CoA synthetase alpha subunit [Sus scrofa]	-2.31 0.69
204	GGEZEB1025H05	CO505112	Transcription factor-like 1 [Mus musculus]	-2.32 0.82
205	GGEZLB1009G09	CD764105	No Hit	-2.33 0.79
206	GGEZCB1005E09	CO503125	Prkab2-prov protein [Xenopus laevis]	-2.34 0.99
207	GGEZLB1012A11	CD764296	No Hit	-2.36 0.76
208	GGEZSM1011F10	CD761527	ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit [Columba livia]	-2.39 0.95
209	GGEZLB1004H12	CD763729	No Hit	-2.41 0.98
210	GGEZEB2003E06	CO507173	"Troponin C, skeletal muscle pir TPCHCS troponin C, skeletal muscle - chicken"	-2.41 0.82
211	GGEZEB1026G10	CO505261	No Hit	-2.41 0.55
212	GGEZSM1030F11	CD762977	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D2; snRNP core protein D2 [Homo sapiens]	-2.42 0.68
213	GGEZSM1012A03	CD761550	No Hit	-2.43 1.04
214	GGEZLB1003H04	CD763642	LIM domains containing 1 [Mus musculus]	-2.44 0.98
215	GGEZEB2017C01	CO507713	No Hit	-2.44 0.73
216	GGEZEB2014B05	CO507289	No Hit	-2.44 0.87
217	GGEZEB2018D11	CO506861	mKIAA0885 protein [Mus musculus]	-2.45 0.55
218	GGEZLB1005F01	CD763770	No Hit	-2.47 0.88
219	GGEZSM1013A02	CD761632	Hemoglobin alpha-D chain pir HACH1 hemoglobin alpha-D chain - chicken	-2.49 0.98

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(continuação)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
220	GGEZLB1003G06	CD763632	No Hit	-2.51 0.88
221	GGEZLB1009B12	CD764054	similar to CG14238-PA [Homo sapiens]	-2.53 0.83
222	GGEZEB1029D03	CO506439	No Hit	-2.53 0.74
223	GGEZEB1029A05		No Hit	-2.54 0.91
224	GGEZCB1006H10	CO504067	"vesicle-associated membrane protein A (33 Kd) [rattus]	-2.57 0.86
225	GGEZLB1018D10	CD764651	No Hit	-2.57 0.68
226	GGEZEB1009H04	CO506408	No Hit	-2.59 1.04
227	GGEZEB1005A02	CO505362	No Hit	-2.60 1.06
228	GGEZEB1020G08	CO505704	Splicing factor 3B subunit 3 (Spliceosome associated protein 130)	-2.61 0.64
229	GGEZSM1007A07	CD761190	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k; muscle specific gene [Homo sapiens]	-2.61 0.66
230	GGEZEB1027D08		No Hit	-2.65 1.04
231	GGEZCB1010F03	CO503868	MnSOD [Gallus gallus]	-2.66 1.03
232	GGEZLB1026G04	CD765225	similar to Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 [rattus norvegicus]	-2.66 0.76
233	GGEZLB1026E07	CD765207	Decorin precursor (Bone proteoglycan II) (PG-S2) [Gallus gallus]	-2.69 0.82
234	GGEZCB1004D02	CO503340	"Calpain, large [catalytic] subunit (Calcium-activated neutral proteinase) (CANP) (Mu/M-type)	-2.71 0.57
235	GGEZEB1023A09	CO505438	No Hit	-2.74 1.11
236	FM1001E04		No Hit	-2.76 0.92
237	GGEZEB2012E02	CO507473	No Hit	-2.76 1.06
238	GGEZLB1004F10	CD763711	"CG8947-PA [Drosophila melanogaster]	-2.78 0.94
239	GGEZEB1034F03	CO505992	No Hit	-2.82 1.08
240	GGEZEB1030C06	CO505141	"pigment epithelium-derived factor [Mus musculus]	-2.84 0.56
241	GGEZCB1025H03	CO504350	corneal endothelium specific protein 1 [Homo sapiens]	-2.85 0.58
242	GGEZEB2014H11	CO507350	Mimecan precursor (Osteoglycin) gb AAD21085.1 osteoglycin [Gallus gallus]	-2.85 1.01
243	GGEZLB1020G05	CD764823	No Hit	-2.88 1.12
244	GGEZSM1008B01	CD761282	HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN HSP 90-BETA pir JC1468 heat shock protein 90 beta	-2.88 0.88
245	GGEZSM1005D11	CD761074	"zinc finger protein 36, C3H type-like 1; butyrate response factor 1 [Mus musculus]	-2.93 1.06
246	GGEZSM1007D09	CD761225	Ribosome biogenesis protein Brix gb AAH36741.1 BRIX [Homo sapiens]	-2.96 1.12
247	GGEZEB2002D11	CO507549	Unknown (protein for MGC:69128) [Xenopus laevis]	-2.98 0.85
248	GGEZEB2014D06	CO507308	similar to immunoglobulin superfamily [Rattus norvegicus]	-2.99 0.96
249	GGEZLB1006B08	CD763817	unnamed protein product [Mus musculus]	-3.02 0.89

