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

**Respostas produtivas e expressão gênica induzidas por períodos de
fornecimento de ractopamina para suínos em terminação**

Vivian Vezzoni de Almeida

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

**Piracicaba
2012**

Vivian Vezzoni de Almeida
Engenheira Agrônoma

**Respostas produtivas e expressão gênica induzidas por períodos de fornecimento de
ractopamina para suínos em terminação**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **VALDOMIRO SHIGUERU MIYADA**

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

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Almeida, Vivian Vezzoni de

Respostas produtivas e expressão gênica induzidas por períodos de fornecimento de ractopamina para suínos em terminação / Vivian Vezzoni de Almeida. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
78 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Aditivo 2. Carcaça 3. Crescimento muscular 4. Expressão gênica 5. Nutrição animal 6. Suínos I. Título

CDD 636.4084
A447r

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

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...

Aos meus queridos pais,

Sérgio Antônio e Elizabeth, que nunca mediram esforços para garantir minha formação, pelo amor, carinho e por sempre me ensinarem os reais valores da vida.

Aos meus amados irmãos,

João Paulo e Renato, pelo constante amor, bondade e pureza de alma. Pessoas que me motivam a sonhar a todo momento.

Ao amor da minha vida, Amoracyr,

Sem você meu céu cairia!

Vocês inundam minha vida com carinho, felicidade e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar o meu caminho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, pelas oportunidades que me ofereceram durante minha trajetória na pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento deste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Valdomiro Shigueru Miyada, pela orientação e participação em minha formação.

Ao Prof. Luiz Lehmann Coutinho, por possibilitar que as análises de expressão gênica fossem realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

Ao Prof. Júlio César de Carvalho Balieiro, pelas orientações nas análises estatísticas.

Aos Profs. Dirlei Antônio Berto, Luciana Correia de Almeida Regitano e José Fernando Machado Menten, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos Profs. do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. José Bento Sterman Ferraz, pelo constante incentivo e apoio para que o meu estágio no exterior fosse concretizado.

Ao Prof. Allan P. Schinckel (Purdue University), pelas valiosas sugestões nas análises estatísticas e comentários durante as correções dos manuscritos. Grata pela pronta disponibilidade, ensinamentos imensuráveis e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Kolapo Ajuwon (Purdue University) e à sua equipe de pesquisa (Meliza, Ramesh, Michelle, Hui, Hang, Xiao), por me acolherem em seu laboratório de Tecido Adiposo e me ajudarem a aprimorar diversas técnicas de biologia molecular. Grata pelo reconhecimento que vocês me deram.

Ao Prof. Jon Schoonmaker, pela receptividade em sua casa, por se preocupar com minha acomodação na Purdue Village e pelas agradáveis conversas nos corredores do Lily Hall.

Aos amigos Giovana, Chirstie, Kaitlin e, em especial ao Fábio Motoki, pelos momentos de descontração vividos em West Lafayette.

Sou sinceramente grata às queridas amigas Patrícia W. Z. Pereira e Elisa T. A. da Silva, pela cumplicidade e inesquecíveis momentos compartilhados.

À minha grande amiga, sempre presente, Priscila Lupino Grato... Você é uma pessoa incrível e sua amizade foi fundamental para que este trabalho fosse concretizado. Obrigada por me escutar e enxugar minhas lágrimas nos momentos difíceis.

À grande amiga Carla de Andrade pela amizade verdadeira, ajuda constante e contribuição para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

Agradeço de forma especial aos amigos conquistados em Piracicaba, Saly, Leila Priscila (Xiua), Carol, Mariana Caetano, Zuza, Juninho, Leo, Gabi, Vitão, Cilaine, Matheus e Marcelo.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos Jose Luis Diaz Zuluaga e José Luiz Fonseca Souza, pela disposição e profundo comprometimento com este estudo.

Aos amigos Gustavo Gasparin, pelos ensinamentos das técnicas de biologia molecular, Minos Esperândio Carvalho, pela colaboração nos abates, Kerli Ninov, Aline Cesar, Andrezza Felício, Lilian Rezende e Marcela Paduan, pela amizade e imenso apoio durante as análises de expressão gênica.

Agradeço ao Bernardo Berenchtein, Maicon Sbardella e Danilo do Prado Perina, pela ajuda na execução de etapas deste trabalho.

À equipe de avicultura do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Kelen, Rafa, Michele, Leo e Gislaine, pela amizade e convivência.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, em especial ao José Pires, Leonilço Ramos, Gilberto Aliberti, Antônio Carlos Oliva, José Knapik e Paulo Marcos de Oliveira, por toda colaboração despendida nesta pesquisa, ao José Henrique Rocha e à querida Bruna Alves Bonfim, pela amizade.

Aos funcionários do abatedouro experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, pela essencial colaboração.

À Ouro Fino Nutrição Animal, pelo fornecimento da ractopamina.

À Ajinomoto Nutrição Animal, pelo fornecimento dos aminoácidos sintéticos.

Toda minha gratidão aos meus queridos sogros, Rosana Maria e Júlio Sérgio, por todas as orações, conselhos, suporte emocional e momentos agradáveis que me proporcionaram.

Aos meus queridos cunhados, Juliana Maria e Carlos Augusto, por todo carinho, risadas e momentos inesquecíveis, e à pequena Maria Luísa, por sua luz contagiante.

Agradeço de coração, aos meus padrinhos, Regiane e Cláudio César, e filhos, Henrique e Gisele, pelo imenso carinho e alegrias.

Aos meus anjos da guarda e vivos em minhas lembranças, Sílvio (in memorian) e Antônio (in memorian). A fé que tenho no nosso reencontro fortalece-me a cada dia.

Agradeço às minhas avós, Dolores e Gilka, por sempre estarem comigo.

Por fim, a todas as pessoas que sempre estiveram dispostas a me ajudar!

Muito Obrigada!

*“A ave sai do ovo. O ovo é o mundo. Quem quiser nascer
tem que destruir um mundo”*

Demian - Hermann Hesse

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
Referências.....	29
2 EFEITOS DO TEMPO DE FORNECIMENTO DE RACTOPAMINA SOBRE O DESEMPENHO, CONCENTRAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA DE SUÍNOS EM TERMINAÇÃO.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Material e Métodos.....	37
2.3 Resultados e Discussão.....	44
2.4 Conclusão.....	50
Referências.....	51
3 EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS E DAS ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA INDUZIDA PELA RACTOPAMINA EM SUÍNOS NÃO PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DE RIANODINA DO TIPO 1.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	58
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e Métodos.....	60
3.3 Resultados e Discussão.....	70
3.4 Conclusão.....	75
Referências.....	75

RESUMO

Respostas produtivas e expressão gênica induzidas por períodos de fornecimento de ractopamina para suínos em terminação

O agonista β -adrenérgico ractopamina (RAC) modifica a composição da carcaça suína por aumentar a massa muscular e reduzir a deposição de gordura. O objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre o desempenho, concentração de ureia plasmática (CUP), características de carcaça e expressão gênica dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) e das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) em suínos em terminação. Oitenta suínos, machos castrados (PV inicial = $69,42 \pm 1,24$ kg), foram utilizados em um experimento em blocos completos casualizados com cinco tratamentos, oito repetições por tratamento e dois animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos consistiram de rações sem RAC (controle) ou com 10 ppm de RAC fornecidas por 7, 14, 21 ou 28 dias pré-abate. O PV individual e o consumo de ração por baia foram obtidos para determinar o ganho diário de peso (GDP), o consumo diário de ração (CDR) e a conversão alimentar (CA). Amostras de sangue foram coletadas para determinação da CUP. No final do experimento, os animais (PV final = $102,46 \pm 1,44$ kg) foram abatidos e amostras de pelos e do músculo *Longissimus dorsi* coletadas. As carcaças foram avaliadas 24 horas *post-mortem*. As amostras de pelos foram utilizadas para detecção da mutação no gene do receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1). A expressão gênica dos β -AR (subtipos β_1 e β_2) e das isoformas MyHC (I, IIa, IIx/d e IIb) foi quantificada nas amostras de músculo. As análises estatísticas foram realizadas apenas com os animais homozigotos dominantes para a mutação no gene do RYR1. O aumento no período de fornecimento de RAC não afetou ($P > 0,05$) o PV final, o GDP e o CDR, porém resultou em melhora linear ($P < 0,01$) na CA. Melhoras ($P < 0,05$) nas médias semanais de GDP e CA foram observadas durante os primeiros 21 dias de fornecimento de RAC, no entanto, o crescimento animal declinou ($P < 0,05$) na 4ª semana de tratamento. A CUP apresentou efeito quadrático ($P < 0,01$) com o aumento na duração do fornecimento de RAC. Houve aumento linear ($P \leq 0,01$) no peso da carcaça quente, na profundidade do músculo *Longissimus dorsi*, na área de olho de lombo e na relação carne:gordura com o aumento na duração do tratamento com RAC. Não foram detectados efeitos da RAC ($P > 0,05$) sobre a expressão gênica dos β_1 -AR e das isoformas MyHC IIa e MyHC IIx/d, porém o aumento no período de fornecimento de RAC tendeu a reduzir linearmente ($P = 0,08$) a expressão gênica dos β_2 -AR. Embora os níveis de RNAm da isoforma MyHC I tenham sido reduzidos linearmente ($P < 0,01$), a expressão gênica da isoforma MyHC IIb aumentou linearmente ($P < 0,01$) com o aumento na duração do tratamento com RAC. Portanto, as melhores respostas de desempenho e carcaça ocorreram quando a RAC foi fornecida por 21 e 28 dias, respectivamente. Além disso, o agonista alterou a expressão gênica das isoformas MyHC, e é possível que a ação da RAC esteja relacionada com a população de β_2 -AR.

Palavras chave: Agonista β -adrenérgico; Crescimento muscular; Nutrição; Suíno

ABSTRACT

Production responses and gene expression induced by ractopamine feeding duration for finishing pigs

The β -adrenergic agonist ractopamine (RAC) modifies the swine carcass composition by increasing muscle mass and decreasing fat deposition. The objective in this study was to evaluate the effects of RAC feeding duration on performance, plasma urea nitrogen (PUN) concentration, carcass traits, and gene expression of β -adrenergic receptors (β -AR) and myosin heavy chain (MyHC) isoforms in finishing pigs. Eighty barrows (initial BW = 69.42 ± 1.24 kg) were used in a randomized complete block design experiment with five treatments, eight replicates per treatment, and two animals per experimental unit (pen). The dietary treatments consisted of diets containing no RAC (control) or 10 ppm RAC fed for 7, 14, 21, or 28 days before slaughter. Individual pig BW and pen feed disappearance were obtained to determine average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed to gain ratio (F:G). Blood samples were collected for determination of PUN concentrations. At the end of the experiment, pigs (final BW = 102.46 ± 1.44 kg) were slaughtered and hair and Longissimus dorsi muscle samples collected. The carcasses were evaluated 24 hours post-mortem. Hair samples were used to detect the mutation of the ryanodine receptor type 1 (RYR1) gene. Gene expression of β -AR (β_1 - and β_2 -subtypes) and MyHC isoforms (I, IIa, IIx/d, and IIb) was quantified in the muscle samples. Statistical analyses were performed using only the homozygous dominant pigs for the RYR1 gene mutation. Increasing RAC feeding period did not affect ($P > 0.05$) final BW, ADG, and ADFI, but resulted in a linear improvement ($P < 0.01$) in F:G. Average weekly improvements ($P < 0.05$) in ADG and F:G were observed during the first 21 days of RAC feeding, however, animal growth declined ($P < 0.05$) in the 4th week of treatment. The PUN concentrations showed a quadratic effect ($P < 0.01$) as RAC feeding duration increased. There were linear increases ($P \leq 0.01$) in hot carcass weight, Longissimus dorsi muscle depth, loin eye area, and muscle to fat ratio as RAC treatment duration increased. No effects of RAC feeding ($P > 0.05$) were detected for β_1 -AR and for isoforms of MyHC IIa and MyHC IIx/d gene expression, but increasing RAC feeding period tended to linearly decrease ($P = 0.08$) β_2 -AR gene expression. Even though mRNA levels of MyHC I isoform decreased linearly ($P < 0.01$), gene expression of MyHC IIb isoform increased linearly ($P < 0.01$) as RAC treatment duration increased. Therefore, greater growth and carcass responses occurred when RAC was fed for 21 and 28 days, respectively. Furthermore, the agonist altered the MyHC gene expression and the RAC action may be related to the β_2 -AR population.

