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

A expressão da isoforma de calpastatina responsiva à ractopamina altera a maciez da carne, com implicações na eficiência de crescimento de suínos

Eric Franchi Leonardo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2008

Eric Franchi Leonardo
Engenheiro Agrônomo

A expressão da isoforma de calpastatina responsiva à ractopamina altera a maciez da carne, com implicações na eficiência de crescimento de suínos

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO FRANCISQUINE DELGADO**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2008

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

Leonardo, Eric Franchi
A expressão da isoforma de calpastatina responsiva à ractopamina altera a maciez da carne, com implicações na eficiência de crescimento de suínos / Eric Franchi Leonardo. - - Piracicaba, 2008.
64 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Carnes e derivados – Qualidade 2. Crescimento animal 3. Expressão gênica 4. Porco Duroc 5. Porco Large White I. Título

CDD 636.413

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

“A felicidade e a realização profissional são conseqüências naturais de atitudes corretas”. (Epícteto de Hierápolis)

“Não há caridade sem esquecimento dos ultrajes e das injurias; não há caridade sem perdão, nem com o coração tomado de ódio”. (Envangelho segundo o Espiritismo)

"O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não se vangloria, não se ensoberbece, não se porta inconvenientemente, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal; não se regozija com a injustiça, mas se regozija com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor". (I Coríntios, 13: 4-7;13)

A você ***Patricia*** minha amada, sempre esteve do meu lado, em todos os momentos de nossas vidas. Minha companheira, minha luz, minha VIDA!

Aos meus pais ***Gislem*** e ***Luiz Carlos***, pelo amor, dedicação e todo esforço para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Devo tudo a vocês, AMO VOCÊS!

As minhas irmãs ***Noele*** e ***Adriele***, pela amizade, pelo carinho e que mesmo longe sou eternamente grato, amo muito vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida concedida;

À gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por de ter cursado a graduação e a pós-graduação e ser mais um filho ESALQUEANO;

Ao Profº. Drº. Eduardo Francisquine Delgado pela orientação segura, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança depositada e acima de tudo, pela amizade construída, muito obrigado;

Ao meu grande amigo e companheiro Ivan Luis Stella, pela amizade, luta, força de vontade, sem as quais não teríamos sucesso neste trabalho. As glórias deste trabalho são suas também, muito obrigado;

Ao Profº. Drº. Dante Pazzanese Lanna, por ceder o seu laboratório para as análises, muito obrigado;

Ao Profº. Drº. Luiz Lehmann Coutinho, por ceder o seu laboratório e pela grande colaboração na realização deste trabalho, muito obrigado;

Ao Profº. Drº. Flávio Vieira Meirelles, pela grande colaboração na realização deste trabalho, muito obrigado;

Ao Profº. Drº. José Eurico Possebon Cyrino, mais conhecido como Profº. Zico, pela amizade construída e pelos ensinamentos durante toda minha vida Esalqueana, muito obrigado;

À Profª. Carmen (LAN) e Carmenzetes, pela grande ajuda dada em nossas análises e pela oportunidade de conhecer e participar de outros experimentos, muito obrigado;

Ao Profº. Drº. Flávio Cesar Almeida Tavares, pela amizade, ensinamentos durante o PET – Biotecnologia agrícola;

Aos Profsº. Drsº. Raul Machado Neto e Raul Dantas D´Arce, verdadeiros mestres no saber e nas relações humanas, muito obrigado;

Aos meus grandes amigos, Maykol, Uira, Kretino e Guzrá, irmãos que Deus colocou no meu caminho, muito obrigado;

À minha grande amiga Anali, vinda de São Luiz, companheira de todas as horas, bares, cervejas e muitas histórias, muito obrigado;

As grandes amigas e colegas de trabalho, Patricia, Tuka e Helena, pela amizade e pela ajuda no trabalho, sem as quais não teria conseguido, muito obrigado;

A todos os amigos que participam ou participaram do GAMA, Carol, Priscila, Paulo, Fernando, Carlos em especial ao meu grande amigo paraguaio Rafael Ferreira Soria, pelos anos de convívio, dificuldades e companheirismo, muito obrigado;

A todo pessoal do prédio da Zoologia, grandes pessoas que entraram em meu caminho e deixaram suas marcas, não irei citar os nomes para não esquecer ninguém, muito obrigado;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, muito obrigado;

E finalmente a todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho, muito obrigado.

SUMARIO

RESUMO 10
ABSTRACT 11
1 Introdução 12
2 Revisão bibliográfica 13
2.1 Suinocultura 13
2.2 Beta agonistas adrenérgicos 15
2.3 Calpastatina 17
Referências 21
3 INCREMENTO NO DESEMPENHO DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC RECEBENDO DIFERENTES DOSES DE RACTOPAMINA E MODIFICAÇÕES NA COR DA CARNE 27
Resumo 27
Abstract 28
3.1 Introdução 29
3.2 Materiais e Métodos 29
3.2.1 Local 29
3.2.2 Animais 30
3.2.3 Manejo de rotina 30
3.2.4 Tratamento com ractopamina 30
3.2.5 Análises de desempenho e qualidade da carne 30
3.2.6 Análise estatística 32
3.3 Resultados e Discussão 32
3.3.1 Análises de desempenho 32
3.3.2 Qualidade da carne 34
3.3.2.1 pH, temperatura e cor 34
3.3.2.2 Área de olho do lombo e espessura de gordura 36
3.4 Conclusão 38
Referências 39

4 RELAÇÃO ENTRE A FREQÜÊNCIA RELATIVA DE ISOFORMAS DE CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC 41
Resumo 41
Abstract 42
4.1 Introdução 43
4.2 Materiais e métodos 44
4.2.1 Local 44
4.2.2 Animais 44
4.2.3 Tratamento com ractopamina 44
4.2.4 Força de cisalhamento e Índice de fragmentação miofibrilar 44
4.2.5 Identificação do genótipo Halotano 45
4.2.6 Coleta de tecidos e extração de RNA total 45
4.2.7 Síntese cDNA 45
4.2.8 Escolha das isoformas do gene da calpastatina para PCR quantitativo em tempo real e síntese dos iniciadores 46
4.2.9 Validação dos genes por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) 47
4.2.10 Análise estatística da expressão gênica 48
4.3 Resultados e discussão 49
4.3.1 Otimização das condições de PCR para amplificação das isoformas 49
4.3.2 Qualidade da carne e sua relação com a expressão relativa das isoformas 51
4.4 Conclusão 56
Referências 57
ANEXOS 59

RESUMO

A expressão da isoforma de calpastatina responsiva à ractopamina altera a maciez da carne, com implicações na eficiência de crescimento de suínos

O mercado consumidor está cada vez mais exigente com relação à qualidade dos produtos cárneos. A ractopamina exerce influência pronunciada sobre as variáveis de desempenho, aumentando, principalmente, o percentual de carne magra, por meio da redução da espessura de toucinho e aumento da área de olho de lombo. Porém estas modificações são acompanhadas de redução na qualidade da carne, alterando cor e principalmente maciez, pois a ractopamina atua na expressão de isoformas da calpastatina, inibidor do processo de amaciamento da carne. Sessenta animais (30 machos castrados e 30 fêmeas), sendo 30 Large White (LW) e 30 Duroc (DU) foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam diferentes doses de ractopamina (RAC): 0 (controle), 10 ppm e 20 ppm na dieta. O fornecimento de RAC iniciou-se quando os animais atingiram 85,0 kg±6.5 de peso vivo e terminou quatro semanas depois com os animais pesando 115,0 kg±11,0. Após o abate, as carcaças foram resfriadas por 24 horas e as medições de pH e temperatura foram feitas 0, 3, 6, 9 e 24 horas. O músculo *L. dorsi* da meia carcaça direita foi separado para medição da área de olho do lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EG) e cor 24 horas. Amostras do mesmo músculo foram separadas para quantificação da expressão gênica relativa das três isoformas (Calp1 – 1xa; Calp2 – 1xb; Calp 3 – 1u) do gene da calpastatina e relacionadas com índice de fragmentação miofibrilar, medido 0, 3 e 5 dias pós-abate, e força de cisalhamento 1 e 5 dias pós-abate. Houve melhora na conversão alimentar para os animais tratados com RAC. Os animais LW apresentaram maior AOL do que os animais DU. Fêmeas e machos apresentaram diferença na AOL. A EG apresentou interação entre raça e sexo e ainda apresentou diferenças entre as doses de RAC e também quando comparadas com o controle. A carne dos animais DU apresentou valores superiores para a* e b*, e menor valor de pH final comparada as amostras de LW, gerando carne com coloração vermelha mais clara. Os resultados confirmam a produção de carne mais magra quando adicionado ractopamina na dieta, entretanto nestas raças puras a adição de RAC não influenciou na AOL. Em relação às isoformas, a Calp 1 e 3 foram expressas em quantidades muito acima da isoforma Calp 2, esta ultima apresentando esperada baixa expressão. Os animais DU apresentaram, tanto no dia 1 como no dia 5, uma menor força de cisalhamento em relação aos animais Large White e isto pode ser explicado pelo aumento da expressão da isoforma Calp1 nesses últimos, o mesmo ocorrendo quando houve o fornecimento da ractopamina. Os animais tratados com 10 e 20 ppm apresentaram uma maior força de cisalhamento, que coincidiu com aumento da expressão da isoforma Calp 1. O índice de fragmentação miofibrilar foi inferior para todos os tempos pós-abate para 20 ppm de ractopamina e para ou 0 e 5 dias pós-abate em animais DU. Houve alta correlação positiva entre nível de expressão da Calp1 e força de cisalhamento. Portanto a raça e a dose influenciaram na expressão relativa das isoformas de calpastatina, o que alterou a maciez da carne suína.

Palavras-chave:Large White; Duroc; Desempenho; pH; Maciez; Expressão gênica

ABSTRACT

The expression of calpastatina isoform responsive of ractopamine modifies meat tenderness, with implications on efficiency of swine growth

The consumer market is each more demanding time with relation to the meat quality products. Ractopamine exerts sharp influence on performance variable, increasing, meanly, percentage of lean meat, by reduction of fat thickness and increase of rib eye area. However these modifications are associate with reduction in meat quality, as color and meanly tenderness, therefore the ractopamine acts in the isoforms expression of calpastatina, inhibitor of muscular proteolysis process. Sixty animals (30 barrows and 30 gilts) being 30 Large White (LW) and 30 Duroc (DU) were randomly assigned to different doses of ractopamine (RAC): 0 (control), 10 ppm and 20 ppm in the diet. The animals were fed with RAC after 10 weeks of their arrival and 85.0 kg±6.5 of live weight and ended up 4 weeks later with animals at 115.0 kg±11.0. After slaughter, carcasses were cooled for 24h and pH and temperature measurements were 0, 3, 6, 9 and 24h after slaughter. The L. dorsi muscle was collected 24h PM from the right carcass side for rib eye area (REA), fat thickness (FT) and color measurements Samples of the same muscle had been separate for quantification of relative gene expression of three isoformas (Calp1 - 1xa; Calp2 - 1xb; Calp 3 - 1u) of calpastatin gene and related with myofibrillar fragmentation index, measured 0, 3 and 5 days after slaughter, and shear force 1 and 5 days after slaughter. Reaching an improvement of feed conversion on animals with RAC. LW animals had greater REA than DU breed. Sex condition influenced REA. FT presented interaction between breeds and sex condition and were different between RAC doses and also compared to the control diet. The DU meat presented superior values for a* and b*, and also lower ultimate pH value compared to LW, generating meat with reddish pink color. The results confirmed the production on leaner carcasses when RAC is added to diet. However, in those pure breeds doses of RAC did not modify REA. In relation isoforms, Calp 1 and 3 were express in amounts very high of Calp2 isoform, this last presenting waited low expression. Animals DU presented, on day 1 and day 5, a low shear in relation to animals Large White and this can be explained by the increase of the Calp1 isoform expression in these last ones, the same occur when ractopamina was supplied. Treated animals with 10 and 20 ppm presented a higher shear force, that coincided with increase of Calp1 isoform expression. The myofibrillar fragmentation index was low for all times after slaughter for 20 ppm of ractopamina and for 0 and 5 days after slaughter on animals DU. High positive correlation between level of Calp1 expression and shear force was founded. Therefore breed and dose influenced on relative expression of calpastatina isoforms, that modified swine meat tenderness.

Keywords: Large White; Duroc; Performance; pH; Meta Tenderness; Gene Expression

1 Introdução

O crescimento populacional tem sido destaque em muitos meios de comunicação e tem afetado todos os setores da economia mundial. A população mundial em 1950 era de 2,5 bilhões de pessoas. De acordo com dados obtidos junto à ONU (2006), no nosso planeta vivem mais de 6,3 bilhões de pessoas, dessas, mais de 75% vivem em países subdesenvolvidos.

Devido ao crescimento da demanda por alimento e a abertura de mercados para exportação, no setor agropecuário se faz cada vez mais necessário a adoção de novas e melhores técnicas para atingir qualidade e maior produtividade. A competitividade é uma realidade a ser enfrentada pelos produtores brasileiros na busca tanto do mercado interno quanto do mercado externo, num cenário que busca maior rentabilidade econômica e sustentabilidade para o setor primário, isto é, eficácia. Qualquer fator que possa interferir no processo de produção, antes ou pós “porteira”, deve ser conhecido, estudado e explorado.

Neste contexto estão inseridos os produtores de suínos, pois a produção brasileira esteve estagnada até os anos 80. A partir deste período se consolidaram importantes fundamentos que deram a base para a suinocultura que conhecemos hoje, como: adequação de instalações, exigências nutricionais, animais genéticamente melhorados, uso de matrizes suínas cruzadas, fundamentos de biossegurança, cuidados com meio ambiente devido a grande quantidade de dejetos, além de outros fatores.

Hoje a carne suína ocupa uma grande parte das refeições brasileiras, ela é um alimento que enriquece a refeição de maneira nutritiva e saborosa. Sua maciez e sabor característico são os motivos de sua grande aceitação. Apesar de atrair pelo sabor, a carne suína é também excelente fonte de vitaminas do complexo B (Tiamina, Riboflavina, B6 e B12) e minerais (fósforo, zinco e ferro). Ao consumir 100 gramas de carne suína uma pessoa atende aos seguintes percentuais de suas necessidades diárias: 39% da Tiamina, 22% da Niacina, 20% do Zinco, 18% da Vitamina B6, 12% da Vitamina B12, 20% do Ferro e 100% do Fósforo.

A quantidade de gordura saturada ainda é considerada pelo consumidor um problema da carne suína, devido a grande preocupação das pessoas com doenças cardiovasculares. A gordura é, hoje em dia, considerada pela maioria dos consumidores como um componente desnecessário ou, pelo menos, evitável. Nesse sentido, os produtores, em especial os suinocultores, trabalham para melhorar o rendimento das suas explorações através da produção de carne magra em curto espaço de tempo. A utilização de tecnologias como raças geneticamente melhoradas e o fornecimento de agonistas β-adrenérgicos pode facilitar esta ação (RAMOS;SILVEIRA, 2000), embora os resultados do uso destes fármacos nem sempre sejam positivas.