Tabela 9 – Genes diferencialmente expressos no estudo de macroarranjo

(conclusão)				
	Clone	GenBank	Gene	Estim. StdErr
250	GGEZEB1005A01		putative nuclear protein (4B256) [Caenorhabditis elegans]	-3.02 0.89
251	GGEZLB1004G01	CD763713	No Hit	-3.03 0.80
252	GGEZSM1008D09	CD761311	No Hit	-3.04 0.96
253	GGEZLB1002F05	CD763529	RIKEN cDNA 0610025L06 [Mus musculus] dbj BAC27866.1 unnamed protein product [Mus musculus]	-3.15 0.98
254	GGEZCB1022B07	CO503766	No Hit	-3.17 1.02
255	GGEZLB1003D08	CD763599	PD284 protein [Gallus gallus]	-3.19 1.03
256	GGEZEB2006D06	CO507672	No Hit	-3.20 1.05
257	GGEZLB1010A12	CD764129	RPL22 ribosomal protein L22	-3.24 0.77
258	GGEZLB1027D09	CD765269	No Hit	-3.95 1.14
259	GGEZSM1012C09	CD761571	No Hit	-4.35 0.97

Genes codificando proteínas da via glicolítica são exemplos de genes que podem exercer uma grande influência na condição de alteração das propriedades da carne durante o processo de maturação *post mortem*. Durante o período de estresse pré abate, sabe-se que há um aumento no consumo de glicogênio muscular (SANDERCOCK et al., 2001; AKSIT et al., 2006). A via de degradação de glicose é acelerada de modo a contemplar a produção de energia para mecanismos de degradação de proteínas defeituosas e reparo de DNA (KULTZ, 2005). Outra função primordial da aceleração da taxa de glicólise nas células estressadas é a necessidade de regeneração dos equivalentes redutores NADH e NADPH (KULTZ, 2005).

De fato, os resultados obtidos com as hibridizações revelaram que o estresse térmico induziu a expressão de genes da via glicolítica. Lactato desidrogenase A (LDHA), glicose fosfomutase e piruvato quinase são enzimas que atuam na degradação da glicose e demonstraram aumento da expressão sob condição de estresse térmico. Tal fato sugere que durante o período de estresse térmico, houve uma maior mobilização do glicogênio muscular, fornecendo assim, maior aporte de glicose na célula muscular, acarretando em aumento da taxa glicolítica nesses animais. Isso, à princípio, nos levaria a imaginar uma redução do pH final do músculo devido a um aumento da produção e acúmulo de lactato, produto final da glicólise anaeróbia. Entretanto, de acordo com os resultados da qualidade de carne, não houve diferença nos valores de pH entre os animais, descartando-se a idéia de acúmulo de lactato no músculo. Sendo a ocorrência da

síndrome PSE na carne dependente da redução acelerada do pH enquanto o músculo ainda está quente (LUCHIARI FILHO, 2000), a não observação desse fenômeno no experimento está de acordo com a hipótese de não acúmulo de ácido láctico no músculo. Dessa forma, infere-se que o estresse nesses animais induziu um aumento na taxa de glicólise, sem superar a capacidade de regeneração dos cofatores NAD^+ pelo ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). Dessa forma a glicólise, mesmo elevada, ocorreu de forma predominantemente aeróbica, sem o acúmulo de lactato no tecido muscular. Tal condição de fato ocorre e vem sendo causa de outra síndrome importante na depreciação da qualidade da carne de frango: a carne DFD (do inglês Dark, Firm and Dry, i.e, escura, seca e dura). A depleção do glicogênio muscular antes do abate limita produção de lactato *post mortem* e, conseqüentemente, impede a redução do pH, podendo levar a formação da carne DFD (SOUZA, 2006). Embora nosso estudo não tenha evidenciado nenhum caso de carne DFD, os resultados mostram uma semelhança maior da carne dos animais estressados com carnes de aspecto DFD do que com aspecto PSE, como observado nas características de cor e CRA. Assim, infere-se que o estresse de 2 horas em condições de alta temperatura e umidade ocasionou o consumo de glicogênio muscular por via aeróbica, impossibilitando, dessa forma, a ocorrência de carne com síndrome PSE.