Keywords: β -adrenergic agonist; Muscle growth; Nutrition; Swine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura molecular das feniletilaminas e as substituições no anel aromático dos agonistas β -adrenérgicos.....	20
Figura 1.2 – Estrutura molecular da ractopamina.....	21
Figura 1.3 – Sinalização intracelular da ractopamina.....	22
Figura 1.4 – Etapas da dessensibilização, ressensibilização e <i>down-regulation</i> dos receptores β -adrenérgicos	24
Figura 1.5 – Estrutura molecular da miosina da classe II.....	26
Figura 2.1 – Padrão de restrição do produto de amplificação de um fragmento da sequência de DNA do gene do receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1) digerido com a enzima de restrição <i>HhaI</i>	43
Figura 2.2 – Conversão alimentar (CA) – A e concentração de ureia plasmática (CUP) – B, em função dos períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate.....	46
Figura 2.3 – Peso da carcaça quente (PCQ) – A, área de olho de lombo (AOL) – B, profundidade do músculo <i>Longissimus dorsi</i> (PM) – C e relação carne:gordura (RCG) – D, em função dos períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate.....	49
Figura 3.1 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para visualização das bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) em amostras do músculo <i>Longissimus dorsi</i> de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina pré-abate.....	63
Figura 3.2 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para verificação da amplificação e especificidade de cada gene estudado	66
Figura 3.3 – Curva de desnaturação do gene calibrador (β -actina) e da isoforma da cadeia pesada de miosina (MyHC) IIb gerada no presente estudo	68
Figura 3.4 – Expressão gênica relativa dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR) – A e dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) – B no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate.....	72
Figura 3.5 – Expressão gênica relativa das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) I – A, MyHC IIa – B, MyHC IIx/d – C e MyHC IIb – D no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –Composição percentual e valores calculados da dieta basal.....	39
Tabela 2.2 –Médias do peso vivo inicial (PV inicial), peso vivo final (PV final), ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar (CA) e concentração de ureia plasmática (CUP) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate.....	45
Tabela 2.3 –Médias semanais do ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC)	47
Tabela 2.4 –Médias do peso vivo pós-jejum (PVJ), peso da carcaça quente (PCQ), rendimento de carcaça (RC), comprimento de carcaça (CC), espessura média de toucinho (EMT), profundidade da gordura (PG), profundidade do músculo <i>Longissimus dorsi</i> (PM), área de gordura (AG), área de olho de lombo (AOL), relação carne:gordura (RCG) e rendimento de carne magra (RCM) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate	48
Tabela 3.1 –Sequência dos <i>primers</i> , tamanho do fragmento amplificado expresso em pares de bases (pb), temperatura de anelamento para cada par de <i>primer</i> e número de acesso (Gene ID) no <i>GenBank</i> do NCBI.....	65
Tabela 3.2 –Temperatura de <i>melting</i> dos genes estudados	68
Tabela 3.3 –Valores de <i>threshold cycle</i> (Ct) mínimo, médio e máximo para os genes referência β -actina, GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e 18S rRNA (18S RNA ribossomal)	70
Tabela 3.4 –Expressão gênica relativa dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR), receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) e das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) I, MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC IIb no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate	71

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais consumida no mundo, porém no Brasil seu consumo continua aquém do observado para as carnes de frango e bovina. Em 2011, o consumo nacional de carne suína foi de 15,10 kg/habitante (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA, 2012), sendo que, deste montante, apenas 37% são consumidos sob a forma de carne *in natura* e 63% sob a forma de produtos processados, dentre os quais a linguiça e a salsicha apresentam prevalência na aquisição domiciliar (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS, 2011). O baixo consumo nacional da carne suína *in natura* pode estar associado à baixa valorização dos atributos que os consumidores modernos desejam, como embalagens práticas e com menores quantidades, cortes variados e de rápido preparo (DE BARCELLOS et al., 2008). Adicionalmente, além do preço de varejo da carne suína ser fator decisivo na escolha do consumidor, a imagem de que o produto é gorduroso e prejudicial à saúde ainda permanece enraizada na sociedade brasileira, sendo reforçada pela forma de apresentação do produto nos pontos de venda (VALENTINI, 2008).

O setor suinícola brasileiro lida atualmente com duas situações distintas. A primeira é do ponto de vista dos produtores, pois a implementação do sistema de tipificação de carcaças suínas pelas indústrias frigoríficas, especialmente na Região Sul do Brasil, tornou o valor da carne magra um fator economicamente importante, sendo bonificados os produtores que fornecerem matéria prima de melhor qualidade. A segunda diz respeito aos consumidores modernos, uma vez que a busca por uma vida mais saudável ocasionou crescente demanda destes por carnes e produtos cárneos com baixos teores de gordura e de colesterol. Nesse sentido, é importante a adoção de estratégias nutricionais capazes de modificar a composição da carcaça suína com o intuito de potencializar o rendimento de carne magra. Logo, crescente interesse científico tem sido direcionado para o uso do agonista β -adrenérgico ractopamina (RAC) como aditivo na dieta de suínos em terminação, fase em que o animal apresenta redução na eficiência alimentar e aumento na deposição de gordura.

O grande potencial de utilização dos agonistas β -adrenérgicos iniciou-se na medicina humana e veterinária como antiasmáticos, broncodilatadores e agentes tocolíticos (SUMANO; OCAMPO; GUTIÉRREZ, 2002). O reconhecimento do potencial anabólico dos agonistas β -adrenérgicos despertou interesse progressivo na comunidade científica e, portanto, desde meados da década de 1980 essas substâncias têm sido empregadas na nutrição animal como agentes repartidores de nutrientes a fim de alterar a composição corporal a favor

da deposição proteica (MOODY; HANCOCK; ANDERSON, 2000). De origem catecolamínica e pertencentes à família das feniletilaminas, os agonistas β -adrenérgicos apresentam estrutura molecular constituída por anel aromático, grupo hidroxila ligado ao carbono β , nitrogênio carregado positivamente na cadeia lateral etanolamina e radical volumoso (R) unido ao nitrogênio alifático, o que torna a molécula mais específica para os receptores adrenérgicos do tipo β (SMITH, 1998) (Figura 1.1). A estrutura molecular das feniletilaminas permite substituições no anel benzênico (A, B ou C), nos carbonos α e β , bem como no grupo amino terminal, originando compostos variados com atividades simpaticomiméticas.

Substituições no anel benzênico			Grupo	Agonista β -adrenérgico
A	B	C		
-OH	-OH	-H	Catecol	Isoproterenol
-H	-OH	-H	Fenol	Ractopamina, Ritodrina
-CH ₂ OH	-OH	-H	Saligenina	Salbutamol, Salmeterol
-OH	-H	-OH	Resorcinol	Fenoterol, Terbutalina
-Cl	-NH ₂	-Cl	Halogenado	Clembuterol

Figura 1.1 – Estrutura molecular das feniletilaminas e as substituições no anel aromático dos agonistas β -adrenérgicos. Adaptado de Smith (1998)

A análise detalhada da estrutura molecular da RAC revelou que além do radical ligado ao grupo amino terminal ser o butilfenol, a substância é um excelente exemplo de quiralidade, pois apresenta dois átomos de carbono com quatro substituintes diferentes que gera assimetria na molécula (Figura 1.2). Duas conformações podem surgir de cada carbono quiral (R ou S) e, portanto, a RAC comercializada é uma mistura de quatro estereoisômeros: RR, RS, SR e SS (RICKE et al., 1999).

Figura 1.2 – Estrutura molecular da ractopamina. Asteriscos indicam os carbonos quirais da molécula. Adaptado de Ricke et al. (1999)

Quando administrada por via oral, a RAC apresenta absorção que varia de 80 a 90%, atingindo picos plasmáticos entre uma e duas horas após seu fornecimento (PALERMO NETO, 2002). Ao alcançar o estômago, o baixo pH favorece a formação de um cátion no grupo amino terminal da molécula, enquanto a natureza mais neutra do intestino delgado reduz a ionização, o que facilita a absorção passiva por meio da mucosa intestinal (SMITH, 1998). Por não se ligar às proteínas plasmáticas para sua distribuição na circulação sistêmica, a RAC possui meia vida de cinco horas (PALERMO NETO, 2002). As vias metabólicas de biotransformação deste agonista ocorrem no fígado por meio da conjugação com sulfato ou ácido glicurônico, originando metabólitos normalmente mais polares e, portanto, mais fáceis de serem eliminados pela urina ou bile (SMITH, 1998). Para suínos, a excreção biliar parece ser menos importante, uma vez que 88% da RAC (^{14}C) é eliminada via urinária (DALIDOWICZ; THOMSON; BABBITT, 1992).

A capacidade da RAC em desviar o fluxo de nutrientes para o anabolismo proteico em detrimento do lipídico está envolvida em complexas redes de sinalização intracelular, cuja dinâmica vem sendo progressivamente elucidada. A tradicional via de sinalização é aquela em que alterações conformacionais ocorrem no receptor β -adrenérgico (β -AR) após o acoplamento da RAC, iniciando o ciclo de atividade da proteína G estimulatória (G_s) (Figura 1.3). O reconhecimento do sinal químico pelos β -AR desencadeia a substituição da guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) na subunidade α_s da proteína G_s , com consequente dissociação desta fração do dímero $\beta\gamma$, o que torna a proteína G_s ativa (ALBERTS et al., 2004). O complexo $G\alpha_s$ -GTP difunde-se livremente pela superfície interna da membrana celular, o que acarreta na estimulação da enzima adenil ciclase que, por sua vez, catalisa a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) a partir da adenosina trifosfato (ATP). O AMPC interage com a proteína quinase dependente de AMPC (PKA) que até então se configurava no estado inativo, ou seja, organizada na forma de

tetrâmeros com duas subunidades regulatórias com alta afinidade para o AMPc e duas subunidades catalíticas (BENOVIC, 1988). A ligação do AMPc às subunidades regulatórias da PKA induz a uma mudança conformacional, liberando as subunidades catalíticas que conduzem a fosforilação de enzimas, responsáveis pela resposta celular. O término do sinal celular é proveniente da atividade intrínseca da guanosina trifosfatase (GTPase) da subunidade α movida pela conversão de GTP em GDP e fósforo inorgânico (ALBERTS et al., 2004). Com isso, a proteína G assume sua forma heterotrimérica inativa com o intuito de finalizar o ciclo de transdução de sinal e manter o trîmero disponível para novo estímulo.

A região reguladora de determinados genes apresenta uma sequência particular de DNA, denominada elemento de resposta ao AMPc (CRE), que é reconhecida pela proteína de ligação ao CRE (CREB). Quando as subunidades catalíticas da PKA liberadas migram para o núcleo celular, fosforilam a CREB ligada à CRE. A CREB fosforilada recruta a proteína de ligação ao CREB (CBP), facilitando o início da transcrição gênica (ALBERTS et al., 2004).