No tocante à qualidade organoléptica do produto carne, a interação entre raça e agonistas β-adrenérgicos pode interferir negativamente na maciez. Muito embora a maciez não ocupe lugar de destaque numa lista de pontos críticos de qualidade para indústria da carne suína, aquela continua sendo um atributo de palatabilidade destacado pelos consumidores internacionais.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Suinocultura

A indústria suinícola brasileira progrediu de forma significativa nos últimos anos. Em 2006 a produção de carne suína cresceu quase 6,0%, atingindo 2,86 milhões de toneladas (ABIPECS, 2007). Este aumento foi concretizado devido à evolução dos conhecimentos na área de nutrição, do melhoramento genético, sanidade, manejo, ambiência e instalações, sendo que hoje temos tecnologia para produção elevada de proteína animal pela espécie suína. Toda esta evolução na área técnica, por sua vez, foi gerada a partir de esforços e investimentos provindos de órgãos de fomento, instituições públicas de pesquisa e empresas privadas.

Em termos de genótipos diretamente envolvidos na evolução da produção podemos destacar algumas raças importantes:

A raça Large White, no registro genealógico, participou com 22,55% em 1998, passando a ocupar o primeiro lugar na composição do rebanho das granjas produtoras de animais puros de origem. Das raças puras criadas, foi a última a ser introduzida no

país, no início da década de 1970 e, pelo desempenho apresentado, vem aumentando anualmente a sua participação. A raça é muito utilizada na produção de híbridos e se caracteriza pela sua prolificidade e excelente habilidade materna.

Já a raça Duroc foi a primeira raça a ser introduzida no país e, portanto, a que iniciou o melhoramento e a tecnificação da suinocultura brasileira. A rusticidade e a fácil adaptação a todas as regiões do país fizeram com que seu uso em cruzamentos industriais propiciasse uma melhoria na qualidade da carne das raças brancas. Já foi a raça mais registrada no "Pig Book Brasileiro" (PBB), hoje participa com 1,94% do total emitido no país, com previsão de manter esta participação.

Resultados comparativos entre diferentes raças mostraram alterações de rendimento de carne que podem estar relacionados aos programas de seleção dos animais. Dados sugerem que a progênie de machos Large White produz mais carne do que a progênie dos machos Duroc, especialmente com ração *ad libitum*. Outros estudos relatam rendimentos superiores de carne da progênie de machos Duroc e Hampshire do que de machos Landrace e Large White (SMITH et al., 1989; BLASCO et al., 1994).

Entre as raças de suínos criadas no Ocidente, a Duroc e seus cruzamentos apresentam o maior conteúdo de gordura intramuscular, seguidas da Hampshire, Landrace, Large White, Landrace belga e Pietrain (BARTON-GADE, 1990; OLIVER, 1994).

Em análise sensorial de maciez e sabor da carne proveniente de animais Duroc, Berkshire e do cruzamento entre eles, os animais Duroc apresentaram carne com as piores avaliações, além da maior perda por cozimento (STOLLER et al., 2003).

Existem diferenças dentro da própria raça quando comparados animais Duroc de dois grupos diferentes, um utilizando progênies de sêmen congelado de animais da década de 80 e outra usando sêmen fresco de animais dos anos 2000, o músculo *L. dorsi* do primeiro grupo apresentou maior acumulo de gordura intramuscular (3,48 vs. 3,09%) e menor força de cisalhamento (5,31 vs. 3,07) comparado com o *L. dorsi* do segundo grupo (SCHWAB et al., 2006)

Apesar de todo o avanço, inclusive na caracterização de aspectos de qualidade da carne e adequação de processamento industrial, a cadeia de produção suína tem

sempre operado em estreitas margens de lucro. Assim, uma das principais metas da cadeia produtiva da carne suína, a exemplo das outras espécies, é a redução dos custos de produção. Em espécies monogástricas, como os suínos, aproximadamente 70% dos custos de produção são devidos à alimentação dos animais (ALBINO; SILVA, 1996).

Dentro deste contexto que está inserida a adição de agonistas β-adrenérgicos na dieta. A incorporação destes na alimentação de animais por algumas semanas tem um efeito de partição de energia, fazendo com que exista um aumento na massa da musculatura esquelética e uma redução da deposição de lipídios no tecido adiposo do animal (COLE et al., 1987; GU et al., 1991ab; MARAMATSU et al., 1991).

2.2 Beta agonistas adrenérgicos

Os agonistas β-adrenérgicos (β AA), embora estejam autorizados na terapia humana e veterinária, principalmente como anti-asmáticos, broncodilatadores e tocolíticos, têm sido, também, usados como promotores de crescimento animal. Estas catecolaminas há muito vêm sendo utilizadas na veterinária em frangos (BUYSE et al., 1991), suínos (BARKER et al., 1992) e bovinos (EISEMANN et al., 1988).

A descrição do mecanismo de ação mais aceita aponta para um receptor (R) na membrana celular que é estimulado pelo agonista (β AA). O complexo βA-R fixa-se sobre uma proteína de ligação que é regulada pelos nucleotídeos guanínicos. O difosfato de guanosina, GDP, quando a proteína está na sua forma inativa e o trifosfato de guanosina, GTP, quando a subunidade α da proteína é ativada pelo complexo agonista/receptor. Esta proteína denominada Gs, na sua forma ativa, vai induzir a modificação da fluidez da membrana, permitindo assim, o seu deslocamento lateral, levando à estimulação da ação catalítica da enzima adenilato ciclase, Ac. Esta, que se situa na face interna da membrana plasmática, vai a partir do trifosfato de adenosina (ATP), levar à formação do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o que atua como mensageiro secundário. O AMPc ativa uma proteína-quinase (PKA) que conduz à fosforilzação de proteínas. As proteínas têm sua funcionalidade controlada pelo processo de fosforilação/defosforilação (adaptado de RAMOS;SILVEIRA, 2002).

Os β AA são capazes de promover maior ganho de peso diário em frangos (RAMOS;SILVEIRA, 2002) e suínos (RAMOS;SILVEIRA, 2002; MOLONEY; ALLEN, 1992). Existe também aumento da massa muscular em percentagens que variam entre 6 e 18% em ratos (RAMOS;SILVEIRA, 2002; CORREIA et al., 1992; CARTER et al., 1991) e suínos (RAMOS;SILVEIRA, 2002). Concomitantemente, observa-se a diminuição da gordura corporal, com valores oscilando entre 6 e 33% em ratos (RAMOS;SILVEIRA, 2002), frangos (MURAMATSU et al, 1991) e suínos (RAMOS;SILVEIRA, 2002; MOLONEY; ALLEN, 1992).

Esta diminuição de gordura é devida a um efeito direto dos β AA no tecido adiposo, estimulando a lipólise, pois foram encontrados receptores dos β AA no tecido adiposo suino, indicando pelo aumento da presença de ácidos graxos livres e glicerol na corrente sangüínea (PETERLA; SCANES, 1990).

No caso de β AA parece ser característico a necessidade de determinação de doses efetivas e tempo de atuação. A utilização do β AA L-644,969 (6-amino-a-{[(1-metil-3-fenilpropil)amino]metil}-3-piridina-metanol) na ração de suínos em concentrações de 0; 0,25; 1 e 4 ppm durante um período de sete semanas, resultou em melhor desempenho dos animais na dose intermediária (1 ppm), particularmente no período inicial do tratamento, sem nenhum benefício observado a partir da sétima semana (WALLACE et al., 1987). Esse tempo para que os tecidos se tornassem refratários ao β AA é reduzido para cinco semanas na dose mais elevada.

Os resultados obtidos por BARK et al. (1992) e ENGESETH et al. (1992) indicam que a adição de ractopamina à ração de suínos numa concentração de 20 ppm melhora a eficiência de crescimento bem como as características da carcaça. Os resultados positivos no ganho de peso diário foi verificado nos primeiros 14 dias de fornecimento da ractopamina, diminuindo com o tempo de tratamento até cessar, após 4 semanas de fornecimento.

Por outro lado, a ractopamina demonstrou ser mais eficiente quando sua administração é feita a animais mais pesados (CROME et al., 1996), o que vem corroborar a idéia geral de que a administração de β AA é mais rentável quando é feita no período final da engorda. Especialmente em suínos geneticamente selecionados

para a produção de carne magra e com abate efetuado até os 114 kg de peso vivo (BARK et al., 1992; ENGESETH et al., 1992).

Alguns testes demonstraram pequenos aumentos na força de cisalhamento da carne, que mede resistência ao corte, proveniente de animais que receberam β AA (AALHUS et al., 1990). Outros pesquisadores relataram não haver nenhuma diferença consistente tanto na resistência ao corte como na maciez sensorial para amostras de pernil e lombo de suínos tratados com ractopamina (JEREMIAH et al., 1994).

A resistência ao corte levemente maior encontrada nos suínos tratados com ractopamina pode ser devido a um maior diâmetro da fibra muscular (AALHUS et al., 1990; UTTARO et al., 1993). Entretanto, o índice de fragmentação das miofibrilas foi menor para os animais tratados com ractopamina (UTTARO et al., 1993), indicando uma influência do fármaco sobre o processo proteolítico muscular.

Embora não tenham encontrado diferenças em maciez e sabor por análise sensorial, STOLLER et al. (2003) sugeriram uma tendência de notas mais baixas (menor satisfação dos provadores) para carne dos animais tratados com ractopamina.

2.3 Calpastatina

DRANSFIELD (1992, 1993) e KOOHMARAIE (1992) concluiram que o principal sistema proteolítico relacionado com a maciez é denominado calpaínas, proteínas que contêm no sítio ativo um resíduo de cisteína, produzidas pelos músculos como proenzimas que são ativadas por cálcio, tendo três componentes principais:

- m – calpaína ou calpaína tipo II (enzima que requer níveis mais elevados ou milimoles (mM) de cálcio). É ativada quando o pH está próximo de neutro, embora conserve alguma atividade em 5,7;
- μ - calpaína ou calpaína tipo I (enzima que requer baixos níveis ou micromoles, μM, de cálcio), bastante eficiente em amaciar a carne logo após o abate (até 6-10 horas), quando as concentrações de cálcio no sarcoplasma se elevam de 10^{-7} moles/L (0,1 μM de Ca^{2+}) para 10^{-6} ou 10^{-5} moles/L (1 – 10 μM de Ca^{2+}). Também é uma proteinase que atua em pH neutro, embora conserve atividade diminuta em pH típico de carne .

- Calpastatina, que tem como principal função inativar as calpaínas. Também dependente de cálcio, apresentando 4 domínios repetidos que são responsáveis pela inibição das calpaínas.

DRANSFIELD (1992) sugeriu que 44% da variação na maciez da carne pode ser explicada pela variação na atividade da calpaína I.

A calpastatina é inibidora das calpaínas impedindo que as calpaínas degradem as proteínas musculares por ocasião da estocagem das carcaças e cortes cárneos (KOOHMARAIE, 1994). A calpastatina apresenta uma atividade "suicida", pois na sua presença, as calpaínas em vez de hidrolisarem as outras proteínas, hidrolisam as calpastatinas (DOUMIT; KOOHMARAIE, 1999).

A atividade da calpastatina medida 24 h pós-abate foi altamente correlacionado com a maciez da carne bovina maturada por 14 dias (WHIPPLE et al., 1990). O coeficiente de correlação entre o nível de atividade de calpastatina e a força de cisalhamento após 14 dias de maturação foi de 0,44, isto é, quanto maior a atividade de calpastatina, maior a força necessária para o corte da carne e, portanto menor a maciez.

Entre espécies, quanto maior a atividade de calpastatina tanto maior a força de cisalhamento medida na carne sendo que dentre as espécies de carne vermelha a bovina apresenta maior calpastatina e menor maciez da carne, enquanto a espécie suína apresenta menor calpastatina e maior maciez da carne (KOOHMARAIE et al., 1991).

Alguns trabalhos demonstram a existência de isoformas de calpastatina em camundongos, ratos, humanos (TAKANO et al., 1999, 2000; PARR et al., 2000, 2001). Existe uma forma inteira, isto é, traduzida normalmente e outras com deleções de exons na região denominada XL e do exon 3, que faz parte da ligação entre o domínio XL com outro domínio da proteína identificado como L (ambos não são domínios de ligação com as calpaínas), mostrando a existência de “slipicing” alternativo.

A região XL da calpastatina, de acordo com CONG et al. (1998), possui sítios de fosforilação, e sua fosforilação bem como sua própria expressão são ambas dependentes de estímulo beta-adrenérgico.

A fosforilação da calpastatina pode diminuir a afinidade desta pela μ-calpaína (PONTREMOLI et al.,1992). Portanto, isoformas com a região XL deletada talvez indique uma diferença na interação entre a calpastatina e as calpaínas. Já a região L é responsável pela regulação da ligação da calpaína no sítio inibitório da calpastatina (LEE et al, 1992) sendo que em moléculas com regiões desse domínio deletadas, isoformas da calpastatina com atividades inibitórias diferenciadas poderiam ser geradas.

Suínos das raças Duroc, Large White e o cruzamento entre elas, demonstraram três isoformas da calpastatina, 172 kDa, 135 kDa e 80 kDa, separadas pela técnica de imunodetecção através do uso de anticorpos anti-calpastatina (SENSKY et al., 1999). O aparecimento da isoforma de 80 kDa foi significativamente maior comparada com as outras isoformas em animais Duroc, sendo verificada uma correlação negativa entre força de cisalhamento e a quantidade da isoforma de 80 kDa. Por outro lado, a força de cisalhamento foi positivamente correlacionada com a quantidade da isoforma de 135 kDa.

Pela mesma técnica BOEHM et al. (1998) encontraram quatro polipeptídeos com aproximadamente 125, 91, 68 e 42 kDa em carne bovina. O primeiro é a forma nativa da calpastatina, já os outros três não foram identificados, sendo que poderiam ser produtos de degradação do primeiro ou isoformas produzidas por “splicing” alternativo.

Três isoformas de RNAm (8,5 Kb; 5,5 Kb e 2,5 Kb) foram encontradas em amostras de *L. dorsi* de suínos (JI et al.,1998). A injeção com somatrotopina suína (pST) provocou uma redução em até 61% da isoforma de 5,5 Kb, havendo redução de 11% no consumo dos animais e um aumento de 26% no ganho destes. Isto pode indicar relação da isoforma de 5,5 Kb com a proteólise miofibrilar e o crescimento muscular.

Em face à ação da ractopamina e raça sobre expressão gênica das diferentes isoformas de calpastatina e suas possíveis implicações no crescimento muscular e maciez da carne, foi realizado este projeto. Os resultados serão apresentados em dois capítulos.

O capítulo 3, intitulado INCREMENTO NO DESEMPENHO DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC RECEBENDO DIFERENTES DOSES DE RACTOPAMINA E MODIFICAÇÕES NA COR DA CARNE, teve como objetivos estudar os efeitos de duas doses de ractopamina no ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar; e alguns parâmetros da carcaça e carne: curva de queda de pH e temperatura, cor 24 horas pós-abate, área de olho do lombo e espessura de gordura, em animais de diferentes condições sexuais.

O capítulo 4, intitulado RELAÇÃO ENTRE A FREQÜÊNCIA RELATIVA DE ISOFORMAS DE CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC, teve como objetivos estudar o efeito de duas doses de ractopamina na expressão gênica de três isoformas de calpastatina e sua relação com maciez de carne medida por dois métodos: força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar em carne de animais de diferentes condições sexuais.