Outras proteínas que tiveram a expressão de seus genes induzida pelo estresse foram miostatina, actina 3, fator de crescimento semelhante à insulina II, calpaína 3 e miosina de Cadeia Pesada, todas relacionadas diretamente com a função muscular. Miostatina é uma proteína da família dos Fatores Transformantes de Crescimento β (TGF- β), responsável por inibir a proliferação de células precursoras musculares no durante a embriogênese e formação da musculatura esquelética (LEE; MCPHERRON, 2001; KOCAMIS; KILLEFER, 2002). Pouco se sabe até o momento do papel desempenhado pela proteína em situações de estresse térmico. Alterações na expressão de miostatina foram previamente descritas em trabalho realizado anteriormente pelo Laboratório de Biotecnologia Animal da USP/ESALQ (GABRIEL et al., 2003). Esse trabalho comparou a expressão de miostatina em embriões de galinhas selecionadas para características divergentes – uma para corte e outra para postura – submetidos ou não a condições de estresse térmico. Seus resultados evidenciam uma diminuição na expressão de miostatina em embriões submetidos ao calor. Esse trabalho ainda evidenciou uma redução dos níveis de expressão de outros genes envolvidos na miogênese, em embriões submetidos a altas temperaturas. Tais resultados indicam uma influência da temperatura ambiental na formação da

musculatura esquelética. O resultado obtido no presente trabalho, entretanto, revela indução da expressão de miostatina nos animais submetidos à alta temperatura. Tal evidência sugere diferenças no padrão de expressão e de resposta ao estresse térmico existentes entre o estágio embrionário e o indivíduo adulto.

Outro gene relacionado ao metabolismo muscular e protéico que teve sua expressão alterada com o estresse térmico foi o gene da calpaína 3. Esse gene codifica uma proteína responsável pela degradação protéica que ocorre no período *post-mortem* auxiliando no amaciamento da carne (LUCHIARI FILHO, 2000). O resultado de macroarranjo evidenciou uma redução dos níveis de expressão desse gene entre os animais submetidos ao estresse térmico. Isso pode significar uma influência da temperatura pré abate sobre a característica de maciez da carne. Reduções nos níveis de calpaína refletem menos lise de proteínas miofibrilares, acarretando fibras musculares mais resistentes, ou seja, carne mais dura.

4.3.3 Otimização das condições de PCR para amplificação dos genes

Com base nos resultados de hibridização e nas evidências biológicas, 9 genes foram selecionados para validação por amplificação em PCR quantitativo em tempo real. Para tanto, previamente às análises de quantificação relativa da expressão gênica, foi realizada a otimização das condições de amplificação para cada gene. As condições ótimas de amplificação de cada gene foram descritas na tabela 3. A figura 5 ilustra a amplificação das bandas únicas de cada produto de PCR.

Figura 5 – Amplificação dos genes para análise da expressão relativa em tempo real. Eletroforese em gel de agarose 1%, 5V.cm⁻². (1) e (12) Marcador de peso molecular φX174; (2) Citrato sintase; (3) Glicogênio fosforilase; (4) HSF1; (5) HSF3; (6) HSP70; (7) HSP90; (8) LDH-A; (9) LDH-B; (10) Miostatina; (11) MRPS

A especificidade de amplificação para cada *amplicon* foi ainda confirmada pela realização da curva de desnaturação (*melting curve*) para cada amplificação realizada por qRT-PCR. Essa

curva consiste na elevação gradual da temperatura de incubação das amostras, logo após o término dos ciclos de reação de PCR. Na medida em que se aumenta a temperatura ocorre a desnaturação (ou separação) gradual das fitas de DNA formadas durante a amplificação. A desnaturação ocorrerá em temperaturas distintas, de acordo com o tamanho do amplicon. Uma vez que o corante fluoróforo SYBR green só emite fluorescência quando intercalado na fita dupla de DNA, conforme as fitas de DNA vão se separando, o sinal de fluorescência captado será menor, até cessar por completo. Desse modo, para que a amplificação seja específica, somente um pico deve ser observado no gráfico gerado pela curva de desnaturação (Figura 6). O programa de análise LightCycler Software 3.3 converte o sinal emitido para valores positivos, usando a fórmula $F = -d(F1)/dT$, permitindo melhor visualização da curva em forma de gráfico.

Figura 6 – Curva de desnaturação obtida após quantificação da expressão gênica em termociclador LightCycler. A presença de um pico único evidencia a especificidade da amplificação.

4.3.4 Validação de genes diferencialmente expressos por qRT-PCR

Quatro transcritos indicados como diferencialmente expressos pela hibridização foram selecionados para validação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real. Os genes selecionados de acordo com os resultados de hibridização foram: *miostatina*, *lactato*

desidrogenase A, *HSP 70* e *HSP 90*. Somado a esses 4 genes, outros cinco foram selecionados para avaliação da expressão relativa, com base nos fundamentos biológicos de cada gene. *Glicogênio fosforilase*, *citrato sintase* e *lactato desidrogenase B* foram selecionados devido aos seus importantes papéis na regulação do metabolismo energético e regeneração de equivalentes redutores NADH, essenciais na defesa contra injúria celular. Os fatores de transcrição para as proteínas de choque térmico, HSF1 e HSF3, foram também selecionados para este estudo por sua função de indução da expressão de HSP 70 e 90, igualmente essencial para o desenvolvimento de resistência ao estresse térmico. O método de quantificação relativa proposto por Livak e Schmittgen (2001) foi utilizado para a comparação da expressão dos genes. As medidas de Ct foram tomadas igualmente para cada gene, determinando-se como Ct o ciclo no qual a emissão de fluorescência pelo *SYBR green* atingisse a marca de 1 na escala do programa LightCycler Data Analysis 3.3. Nesse estudo, *HSP 70*, *HSP 90*, *glicogênio fosforilase*, *citrato sintase* e *miostatina* tiveram expressão diferencial entre os tratamentos (tabela 10). A figura 7 mostra as curvas de eficiência de amplificação para cada um dos genes.