Figura 1.3 – Sinalização intracelular da ractopamina. $G_{\alpha s}\beta/\gamma$: proteína G estimulatória; β/γ : subunidades β e γ ; $G_{\alpha s}$: subunidade α ; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; ATP: adenosina trifosfato; AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase dependente de AMPc; E: enzima, EPO_4 : enzima fosforilada. Adaptado de Anderson, Moody e Hancock (2005)

Em adipócitos, embora a via de sinalização do AMPc/PKA esteja bem estabelecida, outra via de transdução de sinal, que envolve a cascata de fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), tem sido proposta. Nesse caso, a interação entre agonista e β -AR estimula a proteína G inibitória (G_i), que culmina na ativação da cascata das MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) (ROBIDOUX; MARTIN; COLLINS, 2004). No último estágio desta cascata, ERK fosforila tanto a proteína perilipina A como a enzima lipase sensível a hormônio (HSL), fato que estimula a mobilização dos triglicerídeos estocados nos adipócitos.

A dinâmica da lipólise é controlada por interações complexas entre enzimas e proteínas estruturais associadas aos corpúsculos lipídicos. Uma dessas proteínas é a perilipina A que, quando desfosforilada, recobre a micela e bloqueia o acesso da HSL aos triglicerídeos, criando uma barreira à lipólise (TANSEY et al., 2004). Quando assumem a forma fosforilada, a perilipina A e a HSL citosólica atuam na concretização da lipólise. A perilipina A desloca-se da superfície da gotícula de gordura e facilita a translocação da HSL em direção a esta região, com consequente hidrólise dos triglicerídeos (BRASAEMLE, 2007). Baixas e altas concentrações de agonista β -adrenérgico podem desencadear as vias de sinalização da PKA e das MAPK, respectivamente, porém a cascata de fosforilação das MAPK possivelmente não seja de grande importância para a modificação do crescimento animal (MERSMANN, 2005).

Em decorrência da estimulação contínua das células com agonista β -adrenérgico, alterações adaptativas podem ser desencadeadas. Essas alterações, conhecidas como dessensibilização, promovem redução na responsividade celular, e este processo pode ser dividido em dessensibilização homóloga e heteróloga (Figura 1.4). Na dessensibilização homóloga, após ativação da proteína G_s , a fração α da proteína desloca-se do dímero $\beta\gamma$. O dímero $\beta\gamma$, por sua vez, permanece próximo ao complexo agonista/ β -AR, facilitando a translocação da proteína quinase dos receptores acoplados à proteína G, denominada quinase do receptor β -adrenérgico (β -ARK), para a membrana celular. A β -ARK fosforila apenas os β -AR ocupados pelo agonista em múltiplos resíduos de serina e treonina (MILLS, 2002). A ligação da proteína citoplasmática, β -arrestina, aos β -AR fosforilados inibe o acoplamento destes à proteína G, tornando-os inativos (WALLUKAT, 2002). Subsequentemente, a β -arrestina liga-se com alta afinidade às moléculas de clatrina, iniciando a internalização (endocitose) dos β -AR fosforilados em vesículas recobertas por essas moléculas e, mais tarde, para compartimentos endossômicos (LEFKOWITZ, 1998). A recuperação da atividade dos β -AR, fenômeno conhecido como ressensibilização, dá-se com a remoção do agonista. Dessa forma, os β -AR internalizados são desfosforilados por fosfatases, dissociados da β -arrestina e

reciclados para a membrana celular, onde se tornam aptos a iniciarem novo ciclo de regulação (LHOSE et al., 1990).

Em contrapartida, a dessensibilização heteróloga ocorre de forma generalizada e não específica, visto que a PKA fosforila preferencialmente a terceira alça transmembranar de qualquer β -AR (PINTO; GUIDA-CARDOSO; AREAS, 2005). De forma similar à dessensibilização homóloga, os processos que sucedem a fosforilação dos β -AR pela PKA são: desacoplamento da proteína G_s , ligação da β -arrestina e internalização dos β -AR (MILLS, 2002). Além disso, a fosforilação dos β -AR pela PKA também pode envolver a ativação da proteína G_i que culmina na cascata das MAPK (JOHNSON, 2006).

Figura 1.4 – Etapas da dessensibilização, ressensibilização e *down-regulation* dos receptores β -adrenérgicos. $G\alpha_i\beta\gamma$: proteína G inibitória; $G\alpha_s$: subunidade α da proteína G estimulatória; $\beta\gamma$: subunidades β e γ ; GTP: guanosina trifosfato; AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase dependente de AMPc; β -ARK: quinase do receptor β -adrenérgico; P: fosforilação; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos. 1: Sequestro dos receptores β -adrenérgicos; 2: Ressensibilização; 3: Reciclagem; 4: *Down-regulation*. Adaptado de Benovic et al. (1988); Lefkowitz (1998); Pinto, Guida-Cardoso e Areas (2005)

Enquanto a dessensibilização refere-se à redução temporária na densidade dos β -AR presentes na superfície celular, o processo de *down-regulation* implica na diminuição do número total destes por meio da internalização, com subsequente degradação dos β -AR nos lisossomas (ALBERTS et al., 2004; LEFKOWITZ, 1998). Também foi demonstrado que após a internalização por endocitose, os β -AR podem receber a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase (JOHNSON, 2006), sendo em seguida degradados no proteassoma, complexo proteolítico dependente de ATP localizado no citosol (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009a). Em adição, a internalização dos β -AR em vesículas de transporte revestidas por clatrina ativa a cascata das MAPK (LEFKOWITZ, 1998), o que pode resultar na migração das MAPK para o núcleo de forma a afetar a proteína CREB, reprimindo a transcrição gênica dos β -AR e não suprimindo a perda destes na membrana plasmática (MILLS, 2002).

Considerando que a RAC está associada com o anabolismo proteico, o envolvimento deste aditivo nas respostas adaptativas do músculo estriado esquelético deve ser explorado para o melhor entendimento do crescimento muscular induzido. O músculo estriado esquelético é formado pela associação de fibras musculares com a matriz extracelular (SILVA; CARVALHO, 2007). As proteínas contrácteis, miosina e actina, estão envolvidas na organização do aparato contrátil muscular. Por meio de análises filogenéticas foi possível identificar 37 tipos de miosinas, sendo categorizadas em 18 classes distintas (RICHARDS; CAVALIER-SMITH, 2005). Dentre as diversas classes, as miosinas da classe II, ou miosinas convencionais, destacam-se por estarem presentes nas células musculares estriadas (PIOVESAN et al., 2009).

Cada molécula de miosina da classe II é constituída por seis cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas de miosina (MyHC) e quatro cadeias leves de miosina (MyLC) (WEISS; LEINWAND, 1996). A porção N-terminal da MyHC dobra-se em uma cabeça globular alongada (domínio motor) com capacidade de se associar às MyLC, regulatória e essencial, enquanto a porção C-terminal consiste em uma longa cauda filamentosa formada pelo entrelaçamento de longas regiões em α hélice de duas MyHC (RUPPEL; SPUDICH, 1996). Quando digerida com tripsina, a molécula de miosina é clivada em dois fragmentos: meromiosina leve e meromiosina pesada. Apenas o segundo fragmento apresenta atividade da enzima adenosina trifosfatase (ATPase) e capacidade de se associar às MyHC (LOWEY et al., 1969). O tratamento subsequente da meromiosina pesada com papaína origina dois subfragmentos: 1 e 2, sendo no primeiro mantido o sítio catalítico para a

hidrólise do ATP, bem como o sítio de ligação com a actina (LOWEY et al., 1969) (Figura 1.5).

Figura 1.5 – Estrutura molecular da miosina da classe II. S1: subfragmento 1; S2: subfragmento 2. Adaptado de Voet e Voet (2006)

Em mamíferos, as MyHC são codificadas por uma família multigênica altamente conservada com 11 isoformas conhecidas, entre as quais se destacam a MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC IIb, por serem amplamente distribuídas na musculatura esquelética de mamíferos adultos (PETTE; STARON, 2001). Isoformas são proteínas muito similares oriundas do *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro (pré-RNAm), ou seja, as diferentes maneiras de remoção dos íntrons e junção dos éxons produz múltiplas variações do RNAm maduro e, portanto, do produto proteico (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009b). Pequenas diferenças na sequência de aminoácidos destas isoformas ocasionam alterações estruturais e funcionais como, por exemplo, na velocidade de contração muscular (REGGIANI; BOTTINELLI; STIENEN, 2000). As isoformas MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC IIb foram atribuídas aos tipos de fibras musculares definidos histoquimicamente como I, IIA, IIX/D e IIB, respectivamente (HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1995). Ressalta-se que a isoforma MyHC IId e a fibra do tipo IID são consideradas equivalentes à isoforma MyHC IIx e à fibra do tipo IIX, portanto, ambas as nomenclaturas podem ser encontradas na literatura.

Com essas informações, pode-se concluir que a ampla heterogeneidade nas propriedades contráteis e metabólicas das fibras musculares é dependente da expressão preponderante de uma determinada isoforma MyHC em cada tipo de fibra (CANEPARI et al., 2010). Fibras do tipo I e IIB apresentam fenótipos opostos, uma vez que são fibras oxidativas (contração lenta) e glicolíticas (contração rápida), respectivamente (PIOVESAN et al., 2009).

Por outro lado, fibras do tipo IIA e IIX/D são consideradas intermediárias, com similaridade às fibras do tipo I e IIB, respectivamente (DA COSTA; CHANG, 2005).

A plasticidade do músculo esquelético é definida como a capacidade das fibras musculares ajustarem suas propriedades contrácteis e metabólicas em resposta a determinados estímulos, tais como envelhecimento e atividade física, que impõem novas demandas funcionais aos músculos, resultando na alteração da expressão proteica das isoformas MyHC (CANEPARI et al., 2010; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). De modo geral, a modificação na expressão proteica das isoformas MyHC tende a seguir o esquema geral de transição: MyHC I $\leftrightarrow$ MyHC IIA $\leftrightarrow$ MyHC IIX/d $\leftrightarrow$ MyHC IIB (as setas denotam possíveis transições entre as diferentes isoformas MyHC dentro da fibra muscular) (PETTE; STARON, 2001). Neste contexto, a RAC revelou ser um potente modificador do fenótipo das fibras musculares no sentido de lento para rápido (DEPREUX et al., 2002). Entretanto, embora seja importante, a expressão gênica das isoformas MyHC induzida pela RAC tem sido pouco estudada.

Embora o aumento na massa muscular e a redução na deposição de gordura na carcaça sejam preocupações na produção de carne suína, a qualidade da mesma também deve ser levada em consideração, pois influencia o consumidor na seleção inicial e na satisfação final do produto. O direcionamento da produção suína para o aumento na percentagem de carne magra desencadeou alterações na composição proximal, bem como nas características bioquímicas do músculo (MAGANHINI et al., 2007). Tais modificações foram atribuídas a uma mutação que resulta na substituição de uma única base C (citosina) por T (timina) no gene que codifica para o receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1), proteína transmembrana que atua nos canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (FUJII et al., 1991). Animais homozigotos recessivos para esta mutação são extremamente sensíveis a situações de estresse. Por outro lado, estes animais apresentam desenvolvimento muscular superior em relação aos animais normais (homozigoto dominante), porém são mais suscetíveis ao desenvolvimento de carnes PSE (pálida, mole e exsudativa) (COUTINHO; REGITANO, 2001).