Referências

AALHUS, J. L.; JONES, S. D. M.; SCHAEFER, A. L.; TONG, A. K. W. The effect of ractopamine on performance, carcass composition and meat quality of finishing pigs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.70, p.943-951, 1990.

ABIPECS. **Carne suína brasileira em 2006.** Disponível em: < http://www.abipecs.org.br/> Acesso em: 20 dez. 2007.

ALBINO, L.F.T.; SILVA, M.A. Valores nutritivos de alimentos para aves e suínos determinados no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS DE AVES E SUÍNOS, Viçosa, 1996. **Anais…**. Viçosa: UFV, 1996. p.303-318.

AMSA. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat**. Chicago, National LiveStock and Meat Board, 1995. 49 p.

BLASCO A.; GOU, P.; GISPERT, M.; ESTANY, J.; SOLER, Q. Comparison of five types of pig crosses. I. Growth and carcass traits**. Livestock Production Science**, Amsterdam, v.40, p.171-178, 1994.

BARKER, P.K.; DALRYMPLE, R. H.; INGLE, D. L.; RICKS, C. A . Use of a beta-adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs **Journal Animal Science**, Champaign, v. 59, p.1256-1261, 1992.

BARK, L.J.; STAHLY, T. S.; CROMWELL, G. L.; MIYAT, J. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fe ractopamine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.70, p.3391-3400, 1992.

BARTON-GADE, P.A. Danish experience in meat quality improvement. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 4., 1990 Edinburgh. **Proceedings…**, Edinburgh, 1990, p.511-520.

BOEHM, M. L.; KENDALL, T. L.; THOMPSON V. F.; GOLL, D. E. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Journal Animal Science**, Champaign, v.76, p.2415-34, 1998.

BOWKER, B.C.; WYNVEEN, E. J.; GRANT, A. L.; GERRARD, D. E. Effects of electrical stimulation on early postmortem muscle pH and temperature declines in pigs from different genetic lines and halothane genotypes. **Meat Science**, Barking, v.53, n.2, p.125-133, 1999.

BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; HUYGHEBAERT, G.; HERREMANS, M. The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. **Poultry Science**, Ithaca v.70, n.4, p.993-1002, 1987.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.463, p.235-272, 2003.

CARTER, W.J.; DANG, A. Q.; FAAS, F. H.; LYNCH, M. E. Effects of clenbuterol on skeletal muscle mass, body composition, and recovery from surgical stress in senescent rats. **Metabolism**, Hampton, v.40, p.855-860, 1991.

COLE, D.J.A., WOOD, J.D., KILPATRICK, M.J. Effects of the beta agonist GAH/034 (salbutamol) on growth, carcass quality and meat quality in pigs, 1987. In: HANRAHAN, P**. Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality**. Londres:Editora, 1987. p.137-142.

CONG, M.; THOMPSON, V. F.; GOOL, D. E.; ANTIN, P. B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.660-666, 1998.

CORREIA, J.H.R.D., PRATES, J.A.M., SANTOS, P.J.R. Effects du salbutamol sur le dévelopement musculaire et sur l'activité monoamine oxydase du plasma chez le rat. **Revue de Medicine Veterinaire,** Toulouse, v.143, p.905-911, 1992.

CROME, P. K.; MCKEITH, F. K.; CARR, T. R.; JONES, D. J.; MOWREY, D. H. Effect of ractopamine on growth performance, carcass composition, and cutting yields of pigs slaughtered at 107 and 125 kilograms. **Journal Animal Science**, Champaign, v.74, p.709-716, 1996.

CULLER, R. D.; PARRISH, F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p.1177-1180, 1978.

DE SEMET, S.M.; PAUWELS, H.; DE BIE, S.; DEMEYER, D. Effect of halothane genotype, breed, feed withdrawal, and lairage on pork quality of belgian slaughter pigs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.74, p.1854-1863, 1996.

DOUMIT, M. E; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degration: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. **Journal Animal Science**, Champaign, v.77, p.1467-1473, 1999.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization – III: Role of calpain I in conditioning. **Meat Science**, Barking, v.31, p. 85-94, 1992.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization – IV: Role of calpains and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, Barking, v.34, p. 217-234, 1993.

EKKEL, E.D. The effects of mixing on behavior and circadian parameters od salivary cortisol in pigs. **Physiology & Behavior**, Davis, v.62, n.1, p. 181-184, 1997.

EISEMANN, J.H.; HUNTINGTON, G. B.; FERREL, C. L. Effects on dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. **Journal Animal Science**, Champaign, v.66, p.342-353, 1988.

ENGESETH, N.J.; LEE, K. O.; BERGEN, W. G.; HELFERICH, W. G. Fatty acid profiles of lipid depots and cholesterol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, p.1060-1062, 1992.

FAO. **Statistics data base. Agricultural Fata Food And Agriculture Organization of United Nations**. Disponível em http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=nutrition. Acesso em 20 abr. 2005.

GU, Y., SCHINCKEL, A. P.; FORREST, J. C.; KUEI, C. H. Effects of ractopamine, genotype, and growth phase on finishing performance and carcass value in swine: I. Growth performance and carcass merit. **Journal Animal Science**, Champaign, v.69, p.2685-2693, 1991a.

GU, Y., SCHINCKEL, A. P.; FORREST, J. C.; KUEI, C. H. Effects of ractopamine, genotype, and growth phase on finishing performance and carcass value in swine: II. Estimation of lean feed efficiency. **Journal Animal Science**, Champaign, v.69, p.2694-2702, 1991b.

HONKAVAARA, M. Influence of lairage on blood composition of pig and on the development of PSE pork. **Journal of Agricultural Science in Finland,** Helsínquia, v.61, p.425-432, 1989a

HONKAVAARA, M. Influence of selection phase, fasting and transport on porcine stress and on the development of PSE pork. **Journal of Agricultural Science in Finland**, Helsínquia, v.61, p.415-423, 1989b.

HONIKEL, R.; KIM, C.J. Causes of the development of PSE pork. **Fleischwirts**, Lillehammer, v. 66, p. 349-353, 1986.

JEREMIAH, L.E.; BALL, R. O.; MERRILL, J. K.; DICK, P.; STOBBS, L. Effects of feed treatment and gender on the flavor and texture profiles of cured and uncured pork cuts. 1. Ractopamine treatment and dietary-protein level. **Meat Science**, Barking, v.37, n.1, p.1-20, 1994.

JI, S.Q.; FRANK, G. R.; CORNELIUS, S. G.; WILLIS, G. M.; SPURLOCK, M. E. Porcine somatotropin improves growth in finishing pigs without altering calpain 3 (p94) or α-actin mRNA abundance and has a differential effect on calpastatin transcription products. **Journal Animal Science**, Champaign, v.76, p.1389-1395, 1998.

JONES, R.W.; EASTER, R. A.; MCKEITH, F. K.; DALRYMPLE, H. M. Effect of the {beta}-adrenergic agonist cimaterol (CL 283,780) on the growth and carcass characteristics of finishing swine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.61, p.905-913, 1985.

KOOHMARAIE, M; WHIPPLE, G.; KRETCHMAR, J. D.; CROUSE, J. D.; MERSMANN, H. J. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. **Journal Animal Science**, Champaign, v.69, p.617-624, 1991.

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1992. Colorado. **Proceedings …**,Colorado State Universyty, 1992, v.45, p.63-71

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, Barking, v.36, p.93-104, 1994.

LAY JR., D.C.; WILSON, M.E. Physiological Indicators of Stress in Domestic Livestock. Oral Presentation.In: INTERNATIONAL ANIMAL AGRICULTURE AND FOOD SCIENCE CONFERENCE.2001, Indiana. **Proceedings…**, Indiana July 24-28, 2001. p 301-305.

LEE, W. J.; MA, H.; TAKANO, E.; YANG, H. Q.; HATANAKA, M; MAKI, M. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatina bay exon skipping. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.267, p.8437-8442, 1992.

MOLONEY, A.P.; ALLEN, P. . (Re) partitioning effects of ß-adrenergic agonists in meat. In KUIPER, H.A., HOOGENBOOM, L.A.P.,(Ed.). - In Vitro Toxicological Studies and Real Time Analysis of Residues in Food – FLAIR Concerted Action Nº 8: **In:** WORKSHOPS HELD IN GHENT, 1992 Thessaloniki. **Proceedings….** Wageningen, 1992. p.89-101.

MURAMATSU, T.; KAKITA, M.; AOYAGI, Y.; OKUMURA, J. Beta-adrenergic agonist effects on liver and breast muscle protein synthesis in female chicks. **Poultry Science**, Ithaca, v.70, 1630-1632, 1991.

OLIVER, M.A. La calidad de la carne de cerdo y su relación con la demanda de los consumidores. **Eurocarne**, Madri, n.25, p.37-43, 1994.

ONU. **Nações Unidas no Brasil**. Disponível em: < http://www.onu-brasil.org.br/> Acesso em: 15 nov. 2007.

PARR, T.; SENSKY, P. L.; ARNOLD, M. K. Effects of epinephrine infusion on expression of calpastatin in porcine cardiac and skeletal muscle. **Archives Biochemistry Biophysics**, Londres, v.374, p.299-305, 2000.

PARR, T.; SENSKY, P. L.; ARNOLD, M. K. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. **Archives Biochemistry Biophysics**, Londres, v.395, p.1-13, 2001.

PÉREZ, M.P.; PALACIO, J.; SANTOLARIA, M. P.; ACENA, M. C. Influence of lairage time on some welfare and meat quality parameters in pigs. **Veterinary Research**, Leiden, v.33, p.239-250, 2002.

PETERLA, T. A.; SCANES, C. G. Effects of {beta}-adrenergic agonists on lypolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro. **Journal Animal Science**, Champaign**,** v.68, p.1024-1029, 1990.

PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; MICHETTI, M.; SALAMINO, F. An endogenous activator of the Ca 2+ -dependent proteinase of human neutrophils that increases its affinity for Ca 2+ . **Proceedings of the National Academy Sciences**, Whashington, v.85, p.1740-1743, 1992.

RAMOS, F.; DA SILVEIRA, M.I.N. Agonistas adrenérgicos B2 e produção animal. I – Mecanismo de acção. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.95, n.535, p.99-110, 2000.

SCHWAB, C. R.; BAAS, T. J.; STALDER, K. J.; MABRY, J. W. Effects of long-term selection for increases leanness on meat and eating quality traits in Duroc swine. **Journal Animal Science**, Champaign**,** v.84, p.1577-1583, 2006.

SMITH, R.L.; JENSEN, L. S.; HOVELAND, C. S.; HANNA, W. W. Use of pearl millet, sorghum, and triticale grain in broiler diets. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.2, p.7, 1989.

SENSKY, P.L.; PARR, T.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. The effect of breed on calpastatin isoforms and longissimus shear force in pigmeat. **Proceedings of the British Society of Animal Science**, Midlothian,v.99, n. 194, p.16, 1998

STALDER, K.J.; MAYA, J.; CHRISTIAN, L. L.; MOELLER, S. J.; PRUSA, K. L. Effects of preslaughter management on the quality of carcasses from Porcine Stress Syndrome heterozygous market hogs. **Journal Animal Science**, Champaign**,** v.76, p.2435-2443, 1998.

STOLLER, G.M. The effect of feeding ractopamine (Paylean) on muscle quality and sensory characteristics in three diverse genetic lines of swine. **Journal Animal Science**, Champaign v.81, p.1508-1516, 2003.

TAKANO, J.; WATANABE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.128, p. 83-92, 2000.

TAKANO, J.; KAWAMURA, T.; MURASE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Structure of mouse calpstatin isoforms: implications os species-common and species-specific alternative splicing**. Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdan, v.260, p.339-345, 1999.

UTTARO, B.E.; BALL, R. O.; DICK, P.; RAE, W.; VESSIE, G.; JEREMIAH, L. E. Characteristics, processing yield, and meat quality characteristics of crossbred swine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, p.2439-2449, 1993.

WALLACE, D.H.; HEDRICK, H. B.; SEWARD, R. L.; DAURIO, C. P. Growth and efficiency of feed utilization of swine fed a beta-adrenergic agonist (L-644,969). In HANRAHAN, J.P. - Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality. **Proceedings...**,Londres: Elsevier, 1987. p.143-151.

WALKER, W.R.; JOHNSON, D. D.; BRENDEMUHL, J. H.; DALRYMPLE, R. H.; COMBS, G. E. Evaluation of cimaterol for finishing swine including a drug withdrawal period. **Journal Animal Science**, Champaign, v.67, p.168-176, 1989.

WARRISS, P.D.; BROWN, S. N.; BEVIS, E. A.; KESTIN, S. C. The influence of pre-slaughter transport and lairage on meat quality in pigs of two genotypes. **Animal Production,** Wageningen, v.50, p.165-172, 1990.

WEBER, K.; PRINGLE, J.R.; OSBORN, M. Measurement of molecular weight by electrophoresis SDS-acrylamide gel. **Methods in Enzymology, cidade,** v.3, p. 26-27, 1972.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM, R. D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle**. Journal Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 2716-2728, 1990.

3 INCREMENTO NO DESEMPENHO DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC RECEBENDO DIFERENTES DOSES DE RACTOPAMINA E MODIFICAÇÕES NA COR DA CARNE

Resumo

A produção de animais com melhor conversão alimentar aliado à produção de carne magra é muito importante para indústria suína e para a saúde humana. O uso do agonista beta adrenérgico ractopamina tem se mostrado eficaz na produção de suínos com aquelas características, porém afeta a qualidade final da carne. Sessenta animais (30 machos castrados e 30 fêmeas), sendo 30 Large White (LW) e 30 Duroc (DU) foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam diferentes doses de ractopamina (RAC): 0 (controle), 10 ppm e 20 ppm na dieta. O fornecimento de RAC iniciou-se quando os animais atingiram 85,0 kg±6.5 de peso vivo e terminou quatro semanas depois com os animais pesando 115,0 kg±11,0. Os animais foram pesados semanalmente, a conversão média alimentar semanal foi calculada pela divisão do consumo médio semanal pelo ganho de peso médio semanal. Após o abate, as carcaças foram resfriadas por 24 horas e as medições de pH e temperatura foram feitas 0, 3, 6, 9 e 24 horas pós-abate. O músculo *L. dorsi* da meia carcaça direita foi separado para medição da área de olho do lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EG) e cor 24 horas pós-abate. Os animais tratados com RAC tiveram uma melhora da conversão alimentar verificada pelo aumento de ganho de peso, 2,3 kg±0,2 (P<0,01) por semana a mais do que os animais não tratados. Não houve diferença entre as doses. A conversão alimentar melhorou 1,1 kg±0,1 para os animais que receberam 10 e 20 ppm de RAC em relação ao controle. Os animais LW apresentaram maior AOL (P<0,05) do que os animais DU. Fêmeas e machos apresentaram diferença (P<0,05) na AOL, 37,7±1,1 e 34,3±1,2 cm^2, respectivamente. A EG apresentou interação entre raça e sexo (P=0,083) e ainda apresentou diferenças entre as doses de RAC e também quando comparadas com o controle (P=0,054). A carne dos animais DU apresentou valores superiores (P<0,01) para a* e b*, e menor valor de pH final (P<0,01) comparada as amostras de LW, gerando carne com coloração vermelha mais clara. Os resultados confirmam a produção de carne mais magra quando adicionado ractopamina na dieta, entretanto nestas raças puras a adição de RAC não influenciou na AOL.