Tabela 10 – Ct $\pm$ erro padrão do gene constitutivo MRPS 30 e Δ Ct $\pm$ erro padrão dos genes estudados por qRT-PCR

Gene (n=10)	Tratamento		p
	Não estressados	Estressados	
MRPS 30	31,68 $\pm$ 0,50	31,87 $\pm$ 0,46	0,821
Glicogênio Fosforilase	8,81 ^a $\pm$ 0,41	13,62 ^b $\pm$ 0,40	0,015
Citrato Sintase	-4,58 ^a $\pm$ 0,25	-6,05 ^b $\pm$ 0,47	0,026
HSF 1	2,22 $\pm$ 0,17	1,91 $\pm$ 0,27	0,568
HSF 3	7,98 $\pm$ 0,22	7,61 $\pm$ 0,33	0,781
LDH A	-19,50 $\pm$ 0,34	-19,47 $\pm$ 0,49	0,897
LDH B	1,25 $\pm$ 0,55	1,46 $\pm$ 0,40	0,443
HSP 70	-1,64 ^a $\pm$ 0,87	-10,51 ^b $\pm$ 0,56	<0,001
HSP 90	2,55 ^a $\pm$ 0,20	-5,49 ^b $\pm$ 0,56	<0,001
Miostatina	1,68 ^a $\pm$ 0,17	-1,34 ^b $\pm$ 0,49	0,043

Médias seguidas de letras diferentes para um mesmo gene diferem pelo teste F (<0,05), entre os tratamentos. Valores menores de Δ Ct refletem maior expressão gênica no tecido.

A indução de expressão dos genes HSP 70 e 90 está de acordo com resultados obtidos previamente por outros autores (GABRIEL et al., 2003). Isso pode refletir uma condição de adaptação ao estresse térmico por parte das aves, uma vez que a atuação dessas proteínas é fundamental para a resistência a fatores estressantes. Kultz (2005) revisou sobre a função das HSPs no combate a situações de estresse em animais. Segundo o autor, as HSPs protegem a célula contra injúrias atuando como chaperonas – proteínas que degradam ou reparam outras

proteínas mal formadas – evitando o comprometimento da função celular em decorrência do efeito de proteínas defeituosas. Uma vez que essa ação é bastante dependente de energia proveniente da hidrólise de ATP, a elevação do metabolismo glicolítico e o aumento na velocidade do ciclo de Krebs são pontos fundamentais para a geração de ATP necessária para que essa atividade seja efetivamente desempenhada.

Podemos inferir indiretamente o aumento na taxa glicolítica e na velocidade do ciclo de Krebs pelo perfil de expressão dos genes envolvidos nessas duas importantes rotas metabólicas. *Glicogênio fosforilase*, enzima responsável por catalisar a primeira quebra na molécula de glicogênio, foi o único transcrito estudado que teve sua expressão inibida pelo estresse térmico. Esse resultado poderia nos levar a pensar em um estado de esgotamento das reservas de glicogênio muscular até o momento do abate, resultando na falta de substrato para a enzima glicogênio fosforilase. Já o transcrito de *citrato sintase* teve sua expressão induzida pelo estresse térmico. Essa enzima catalisa a formação de citrato a partir de oxalacetato e acetil-CoA, o primeiro passo do ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico. Embora glicogênio fosforilase tenha apresentado redução dos níveis de expressão nos animais submetidos ao estresse, os demais resultados não sustentam a hipótese de esgotamento das reservas de glicogênio. Pelo contrário, o decréscimo nos valores de pH final e a indução da expressão do gene citrato sintase sugerem que a via glicolítica está ativa. Dessa forma, outros mecanismos de regulação da atividade enzimática de glicogênio fosforilase devem estar atuando, como por exemplo, o controle exercido por fosforilação das enzimas. A expressão aumentada de citrato sintase sugere uma elevação da velocidade do ciclo do ácido cítrico, o que nos leva a crer que as vias de degradação de nutrientes estão bastante ativas. Podemos inferir, então, que a via glicolítica foi aumentada na situação de estresse, convertendo glicogênio muscular até piruvato e, conseqüentemente, suprindo a célula de precursores do para o ciclo de Krebs, com a acetil-CoA.