A mutação no gene do RYR1 está associada ao aparecimento da Síndrome do Estresse Suíno (PSS) (FUJII et al., 1991). Sabe-se que animais portadores da mutação apresentam disfunção estrutural e funcional nos RYR1, assim, grande quantidade de cálcio é liberada do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma, fato que ocasiona prolongada estimulação da atividade contráctil do músculo e rápido desdobramento do glicogênio, resultando em metabolismo celular acelerado, acidificação do músculo e produção de calor. Devido à elevada produção de calor, esta síndrome também é conhecida como Hipertermia

Maligna (MacLENNAN; PHILLIPS, 1992). Até o início da década de 1990, essa mutação era detectada pelo uso do gás anestésico halotano, o que originou o termo gene halotano (HAL). No entanto, este teste somente diferencia animais normais dos homozigotos recessivos para a mutação, não permitindo a identificação de animais heterozigotos (COUTINHO; REGITANO, 2001). Com os avanços na área de genética molecular, Fujii et al. (1991) desenvolveram um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), permitindo a detecção de três genótipos: HAL^{NN}, animal normal ou homozigoto dominante; HAL^{Nn}, heterozigoto; HALⁿⁿ, animal sensível ou homozigoto recessivo.

Comercialmente, a mutação no gene que codifica para o RYR1 é de interesse, pois melhora a eficiência alimentar dos animais (LEACH et al., 1996), aumenta a quantidade de carne e diminui a deposição de gordura na carcaça (OLIVER; GISPERT; DIESTRE, 1993). Além disso, suínos com genótipo HAL^{Nn} apresentam vantagens em termos de eficiência alimentar e carcaças mais magras em comparação àqueles com genótipo HAL^{NN} (LEACH et al., 1996). Diante desses aspectos, considera-se que os efeitos desta mutação são similares aos ocasionados pela RAC. Portanto, em estudos que abordem o uso de RAC para suínos em terminação, a identificação dos três genótipos halotano na população animal estudada é necessária a fim de remover os efeitos dos animais portadores da mutação (HAL^{Nn} e HALⁿⁿ) e, conseqüentemente, garantir que a resposta animal seja definida apenas pelo agonista.

É vasta a literatura científica relativa ao uso de agentes repartidores de nutrientes para suínos, com destaque para o cimaterol (MOSER et al., 1986; YEN et al., 1990), salbutamol (WARRISS et al., 1990), clenbuterol (JENTSCH et al., 1993; PETERLA; SCANES, 1990) e RAC (BARK et al., 1992; CROME et al., 1996). Embora existam vários agonistas β -adrenérgicos, o clenbuterol e a RAC foram os únicos que tiveram seus perfis farmacocinéticos e toxicológicos avaliados pelos membros do *Joint Expert Committe on Food Additives* (JECFA) do *Codex alimentarius* da *Food and Agriculture Organization* (FAO)/Organização Mundial da Saúde (OMS) para o uso como aditivos repartidores de nutrientes na produção animal (PALERMO NETO, 2002).

Em virtude dos relatos sobre intoxicação alimentar com resíduos de clenbuterol ocorridos na Espanha e França (MITCHELL; DUNNAVAN, 1998), grandes mercados como os EUA, China e União Europeia baniram o uso de clenbuterol para fins de promoção do crescimento em animais de produção. Com isso, intensas pesquisas foram conduzidas com RAC e, de modo geral, o tratamento oral dos suínos com este composto tem evidenciado maiores peso vivo final e ganho de peso (BOLER et al., 2011; RICKARD et al., 2012), sendo

a melhora na conversão alimentar (ALMEIDA et al., 2010; WATANABE et al., 2011) a resposta de desempenho de maior consistência na literatura. Outro efeito deste aditivo está associado ao maior rendimento de carcaça (KUTZLER et al., 2011) e ao aumento na área de olho de lombo (RICKARD et al., 2012), enquanto sua capacidade em reduzir a espessura de toucinho ainda permanece contraditória (HINSON et al., 2011; LEICK et al., 2010). Mesmo diante dos benefícios proporcionados pela RAC na cadeia produtiva da carne suína, seu futuro ainda permanece incerto. É fato bem estabelecido a proibição tanto da importação como da exportação de carne suína oriunda de animais suplementados com RAC na União Europeia e na China, embora os EUA, Brasil, México e Canadá permitam o uso do agonista.

Com base no exposto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre o desempenho, concentração de ureia plasmática e características de carcaça de suínos em terminação. Além disso, objetivou-se determinar a relação entre períodos de fornecimento de RAC e expressão gênica dos β -AR (subtipos β_1 e β_2) e das isoformas MyHC (I, IIa, IIx/d e IIb) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos em fase de terminação.

Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Comunicação celular. In: JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (Ed.) **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo: Artmed, 2004. cap. 15, p. 831-906.
- ALMEIDA, V.V.; BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; BRAZ, D.B.; MIYADA, V.S. Ractopamina, cromo-metionina e suas combinações como aditivos modificadores do metabolismo de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 9, p. 1969-1977, 2010.
- ANDERSON, D.B.; MOODY, D.E.; HANCOCK, D.L. Beta adrenergic agonist. In: POND, W.G.; BELL, A.W. (Ed.). **Encyclopedia of Animal Science**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 104-107.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Brasil – Oferta e demanda da carne suína – 2002 a 2011**. Disponível em: < <http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 16 jun. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS. Relatório anual do registro genealógico e provas zootécnicas de suínos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA SUINOCULTURA, 14., 2011. Salvador. **Anais...** Salvador: ABCS, 2011. p. 1-41.

BARK, L.J.; STAHL, T.S.; CROMWELL, G.L.; MIYAT, J. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fed ractopamine.

Journal of Animal Science, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3391-3400, 1992.

BENOVIC, J.L.; BOUVIER, M.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 405-428, 1988.

BOLER, D.D.; HOLMER, S.F.; DUNCAN, D.A.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; STITES, C.R.; PETRY, D.B.; HINSON, R.B.; ALLEE, G.L.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Fresh meat and further processing characteristics of ham muscles from finishing pigs fed ractopamine hydrochloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 210-220, 2011.

BRASAEMLE, D.L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 48, n. 12, p. 2547-2559, 2007.

CANEPARI, M.; PELLEGRINO, M.A.; D'ANTONA, G.; BOTTINELLI, R. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 199, n. 4, p. 465-476, 2010.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Síntese proteica. In: _____. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2009a. cap. 31, p. 431-448.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Regulação da expressão gênica. In: _____. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2009b. cap. 32, p. 449-464.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.12-24.

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 cutting yields of pigs slaughtered at 107 and 125 kilograms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 4, p. 709-716, 1996.

DA COSTA, N.; CHANG, K.C. Molecular characterisation of the porcine skeletal myosin heavy chain cluster and a major candidate regulatory domain. **Archiv Tierzucht**, Dummerstorf, v. 48, sp. iss., p. 32-39, 2005.

DALIDOWICZ, J.E.; THOMSON, T.D.; BABBITT, G.E. Ractopamine hydrochloride, a phenethanolamine repartitioning agent: metabolism and tissue residues. In: HUTSON, D.H.; HAWKINS, D.R.; PAULSON, G.D.; STRUBLE, C.B. (Ed.) **Xenobiotics and Food-Producing Animals – Metabolism and Residues**. Washington: ACS Symposium Series, 1992. chap. 16, p. 234-243.

DE BARCELLOS, M.D.; FERREIRA, G.C.; VIEIRA, L.M.; AGUIAR, L.K. Food innovation: perspectives for the poultry chain in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MANAGEMENT IN AGRI-FOOD CHAINS AND NETWORKS, 8., 2008. Ede. **Proceedings...** Ede: Wageningen University, 2008. p. 19-33.

DEPREUX, F.F.S.; GRANT, A.L.; ANDERSON, D.B.; GERRARD, D.E. Paylean alters myosin heavy chain isoform content in pig muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1888-1894, 2002.

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

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 30, n. 5, p. 381-389, 1995.

HINSON, R.B.; WIEGAND, B.R.; RITTER, M.J.; ALLEE, G.L.; CARR, S.N. Impact of dietary energy level and ractopamine on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 3572-3579, 2011.

JENTSCH, W.; HERRMANN, U.; BEYER, M.; MICHELCHEN, G.; HOFFMANN, L. Investigations on the influence of clenbuterol and recombinant porcine somatotropin on nitrogen and energy metabolism in growing pigs. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 45, n. 1, p. 1-11, 1993.

JOHNSON, M. Molecular mechanisms of β_2 -adrenergic receptor function, response, and regulation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 117, n. 1, p. 18-24, 2006.

KUTZLER, L.W.; HOLMER, S.F.; BOLER, D.D.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; PARKS, C.W.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Comparison of varying doses and durations of ractopamine hydrochloride on late-finishing pig carcass characteristics and meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2176-2188, 2011.

LEACH, L.M.; ELLIS, M.; SUTTON, D.S.; MCKEITH, F.K.; WILSON, E.R. The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 934-943, 1996.

LEFKOWITZ, R.J. G Protein-coupled Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 30, p. 18677-18680, 1998.

LEICK, C.M.; PULS, C.L.; ELLIS, M.; KILLEFER, J.; CARR, T.R.; SCRAMLIN, S.M.; ENGLAND, M.B.; GAINES, A.M.; WOLTER, B.F.; CARR, S.N.; MCKEITH, F.K. Effect of distillers dried grains with solubles and ractopamine (Paylean) on quality and shelf-life of fresh pork and bacon. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 8, p. 2751-2766, 2010.

LOHSE, M.J.; BENOVIC, J.L.; CODINA, J.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. **Science**, Washington, v. 248, n. 4962, p. 1547-1550, 1990.

LOWEY, S.; SLAYTER, H.S.; WEEDS, A.G.; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule: I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 42, n. 1, p. 1-29, 1969.

MacLENNAN, D.H.; PHILLIPS, M.S. Malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v.256, n.3, p.789-793, 1992.

MAGANHINI, M.B.; MARIANO, B.; SOARES, A.L.; GUARNIERI, P.D.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.69-72, 2007.

MERSMANN, H.J. Mechanisms for modification of porcine growth by beta-adrenergic agonist. In: MANIPULATING PIG PRODUCTION X: PROCEEDINGS OF THE, 10., BIENNIAL CONFERENCE OF THE AUSTRALASIAN PIG SCIENCE ASSOCIATION (APSA), 2005. Christchurch. **Proceedings...** Christchurch: Australasian Pig Science Association, 2005. p. 76-89.

MILLS, S.E. Implications of feedback regulation of beta-adrenergic signaling. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, suppl. 1, p. E30-E35, 2002.

MITCHELL, G.A.; DUNNAVAN, G. Illegal use of beta-adrenergic agonists in the United States. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 208-211, 1998.

MOODY, D.E.; HANCOCK, D.L.; ANDERSON, D.B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.). **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. New York: CABI Publishing, 2000. chap. 4, p. 65-95.

MOSER, R.L.; DALRYMPLE, R.H.; CORNELIUS, S.G.; PETTIGREW, J.E.; ALLEN, C.E. Effect of cimaterol (CL 263, 780) as a repartitioning agent in the diet for finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, p. 21-26, 1986.

OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. The effects of breed and halothane sensitivity on pig meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 35, n. 1, p. 105-118, 1993.

PALERMO NETO, J. Agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos e produção animal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 50, p. 545-557.

PETERLA, T.A.; SCANES, C.G. Effect of beta-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 4, p. 1024-1029, 1990.

PETTE, D.; STARON, R. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 115, n. 5, p. 359-372, 2001.