Palavras-chave: Conversão alimentar; pH; Área de olho do lombo; Espessura de gordura; sexo

INCREMENT IN PERFORMANCE OF PURE SWINE OF LARGE WHITE AND DUROC BRREDS RECEIVING DIFFERENT DOSES OF RACTOPAMINA MODIFICATIONS AND MEAT COLOR

Abstract

Lean meat production has been an important issue for health and economical reasons in swine meat industry. The use of the beta adrenergic ractopamine have been very efficient in the production of lean carcass and meat, however it affects the final meat quality. Sixty animals (30 barrows and 30 gilts) being 30 Large White (LW) and 30 Duroc (DU) were randomly assigned to different doses of ractopamine (RAC): 0 (control), 10 ppm and 20 ppm in the diet. The animals were fed with RAC after 10 weeks of their arrival and 85.0 kg±6.5 of live weight and ended up 4 weeks later with animals at 115.0 kg±11.0. The animals were weighed weekly, average feed conversion were calculated by the division of the average ration consumption for weight gain.week^{-1}. After slaughter, carcasses were cooled for 24h and pH plus temperature measurements were taken 0, 3, 6, 9 and 24h *postmortem* (PM). The L. dorsi muscle was collected 24h PM from the right carcass side for rib eye area (REA), fat thickness (FT) and color measurements. The animals fed with both doses of RAC had an improvement of feed conversion verified by an increase in weight gain of 2.3 kg±0.2 week^{-1} (P<0.01). The feed conversion improved by 1.1 kg±0.1to the animals under 10 and 20 ppm RAC doses compared to the control. LW animals had greater REA (P<0.05) than DU breed (37.7±1.0 and 34.3±1.2 cm^2, respectively). Sex condition influenced REA (P<0,05) with gilts and barrows presenting 37.7±1.1 and 34.3±1.2 cm^2, respectively. FT presented interaction between breeds and sex condition (P=0.083). FT were different between RAC doses (P<0.05) and also compared to the control diet (P=0.054) (0: 2.62±0.13 cm; 10 ppm: 2.53±0.12 cm; 20 ppm: 2.10±0.13 cm). The meat of DU presented superior values (P<0.01) for a* and b*, and also lower pH compared to LW, generating meat with reddish pink color. The results confirmed the production on leaner carcasses when RAC is added to diet. However, in those pure breeds doses of RAC did not modify REA.

Keywords: Feed conversion; pH; Rib eye area; Fat thickness; Sex condition

3.1 Introdução

No mundo, os suínos respondem por cerca de 39 % do consumo de carnes (FAO, 2005). No Brasil, a carne bovina representa 52% do consumo total; a carne de frango, 34%, e a suína, contribui com 15%. Em levantamento recente, o rebanho suíno brasileiro somava cerca de 38 milhões de cabeças (IBGE, 2003). Do produtor ao consumidor, a demanda da indústria suína é por um produto com baixa quantidade de gordura, refletindo na valorização da carne em função da quantidade e da qualidade da gordura produzida.

Agonistas beta adrenérgicos, como a ractopamina (RAC), têm sido usados para aumentar a quantidade de músculo e reduzir o teor de gordura nas carcaças suínas, aumentando a eficiência do sistema produtivo (ANDERSON et al., 1987; PRINCE et al., 1987; UTTARO et al., 1993; DUNSHEA et al., 1993a,b). Esta eficiência é estendida ao processamento industrial com obtenção de maior rendimento de presunto (STITES et al.,1991).

Os efeitos da ractopamina sobre a qualidade da carne são controversos, onde alguns trabalhos indicam que a RAC não exerce nenhum impacto significativo sobre a qualidade da carne suína, inclusive na cor, na marmorização, na firmeza e nos valores de pH final (STITES et al., 1994; UTTARO et al., 1993). Porém trabalhos mais recentes indicam efeito da ractopamina sobre a cor devido a mudanças na composição das fibras musculares (CHANG et al.2003; DEPREUXE et al., 2002). O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes doses de ractopamina sobre o desempenho e qualidade da carne de suínos puros das raças Large white e Duroc.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Local

O experimento foi realizado em galpão de terminação de suínos que apresenta 717,75 m^2 (43,5 x 16,5 m) de construção e pé direito de 3,0 m, provido de janelas de vidro teladas em ambos os lados de seu comprimento, permitindo ventilação e claridade durante o dia todo. O mesmo possui 80 baias construídas em alvenaria, com dimensões de 1,11 m de largura por 2,20 m de comprimento (2,40 m^2 de área). Cada baia apresenta em sua parte posterior um bebedouro do tipo niplee (chupeta) e na parte

anterior um cocho de 45,0 cm de comprimento. As baias são divididas com grades de ferro permitindo a visualização dos animais vizinhos.

3.2.2 Animais

Foram utilizados 60 suínos para a realização do experimento, sendo 30 da raça Large White (15 machos castrados e 15 fêmeas) e 30 da raça Duroc, com mesma distribuição de condição sexual. Os animais foram transportados para o local do experimento, com média de 60 dias de idade e 27,0 (±0,56) kg de peso vivo. Foram, aleatoriamente, alocados nas baias individuais, não se respeitando a ordem de desembarque. No mesmo instante tiveram acesso à água e ao alimento.

3.2.3 Manejo de rotina

A primeira alimentação do dia era fornecida às 07h 30 min. Após a alimentação, as baias eram lavadas com água, sob pressão. Durante o dia, era fornecida alimentação aos animais, conforme os cochos eram esvaziados, sendo que a último trato do dia ocorria às 17h 30min. Uma vez na semana, havia a pesagem dos animais, que se iniciava às 08h. Neste dia, os animais recebiam o primeiro trato após a pesagem.

3.2.4 Tratamento com ractopamina

Após 10 semanas de experimento, os animais atingiram média de 85,0 (±6,5) kg de peso vivo. Neste momento, foi iniciado o fornecimento da ractopamina (Paylean 20). Foram preparadas três dietas que diferiam nas doses do agonista β2-adrenérgico: 10 e 20 ppm, e grupo controle (0 ppm). As doses foram, aleatoriamente, designadas aos animais, dentro dos dois grupos de condição sexual diferenciada (machos castrados e fêmeas) e das raças (Large White e Duroc). A ractopamina foi adicionada à ração comercial na fábrica de ração experimental.

3.2.5 Análises de desempenho e qualidade da carne

O experimento foi dividido em duas fases: A primeira, chamada de período pré-dosagem, iniciou-se com a chegada dos animais e durou 10 semanas, até os animais

atingirem média de 85,0±6,5 kg de peso vivo. Nesta fase os animais foram identificados individualmente, tratados contra endo- e ectoparasitas e distribuídos individualmente nas baias, sendo alimentados com dieta comercial Crescimento-Engorda (Tabela 1). A segunda fase, chamada de período de dosagem, iniciou-se após a 10ª semana, a partir do momento que se iniciou o fornecimento de ractopamina (Paylean 20). Foram utilizados os seguintes níveis deste β2-adrenérgico na ração: 0 (controle), 10 e 20 ppm. Os animais foram aleatoriamente divididos entre as doses, dentro dos dois grupos de condição sexual diferenciada (machos castrados e fêmeas). O fármaco foi adicionado à mesma dieta do período pré-dosagem, juntamente com suplementação do aminoácido lisina, na fábrica de ração da universidade. Os animais controle também receberam a suplementação de lisina na ração. Esta fase do experimento durou quatro semanas e foi finalizada com o abate dos animais (média de 115,0±11,0 kg de peso vivo).

Tabela 1 - Porcentagem, na matéria seca, dos nutrientes na dieta

Nutrientes (níveis de garantia)	**% na matéria seca**
Umidade (máx.)	13,00
Proteína Bruta (min.)	20,00
Extrato etéreo (mín.)	3,50
Matéria fibrosa (máx.)	3,50
Matéria mineral (máx.)	9,00
Cálcio (máx.)	1,00
Fórforo (min.)	1,00
Cinzas (máx.)	10,00

Dieta : Ração completa, extrusada em forma de cilindro com diâmetro entre 13 mm e 15 mm.

Os animais foram pesados no início do período pré-dosagem, sendo pesados semanalmente a partir deste ponto até o abate. A conversão média alimentar semanal foi calculada pela divisão do consumo médio semanal pelo ganho de peso médio semanal. Antes de cada pesagem, os animais ficavam em jejum de 6-8 horas para eliminar os resíduos gastro-intestinais.

Após o abate, as carcaças foram identificadas e resfriadas por 24 horas. As medições de pH e temperatura foram feitas 0, 3, 6, 9 e 24 horas pós-abate utilizando, pHmetro portátil Digimed DM-2. Depois deste período foi separado o músculo *L. dorsi* da meia carcaça direita dos 60 animais e levados em caminhão refrigerado para o Laboratório de Processamento de Carnes, onde as peças permaneceram sob

resfriamento de 4 ºC. As medidas de área de olho do lombo, ou seja, área do músculo *Longissimus dorsi* (AOL), espessura de gordura subcutânea (EG) foram avaliadas às 24 horas pós-abate através da utilização da régua de quadrantes de pontos (LUCHIARI FILHO, 2000).

A avaliação da cor foi obtida por meio do colorímetro MINOLTA Chroma Meter CR-508d. As leituras dos parâmetros L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo) foram feitas no sistema CIELab com as seguintes características: área de medição 8,0 mm de diâmetro, ângulo de observação 10º, iluminante D65 com componente especular incluído. Foram utilizados dois bifes do músculo *L. dorsi* por animal, sendo realizadas duas leituras por bife. O resultado dos valores de L*, a* e b*, foi a média das quatro leituras realizadas às 24 horas após o abate.

3.2.6 Análise estatística

O experimento foi delineado, inteiramente ao acaso, com estrutura fatorial 2 (raças) X 2 (condição sexual) X 3 (doses de ractopamina). Os dados foram analisados utilizando-se o Proc Mixed do pacote estatístico do SAS (SAS INST., INC., CARY, NC). Foram incluídos no modelo os efeitos principais (raça, condição sexual e dose) e suas interações. Os efeitos principais e suas interações foram submetidos à ANOVA. O teste Student'*t* foi utilizado para a comparação das médias .

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análises de desempenho

A eficácia da administração de ractopamina ficou evidente nos dados de desempenho (Tabela 2). Não houve diferença no desempenho entre raça e sexo.

Tabela 2 - Desempenho de suínos machos castrados e fêmeas das raças Large-White e Duroc nos períodos pré-dosagem e pós dosagem com 0, 10 e 20 ppm de ractopamina

	Períodos					
	Pré-dosagem[£]			Pós-dosagem		
Efeitos	0 ppm	10 ppm	20 ppm	0 ppm	10 ppm	20 ppm
N° de animais	20	20	20	20	20	20
Ganho de peso médio semanal	6,1 (0,3)[a]	6,0 (0,3)[a]	6,1 (0,2)[a]	6,9 (0,4)[a]	9,8 (0,2)[b]	10,1 (0,3)[b]
Consumo médio semanal	18,1 (0,9)[a]	18,3 (1,1)[a]	18,0 (1,0)[a]	24,7 (1,1)[b]	25,2 (0,8)[b]	24,9 (0,9)[b]
Conversão alimentar média	3,1 (0,2)[b]	3,2 (0,4)[b]	3,0 (0,1)[b]	3,7 (0,1)[c]	2,3 (0,1)[a]	2,2 (0,3)[a]

[£] No período pré-dosagem (idade - 60 dias a 130 dias – peso vivo - 27±0,56 e 85,0±6,5 kg) os animais foram divididos, para no período pós-dosagem (130 dias e 85,0±6,5 a 158 dias e 115,0±11,0) iniciar-se os tratamentos com ractopamina; [abc] Valores seguidos por letras diferentes diferem entre si (P<0,01)

O ganho de peso médio semanal, consumo médio semanal e a conversão alimentar média semanal sofreram oscilação durante todo período pré-dosagem, porém não houve diferença entre os grupos de animais sorteados para receberem posteriormente as diferentes doses de ractopamina. Neste mesmo período os animais apresentaram conversão alimentar média semanal em torno de 3,1. Este valor corrobora com dados obtidos para animais puros Large White (OLIVEIRA, et al., 2002) e Duroc (YOUNG et al., 1976) apresentando conversão média alimentar semanal de 3,1 kg.

No período pós-dosagem, os animais controle (0 ppm) tiveram um aumento na conversão alimentar, fato este esperado para animais na fase de terminação, onde ocorre alto consumo e o mesmo ganho de peso semanal já que grande parte do crescimento concentra-se na deposição de gordura (CAMPBELL; TAVERNER, 1988; WHITTEMORE, 1992).

Os animais que receberam ractopamina, independente da dose, apresentaram um ganho de peso adicional de 3,0 kg (P<0,01) por semana, aproximadamente 430 g dia^{-1} de ganho de peso vivo adicional comparados aos animais não tratados. Para a conversão alimentar houve uma melhora de 1,4 kg semana^{-1}, ou seja, 200 g dia^{-1} (P<0,01) para os animais que receberam ractopamina em relação ao controle.

Resultados semelhantes, porém mais modestos, para suínos tratados com 20 ppm de RAC mostraram uma melhora de 0,52 kg na conversão alimentar média semanal e ganho adicional de peso de 150g dia^{-1} (UTTARO, et al.,1993). Outros resultados similares em suínos que receberam 20 ppm tiveram ganho de peso 120 g

dia^{-1} maior do que os não tratados resultando em uma melhora de 0,54 kg na conversão média alimentar semanal (CROME, 1996).

3.3.2 Qualidade da carne

3.3.2.1 pH, temperatura e cor

A ractopamina não influenciou nas medidas do pH e temperatura durante as primeiras horas pós-abate (*P*>0,05), assim como não influenciou o pH final. Por outro lado, animais DU apresentaram carne com pH final de 5,40±0,1, inferior (*P*<0,05*)* aos 5,74±0,08 observados na carne dos LW (Figura 1). Não houve influência de sexo no pH final.