Figura 7 – Curvas de eficiência de amplificação de qRT-PCR dos genes estudados

Lactato desidrogenase A não confirmou os resultados obtidos nos macroarranjos, mostrando-se sem alteração nos níveis de expressão em relação aos tratamentos. O transcrito de *lactato desidrogenase B* foi também igualmente expresso entre os tratamentos. Ambas as enzimas atuam na conversão de piruvato a lactato, em condições de glicólise anaeróbica. A não alteração no padrão de expressão desses genes sugere que o ciclo do ácido cítrico estava em pleno funcionamento no momento do abate, transformando o piruvato produzido na glicogenólise e glicólise em acetil-CoA em detrimento da formação de ácido láctico. No experimento aqui conduzido, entretanto, esse resultado mostra-se contraditório com o resultado encontrado para pH em 24h. Os valores de pH 24h ligeiramente reduzidos na carne dos animais submetidos ao estresse em relação ao pH dos animais não estressados, e dentro dos valores normais para pH final (5,8), não deixam claro a não formação de ácido láctico. Uma causa dessa redução de pH final na carne dos animais estressados pode ser também o acúmulo de outros produtos dos processos de maturação da carne, capazes de acidificar a carne de modo a diminuir seu pH. Nesse caso, a teoria de não formação ou de não acúmulo de ácido láctico no tecido muscular dessas aves tem embasamento. De forma resumida, os genes envolvidos no metabolismo glicolítico estudados indicam um aumento de glicogenólise, levando a redução das reservas de glicogênio muscular ainda enquanto as aves encontravam-se vivas e o pleno funcionamento do ciclo de Krebs não possibilitou o acúmulo exacerbado de ácido láctico. Alguns autores discutem que o estresse por aumento de temperatura pode ocasionar depleção das reservas de glicogênio muscular antemortem, impedindo a formação de ácido láctico durante a conversão de músculo em carne (BERG, 2001; BRESSAN; BERAQUET, 2002), condição não percebida no presente estudo.

Miostatina foi outro transcrito que teve sua expressão diferencial validada pelo experimento de PCR quantitativo. Os animais estressados apresentaram indução de expressão do gene de miostatina em relação aos animais não estressados. Esse resultado confirma o obtido com as hibridizações dos arranjos de DNA neste estudo e contaria resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório (GABRIEL et al., 2003). Em contrapartida, Gonzáles-Cadavid et al. (1998) evidenciaram aumento dos níveis de expressão de RNA de miostatina em humanos em condições patológicas como infecção pelo vírus do HIV. Levando-se em conta que em situações de estresse, seja por doenças, seja por estresse térmico, a maquinaria celular estará voltada para a sobrevivência do organismo, uma possível explicação para que a miostatina tenha sua expressão

aumentada, é o fato de ela evitar o crescimento muscular e, assim, limitar o gasto energético. Esse mecanismo facilita o direcionamento do uso das moléculas ricas em energia, como o glicogênio, para as rotas relacionadas a glicólise e respiração celular, que estão em ritmo acelerado em situações de estresse térmico.

5 CONCLUSÕES

- Não foi possível reproduzir experimentalmente as condições de PSE ou DFD nos frangos de corte submetidos ao estresse térmico no período pré-abate.
- Os animais submetidos ao estresse térmico de 35°C e 85% de umidade durante duas horas prévias ao abate evidenciaram padrões de expressão gênica diferentes daqueles animais mantidos em condições termoneutras. Isso sugere que o modo como o repertório genético é ativado e regulado desempenha um importante papel em situações de elevado estresse térmico.
- Genes relacionados ao metabolismo energético mostraram-se com expressão alterada nos animais estressados. *Glicogênio fosforilase* teve inibição de expressão, enquanto que *citrato sintase* mostrou-se induzida pelo estresse térmico. Isso pode refletir uma elevada taxa glicolítica nos animais estressados.
- Genes de resistência a choque térmico (*HSP 70* e *HSP90*) foram induzidos nos animais estressados, confirmando o papel de proteção oferecida por seus produtos em situações de estresse.
- *Miostatina* teve expressão induzida pela alta temperatura, indicando uma possível ação benéfica para o animal quando submetidos a fatores de estresse térmico e desgaste energético.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.; MCCOMBIE, W.R.; VENTER, J. C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, p. 1651-1656, 1991.
- AKSIT, M.; YALÇIN, S.; ÖZKAN, S.; METIN, K.; ÖZDEMİR, D. Effects of Temperature During Rearing and Crating on Stress Parameters and Meat Quality of Broilers. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, n 11, p. 1867-1874, 2006.
- ALLEN, C.D.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUT, J.K.; RUSSEL, S.M. The relationship of broiler breast color to meat quality shelf-life. **Poultry Science**, Ithaca, v. 77, p. 361-366, 1998.
- ALMEIDA, S. E.M.; ALMEIDA, E.A.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A.. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics - Zeitschrift Für Tierzucht Und Zuchtungsbiologie**, Berlin, v. 120, p. 1-7, 2003.
- ANADÓN, H.L.S. **Biological, nutritional and processing factors affecting breast meat quality of broilers**. 2002. 171p. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal and Poultry Sciences) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002.
- ANTHONY, N.B. A review of genetics practices in poultry: efforts to improve meat quality. **Journal of Muscle Food**, Malden, v. 9, p. 25-33, 1998.
- ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews-Genetics**, London, v. 5, n. 33, p. 202-212, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE CARNE DE FRANGO. Estatísticas da produção. Disponível em: <www.abef.com.br> Acesso em: 2 mar. 2007.
- BARBUT, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. **British Poultry Science**, London, v. 38, p. 355-358, 1997.
- BARBUT, S. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. **Journal of Muscle Food**, Malden, v. 9, p. 35-49, 1998.
- BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; LEDUR, M.C.; CAMPOS, R.L.R.; AMBO, M.; COUTINHO, L.L. Identificação de QTL para peso corporal em aves (*Gallus gallus*) no cromossomo 4. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos ...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1 CD-ROM.
- BERG, E.P. **Influence of stress on composition and quality of meat poultry, and meat products**. 2001. Disponível em: <<http://www.fass.org/fass01/pdfs/Berg.pdf>> Acesso em: 05 ago. 2005.