PINTO, W.J.; GUIDA-CARDOSO, S.M.; AREAS, M.A. Fisiologia dos adrenoceptores cardíacos. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 77-96, 2005.

PIOVESAN, R.F.; MARTINS, M.D.; FERNANDES, K.P.S.; BUSSADORI, S.K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Revista Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 211-220, 2009.

REGGIANI, C.; BOTTINELLI, R.; STIENEN, G.J.M. Sarcomeric myosin isoforms: Fine tuning of a molecular motor. **News in Physiological Sciences**, Bethesda, v. 15, n. 1, p. 26-33, 2000.

RICHARDS, T.A.; CAVALIER-SMITH, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. **Nature**, London, v. 436, n. 7054, p. 1113-1118, 2005.

RICKARD, J.W.; WIEGAND, B.R.; POMPEU, D.; HINSON, R.B.; GERLEMANN, G.D.; DISSELHORST, R.; BRISCOE, M.E.; EVANS, H.L.; ALLEE, G.L. The effect of corn distiller's dried grains with solubles, ractopamine, and conjugated linoleic acid on the carcass performance, meat quality, and shelf-life characteristics of fresh pork following three different storage methods. **Meat Science**, Barking, v. 90, n. 3, p. 643-652, 2012.

RICKE, E.A.; SMITH, D.J.; FEIL, V.J.; LARSEN, G.L.; CATON, J.S. Effects of ractopamine HCl stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 701-707, 1999.

ROBIDOUX, J.; MARTIN, T.L.; COLLINS, S. β adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: A family affair. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 297-323, 2004.

RUPPEL, K.M.; SPUDICH, J.A. Structure-function analysis of the motor domain of myosin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 543-573, 1996.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, 2011.

SILVA, M.D.P.; CARVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, supl., p. 21-31, 2007.

SMITH, D.J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 173-194, 1998.

SUMANO, L.H.; OCAMPO C.L.; GUTIÉRREZ, O.L. Clenbuterol y otros b-agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? **Veterinaria Mexico**, Mexico, v. 33, n. 2, p. 137-159, 2002.

TANSEY, J.; SZTALRYD, C.; HLAVIN, E.; KIMMEL, A.; LONDOS, C. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 56, n. 7, p. 379-385, 2004.

VALENTINI, R. Aumentar o consumo de carne suína no Brasil: por que e como? **PorkWorld**, Campinas, n. esp., n. 46, p. 178-182, 2008.

VOET, D.; VOET, J.G. Fisiologia molecular – Motilidade: músculo, transporte de vesículas, cílios e flagelos. In: _____. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 35, p. 1524-1619.

WALLUKAT, G. The β adrenergic receptors. **Herz**, Bergzabern, v. 27, n. 7, p. 683-690, 2002.

WARRISS, P.D.; BROWN, S.N.; ROLPH, T.P.; KESTIN, S.C. Interactions between the beta-adrenergic agonist salbutamol and genotype on meat quality in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 11, p. 3669-3676, 1990.

WATANABE, P.H.; THOMAZ, M.C.; PASCOAL, L.A.F.; RUIZ, U.S.; DANIEL, E.; CRISTANI, J. Ractopamine in diets for finishing gilts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 4, p. 827-833, 2011.

WEISS, A.; LEINWAND, L.A. The mammalian myosin heavy chain gene family. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 417-439, 1996.

YEN, J.T.; MERSMANN, H.J.; NIENABER, J.A.; HILL, D.A.; POND, W.G. Responses to cimaterol in genetically obese and lean pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2698-2706, 1990.

2 EFEITOS DO TEMPO DE FORNECIMENTO DE RACTOPAMINA SOBRE O DESEMPENHO, CONCENTRAÇÃO DE UREIA PLASMÁTICA E CARACTERÍSTICAS DE CARÇA DE SUÍNOS EM TERMINAÇÃO

Resumo

A ractopamina (RAC) melhora a eficiência da produção suína por redirecionar os nutrientes para a deposição proteica em detrimento da deposição de tecido adiposo. No entanto, o período ideal de fornecimento de RAC que proporciona melhor desempenho animal e carcaças mais magras permanece incerto. O objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre o desempenho, concentração de ureia plasmática (CUP) e características de carcaça de suínos em terminação. Oitenta suínos, machos castrados, com peso vivo (PV) médio inicial de $69,42 \pm 1,24$ kg, foram utilizados em um experimento em blocos completos casualizados com cinco tratamentos, oito repetições por tratamento e dois animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos consistiram de rações compostas principalmente por milho e farelo de soja sem RAC (controle) ou com 10 ppm de RAC fornecidas por 7, 14, 21 ou 28 dias antes do abate. As dietas foram formuladas com base no conceito de proteína ideal para conter 0,88% de lisina digestível e 3.233 kcal de energia metabolizável/kg. O PV individual e o consumo de ração por baia foram obtidos semanalmente para determinar o ganho diário de peso (GDP), o consumo diário de ração (CDR) e a conversão alimentar (CA). Amostras de sangue foram coletadas da veia cava anterior de cada animal para determinação da CUP. No final do período experimental, os animais (PV médio final = $102,46 \pm 1,44$ kg) foram abatidos e amostras de pelos foram coletadas para identificação da mutação no gene do receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1). As carcaças foram avaliadas 24 horas *post-mortem*. As análises estatísticas foram realizadas apenas com os animais homozigotos dominantes para a mutação no gene do RYR1. Em geral, os diferentes períodos de fornecimento de RAC não afetaram ($P > 0,05$) o PV final, o GDP e a CDR, porém resultaram em melhora linear ($P < 0,01$) na CA. Não foi encontrado efeito da RAC ($P > 0,05$) sobre as médias semanais de CDR. Melhoras ($P < 0,05$) nas médias semanais de GDP e CA foram observadas durante os primeiros 21 dias de fornecimento de RAC, mas as respostas de crescimento declinaram ($P < 0,05$) na 4ª semana de tratamento. A CUP apresentou efeito quadrático ($P < 0,01$) com o aumento na duração do fornecimento de RAC. Embora a RAC não tenha afetado ($P > 0,05$) a espessura média de toucinho, o rendimento de carcaça, o comprimento de carcaça e a estimativa da percentagem de carne magra, o aumento na duração do tratamento com RAC aumentou linearmente ($P \leq 0,01$) o peso da carcaça quente, a profundidade do músculo *Longissimus dorsi*, a área de olho de lombo e a relação carne:gordura. Portanto, as maiores taxas de crescimento foram alcançadas durante os primeiros 21 dias de fornecimento de RAC, enquanto as respostas de carcaça foram diretamente dependentes da duração do agonista.

Palavras chave: Agente repartidor de nutriente; Agonista β -adrenérgico; Nutrição; Suínos

Abstract

Ractopamine (RAC) improves swine production efficiency by redirecting nutrients toward muscle accretion and away from adipose tissue deposition. However, the optimal RAC treatment duration to achieve improvements in growth performance and carcass leanness

remains unclear. The objective in this study was to evaluate the effects of RAC feeding duration on performance, plasma urea nitrogen (PUN) concentration, and carcass traits of finishing pigs. Eighty barrows, with average initial body weight (BW) of 69.42 ± 1.24 kg, were used in a randomized complete block design experiment with five treatments, eight replicates per treatment, and two animals per experimental unit (pen). The dietary treatments consisted of corn-soybean meal-based diets containing no RAC (control) or 10 ppm RAC fed for 7, 14, 21, or 28 days before slaughter. The diets were formulated based on ideal protein concept to contain 0.88% digestible lysine and 3,233 kcal metabolizable energy/kg. Individual pig BW and pen feed disappearance were obtained weekly to determine average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed to gain ratio (F:G). Blood samples were collected from the anterior vena cava of each animal to determine PUN concentrations. At the end of the experimental period, pigs (average final BW = 102.46 ± 1.44 kg) were slaughtered and hair samples were collected to detect the mutation of the ryanodine receptor type 1 (RYR1) gene. The carcasses were evaluated 24 hours post-mortem. Statistical analyses were performed using only the homozygous dominant pigs for the RYR1 gene mutation. Overall, providing pigs different RAC feeding duration did not affect ($P > 0.05$) final BW, ADG, and ADFI, but resulted in a linear improvement ($P < 0.01$) in F:G. No effect of RAC feeding ($P > 0.05$) was found on average weekly ADFI. Average weekly improvements ($P < 0.05$) in ADG and F:G were observed during the first 21 days of RAC feeding, but growth response declined ($P < 0.05$) in the 4th week of RAC treatment. The PUN concentrations showed a quadratic effect ($P < 0.01$) as RAC feeding duration increased. Even though RAC feeding did not affect ($P > 0.05$) average backfat thickness, dressing percentage, carcass length, and estimated carcass lean, increasing RAC feeding duration linearly increased ($P \leq 0.01$) hot carcass weight, Longissimus dorsi depth, loin eye area, and muscle to fat ratio. Therefore, greater growth rates were achieved during the first 21 days of RAC feeding, whereas the carcass responses were directly dependent on the duration of the agonist.

Keywords: β -adrenergic agonist; Nutrient repartitioning agent; Nutrition; Swine

2.1 Introdução

A utilização do agonista β -adrenérgico ractopamina (RAC) tornou-se uma das estratégias nutricionais mais bem sucedida para a modificação da composição da carcaça suína, especialmente com a adoção do sistema de tipificação de carcaças pelos frigoríficos. A capacidade deste composto em redirecionar os nutrientes para o anabolismo proteico em detrimento do lipídico melhora o desempenho animal (HINSON et al., 2011; KUTZLER et al., 2010), além de proporcionar carcaças de melhor qualidade atribuída à maior percentagem de carne magra (GROESBECK et al., 2007; WEBSTER et al., 2007). Contudo, ainda existem controvérsias quanto à eficiência da RAC na redução da deposição de gordura (DUNSHEA; KING; CAMPBELL, 1993; DUNSHEA et al., 1998, 2005).

Considerando que a resposta animal é alterada pela duração do tratamento com RAC (SCHINCKEL; RICHERT; HERR, 2002), pesquisas que visem identificar o tempo ideal de fornecimento deste aditivo com a finalidade de obter maior eficiência produtiva são

necessárias. Embora a inclusão de RAC nas dietas de suínos por 28 dias pré-abate seja normalmente utilizada (MOORE et al., 2009), a resposta máxima de crescimento animal pode ser obtida durante os primeiros 21 dias de uso do agonista (SCHINCKEL et al., 2003a; WILLIAMS et al., 1994). Curtos períodos de suplementação de RAC são suficientes para ocasionar benefícios diretos no desempenho animal, porém o fornecimento prolongado do agonista pode ser uma estratégia eficiente para melhorar a qualidade da carcaça suína (ARMSTRONG et al., 2004).

De forma similar à RAC, a mutação no gene que codifica para o receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1) é de interesse comercial, pois melhora a eficiência alimentar dos animais (LEACH et al., 1996), aumenta a quantidade de carne e diminui a deposição de gordura na carcaça (OLIVER; GISPERT; DIESTRE, 1993). O teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), permite a detecção de três genótipos: HAL^{NN} , animal normal ou homozigoto dominante; HAL^{Nn} , heterozigoto; HAL^{nn} , animal sensível ou homozigoto recessivo (FUJII et al., 1991). Sabendo que suínos com genótipo HAL^{Nn} apresentam vantagens em termos de eficiência alimentar e carcaças mais magras em comparação àqueles com genótipo HAL^{NN} (LEACH et al., 1996), a remoção dos efeitos dos animais portadores da mutação (HAL^{Nn} e HAL^{nn}) é fundamental em estudos que abordem o uso de RAC a fim de garantir que a resposta animal seja definida apenas pelo agonista.