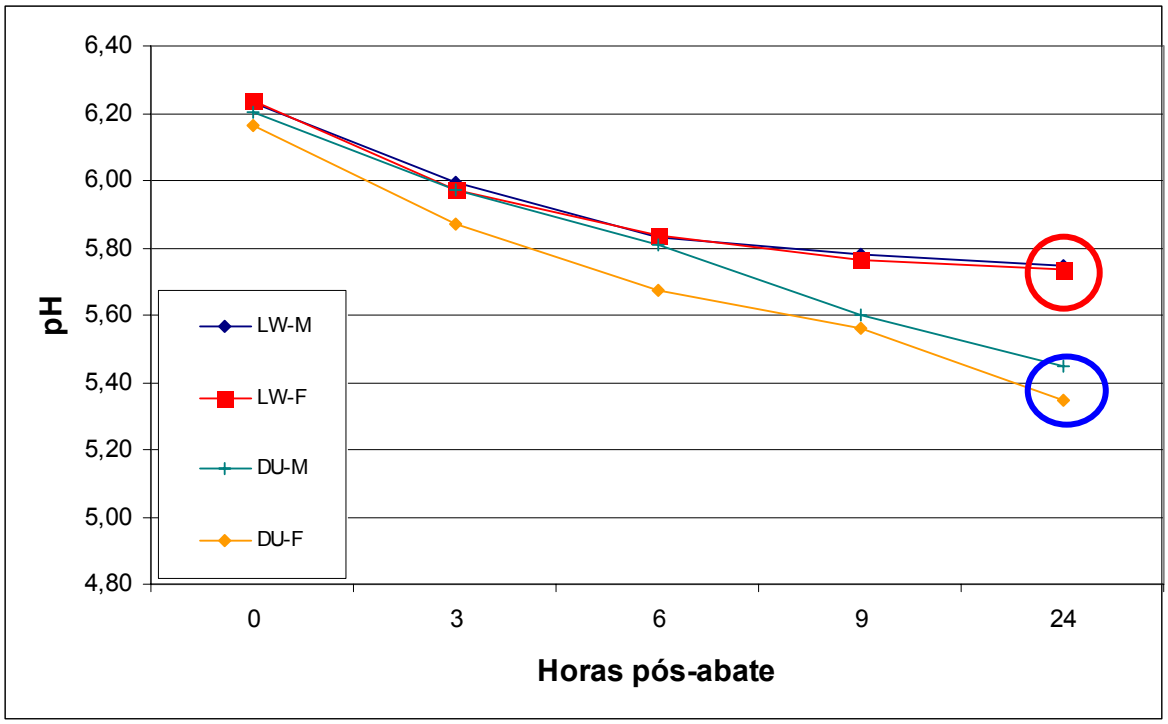

Figura 1 - Curva de queda do pH da carne suína 24 horas pós-abate para suínos Large White e Duroc (machos castrados-M e fêmeas-F). Circulo vermelho (agrupamento pH final): Large White; Circulo azul (agrupamento pH final): Duroc

A temperatura da musculatura não foi alterada por raça, sexo (tabela 3), portanto a conjunção temperatura alta e pH baixo não servem para explicar possíveis diferenças nas características de luminosidade. Temperatura próxima do seu estado fisiológico (>38 ºC) com pH abaixo de 6 gera um acumulo de ácido lático muscular, resultado do

metabolismo acelerado anaeróbico da reserva de energia muscular (GREGORY;GRANDIN, 1998).

A carne dos animais da DU apresentou valores superiores (*P*<0,01) para a* e b*, possivelmente devido ao menor pH final em relação ao obtido para a raça LW (tabela 3). Valores elevados das variáveis de cor a* e b* estão relacionados a baixo pH final da carne, característico em animais com grande reatividade ao estresse pré-abate (JUNCHER et al., 2001). Outro fator importante na definição da cor seria o tipo de fibra. Mudanças nos tipos de fibra muscular pelo tratamento com ractopamina demonstraram um aumento da fibra tipo 2A com queda do tipo 1 (DEPREUX et al., 2002). Justamente a isoforma de miosina da fibra tipo 2A que apresenta uma correlação positiva com o valor de a* para a raça DU e negativa para o mesmo espectro de cor para a raça LW (CHANG et al.,2003).

Tabela 3 – Análise de parâmetros de cor da carne proveniente do músculo L. Dorsi 24 horas pós-abate de suínos Large White e Duroc (machos castrados e fêmeas) e temperatura do mesmo músculo 0, 3, 6 e 24 horas pós-abate

	Cor			**Temperatura**				
				horas				
	L*	**a***	**b***	**0**	**3**	**6**	**9**	**24**
Raça								
Large White (LW)	51,3 (0,7)	6,7 (0,3)^{B}	4,4 (0,2)^{b}	36,6	23,3	16,4	9,5	3,5
Duroc (DC)	52,6 (0,8)	7,6 (0,4)^{A}	5,2 (0,3)^{a}	36,2	23,8	16,0	9,2	3,1
P	NS	0,08	0,03	NS	NS	NS	NS	NS
Sexo^{Ŧ}								
Macho Castrado (MC)	51,8 (0,8)	6,9 (0,3)	4,6 (0,2)	36,4	23,6	16,6	9,6	3,5
Fêmea (F)	52,0 (0,8)	7,4 (0,3)	4,8 (0,2)	36,4	23,5	15,8	9,1	3,1
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Raça X Sexo								
LW-MC	49,9 (1,0)^{b}	-	-	-	-	-	-	-
LW-F	52,7 (1,0)^{a}	-	-	-	-	-	-	-
DC-MC	53,7 (1,2)^{a}	-	-	-	-	-	-	-
DC-F	51,4 (1,1)^{ab}	-	-	-	-	-	-	-
P	0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

L: luminosidade; a*: vermelho; b*: amarelo;
^{Ŧ}Sexo: condição sexual;
A diferença (P< 0,05) entre as médias está representada pelas letras minúsculas e a diferença (P=0,08) está representada por letras maiúsculas no canto superior direito dos valores, dentro dos efeitos principais ou suas interações para cada quadrante.

Outro fator que também pode estar relacionado com o pH final é o valor de L, machos DU apresentaram maior valor de L quando comparados com os machos LW, e os primeiros apresentaram um menor pH final. Este valor de pH final observado resulta na perda da capacidade de retenção de água pela aproximação do ponto isoelétrico das principais proteínas musculares, aumentando a exsudação de água (BREWER, 2004), o que gera uma maior luminosidade (valor de L). Fato corroborado pela correlação negativa (-0,31) entre valor de pH final e refletância (valor L) em animais Duroc (SCHWAB et al., 2006).

A diferença de L entre os grupos citados acima pode estar relacionada com diferenças de reatividade entre os animais das diferentes raças e condições sexuais (STELLA et al., 2007), embora fosse esperado que animais da raça LW apresentassem um menor valor de L, fêmeas LW apresentaram o mesmo valor de L da carne dos suínos DU, o que confirma que não é somente o pH final o responsável por variações no valor de L.

3.3.2.2 Área de olho do lombo e espessura de gordura

A raça Large White e as fêmeas apresentaram uma maior área de olho do lombo (AOL) do que a raça Duroc e os machos, respectivamente (Tabela 4). A diferença em espessura de gordura (EG) foi verificada para a condição sexual, onde os machos apresentaram maior deposição de gordura subcutânea. As doses de ractopamina foram efetivas na diminuição da deposição de gordura, com menores espessuras de gordura especialmente na maior dosagem (Tabela 4).

Tabela 4 - Área de olho do lombo (AOL)* e espessura de gordura (EG)* para suínos Large White e Duroc (machos castrados e fêmeas) de 115,0± 11,0 kg de peso vivo médio recebendo diferentes doses de ractopamina na ração

	Raça		**Sexo**		**Dose**		
	LW	**DU**	**Machos**	**Femeas**	**0**	**10 ppm**	**20 ppm**
AOL (cm^2)	**37,7±1,0[a]**	**34,3±1,2[b]**	**34,3±1,2[b]**	**37,7±1,1[a]**	**34,4±1.4[a]**	**36,1±1,4[a]**	**37,5±1,4[a]**
EG (cm)	**2,30±0,09[a]**	**2,54±1,11[a]**	**2,68±0.11[a]**	**2,16±0.10[b]**	**2,62±0,13[a]**	**2,53±0,12[b]**	**2,10±0,13[c]**

*LSMEANS±SD medidas na 10-11ª costela no dia 1 pós-abate; Raças : LW – Large White e DU – Duroc; Sexo – condição sexual; [abc] Valores seguidos pela mesma letra dentro de raça, sexo ou dose não diferem (P>0,05)

Todavia, como houve interação (P=0,083) entre as raças e condição sexual para área de olho do lombo e espessura de gordura (Tabela 5), grande parte das diferenças detectadas na AOL entre raças e entre os sexos é devida a uma menor deposição de tecido magro e maior deposição de gordura verificada em animais Duroc machos castrados.

Tabela 5 - Interação entre raça e condição sexual (sexo) para Área de Olho do Lombo (AOL)* e Espessura de Gordura (EG)* em suínos Large White e Duroc (machos castrados e fêmeas)

	Raça x Sexo			
	LW-M	LW-F	DU-M	DU-F
AOL (cm^2)	37.1±1.5a	38.3±1.5a	31.5±1.8b	37.1±1.7a
EG (cm)	2.43±0.13b	2.17±0.13b	2.93±0.16a	2.15±0.15b

*LSMEANS±SD medidas na 10-11ª costela no dia 1 pós-abate; [ab] Valores seguidos pela mesma letra dentro de raça, sexo ou dose não diferem (P>0,05); LW: Large white; DU: Duroc; M: Macho castrado; F: Fêmea

UTTARO et al. (1993) observaram que o depósito de gordura foi 0,18 cm menor para suínos tratados com RAC. Porém, no mesmo trabalho, uma grande diferença foi encontrada entre os sexos, onde fêmeas tratadas tiveram 0,49 cm a menos de depósito de gordura do que machos castrados. Este fato mostra que possivelmente, a RAC tem maior efeito na deposição de gordura em fêmeas já que elas possuem um menor depósito de gordura comparado com machos (HAFEZ, 1972). Fêmeas de ratos são mais sensíveis ao efeito de promotor de crescimento do beta adrenérgico do que

ratos jovens machos (KIM et al., 1992) e nesta mesma espécie o beta adrenérgico era capaz de estimular o crescimento dos músculos esqueléticos e do conteúdo protéico.

3.4 Conclusão

Suínos tratados com ractopamina aumentaram a eficiência alimentar, em parte devido a menor deposição de gordura subcutânea.

Machos castrados Duroc apresentaram menor crescimento do músculo *L. dorsi* e maior deposição de gordura. A carne dos animais desta raça apresentou pH final que resulta em coloração vermelha mais clara.

Referências

BREWER, M. S. Water-holding capacity. : In:JENSEN, W. K.; DEVINE, C. ; DIKEMAN, M. (Ed.), **Encyclopedia of meat sciences**, v.1 Hamilton: .Elsevier academic press , 2004
p.242-249.

CAMPBELL, R. G.; TAVERNER, M. R. Genotype and sex effects on the relationship between energy intake and protein deposition in growing pigs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.66, p.676-686, 1988.

CHANG, K. C.; DA COSTA, N.; BLACKLEY, R.; SOUTHWOOD, O. Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat Science**, Barking, v. 64, pp. 93-103, 2003.

CROME, P. K.; MCKEITH, F. K.; CARR, T. R.; JONES, D. J.; MOWREY, D. H.; CANNON, J. E. Effect of ractopamine on growth performance, carcass composition, and cuttind yields of pigs slaughtered at 107 and 125 kilograms . **Journal Animal Science**, Champaign, v. 74, p.709-716, 2002.

DEPREUX, F. F. S.; GRANT, A. L.; ANDERSON, D. B.; GERRARD, D. E. Paylean alters myosin heavy chain isoform content in pig muscle. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 80, p1888-1894, 2002.

DUNSHEA, F.R.; KING, R. H.; CAMPBELL, R. G. Interrelationships between dietary protein and ractopamine on protein and lipid deposition in finishing gilts. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, p.2931, 1993a.

DUNSHEA, F.R.; KING, R. H.; CAMPBELL, R. G.; SAINZ, R. D.; KIM, Y. S. Interrelationships between sex and ractopamina on protein and lipid deposition in rapidly growing pigs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, p.2919, 1993b.

ENGESETH, N.J.; LEE, K. O.; BERGEN, W. G.; HELFERICH, W. G. Fatty acid profiles of lipid depots and cholesterol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, p.1060-1062, 1992.

GREGORY, N.G.; GRANDIN, T. **Animail welfare and meat science**. London: CAB International, 1998. 286p.

HAFEZ, E.S.E.; BADERELDIN, A.L.; SHARAFELDIN, M.A. Heat-tolerance studies of fat-tailed sheep in the subtropics. **Journal of Agricultural Science**, Londres, v. 47, 280-286, 1972.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Pesquisa agropecuária**. 2. ed., São Paulo, 2003. p. 58.

KIM, Y. S.; SAINZ, R. D.; SUMMERS, R. J.; MOLENAAR, P. Cimaterol reduces {beta}-adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. **Journal Animal Science**, Champaign**,** v.70, p.115-122, 1992.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: A. Luchiari Filho,2000. 134p.

OLIVERIA, S. L; FIALHO, E. T.; MURGAS, L. D. S.; FREITAS, R. T. F.; OLIVERIA. A. I. Utilização de casca de café melosa em rações de suínos em terminação. **Ciência & Agrotécnica**, Lavras, v. 26, n.6, p.1330-1337, 2002.

PERDOMO, C. C.; KOZEN, E. A.; SOBESTIANSKY, J.; SILVA, A. P. Considerações sobre edificações para suínos. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE SUÍNOS, 4., 1985, Concórdia, SC. **Anais…**. Concórdia: EMBRAPA - CNPSA, 1985. 1v.

SCHWAB, C. R.; BAAS, T. J.; STALDER, K. J.; MABRY, J. W. Effects of long-term selection for increases leanness on meat and eating quality traits in Duroc swine. **Journal Animal Science**, Champaign**,** v.84, p.1577-1583, 2006.

STELLA, I.L. **Comportamento suíno, interações com Ractopmaina e suas possíveis implicações na qualidade da carne**. 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

STITES, C.R.; MCKEITH, F. K.; SINGH, S. D.; BECHTEL, P. J. The effect of ractopamine hydrochloride on the carcass cutting yields of finishing swine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.69, p.3094, 1991.

UTTARO, B.E.; BALL, R. O.; DICK, P.; RAE, W.; VESSIE, G.; JEREMIAH, L. E. Characteristics, processing yield, and meat quality characteristics of crossbred swine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, p.2439-2449, 1993.

WHITTEMORE, C. T. Nutritional manipulation of carcass quality in pigs. In: COLE, D.J.A.; HARERDIGN, W.; GARNSWORTTY, P.C. (Ed**.). Recent developments in pig nutrition***,* 1993, p.12-19.

YOUNG, L. D.; JOHNSON, R. K.; OMTVEDT, T. I.; WALTERS, L. E. Postweaning performance and carcass merit of purebred and two-breed croos pigs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.42, p.1124-1132, 1976.

4 RELAÇÃO ENTRE A FREQÜÊNCIA RELATIVA DE ISOFORMAS DE CALPASTATINA E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS PUROS DAS RAÇAS LARGE WHITE E DUROC

Resumo

A calpastatina é o inibidor endógeno específico das calpaínas e é codificada por um único gene. Estudos demonstraram que as regiões 1xa, 1xb e 1u do promotor da calpastatina são funcionais e podem gerar três isoformas diferenciadas. A expressão diferenciada de isoformas pode estar relacionada com crescimento muscular e maciez da carne. Sessenta animais (30 machos castrados e 30 fêmeas), sendo 30 Large White (LW) e 30 Duroc (DU) foram divididos aleatoriamente em grupos recebendo diferentes doses de ractopamina (RAC): 0 (controle), 10 ppm e 20 ppm na dieta. O experimento iniciou-se quando os animais atingiram 85,0 kg±6,5 de peso vivo e terminou quatro semanas depois com os animais pesando 115,0 kg±11,0. Amostras do músculo *L. dorsi* da meia carcaça direita foram separadas para quantificação da expressão gênica relativa das três isoformas (Calp1 – 1xa; Calp2 – 1xb; Calp 3 – 1u) do gene da calpastatina e relacionadas com índice de fragmentação miofibrilar, medido 0, 3 e 5 dias pós-abate, e força de cisalhamento 1 e 5 dias pós-abate. Apenas a isoforma Calp 1 teve expressão diferencial ($P<0,05$) entre as raças e as doses, com maior expressão ($P<0,05$) nos animais Large White e nos animais tratados com 10 e 20 ppm de ractopamina. A isoforma Calp 2, correspondente ao exon 1xb apresentou uma baixa expressão relativa. A isoforma Calp 3 foi expressa de maneira igual quando comparados sexo e dose de ractopamina. A carne dos animais Large White e tratados com RAC apresentaram uma maior força de cisalhamento e menores índices de fragmentação miofibrilar durante o período de amaciamento da carne coincidentes com o aumento da expressão da isoforma Calp1.