- BIANCHI, M.; PETRACCI, M.; SIRRI, F.; FOLEGATTI, E.; FRANCHINI, A.; MELUZZI, A. The Influence of the Season and Market Class of Broiler Chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 86, p. 959-963, 2007.
- BRESSAN, M.C.; BERAQUET, N.J. Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da care de peito de frango. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1049-1059, set./out. 2002.
- BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Mapping quantitative trait loci and identification of genes that control fatness in poultry. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 61, n.4, p. 441-446, 2002.
- BURNSIDE, J.; NEIMAN, T.; TANG, J.; BASOM, R.; TAUBOT, R.; ARONSZAJN, M.; BURT, D.; DELROW, J. Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 13, p. 1-11, 2005.
- BUTTE, A. The use and analysis of microarray data. **Nature Reviews**, London, v. 1, p. 951-960, Dec. 2002.
- CANEVER, M.D.; TALAMINI, D.J.D.; CAMPOS, A.C.; SANTOS FILHO, J.I. **A cadeia produtiva do frango de corte no Brasil e na Argentina**. Concórdia: EMBRAPA, CNPSA, 1997. 150 p. (EMBRAPA. CNPSA. Documentos, 45).
- CLASSEN, H.L. Managing metabolic disease in rapidly growing strains of poultry. In: HILL, W.G.; BISHOP, S.C.; MCGUIRK, B.; MCKAY, J.C.; SIMM, G.; WEBB, A. (ed.). **The challenge of genetic change in animal production**. Edinburgh: Journal of the British Society of Animal Science, 2000. p.63-64. (Occasional publication, 27).
- CROS, N.; MULLER, J.; BOUJU, S.; PIÉTU, G.; JACQUET, C.; LÉGER, J.J.; MARINI J.F.; DECHESNE, C.A. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 276, p. 308-316, 1999.
- De KONING, D.J.; WINDSOR, D.; HOCKING, P.M.; BURT, D.W.; LAW, A.; HALEY, C.S.; MORRIS, A.; VINCENT, J.; GRIFFIN, H. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, n. 5, p. 1158-1165, 2003.
- DEBUT, M.; BERRI, C.; BAEZA, E.; SELLIER, N.; ARNOULD, C.; GUEMENE, D.; JEHL, N.; BOUTTEN, B.; JEGO, Y.; BEAUMONT, C.; LE BIHAN-DUVAL, E. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and pre-slaughter stress conditions. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 1829-1838, 2003.
- DEEB, N.; CAHANER, A. Genotype-by-environment interaction with broiler genotypes differing in growth rate: 2. The effects of high ambient temperature on dwarf versus normal broilers. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 541-548, 2001.
- DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A.A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 743-746, 1999.

DUKES, H.H. Fisiologia dos animais domésticos. 11.ed. SWENSON, M.; REECE, W. (ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

ENGERT, J.C.; BERGLUND, E.B.; ROSENTHAL, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-1-stimulated myogenesis. **Journal of Cell Biology**, Rockefeller, v. 135, n. 2, p. 431-440, 1996.

FLETCHER, D.L. Broiler breast meat color variation, pH and texture. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 1323-1327, 1999.

FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization for gene expression analysis. **BioTechniques**, Natick, v. 29, n. 5, p. 1042-1055, Nov. 2000.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; de LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v. 253, n. 5018, p.448-451, 1991.

GABRIEL, J.E.; ALVARES, L.E.; GOBET, M.C.; PAZ, C.C.P.; PACKER, I.U.; MACARI, M.; COUTINHO, L.L. Expression of MyoD, myogenin, myostatin and Hsp70 transcripts in chicken embryos submitted to mild cold and heat. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 28, p. 261-269, 2003.

GAYA, L.G.; FERRAZ, J.B.S. Quantitative-genetic aspects of broiler meat quality. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 349-356, jan./fev. 2006.

GONZALEZ-CADAVID, N.F.; TAYLOR, W.E.; YARASHESKI, K.; SINHA-HIKIM, I.; MA, K.; EZZAT, S.; SHEN, R.; LALANI, R.; ASA, S.; MAMITA, M.; NAIR, G.; ARVER, S.; BHASIN, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 95, p. 14938-14943, 1998.

GRAU, R.; HAMM, R. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Fleisch. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.4, p.295-297, 1953.