Efeitos positivos sobre o desempenho e as características de carcaça quando a RAC é adicionada na dieta de suínos em terminação por 21 a 35 dias antes do abate têm sido bem documentados na literatura (APPLE et al., 2008; BOLER et al., 2011; RIKARD-BELL et al., 2009). Entretanto, a relação entre resposta animal e tempo de fornecimento do agonista não tem sido amplamente investigada. Além disso, poucos estudos referentes ao período de suplementação de RAC que maximize a utilização de nitrogênio são encontrados na literatura. Portanto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre o desempenho, concentração de ureia plasmática (CUP) e características de carcaça de suínos em terminação.

2.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido na instalação experimental de crescimento e terminação do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUAP) da ESALQ/USP.

2.2.1 Animais, alojamento e delineamento experimental

Oitenta suínos, machos castrados, da linha genética Topigs, com peso vivo (PV) médio inicial de $69,42 \pm 1,24$ kg, foram adquiridos de uma granja comercial e utilizados em um experimento de 28 dias. A instalação experimental de crescimento e terminação, onde os animais foram alojados, é dotada de cobertura de telhas de barro, pé-direito de 2,70 m e mureta de alvenaria com 1,20 m de altura. As baias, com área de $3,48 \text{ m}^2$ e providas de piso de concreto parcialmente ripado, foram equipadas com bebedouro tipo chupeta e comedouro semiautomático, que permitiram acesso à vontade à água e à ração farelada durante todo o período experimental.

Ao chegarem à instalação experimental, os animais foram pesados individualmente e distribuídos nas baias. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos completos casualizados para controlar as diferenças no PV inicial dos animais, com cinco tratamentos, oito repetições por tratamento e dois animais por unidade experimental. A unidade experimental foi representada pela baia.

2.2.2 Tratamentos

Os seguintes tratamentos foram avaliados:

- RAC 0 (controle): dieta basal fornecida do 1º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 7: dieta basal fornecida do 1º ao 21º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 22º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 14: dieta basal fornecida do 1º ao 14º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 15º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 21: dieta basal fornecida do 1º ao 7º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 8º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 28: dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 1º ao 28º dia de experimentação.

A dieta basal (Tabela 2.1), compostas principalmente por milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas, foi formulada para atender as exigências nutricionais

mínimas descritas por Rostagno et al. (2005), com exceção dos níveis de lisina, treonina, metionina e triptofano digestíveis. Embora Rostagno et al. (2005) sugiram 0,679% de lisina digestível verdadeira para suínos machos castrados de alto potencial genético com PV de 70 a 100 kg, o nível de 0,883% de lisina digestível verdadeira foi estabelecido em virtude da maior exigência deste aminoácido quando há suplementação de RAC na dieta (SCHINCKEL et al., 2003a; WEBSTER et al., 2007). Uma vez que o nível de lisina digestível verdadeira foi acrescido em 30%, os níveis dos demais aminoácidos essenciais (treonina, metionina e triptofano) também foram aumentados na mesma proporção de forma a manter constante a relação entre estes aminoácidos e a lisina digestível verdadeira. Para avaliação das relações aminoacídicas das dietas, foram utilizadas as relações na proteína ideal para suínos na fase de terminação, preconizadas por Rostagno et al. (2005). O caulim foi utilizado como inerte na dieta basal, sendo substituído pela RAC quando houve suplementação com este aditivo.

Tabela 2.1 – Composição percentual e valores calculados da dieta basal

Ingredientes	%
Milho	82,491
Farelo de soja (46%)	14,139
Calcário calcítico	0,589
Fosfato bicálcico	1,286
Sal comum	0,500
L-Lisina.HCl (99%)	0,472
L-Treonina (98,5%)	0,163
DL-Metionina (99%)	0,068
L-Triptofano (99%)	0,042
Suplemento mineral ¹	0,100
Suplemento vitamínico ²	0,100
Inerte ou ractopamina ³	0,050
<i>Valores calculados:</i>	
Energia metabolizável, kcal/kg	3,233
Proteína bruta, %	13,83
Lisina digestível, %	0,883
Treonina digestível, %	0,594
Metionina digestível, %	0,274
Triptofano digestível, %	0,168
Cálcio, %	0,600
Fósforo total, %	0,511
Fósforo disponível, %	0,273

¹Quantidades supridas por kg de ração: iodo, 1,5 mg; cobalto, 1 mg; cobre, 10 mg; zinco, 100 mg; ferro, 100 mg; manganês, 40 mg.

²Quantidades supridas por kg de ração: vit. A, 6000 UI; vit. D₃, 1500 UI; vit. E, 20 UI; vit. K₃, 1,5 mg; tiamina, 1,35 mg; riboflavina, 4 mg; piridoxina, 2 mg; vit. B₁₂, 0,02 mg; ácido nicotínico, 20 mg; ácido fólico, 0,6 mg; biotina, 0,08 mg; ácido pantotênico, 9,35 mg; selênio, 0,3 mg.

³Produto comercial: Ractosuín (2% de ractopamina).

2.2.3 Desempenho e CUP

O PV individual dos animais e o consumo de ração por baia foram registrados semanalmente durante o período experimental a fim de determinar as variáveis de desempenho: ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA). O estudo do desempenho foi finalizado às 12h00 do 28º dia de experimentação, com os animais apresentando PV médio final de $102,46 \pm 1,44$ kg. Os animais permaneceram em jejum sólido das 12h00 à 01h00, receberam ração à vontade da 01h00 às 02h00 e, em seguida, retornaram ao jejum sólido das 02h00 às 07h00, quando se iniciou a coleta de sangue, conforme descrito por Caldara et al. (2003). As amostras de sangue foram coletadas da veia cava anterior dos animais, com auxílio de agulhas 40 x 12 e seringas descartáveis de 10 mL. Terminada a coleta de sangue, a agulha foi retirada da seringa e o sangue transferido lentamente para tubos com EDTA 10%. O plasma foi obtido pela centrifugação das amostras de sangue a $1.600 \times g$ por 30 minutos a 4°C e armazenado em *freezer* a -20°C até o momento da análise de CUP. As análises de CUP foram realizadas pelo Tecs Laboratórios Ltda, Belo Horizonte, MG, com o uso de *kit* enzimático comercial (Labtest Diagnostica, Belo Horizonte, MG).

2.2.4 Características de carcaça

Após 24 horas de jejum sólido, os animais foram pesados para obtenção do PV pós-jejum (PVJ) e encaminhados ao abatedouro experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – FZEA/USP, Pirassununga, SP, para serem abatidos. A insensibilização dos animais por meio de descarga elétrica foi seguida pelos procedimentos de sangria, escaldagem, depilação e evisceração. Logo após a retirada das vísceras, as carcaças foram serradas ao meio no sentido longitudinal, pesadas para obtenção do peso da carcaça quente (PCQ) e colocadas em câmara fria a 4°C por 24 horas. A partir da relação entre o PCQ e o PVJ dos animais, obteve-se o rendimento de carcaça (RC).

O comprimento de carcaça (CC), a espessura média de toucinho (EMT; resultante de três medições que foram realizadas na altura da primeira e última vértebra torácica e última vértebra lombar), a área de olho de lombo (AOL) e a área de gordura (AG) foram mensurados na meia carcaça esquerda de cada animal 24 horas *post-mortem*, de acordo com o Método Brasileiro de Classificação de Carcaças (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS, 1973). Na altura da última costela, a AOL e a AG foram copiadas em papel

vegetal para posterior medição com auxílio de planímetro e, de posse dos resultados foi calculada a relação carne:gordura (RCG). Ainda no desenho da AOL e AG, as profundidades do músculo *Longissimus dorsi* (PM) e da gordura (PG) foram obtidas com régua milimetrada orientada perpendicularmente a partir de 6 cm da linha dorsal mediana da carcaça até o limite extremo oposto do músculo. Para estimativa da percentagem de carne magra na carcaça, utilizou-se a eq. (1) proposta por Irgang¹ (informação pessoal):

$$\text{RCM (\%)} = 60 - \text{PG} \times 0,58 + \text{PM} \times 0,10 \quad (1)$$

Em que:

RCM = rendimento de carne magra;

PG = profundidade da gordura em mm;

PM = profundidade do músculo *Longissimus dorsi* em mm.

2.2.5 Detecção da mutação no gene do RYR1

A mutação no gene do RYR1 foi detectada por meio da PCR-RFLP. Para isso, amostras de pelos com bulbos intactos foram coletadas após a sangria dos animais, e encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP, onde foram realizadas as análises.

2.2.5.1 Extração do DNA genômico

Os pelos com bulbos intactos foram acondicionados em microtubos estéreis com posterior acréscimo de 50 µL de solução de lise (NaOH 200 mM). As amostras foram vigorosamente agitadas em agitador mecânico, sendo em seguida o homogeneizado centrifugado a 13.000 x g por 10 segundos e incubado a 95°C por 10 minutos. Finalmente, foram adicionados 50 µL de solução neutralizadora (HCl 200 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5).

¹IRGANG, R. **Predição do rendimento de carne na carcaça de suínos**. Mensagem recebida por <ambridi@hotmail.com> em 2 de jul . 2004.

2.2.5.2 Amplificação da sequência de DNA do gene do RYR1

Um par de oligonucleotídeos específicos (*primers*) foi utilizado para amplificação por PCR de um fragmento da sequência de DNA do gene que codifica para o RYR1 suíno. Os *primers* utilizados foram descritos por Fujii et al. (1991):

Direto: 5'-GTTCCTGTGTGTGTGCAATGGTG-3'

Reverso: 5'-ATCTCTAGAGCCAGGGAGCAAGTTCTCAGTAAT-3'

A reação de PCR foi conduzida com volume final de 25 µL, contendo 7 µL da solução de extração com DNA genômico, 2,5 µL de *buffer* 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 12,15 µL de água filtrada autoclavada. As condições de termociclagem consistiram em: 1) desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 2) 33 ciclos de a) desnaturação a 94°C por 30 segundos; b) anelamento a 65°C por 30 segundos; c) extensão a 72°C por 20 segundos; 3) extensão final e estabilização do produto a 72°C por 5 minutos. A confirmação da amplificação foi observada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), aplicando-se 5 µL do produto amplificado, 2 µL de tampão de corrida e 0,5 µL de GelRed (Biotium). As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado.

2.2.5.3 Digestão do produto amplificado com enzima de restrição

O produto da amplificação por PCR foi clivado com uma endonuclease de restrição para a análise do RFLP. A reação, com volume final de 20 µL, foi constituída por 10 µL do produto amplificado, 2 µL de *buffer* 10X, 10 U da enzima de restrição *HhaI* (Invitrogen) e 7 µL de água filtrada autoclavada. As amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas e, posteriormente, a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima. A enzima de restrição *HhaI* cliva a molécula de DNA no sítio 5'-GCG↓C-3' e 3'-C↑GCG-5'. Quando a enzima cliva a região amplificada em dois fragmentos, isso indica a presença de homozigose dominante (HAL^{NN}), isto é, animais normais. Caso a região amplificada do gene não seja digerida pela enzima, isso indica a presença da mutação em homozigose recessiva (HALⁿⁿ) e a digestão de apenas metade do produto amplificado é indicativo de heterozigose (HAL^{Nn}) (COUTINHO; REGITANO, 2001).