Palavras-chave: Expressão gênica; Índice de fragmentação miofibrilar; Força de cisalhamento

RELATION BETWEEN RELATIVE FREQUENCY OF CALPASTAIN ISOFORMS AND MEAT QUALITY OF LARGE WHITE AND DUROC PURE BREEDS

Abstract

Calpastatin is specific endogenous inhibitor of calpains and is codified by an only gene. Studies had demonstrated that the regions 1xa, 1xb and 1u of the calpastatin promoter are functional and can generate three differentiated isoforms. The expression differentiated of isoformas can be related with muscular growth and meat tenderness. Sixty animals (30 barrows and 30 gilts) being 30 Large White (LW) and 30 Duroc (DU) were randomly assigned to different doses of ractopamine (RAC): 0 (control), 10 ppm and 20 ppm in the diet. The animals were fed with RAC after 10 weeks of their arrival and 85.0 kg±6.5 of live weight and ended up 4 weeks later with animals at 115.0 kg±11.0. Samples of muscle *L. dorsi* of the half right carcass had been separate for quantification of relative gene expression of three isoformas (Calp1 - 1xa; Calp2 - 1xb; Calp 3 - 1u) of calpastatin gene and related with myofibrillar fragmentation index, measured 0, 3 and 5 days after slaughter and shear force 1 and 5 days after slaughter. Only isoform Calp 1 had differentiated expression ($P<0.05$) between breeds and doses, with higher expression ($P<0.05$) in the animals Large White and the animals with 10 and 20 ppm of ractopamina. Isoform Calp 2, correspondent to exon 1xb presented low a relative expression. Isoform Calp 3 was express in equal when compared sex and dose of ractopamina. The meat of the animals Large White and treated with RAC had presented a higher force of shear and myofibrillar fragmentation index during the period of coincident meat tendering with increase of expression of isoform Calp1.

Keywords: Gene expression; Myofibrillar fragmentation index; Shear force

4.1 Introdução

O sistema das calpaínas (μ-calpaína, m-calpaína e calpastatina) foi primeiramente identificado como composto de proteinases cisteínicas, cálcio dependentes presente em todas as células, e desde então tem sido descrito com grande detalhamento (CAMOU et al., 2007; GOLL et al., 2003; SORIMACHI, H.; SUZUKI, 2001). As isoformas μ-calpaína e m-calpaína catalisam a proteólise no citoesqueleto e em proteínas de membrana e são reguladas pela concentração de íons de cálcio e pela calpastatina que funciona como inibidor. Na musculatura estriada, o sistema calpaina/calpastatina está ligado com o *turnover* protéico e com o crescimento, fusão de mioblastos e desenvolvimento da textura na carne.

A calpastatina tem quatro domínios (I-IV) na região C-terminal da proteína que são responsáveis pela inibição das calpaínas e um domínio não inibitório (L) cuja maior parte da função ainda é desconhecida, embora esteja associada à atividade da proteína (TAKANO et al., 2000). Uma seqüência adicional de peptídeos (XL) na região N-terminal foi identificada em bovinos (CONG, et al., 1998). Diferenças nas seqüências das regiões XL e L em tecidos específicos podem gerar isoformas da calpastatina, tipo I-IV (TAKANO et al., 2000).

Um promotor do gene da calpastatina foi isolado por CONG et al. (1998) e este pode ser ativado pela via do AMPc. Trabalho subseqüente baseado na análise dos transcritos de mRNA localizou quatro possíveis regiões que seriam induzidas pelo AMPc (TAKANO et al., 2000), sendo três destas identificadas na estrutura do gene em suínos podendo assim gerar três isoformas da calpastatina (PARR et al., 2001).

A distribuição de isoformas da proteína calpastatina de 172 kDa, 135 kDa e 80 kDa foi correlacionada com força de cisalhamento, a segunda positivamente e a terceira negativamente. (SENSKY et al., 1998).

Neste presente estudo, três construções do promotor do gene da calpastatina foram feitas 5’ referentes aos exons 1xa, 1 xb e 1u, apontando para expressão relativa destas isoformas e sua relação com a maciez da carne suína medida pelo índice de fragmentação miofibrilar e pela força de cisalhamento.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Local

O experimento foi realizado em galpão utilizado para a criação dos suínos apresentando 717,75 m^2 (43,5 x 16,5m). O mesmo possui 80 baias individuais construídas em alvenaria, com dimensões de 1,11 m de largura por 2,20 m de comprimento (2,40 m^2 de área). Cada baia possuía em sua parte posterior um bebedouro do tipo niplee (chupeta) e na parte anterior um cocho de 45,0 cm de comprimento. As baias eram divididas com grades de ferro permitindo a visualização dos animais vizinhos.

4.2.2 Animais

Foram utilizados 60 suínos para a realização do experimento, sendo 30 da raça Large White (15 machos castrados e 15 fêmeas) e 30 da raça Duroc, com mesma distribuição de condição sexual. Os animais foram transportados para o local do experimento, com média de 60 dias de idade e 27,0 (±0,56) kg de peso vivo. Foram aleatoriamente alocados nas baias individuais. No mesmo instante tiveram acesso à água e ao alimento.

4.2.3 Tratamento com ractopamina

Após 10 semanas de experimento, os animais atingiram média de 85,0 (±6,5) kg de peso vivo. Neste momento, foi iniciado o fornecimento da ractopamina Foram fornecidas duas doses do agonista β2-adrenérgico na ração: 10 e 20 ppm, e grupo controle. As doses foram, aleatoriamente, designadas aos animais, dentro dos dois grupos de condição sexual diferenciada (machos castrados e fêmeas) e das raças (Large White e Duroc). A ractopamina foi adicionada à ração comercial na fábrica de ração experimental.

4.2.4 Força de cisalhamento e Índice de fragmentação miofibrilar

Para a realização do MFI foram utilizados 3 g de tecido muscular (*L. dorsi*) de cada animal, seguindo o protocolo descrito por CULLER et al. (1978), onde o músculo foi colocado em um tampão fosfato e homogeneizado em liquidificadores "Waring". Foi

feita a leitura do MFI em espectrofotômetro a 540 nm. As amostras foram refrigeradas por 0, 3 e 5 dias de maturação.

Para corroborar com os dados de MFI, foram realizadas análises da força de cisalhamento das amostras do lombo provenientes das carcaças dos animais nos dias 0 e 5 pós-abate de acordo com as normas da AMSA (1995).

4.2.5 Identificação do genótipo Halotano

A identificação de suínos com genótipo halotano homozigotos recessivos se fez necessária, pois animais com estas características poderiam interferir na análise da relação da expressão gênica de isoformas e os resultados de qualidade da carne.

A carne destes animais apresenta menores valores de pH no músculo após abate (pH inicial) em relação à carne de suínos livres do gene halotano (OURIQUE; NICOLAIEWSKY, 1990; SATHER et al., 1991). Portanto, a presença do alelo halotano aumenta a freqüência de carcaças classificadas como PSE (carne de textura mole, de cor pálida e que retém pouca água) (BRIDI ET al., 2003).

O procedimento para identificação do genótipo do halotano foi baseado na extração de DNA dos bulbos capilares (MILLER et al., 1998) e a análise foi baseada no polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (FUJII et al., 1991; SAMBROOK et al., 1989). Os resultados estão no anexo 3.

4.2.6 Coleta de tecidos e extração de RNA total

Amostras de tecido do músculo *L. dorsi* dos 60 suínos do experimento foram coletadas após o abate. O material coletado foi congelado em nitrogênio líquido, colocado em tubos devidamente identificados e mantido congelado até análise. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo o protocolo desenvolvido por SIMMS et al. (1993)

4.2.7 Síntese cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 30 µg de RNA total extraído a partir de amostras de tecido de muscular, utilizando-se o protocolo descrito em SCHUMMER (1999) com a utilização do kit *First Strand Superscript III* (Invitrogen).

4.2.8 Escolha das isoformas do gene da calpastatina para PCR quantitativo em tempo real e síntese dos iniciadores

Para escolha das isoformas do gene da calpastatina a serem estudadas na análise de expressão foram tomados como base o estudo sobre a presença da região XL no gene da calpastatina (CONG et al 1998) e o estudo da expressão das isoformas da calpastatina (Calp 1, Calp 2 e Calp 3) no músculo suíno (PARR et al., 2004). Embora neste ultimo trabalho as isoformas tenham sido quantificadas com base em sondas, optou-se por utilizar a técnica de QC-RT-PCR em tempo real (*Real-Time quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) com desenho de iniciadores com base na seqüência de RNA mensageiro disponível no banco de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/; acessos Nº. AJ583407, AJ583408 e AJ583409) e uso do programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). As seqüências dos iniciadores estão na tabela 1.

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. Para as análises de comparação entre as expressões se fez necessário a construção de um par de iniciadores para um gene controle constitutivo, definido no projeto como sendo o gene da Actina, utilizando-se de iniciadores publicados anteriormente (PARR et al., 2004).

Tabela 1 - Combinação dos iniciadores para análise de expressão por RT-PCR quantitativo em tempo real

Nome do iniciador	Região alvo	Tamanho do produto amplificado	Seqüência do iniciador
Calp 1	Exon 1xa	251 pb	F: CTCCAAGGCCTTACCATGTC R: CTCGTTGAAGCAGAGGAAGG
Calp 2	Exon 1xb	181 pb	F: TCAGAGCAAATTGGTTGTCG R: CTCGTTGAAGCAGAGGAAGG
Calp 3	Exon 1u	91 pb	F: CCAACCAGGAATGCAAACAT R: CTCGTTGAAGCAGAGGAAGG
Actina	Actina	95 pb	F: GTGGCCCTGGACTTCGAG R: TTGCCGATGGTGATGACCT

4.2.9 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 kit LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I (Invitrogen). As condições de PCR em tempo real para foram de 10 minutos de pré-incubação à 95°C, seguido de 45 ciclos de três etapas consistindo em desnaturação durante 7 segundos à 95°C, pareamento dos iniciadores durante 10 segundos e temperatura variando de acordo com o gene (Anexo 1), e finalmente um período de extensão de 5 segundos à 72°C. A temperatura e a duração da etapa de pareamento dos iniciadores foram de 7 segundos para todos os genes.

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 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; SCHMITTGEN (2001), sendo o gene Actina 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 (Ct) entre os genes avaliados e um gene de referência. O ΔCt é calculado conforme a equação (1).

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

Em que:

$(Ct_{alvo} - Ct_{ref})_{trat}$ reflete a diferença de Ct entre o gene alvo (isoformas de Calpastatina) e o gene de referência para o tratamento (gene da actina suina). Ct indica o ciclo no qual o sinal de fluorescência ultrapassou o limiar basal pré-definido. Sendo que um menor ΔCt significa uma maior abundância de RNAm, isto é, uma maior expressão relativa para aquele gene alvo.

4.2.10 Análise estatística da expressão gênica

Os resultados de expressão relativa referentes ao estudo de qRT-PCR foram analisados empregando-se Proc GLM do SAS 8.0, obtendo uma análise de variância, com teste de F a 5% de significância. O experimento foi delineado, inteiramente ao acaso, com estrutura fatorial 2 (raças) X 2 (condição sexual) X 3 (doses de ractopamina).

Para MFI e força de cisalhamento foi utilizado o mesmo deliniamento experimental. Os dados foram analisados utilizando-se o Proc Mixed do pacote estatístico do SAS (SAS INST., INC., CARY, NC). Foram incluídos no modelo os efeitos principais (raça, condição sexual e dose) e suas interações. Os efeitos principais e suas interações foram submetidos à ANOVA. O teste utilizado para a comparação das médias foi o Student'*t.* Para estudo de correlação foi utilizado o Proc CORR do SAS 8.0.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Otimização das condições de PCR para amplificação das isoformas

O método de quantificação relativa proposto por LIVAK; SCHMITTGEN (2001) foi utilizado para a comparação da expressão das isoformas. As medidas de Ct foram tomadas igualmente para cada isoforma, 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, apenas a isoforma Calp 1 teve expressão diferencial entre as raças e as doses (Tabela 2). A figura 1 mostra as curvas de eficiência de amplificação para cada um dos genes

Tabela 2 – Expressão relativa do gene controle constitutivo Actina e das isoformas do gene da calpastatina Calp 1, Calp 2 e Calp 3 em diferentes raças suínas e dosagens de ractopamina na dieta

	Large white	Duroc	0	10	20
Actina	*10,11±0,42*	*10,32±0,55*	*10,22±0,40*	*10,71±0,33*	*10,46±0,48*
Calp 1	7,73±0,33 **Aa**	15,45±64 **Bb**	17,34±0,71 **Yy**	8,54±0,11 **Xx**	9,21±0,19 **Xx**
Calp 2	36,12±0,18 **B**	35,56±0,32 **C**	37,14±0,21 **Z**	37,25±0,37 **Z**	35,89±0,20 **Z**

ABC XYZ A diferença (P< 0,05) entre as médias estão representadas pelas letras à direita dos valores, cujas maiúsculas referem-se às colunas e minúsculas ás linhas.

A expressão do gene constitutivo controle, Actina, foi igual em todos os parâmetros estudados, confirmando a validade dos resultados segundo a metodologia proposta por LIVAK; SCHMITTGEN (2001).

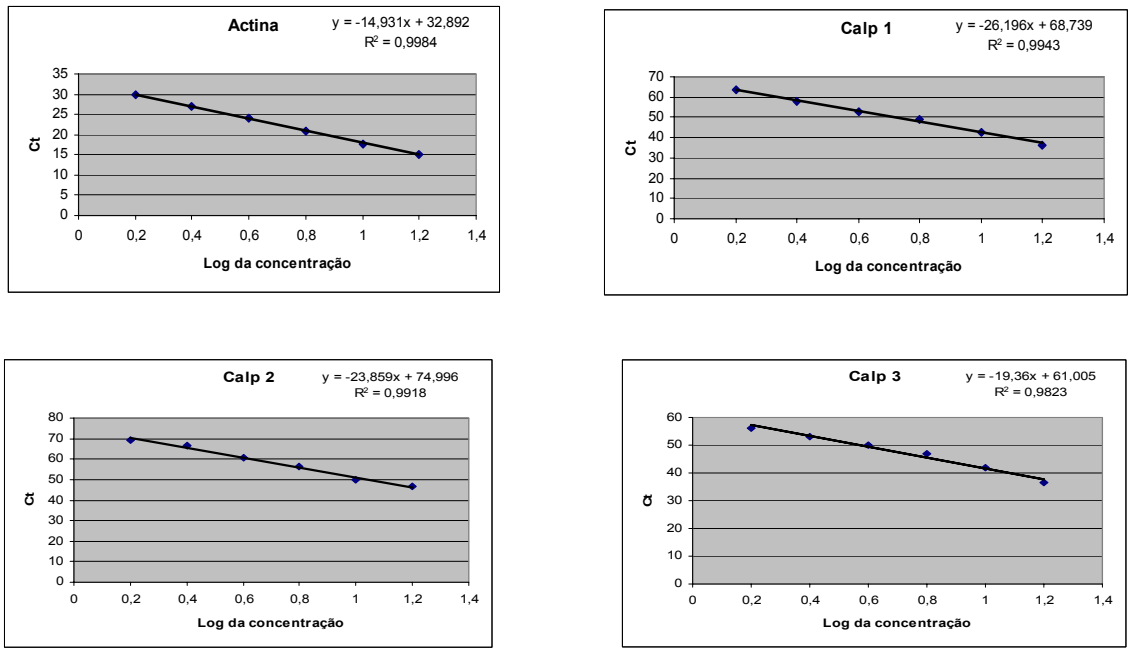

Figura 1 – Curvas de eficiência de amplificação de qRT-PCR dos genes estudados

A isoforma Calp 2, correspondente ao exon 1xb apresentou uma baixa expressão relativa, isto pode ser explicado por dois fatores: 1) Uma baixa atividade do promotor 1xb e; 2) o mRNA da Calp 2 é rapidamente degradado. Este fato era esperado, pois PARR et al., (2004) encontraram uma baixa expressão desta isoforma, comparada à alta expressão das outras duas isoformas.