GROBET, L.; MARTIN, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 1, p. 71-74, Sept. 1997.

GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E.I.; LARA, J.A.F.; SHIMOKOMAKI, M. Bem estar animal e qualidade da carne das aves: uma exigência dos consumidores. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 26, n. 301, p. 36-44, 2002.

HOCKING, P.M.; BURT, D.W. Identifying quantitative trait *loci* for growth, muscling and fatness traits in a broiler x layer cross. **Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium**, Armidale, v. 15, p. 168-171, 2003.

JUDGE, M.D.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; HEDRICK, H.B.; MERDEL, R.A. **Principles of meat science**. 2nd ed. Dubuque: Kendall/ Hunt Publ. 1989. 351 p.

KANNAN, G.; MENCH, J.A. Prior handling does not significantly reduce the stress response tp pre-slaughter handling in broiler chickens. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 51, p. 87-99, 1997.

KOCAMIS, H.; KILLEFER, J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domestic Animal Endocrinology**, Aubur, v. 23, p. 447-454, 2002.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual review of Physiology**, Palo Alto, v. 67, p. 225–257, 2005.

LAGANA, C. **Otimização da produção de frangos de corte em estresse por calor**. 2005. 180 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LAGANA, C.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; KRATZ, L.R.; PINHEIRO, C.C. Effects of the Reduction of Dietary Heat Increment on the Performance, Carcass Yield, and Diet Digestibility of Broilers Submitted to Heat Stress. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 9, p. 45-51, 2007.

Le BIHAN-DUVAL, E.; MILLET, N.; REGMIGNON, H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, n. 6, p. 822-826, 1999.

Le BIHAN-DUVAL, E.; BERRI, C.; BAÉZA, E.; SANTÉ, V.; ASTRUC, T.; RÉMIGNON, H.; Le POTTIER, G.; BENTLEYE, J.; BEAUMONTA, C.; FERNANDEZ, X. Genetic parameters of meat technological quality traits in a grand-parental commercial line of turkey. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 35, p. 623-635, 2003.

LEDGER, T.N.; PINTON, P.; BOURGES, D.; ROUMI, P.; SALMON, H.; OSWALD, I.P. Development of a microarray to specifically analyze immunological gene expression in swine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 4, p. 691-698, july, 2004.

LEDUR, M.C. Genoma do frango - Mapeamento de QTL. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais ... Piracicaba: FEALQ**, 2001. p. 620-633.

LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; SAATKAMP, M.G.; BASSI, L.J.; COUTINHO, L.L. Peso e características de carcaça em linhagens utilizadas no desenvolvimento de populações referência para detecção de QTL em aves. In: APINCO 2000, CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000, Campinas. **Anais ... Campinas: FACTA**, 2000a. p.73.

- LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; SILVA, V.S.; VENTURA, L.; COUTINHO, L.L. Divergence of strains and strain crosses used to develop new reference populations for QTL studies in poultry. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 21. 2000, Montreal. **Abstracts ...** Montreal. 2000b. 1CD-ROM.
- LEE, S.J.; MCPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.
- LENGERKEN, G.; MAAK, S.; WICKE, M. 2002. Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry. **Veterinarija ir Zootechnika**, Kaunas, v. 20, ed. 42, p. 82-86. 2002.
- LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H.; MITCHELL, A.D.; ASHWELL, C.M.; LAMONT, S.J. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with Transforming Growth Factor- β genes. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 347-356, 2003.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, Aug. 1992
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: o autor, 2000, 134 p.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Genoma de bovinos: mapeamento de caracteres de importância econômica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 599 – 611.
- McCURDY, R.D.; BARBUT, S.; QUINTON, M. Seasonal effect on pale soft exsudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Research International**, Essex, v. 29, p. 363-366, 1996.
- McKAY, J.C.; BARTON, N.F.; KOERHUIS, A.N.M.; McADAM, J. The challenge of genetic change in the broiler chicken. In: HILL, W.G.; BISHOP, S.C.; MCGUIRK, B.; MCKAY, J.C.; SIMM, G.; WEBB, A. (ed.). **The challenge of genetic change in animal production.**, Edinburgh: Journal of The British Society of Animal Science, 2000. p.1-7. (Occasional publication, 27).
- McKEE, S.R.; SAMS, A.R. *Rigor mortis* development at elevated temperatures induces pale soft exsudative turkey meat characteristics. **Poultry Science**, Ithaca, v. 77, p. 169-174, 1998.
- McPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.
- MOLETTE C.; REMIGNON, H.; BABILE, R. Effect of rate of pH fall on turkey breast meat quality. **British Poultry Science**, London, v. 44, n. 5, p. 787-788, 2003.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; COUTINHO, L.L. Identificação de QTLs associados a peso corporal no cromossomo 1 de aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, Suplemento 5, p. 109, 2003.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.R.; COUTINHO, L.L. Identificação de locos controladores de características quantitativas (QTL) para desempenho e deposição de gordura no cromossomo 1 da galinha. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais ...** Pirassununga: SBMA, 2004. 1CD-ROM.