2.2.5.4 Eletroforese em gel de agarose *low melting point* (LMP)

Para verificação do RFLP, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose LMP 3,5% com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), aplicando-se 10 µL do produto digerido, 2 µL de tampão de corrida e 0,5 µL de GelRed (Biotium). As bandas foram visualizadas em luz UV e o gel foi fotodocumentado (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Padrão de restrição do produto de amplificação de um fragmento da sequência de DNA do gene do receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1) digerido com a enzima de restrição *HhaI*. Colunas 1 a 6: Produto da digestão de homozigotos dominantes (HAL^{NN}); Coluna 7: Controle positivo de animais HAL^{NN} ; Coluna 8: Controle positivo de animais heterozigotos (HAL^{Nn}); Coluna 9: Controle positivo de animais homozigotos recessivos (HAL^{nn}); Coluna 10: Controle negativo da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com base na análise descrita, o genótipo HAL^{nn} não foi detectado na população animal do presente estudo. Entretanto, cinco animais com genótipo HAL^{Nn} foram identificados na população estudada. Desta forma, estes animais foram removidos das análises estatísticas, sendo somente considerados os animais com genótipo HAL^{NN} .

2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o uso do procedimento GLM do programa estatístico computacional SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002). Além de cinco

animais apresentarem genótipo HAL^{Nn}, houve a morte de um animal durante o período experimental. Logo, os resultados destes seis animais foram retirados das análises estatísticas.

As premissas da análise de variância (ANOVA), normalidade e homogeneidade das variâncias, bem como a presença de *outliers*, foram testadas. Os resultados de desempenho e CUP foram submetidos à ANOVA, sendo os efeitos de bloco e tratamento incluídos no modelo matemático. Para os resultados de características de carcaça foi realizada a análise de covariância, com os efeitos de PV final (covariável), bloco e tratamento incluídos no modelo matemático. No caso de Teste F significativo ($P < 0,05$) para o fator período de fornecimento de RAC, efetuou-se a análise de regressão polinomial (linear e quadrática). Além disso, a fim de determinar a resposta animal semanal à RAC, os resultados de desempenho foram submetidos à ANOVA com os seguintes efeitos presentes no modelo matemático: bloco, semana do experimento e semana de alimentação com RAC. Quando a ANOVA indicou diferença significativa ($P < 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do Teste de *Student-Newman-Keuls* (SNK) ($P < 0,05$). As médias dos tratamentos foram ajustadas pelo comando LSMEANS do SAS.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Desempenho e CUP

Durante o período total de experimentação, o PV final, o GDP e o CDR não foram afetados ($P > 0,05$) pelos tratamentos, porém houve melhora linear ($P < 0,01$) na CA à medida que aumentaram os dias de fornecimento de RAC (Tabela 2.2, Figura 2.2A). Diversos estudos demonstraram que a inclusão de RAC nas dietas de suínos em terminação por 28 dias pré-abate promove aumentos de 3,5% no PV final (APPLE et al., 2008) e de 13 a 19% no GDP (HALSEY et al., 2011; POLETO et al., 2009; WEBSTER et al., 2007), sem afetar o CDR dos animais (KUTZLER et al., 2010). Com os resultados obtidos para o CDR no presente estudo, nota-se que houve redução numérica de aproximadamente 3, 5, 6 e 4% para os animais submetidos à dieta contendo RAC por 7, 14, 21 e 28 dias antes do abate, respectivamente, em relação aos animais do grupo controle. Por outro lado, Carr et al. (2005) constataram depressão significativa de 8% no CDR de suínos suplementados com RAC por 28 dias antes do abate.

A melhora na eficiência alimentar de suínos em fase de terminação destaca-se como um dos principais benefícios da utilização de RAC, independentemente da dose e duração do tratamento (EDMONDS; BAKER, 2010; HINSON et al., 2011; RIKARD-BELL et al., 2009). Publicações nacionais que avaliaram a CA de suínos submetidos à RAC dão evidências adicionais de que o aditivo melhora a eficiência de utilização dos nutrientes dietéticos (ALMEIDA et al., 2010; AMARAL et al., 2009; WATANABE et al., 2011). Uma possível justificativa para este fato pode estar relacionada com o direcionamento dos nutrientes para a deposição de tecido muscular, uma vez que a síntese de músculo requer menos energia do que a síntese de gordura (MOSER et al., 1986).

Tabela 2.2 – Médias do peso vivo inicial (PV inicial), peso vivo final (PV final), ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR), conversão alimentar (CA) e concentração de ureia plasmática (CUP) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate

Variável	Período de fornecimento de RAC pré-abate, dias					CV ¹ , %	Efeito ²	P
	0	7	14	21	28			
PV inicial, kg	70,07	69,51	69,32	68,95	69,27	..	..	..
PV final, kg	102,03	101,73	102,40	103,17	102,97	3,23	NS	0,90
GDP, kg	1,184	1,193	1,225	1,267	1,248	8,80	NS	0,50
CDR, kg	3,52	3,40	3,35	3,32	3,37	7,86	NS	0,60
CA	3,00	2,84	2,73	2,63	2,71	7,34	L	<0,01
CUP, mg/dL	30,31	23,34	22,18	23,84	23,20	14,52	Q	<0,01

¹Coeficiente de variação.

²Efeito linear (L); efeito quadrático (Q); efeito não significativo (NS).

Nota: Sinal convencional utilizado:

.. Não se aplica dado numérico.

O aumento no período de fornecimento de RAC para suínos em terminação ocasionou efeito quadrático ($P < 0,01$) na CUP, com ponto de mínimo de 22,08 mg/dL para o período de 18 dias de fornecimento do aditivo (Tabela 2.2, Figura 2.2B). Em estudo com ovinos submetidos ao tratamento com clenbuterol, MacRae et al. (1988) sugeriram que os agonistas β -adrenérgicos podem, inicialmente, reduzir a degradação proteica, mas o posterior anabolismo provavelmente exige elevação na síntese de proteína. O aumento na retenção de nitrogênio e a consequente elevação na síntese proteica ocasionada pela RAC resultam baixas CUP (SEE; ARMSTRONG; WELDON, 2004). Portanto, a baixa concentração de ureia no plasma observada em suínos suplementados com RAC, efeito demonstrado anteriormente por Cantarelli et al. (2009), pode ser parcialmente explicada pelas hipóteses mencionadas.

Dietas de suínos, machos castrados, de alto potencial genético em fase de terminação, com 70 a 100 kg PV, devem conter 0,679% de lisina digestível (0,772% de lisina total) (ROSTAGNO et al., 2005). Entretanto, suínos suplementados com RAC demandam maior quantidade de lisina total, que deve ser adicionada para alcançar o nível mínimo de 1% da dieta (SCHINCKEL et al., 2003a). Com a finalidade de oferecer a mesma condição para todos os animais do presente estudo, as dietas experimentais foram formuladas para conter 0,883% de lisina digestível (1% de lisina total). Neste caso, os animais do grupo controle ingeriram e possivelmente absorveram aminoácidos em excesso. Sabe-se que aminoácidos absorvidos acima das necessidades para manutenção e crescimento do animal devem ser catabolizados e excretados na forma de ureia pelos rins (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Desta forma, os animais do tratamento controle provavelmente apresentaram maior gasto energético para eliminar o excesso de nitrogênio, reduzindo a energia disponível para o seu crescimento.

Figura 2.2 – Conversão alimentar (CA) – A e concentração de ureia plasmática (CUP) – B, em função dos períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate

Os resultados semanais de desempenho indicaram que os suínos cresceram mais rápido ($P < 0,05$) e foram mais eficientes ($P < 0,05$) já na 1ª semana do consumo de RAC em relação aos animais do grupo controle (Tabela 2.3). Em contrapartida, não foi observado efeito da RAC ($P > 0,05$) sobre a média semanal de CDR dos animais. Na 2ª ou 3ª semana de alimentação com RAC, os animais apresentaram ($P > 0,05$) GDP e CA similares aos da 1ª semana de consumo do aditivo. No entanto, na 4ª semana do consumo de RAC, os animais demonstraram redução ($P < 0,05$) no GDP e menor eficiência na utilização dos nutrientes dietéticos ($P < 0,05$) em relação aos resultados observados na 1ª, 2ª ou 3ª semana.

Tabela 2.3 – Médias semanais do ganho diário de peso (GDP), consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC)

Variável	Semana de alimentação com RAC					CV ¹ , %	P
	0 (Controle)	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a		
GDP, kg	1,125 ^b	1,311 ^a	1,260 ^{ab}	1,187 ^{ab}	0,951 ^c	16,19	<0,01
CDR, kg	3,34	3,21	3,30	3,18	2,93	11,37	0,32
CA	3,04 ^a	2,49 ^b	2,64 ^b	2,72 ^b	3,16 ^a	14,69	<0,01

¹Coeficiente de variação.

^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Suínos selecionados para alta deposição de carne magra podem apresentar curta duração de resposta quando submetidos ao tratamento com RAC (SCHINCKEL; RICHERT; HERR, 2002; SCHINCKEL et al., 2003a). No presente estudo, os resultados mais notáveis do desempenho animal ocorreram nos primeiros sete dias de fornecimento de RAC, sendo mantidos por 14 dias adicionais, seguido de declínio após 21 dias. Da mesma forma, Williams et al. (1994) reportaram redução no GDP após 21 dias de fornecimento de dietas com inclusão de 44,7 ppm de RAC. Sabe-se que a estimulação prolongada das células com RAC ocasiona, inicialmente, a dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos (β -AR), e, posteriormente, o sistema de *down-regulation* dos mesmos, sendo ambos os processos responsáveis pela atenuação da resposta animal (BENOVIC et al., 1988; LEFKOWITZ, 2007).

2.3.2 Características de carcaça

Neste estudo, não foram observados efeitos da RAC ($P > 0,05$) sobre o RC, CC, PG e AG (Tabela 2.4). Estes resultados são similares àqueles relatados por Carr et al. (2009) e Moore et al. (2009). Por outro lado, com o aumento no período de fornecimento de RAC, o PCQ aumentou linearmente ($P = 0,01$), de maneira que os animais com carcaças mais pesadas foram aqueles alimentados com dietas contendo RAC por 28 dias antes do abate (Tabela 2.4, Figura 2.3A). Estudos prévios dão suporte a estes resultados, pois demonstraram que suínos suplementados com 7,4 ppm de RAC durante 21 e 28 dias apresentam aumentos no PCQ de 3,74 e 5,47 kg, respectivamente, quando comparados aos animais controle (HINSON et al., 2011; RICKARD et al., 2012).

Tabela 2.4 – Médias do peso vivo pós-jejum (PVJ), peso da carcaça quente (PCQ), rendimento de carcaça (RC), comprimento de carcaça (CC), espessura média de toucinho (EMT), profundidade da gordura (PG), profundidade do músculo *Longissimus dorsi* (PM), área de gordura (AG), área de olho de lombo (AOL), relação carne:gordura (RCG) e rendimento de carne magra (RCM) de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate

Variável	Período de fornecimento de RAC pré-abate, dias					CV ¹ , %	Efeito ²	P
	0	7	14	21	28			
PVJ, kg	97,49	97,81	99,03	99,08	99,74	3,36	NS	0,63
PCQ, kg	78,32	78,94	79,62	79,38	80,78	1,80	L	0,01
RC, %	79,93	80,10	80,26	80,65	81,37	1,52	NS	0,18
CC, cm	91,10	90,76	89,60	89,90	90,26	1,50	NS	0,20
EMT, cm	2,73	2,72	2,72	2,64	2,80	7,85	NS	0,73
PG, mm	15,66	14,29	14,51	13,27	14,01	16,48	NS	0,40
PM, mm	61,83	64,24	66,08	65,33	69,71	6,88	L	<0,01
AG, cm ²	18,29	18,18	17,78	16,97	18,07	12,89	NS	0,79
AOL, cm ²	39,43	43,18	43,38	44,32	48,34	8,86	L	<0,01
RCG	2,17	2,44	2,54	2,70	2,71	14,68	L	<0,01
RCM, %	57,10	58,13	58,19	58,83	58,85	2,57	NS	0,16

¹Coefficiente de variação.