A expressão elevada das isoformas Calp 1 e Calp 3 foi também relatada por PARR et al. (2004). Porém a observação de expressão diferenciada das duas isoformas difere do relato daqueles autores. A isoforma Calp 3 foi expressa de maneira igual quando comparados sexo e dose de ractopamina, já a isoforma Calp 1 teve uma maior expressão nos animais Large White e nos animais tratados com 10 e 20 ppm de ractopamina.

Estudos *in vivo* têm mostrado que tratamento de animais com agonistas beta adrenérgicos induzem profundas mudanças no sistema das calpaínas (PARR et al, 2001, 2004). Em bovinos, o aumento de 36% na massa muscular em animais tratados com agonistas beta foi seguido de um aumento de 96% nos níveis de calpastatina e 76% de aumento na sua atividade (PARR et al, 1992). O β-adrenérgico se liga ao

receptor β_2 e ativa a proteína quinase A dependente de AMPc, sendo a calpastatina um dos alvos desta quinase (CONG et al, 1998).

Os dados deste trabalho indicam que o exon 1xa é fundamental para a resposta ao beta adrenérgico e modulação da função da proteína calpastatina. A isoforma Calp1, que apresenta este exon, teve sua expressão alterada pela ractopamina e pela raça, o que indica que elementos de resposta ao AMPc são importantes na modulação da função da proteína. Por outro lado, isoformas como Calp 2 e Calp 3 que não apresentavam em sua constituição o exon 1xa não modificaram sua expressão relativa.

Os elementos de resposta ao AMPc são locais que podem ser fosforilados pela proteína quinase A e estes estão presentes em uma extensão do domínio N-terminal L, denominada região XL, do gene da calpastatina (CONG et al., 1998). Alguns destes elementos estão presentes no exon 1xa, e quando promove-se a deleção deste exon ocorre uma redução de 67% na função basal do promotor, indicando que esta região é essencial para regulação da transcrição da calpastatina e por conseqüência sua função (CONG et al, 1998).

4.3.2 Qualidade da carne e sua relação com a expressão relativa das isoformas

A ractopamina influenciou os valores do índice de fragmentação miofibrilar (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de fragmentação miofibrilar das raças e doses nos dias 0, 3 e 5 pós-abate

Dias	**Raça**		**Dose (ppm)**		
	Large White	Duroc	0	10	20
0	32±1,1 **a**	37±0,7 **b**	40±1,1 **x**	36±1,3 **x**	31±1,1 **y**
3	44±0,8 **a**	47±0,6 **a**	49±1,4 **x**	48±1,2 **x**	39±0,5 **y**
5	52±1,2 **a**	58±0,9 **b**	60±0,4 **x**	57±0,7 **x**	47±0,9 **y**

ab xy A diferença (P< 0,01) entre as médias dentro de raça e dose na mesma linha estão representadas pelas letras à direita dos valores

Nas primeiras 24 horas pós-abate o MFI foi maior para a raça Duroc em relação à raça Large White, enquanto a dose de 20 ppm de ractopamina apresentou o menor índice. As diferenças dentro de raças e doses perduraram com o passar dos dias de maturação, como exceção do dia 3 onde não houve diferença do MFI entre as raças.

Mesmo estando bem estabelecida na literatura científica a alta relação entre medida indireta de MFI e medida direta de força de cisalhamento, testes de correlação foram desenvolvidos para estes parâmetros a fim de observar e certificar que o mesmo se repetia neste experimento

Analisando a maciez da carne através da força de cisalhamento (Figura 2), tanto a raça quanto a dose influenciaram a maciez. No dia 1 pós-abate a força foi mais elevada para animais Large White do que da raça Duroc, e embora tenha ocorrido queda da força de cisalhamento com o tempo pós-abate, a diferença entre as raças se manteve no dia 5 pós-abate. Para as doses, no dia 1 não houve diferença entre elas, mas diferiram do controle, já no dia 5 as doses diferiram entre si além de diferirem do controle.

Embora tenha sido observado MFI idêntico entre LW e DU no dia 3, o que poderia ser resultado de preservar calpaínas de autólise e, portanto um período de alta taxa de proteólise, como um período compensatório, a extensão acaba sendo ditada pela quantidade de calpastatina total (LEONARDO et al, 2008). O MFI idêntico para controle e 10 ppm, e diferenças com relação aos 20 ppm, especialmente com as diferenças na FC pode se dever ao fato que nesta faixa de força de cisalhamento, as diferenças de fragmentação sejam muito diminutas, pois a ação das calpaínas é bastante “limitada”, com rupturas diminutas na estrutura miofibrilar que acabam sendo suficientes para diferenças na maciez.

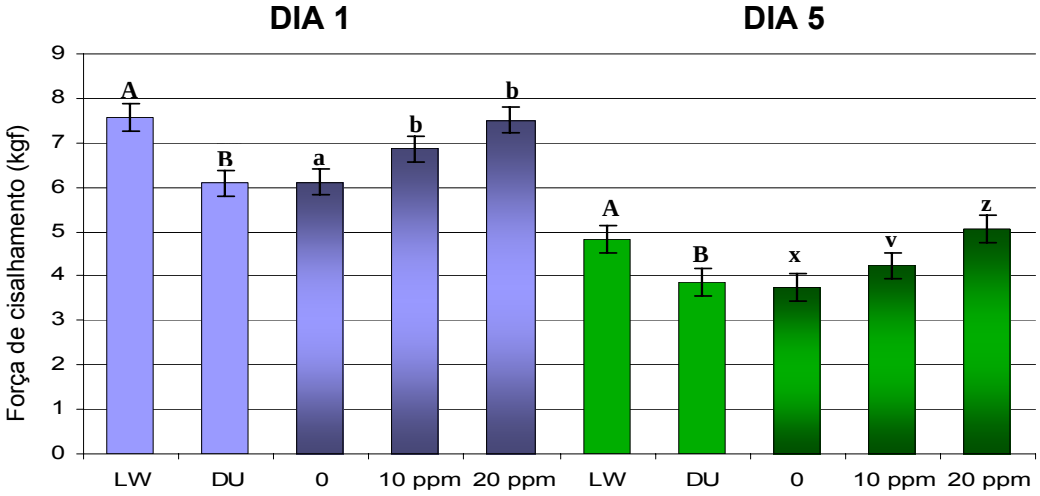

Figura 2 -. Força de Cisalhameto no músculo *Longissimus dorsi* nos dias 1 e 5 pós-abate das raças Large white (LW) e Duroc (DU) alimentadas com 0, 10 and 20 ppm de ractopamina. A comparação entre as raças e as doses foi feita dentro dos dias pós-abate; [AB] Valores dentro do mesmo dia pós-abate com a mesma letra não diferem entre si (P>0.01); [ab](P= 0.053); [xyz] (P<0.05)

Para os dias 0 e 5 as correlações entre MFI (Figura 3 e 4) e força de cisalhamento foram -0,72 e -0,78 (P<0,001) respectivamente, o que está de acordo com a literatura, valores de correlação próximos a estes (-0,72 e -0,75) foram encontrados por CULLER et al. (1978) e DAVIS et al. (1980), respectivamente.

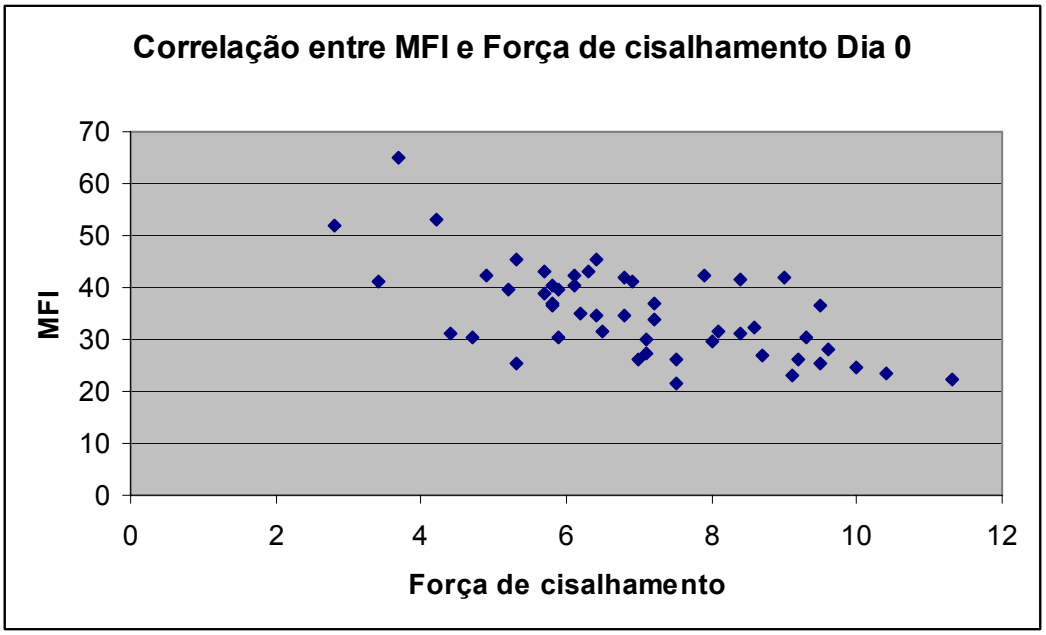

Figura 3 - Correlação entre Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e Força de Cisalhamento (FC) dia 0

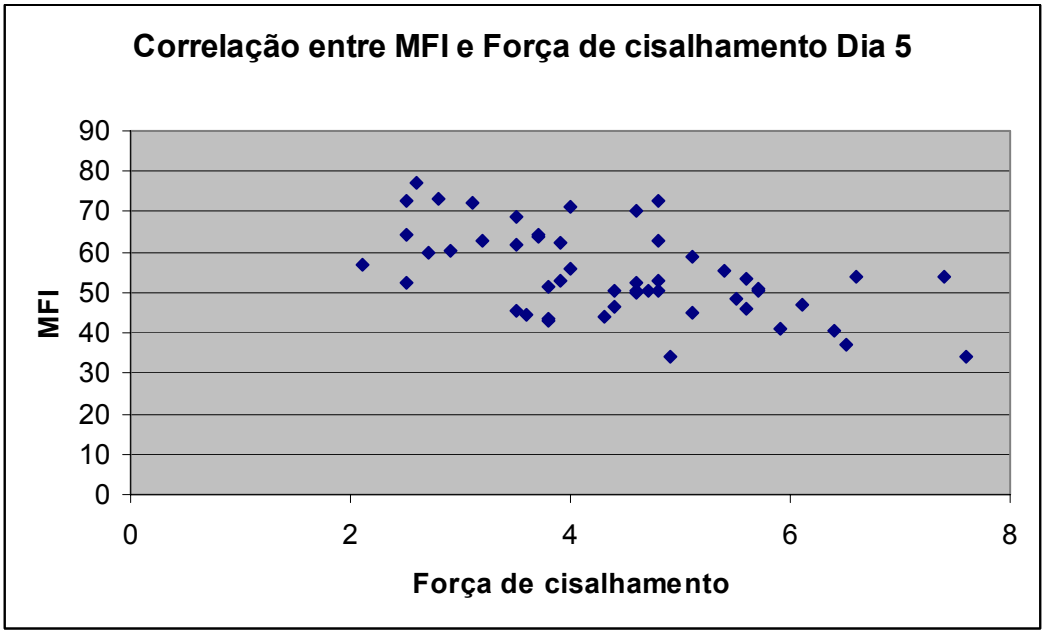

Figura 4 - Correlação entre Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e Força de Cisalhamento (FC) dia 5

PARR et al. (2004) concluíram em seu trabalho que na musculatura esquelética o nível dos transcritos originados dos promotores mostram um baixo nível do mRNA do tipo II (Calp 2), entretanto os níveis do mRNA dos tipos I (Calp 1) e III (Calp 3) foram iguais, sendo que estas observações sobre o nível de controle dos produtos do gene da calpastatina pode interferir diretamente na inibição das calpaínas pela calpastatina, alterando vias fisiológicas e desenvolvimento da textura da carne.

No presente trabalho, a isoforma Calp 1 foi expressa de maneira diferente da isoforma Calp 2, esta ultima tendo uma baixa expressão como era de se esperar (PARR, et al., 2004). Os animais Duroc apresentaram, tanto no dia 1 como no dia 5, uma menor força de cisalhamento em relação aos animais Large White e isto pode ser explicado pelo aumento da expressão da isoforma Calp1 nesses últimos, o mesmo ocorrendo quando houve o fornecimento da ractopamina. Os animais tratados com 10 e 20 ppm apresentaram uma maior força de cisalhamento, que coincidiu com aumento da expressão da isoforma Calp 1. A relação entre Calp1 e maciez é válida pelo alto coeficiente de correlação (Figura 5) 0,81 (P<0,001).

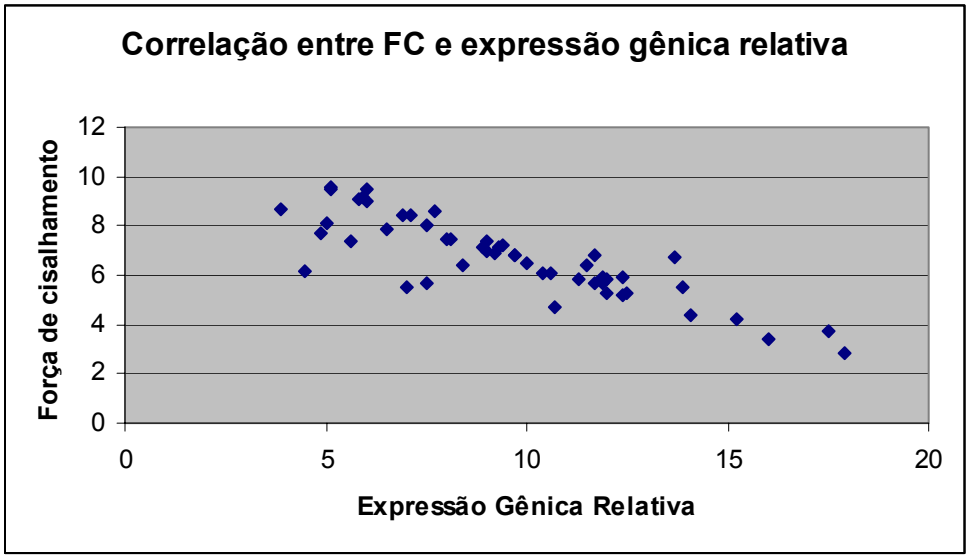

Figura 5 - Correlação entre força de cisalhamento dia 1 e expressão gênica relativa da isoforma Calp1 ($\Delta Ct = (Ct_{actina} - Ct_{Calp1})_{trat}$

Estes resultados indicam que a adundância do RNAm da isoforma Calp 1 foi modificado em músculos de acordo com raça e fornecimento de ractopamina, podendo esta isoforma estar diretamente relacionada com a maciez da carne suína.