OFFER, G.; KNIGHT, P. The structural basis of water holding in meat. Part 2. Drip losses. In: R. Lawrie (Ed.): **Developments in Meat Science**. London: Elsevier Applied Science, vol. 4, p. 173-243. 1988.

OLIVO, R. Fatores que influenciam na cor de filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 25, n. 289, p. 44-49, 2001.

OWENS, C.M.; MATTHEWS, N.S.; SAMS, A.R. The use of the halothane gas to identify turkeys prone to development pale, soft, exudative meat when transported before slaughter. **Poultry Science**, Ithaca, v. 79, p. 789-795, 2000.

PLASTOW, G.S. The changing world of genomics and its impact on the pork chain. **Advances in Pork Production**. Alberta, v. 14, p. 67-71, 2003.

RAJEEVAN, M.S.; RANAMUKHAARACHI, D.G.; VERNON, S.D.; UNGER, E.R. Use of Real-Time Quantitative PCR to validate the results of cDNA Array and Differential Display PCR technologies. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 443-451, 2001.

RUY, D.C.; NONES, K.; BARON, E.E.; LEDUR, M.C.; CAMPOS, R.L.R.; AMBO, M.; COUTINHO, L.L. Identificação de QTL influenciando o peso corporal no cromossomo 3 de aves (*Gallus gallus*). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos ...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1CD-ROM.

SAMS, A. R. Meat Quality during processing. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 798-803, 1999.

SANDERCOCK, D.A.; HUNTER, R.R.; NUTE, G.R.; MITCHELL, M.A.; HOCKING, P.M. Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: Implications for meat quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 418-425, 2001.

SAS INSTITUTE, System for microsoft Windows: release 8.2, Cary, 2002.

SCHENA M.; SHALON D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v. 270, p. 467-470, oct., 1995.

SCHMID, M.; NANDA, I.; GUTTENBACH, M.; STEINLEIN, C.; HOEHN, H.; SCHARTL, M.; HAAF, T.; WEIGEND, S.; FRIES, R.; BUERSTEDDE, J.M.; WIMMERS, K.; BURT, D.W.;

SMITH, J.; A'HARA, S.; LAW, A.; GRIFFIN, D.K.; BUMSTEAD, N.; KAUFMAN, J.; THOMSON, P.A.; BURKE, T.A.; GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; MORISSON, M.; PITEL, F.; TIXIER-BOICHARD, M.; LADJALI-MOHAMMEDI, K.; HILLEL, J.; MÄKI-TANILA, A.; CHENG, H.H.; DELANY, M.E.; BURNSIDE, J.; MIZUNO, S. First report on chicken genes and chromosomes. **Cytogenetics Cell Genetics**, Basel, v. 90, p.169-218, 2000.

SCHUMMER, M.; NG, W. V.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B. BEDNARSKI, D. W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Amsterdam, v. 238, n. 2, p. 375-385, 1999.

SOUZA, H.B.A. de. Parâmetros físicos e sensoriais utilizados para avaliação de qualidade da carne de frango. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5., Florianópolis. **Anais ...** Itu: AVESUI, 2006. p. 91-96.

SWATLAND, H.J. **On-line evaluation of meat**. Lancaster: Technomic, 1995. 247 p.

TANKSON, J.D.; VIZZIER-THAXTON, Y.; THAXTON, J.P; MAY, J.D.; CAMERON, J.A. Stress and nutritional quality of broilers. **Poultry Science**, Ithaca, v.80, n. 9, p. 1384-1389, 2001.

VAN LAACK, R.L.J.M.; LIU, C.H.; SMITH, M.O.; LOVEDAY, H.D. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. **Poultry Science**, Ithaca, v. 79, p. 1057-1061, 2000.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; TRAVERSO, G.; CROIX, B.S.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270. n. 5235, p. 484-487, 1995.

WOELFEL, R.L.; SAMS, A.R. Marination performance of pale broiler breast meat. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, n. 10, p. 1519-1522, 2001.

WOELFEL, R.L., OWENS, C.M., HIRSCHLER, E.M., MARTINEZ-DAWSON, R., SAMS, A. R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. **Poultry Science**, Ithaca, v. 81, p. 579-584, 2002.

WOLFINGER, R.D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E.D.; BENNET, L.; HAMADEH, H.; BUSHEL, P.; AFSHARI, C.; PAULES R.S. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 8, n.6, p. 625-637, 2001.

ZANELLA, E.L; LEDUR, M.C.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; COUTINHO, L.L. Development of a new reference population for QTL detection in poultry. In: **Poultry Science**, Ithaca, v.79, suppl. 1, p. 61, 2000. Apresentado no POULTRY SCIENCE ANNUAL MEETING, 89., 2000, Montreal.

ZHAO, H.; ROTHSCCHILD, M.F.; FERNANDO, R.L.; DEKKERS, J.C. Tests of candidate genes in breed cross populations for QTL mapping in livestock. **Mammalian Genome**, New York, v. 14, n. 7, p. 472-82, 2003.