Outra análise realizada foi a relação da expressão diferenciada da isoforma Calp 1 com crescimento muscular, representado pela área de olho do lombo (AOL). Animais Duroc apresentaram uma menor AOL (P<0,05) comparada com os animais Large White, 34,3±1,2 cm^2 e 37,7±1,0 cm^2 respectivamente. Houve uma correlação alta (0,58 – P<0,001) entre a maior expressão da isoforma Calp 1 com maior crescimento muscular em animais Large White (Figura 6), sugerindo uma efeito direto da maior expressão no crescimento muscular.

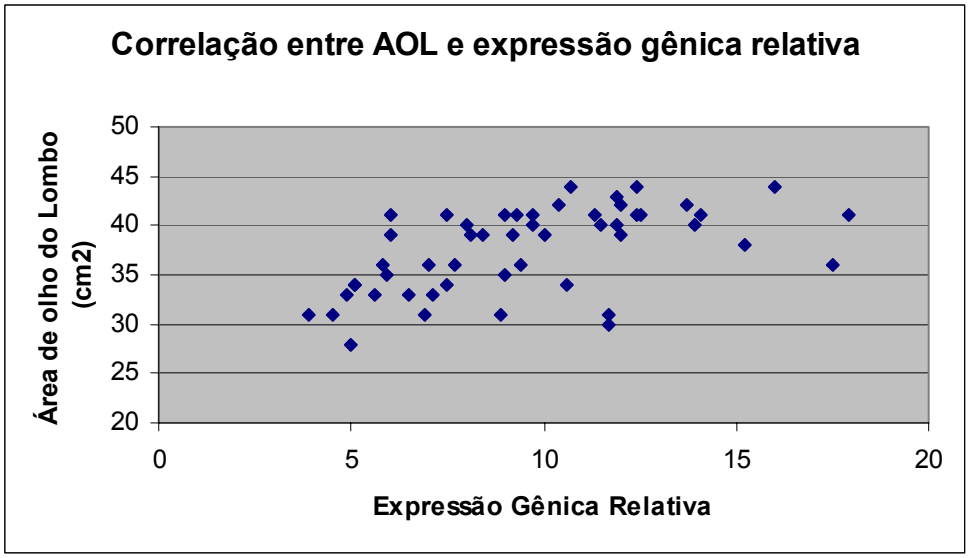

Figura 6 – Correlação entre área de olho do lombo e expressão gênica relativa da isoforma Calp1 ($\Delta Ct = (Ct_{actina} - Ct_{Calp1})_{trat}$

Esta abordagem pode tentar explicar o porquê grupos de animais com alto crescimento muscular (WHIPPLE et al., 1990b; KOOHMARAIE et al., 1992; MORGAN et al., 1993; DELGADO et al., 2001; MCDONAGH et al., 2001), apresentam carne menos macia devido a alta atividade de calpastatina 0 ou 24 horas pós-abate.

4.4 Conclusão

A raça e o fornecimento de ractopamina influenciaram na expressão relativa das isoformas de calpastatina, e esta modificação alterou a maciez da carne suína. Animais da raça Duroc apresentaram menor expressão relativa da isoforma Calp 1, e carne com maior extensão de fragmentação e maciez. Ractopamina aumentou a expressão desta mesma isoforma e carne com maior força de cisalhamento.

Referências

AMSA. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat**. Chicago: Natl. Live Stock and Meat Board, 1995, p. 35.

BRIDI, A.M.; RÜBENSAM, J. M.; NICOLAIEWSKY, S.; LOPES, R. F. F. Efeito do genótipo halotano e de diferentes sistemas de produção na qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.6, p.1362-1370, 2003.

BRIDI, A.M.; DE OLIVEIRA, A. R.; FONSECA, N. A. N.; SHIMOLOMAKI, M.; COUTINHO, L. L.; SILVA, C. A. Efeito do genótipo halotano, da ractopamina e do sexo do animal na qualidade da carne suína**. Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.5, p.2027-203, 2006.

CAMOU, J. P.; MARES, S. W.; MARCHELLO, J. A.; VASQUEZ, R.; TAYLOR, M.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Isolation and characterization of {micro}-calpain, m-calpain, and calpastatin from postmortem muscle. I. Initial steps. **Journal of Animal Science**, Champgne, v.85, p.3400-3414, 2007.

CONG, M.; THOMPSON, V. F.; GOOL, D. E.; ANTIN, P. B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.660-666, 1998.

CULLER, R. D.; PARRISH, F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, Chicago v.43, p.1177-1180, 1978.

DAVIS, G. W.; DUTSON, T. R.; SMITH, G. C.; CARPENTER, Z. L. Fragmentation procedure for bovine *Longissimus* muscle as an index of cooked steak tenderness. **Journal of Food Science**, Chicago, v.15, pp.880-884, 1980.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V. K. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v.253, n.2, p.448-451, 1991.

GOLL, E.D., THOMPSON, V. F.; LI, H.; CONG, J. The Calpain System. **Physiological Reviews, Bethesda,** v.83, p. 731-801, 2003

LEONARDO, E. F.; DELGADO, E. F.; BAGALDO, A. R.; LANNA, D. P. D.; DE PAZ, C. C. P. Differential growth retardadion and myofibrillar fragmentation in rats submitted to feed restriction and realimentation. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 66, 2008. No prelo.

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 in Enzymology**, Oklahoma, v.25, p. 402-408, 2001.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.16, n.4, p.1215, 1988.

OURIQUE, J.M.R.; NICOLAIEWSKY, S. Características físico-químicas e organolépticas e suas relações na avaliação da qualidade da carne suína. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.19, n.2, p.118-125, 1990.

PARR, T.; SENSKY, P. L.; ARNOLD, M. K. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. **Archives Biochemistry Biophysics**, Londres, v.395, p.1-13, 2001.

PARR, T.; JEWELL, K. K.; SENSKY, P. L.; BRAMELD, J. M. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. **Archives Biochemistry Biophysics**, Londres, v.427, p.8-15, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. p.720 v.3.

SATHER, A.P.; MURRAY, A. C.; ZAWADSKI, S. M.; JOHNSON, P. The effect of the halothane genotype on pork production and meat quality of pigs reared under commercial conditions. **Canadian Journal of Animal Science**, Sherbrooke, n.71, p.959-967, 1991.

SCHUMMER, J. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpresed in ovarian carcinomas. **Gene**, Amsterdam, v.238, p. 375-385, 1999

SIMMS, D.; CIZDZIEL, P. E.; CHOMCZYNSKI, P. Trizol: A new reagent for optimal single-step isolation of rna. **Focus Magazine**, Knoxville, v. 15, p.99-102, 1993.

SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. The Structure of Calpain. **Journal of Biochemistry,** Oxford, v.129, n. 5, p.653-664, 2001.

TAKANO, J.; WATANABE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.128, p. 83-92, 2000.

ANEXOS

Anexo 1

Otimização do PCR

A amplificação ocorreu por meio de ciclos de PCR constituídos por uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94ºC durante 30s, pareamento dos iniciadores (54,0-62,0°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.

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 1.

Tabela 1 – Condições de PCR inicial (pré-otimização)

Reagentes	Concentração da solução estoque	Concentração na reação	Volume por amostra
H_2O			q.s.p 25 μL (13,5)
Tampão	10x	1x	2,5 μL
$MgCl_2$	50 mM	2,0 mM	1,0 μL
Iniciador F	10 pmol/μL	2 pmol/μL	2,5 μL
Iniciador R	10 pmol/μL	2 pmol/μL	2,5 μL
DNTP	10 mM	0,25 mM	0,5 μL
Taq DNA Polimerase	1,5 U/μL	0,75 U	0,5 μL
cDNA	25 ng/μL	25 ng	2,0 μL
Total			25 μL

As condições de amplificação e de temperatura de pareamento de iniciadores estão sintetizadas na tabela 2.

Tabela 2 – Condições de PCR para cada isoforma, após otimização

Gene	Condições PCR (volume final = 25 µL; volumes em µL)								
	H_2O	Tampão 10X	$MgCl_2$ (50mM)	dNTP (10mM)	Iniciador F (2pmol/µL)	Iniciador R (2pmol/µL)	*Taq* DNA *Polimerase* (5U/µL)	cDNA	Temperatura pareamento iniciadores
Calp 1	13,5	2,5	1,0	0,5	2,5	2,5	0,5	2,0	60°C
Calp 2	13,5	2,5	1,0	0,5	2,5	2,5	0,5	2,0	61°C
Calp 3	13,5	2,5	1,0	0,5	2,5	2,5	0,5	2,0	61°C
Actina	13,5	2,5	1,0	0,5	2,5	2,5	0,5	2,0	60°C

Anexo 2

Otimização das condições de PCR para amplificação dos genes

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 1). 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.

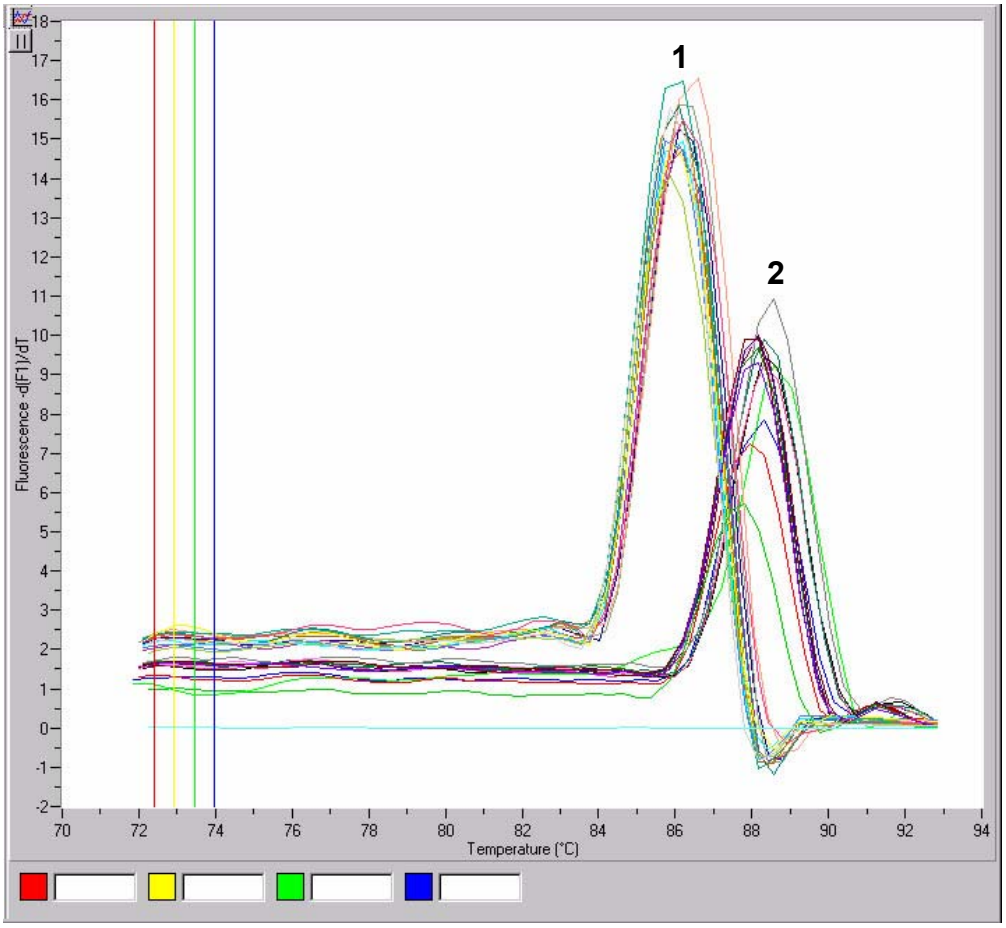

Figura 1 – Curva de desnaturação obtida após quantificação da expressão gênica em termociclador LightCycler®. A presença de um pico único evidencia a especificidade da amplificação. (1) Pico para a Actina; (2) Pico para a Calp 1

Anexo 3

Identificação do genótipo Halotano

Foram analisados o genótipo dos 60 (Figura 1 – amostragem) animais para o genótipo do halotano, apenas três animais apresentaram o genótipo heterozigoto (Hal^{Nn}), já o restante apresentou o genótipo normal (Hal^{NN}),

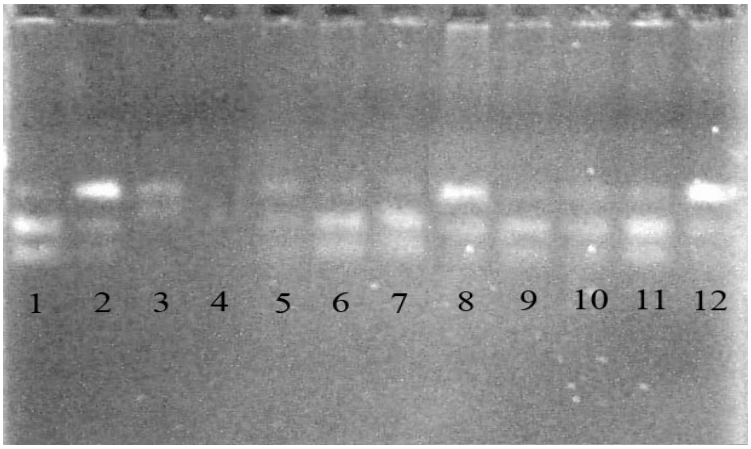

Figura 1 - Amplificação dos produtos de PCR para o gene do halotano. Eletroforese em gel de agarose 2% "Low melting". (1) Marcador para o genótipo recessivo (Hal^{NN}); (2) Marcador para o genótipo heterozigoto (Hal^{Nn}); (3) Marcador para o genótipo dominante (Hal^{nn}); (4) branco; (5) Animal 22; (6) Animal 14; (7) Animal 35; (8) Animal 10; (9) Animal 47; (10) Animal 67; (11) Animal 51; (12) Animal 69

Os animais que tiveram o genótipo heterozigoto (Hal^{Nn}) não apresentaram alterações que caracterizaram PSE para os parâmetros analisados neste experimento. Características como pH inicial e final da carne, temperatura da carcaça quente, grau de marmorização e maciez da carne já haviam sido relatadas como similares entre suínos homozigotos dominantes (Hal^{NN}) livres do gene halotano e heterozigotos portadores de um alelo halotano (Hal^{Nn}) (BRIDI et al.,2006).