²Efeito linear (L); efeito não significativo (NS).

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na EMT dos animais (Tabela 2.4), o que está de acordo com os resultados observados em outras pesquisas (FERNÁNDEZ-DUEÑAS et al., 2008; HALSEY et al., 2011; LEICK et al., 2010). Apesar de existir discordâncias com relação ao efeito da RAC sobre a deposição de gordura, em trabalhos anteriores foram reportadas reduções de 12 a 37% na espessura de toucinho da 10ª costela de suínos suplementados com o aditivo (MIMBS et al., 2005; RICKARD et al., 2012). Em virtude da quiralidade da sua molécula, a RAC comercializada é constituída por quatro estereoisômeros com as configurações RR, RS, SR e SS, sendo o estereoisômero RR provavelmente o ligante biologicamente ativo (MILLS et al., 2003; RICKE et al., 1999). Pelo fato do estereoisômero RR desencadear melhor sinal transducional por meio dos β_2 -AR, reduções na deposição de gordura podem não ser observadas, uma vez que os β_1 -AR são predominantes no tecido adiposo de suínos (MILLS; SPURLOCK; SMITH, 2003). Além disso, conforme mencionado anteriormente, a RAC pode desencadear a *down-regulation* dos β -AR, fenômeno que foi responsável pela redução de 53% na densidade dos β -AR observada

no tecido adiposo subcutâneo de suínos após o 8º dia de tratamento com o agonista (SPURLOCK et al., 1994).

É de consenso na literatura que os aditivos repartidores de nutrientes aumentam a massa muscular (BARK et al., 1992; CARR et al., 2009). Os aumentos lineares ($P < 0,01$) na PM, AOL e RCG, à medida que aumentaram os dias de fornecimento de RAC observado neste estudo (Tabela 2.4; Figuras 2.3B, 2.3C e 2.3D), podem ser parcialmente explicados pelo aumento no fluxo sanguíneo em direção às células musculares que, consequentemente, disponibiliza substratos e energia necessários para a síntese proteica (MERSMANN, 1998).

Figura 2.3 – Peso da carcaça quente (PCQ) – A, área de olho de lombo (AOL) – B, profundidade do músculo *Longissimus dorsi* (PM) – C e relação carne:gordura (RCG) – D, em função dos períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate

Consideráveis evidências do aumento na síntese de proteína proporcionado pela RAC estão disponíveis na literatura (ADEOLA; BALL; YOUNG, 1992; BERGEN et al., 1989; DUNSHEA et al., 1993). Uma abordagem alternativa para o aumento da musculatura

esquelética está associada à ativação das células satélites induzida pela RAC. Conforme revisado por Zammit (2008), as células satélites são capazes de originar mioblastos que, por sua vez, proliferam-se antes de fundirem-se às miofibras existentes para tornarem-se núcleos pós-mitóticos (mionúcleos), ou unem-se para formar miotubos (miofibras imaturas). Ensaios com culturas de células constataram que a RAC estimula a atividade proliferativa das células satélites de pintos (GRANT et al., 1990) e ratos (SHAPPELL et al., 2000).

O advento da bonificação das carcaças suínas contribuiu para tornar o valor da carne magra um fator economicamente importante. Com o uso de equações de predição, estudos relataram que a administração de RAC para suínos acarretou aumentos de 1,0 a 3,8% na percentagem de carne magra (BOLER et al., 2011; GROESBECK et al., 2007). De forma contrastante, o RCM não foi afetado ($P > 0,05$) pelos tratamentos neste estudo (Tabela 2.4). A estimativa da percentagem de carne magra por meio de equações de predição baseadas em medidas padrões realizadas na carcaça no momento do abate, tais como PG e PM, subestima a massa magra de suínos suplementados com RAC (SCHINCKEL et al., 2003b). De acordo com Gu et al. (1992), o uso de equações de predição, que incluem as medidas acima citadas, representam aproximadamente 50% do aumento na percentagem de carne magra induzido pela RAC. Diante do exposto, a estimativa do RCM calculada no presente experimento pode ter sido subestimada. Para obtenção de predições acuradas da composição da carcaça de suínos alimentados com dietas contendo RAC, análise química ou dissecação parcial da carcaça deve ser implementadas (SCHINCKEL et al., 2003b).

Por fim, é interessante mencionar que a literatura disponível sobre o uso de RAC na alimentação de suínos é muito diversificada quanto ao peso de abate dos animais. O fato do peso de abate não ser padronizado dificulta a comparação entre os trabalhos, principalmente no que diz respeito às características de carcaça suína. Isso porque a alteração da composição corporal induzida pela RAC pode ser mais perceptível em animais mais pesados, visto que estes apresentam maior deposição de gordura e menor deposição proteica.

2.4 Conclusão

Efeitos positivos sobre o desempenho animal e características de carcaça foram obtidos com a inclusão de 10 ppm de RAC nas dietas de suínos em fase de terminação. Mesmo que o CDR tenha permanecido inalterado durante todo o período experimental, as respostas máximas de crescimento ocorreram nos primeiros 21 dias de fornecimento do agonista. No entanto, os resultados benéficos mais notórios com relação às características de

carcaça foram atingidos quando a RAC foi administrada por 28 dias antes do abate, indicando que a magnitude das respostas de carcaça foi diretamente dependente da duração do fornecimento do aditivo.

Referências

ADEOLA, O.; BALL, R.O.; YOUNG, L.G. Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n. 3, p. 488-495, 1992.

ALMEIDA, V.V.; BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; BRAZ, D.B.; MIYADA, V.S. Ractopamina, cromo-metionina e suas combinações como aditivos modificadores do metabolismo de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 9, p. 1969-1977, 2010.

AMARAL, N.O.; FIALHO, E.T.; CANTARELLI, V.S.; ZANGERONIMO, M.G.; RODRIGUES, P.B.; GIRÃO, L.V.C. Ractopamine hydrochloride in formulated rations for barrows or gilts from 94 to 130 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 8, p. 1494-1501, 2009.

APPLE, J.K.; MAXWELL, C.V.; KUTZ, B.R.; RAKES, L.K.; SAWYER, J.T.; JOHNSON, Z.B.; ARMSTRONG, T.A.; CARR, S.N.; MATZAT, P.D. Interactive effect of ractopamine and dietary fat source on pork quality characteristics of fresh pork chops during simulated retail display. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2711-2722, 2008.

ARMSTRONG, T.A.; IVERS, D.J.; WAGNER, J.R.; ANDERSON, D.B.; WELDON, W.C.; BERG, E.P. The effect of dietary ractopamine concentration and duration of feeding on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 3245-3253, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. **Método brasileiro de avaliação de carcaças**. Estrela, 1973. 17p.

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 fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3391-3400, 1992.

BENOVIC, J.L.; BOUVIER, M.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 405-428, 1988.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Protein turnover and amino acid catabolism. In: _____. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2002. chap. 23, p. 633-664.

BERGEN, W.G.; JOHNSON, S.E.; SKJAERLUND, D.M.; BABIKER, A.S.; AMES, N.K.; MERKEL, R.A.; ANDERSON, D.B. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 9, p. 2255-2262, 1989.

- BOLER, D.D.; HOLMER, S.F.; DUNCAN, D.A.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; STITES, C.R.; PETRY, D.B.; HINSON, R.B.; ALLEE, G.L.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Fresh meat and further processing characteristics of ham muscles from finishing pigs fed ractopamine hydrochloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 210-220, 2011.
- CALDARA, F.R.; BERTO, D.A.; BISINOTO, K.S.; TRINDADE NETO, M.A.; WECHSLER, F.S. Exigências em lisina de leitões de 6 a 11 kg com base no conceito da proteína ideal. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 121-127, 2003.
- CANTARELLI, V.S.; FIALHO, E.T.; ALMEIDA, E.C.; ZANGERONIMO, M.G.; AMARAL, N.O.; LIMA, J.A.F. Características de carcaça e viabilidade econômica do uso de cloridrato de ractopamina para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 844-851, 2009.
- CARR, S.N.; RINCKER, P.J.; KILLEFER, J.; BAKER, D.H.; ELLIS, M.; MCKEITH, F.K. Effects of different cereal grains and ractopamine hydrochloride on performance, carcass characteristics, and fat quality in late-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 223-230, 2005.
- CARR, S.N.; HAMILTON, D.N.; MILLER, K.D.; SCHROEDER, A.L.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, D.; KILLEFER, J.; ELLIS, M.; MCKEITH, F.K. The effect of ractopamine hydrochloride (Paylean) on lean carcass yields and pork quality characteristics of heavy pigs fed normal and amino acid fortified diets. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 3, p. 533-539, 2009.
- COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.12-24.
- DUNSHEA, F.R.; KING, R.H.; CAMPBELL, R.G. Interrelationships between dietary protein and ractopamine on protein and lipid deposition in finishing gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2931-2941, 1993.
- DUNSHEA, F.R.; KING, R.H.; CAMPBELL, R.G.; SAINZ, R.D.; KIM, Y.S. Interrelationships between sex and ractopamine on protein and lipid deposition in rapidly growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2919-2930, 1993.
- DUNSHEA, F.R.; EASON, P.J.; CAMPBELL, R.G.; KING, R.H. Interrelationships between dietary ractopamine, energy intake, and sex in pigs. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 49, n. 4, p. 565-574, 1998.
- DUNSHEA, F.R.; D'SOUZA, D.N.; PETHICK, D.W.; HARPER, G.S.; WARNER, R.D. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. **Meat Science**, Barking, v. 71, n. 1, p. 8-38, 2005.
- EDMONDS, M.S.; BAKER, D.H. Effect of dietary protein and lysine fluctuations in the absence and presence of ractopamine on performance and carcass quality of late-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 604-611, 2010.

FERNÁNDEZ-DUEÑAS, D.M.; MYERS, A.J.; SCRAMLIN, S.M.; PARKS, C.W.; CARR, S.N.; KILLEFER, J.; MCKEITH, F.K. Carcass, meat quality, and sensory characteristics of heavy body weight pigs fed ractopamine hydrochloride (Paylean). **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 12, p. 3544-3550, 2008.

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

GRANT, A.L.; HELFERICH, W.G.; MERKEL, R.A.; BERGEN, W.G. Effects of phenethanolamines and propranolol on the proliferation of cultured chick breast muscle satellite cells. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 652-658, 1990.

GROESBECK, C.N.; GOODBAND, R.D.; TOKACH, M.D.; DRITZ, S.S.; NELSEN, J.L.; DEROUCHÉY, J.M. Effects of pantothenic acid on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets with or without ractopamine hydrochloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 10, p. 2492-2497, 2007.

GU, Y.; SCHINCKEL, A.P.; MARTIN, T.G.; FORREST, J.C.; KUEI, C.H.; WATKINS, L.E. Genotype and treatment biases in estimation of carcass lean of swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1708-1718, 1992.

HALSEY, C.H.C.; WEBER, P.S.; REITER, S.S.; STRONACH, B.N.; BARTOSH, J.L.; BERGEN, W.G. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1011-1019, 2011.

HINSON, R.B.; WIEGAND, B.R.; RITTER, M.J.; ALLEE, G.L.; CARR, S.N. Impact of dietary energy level and ractopamine on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 3572-3579, 2011.

KUTZLER, L.W.; PETERSON, C.M.; ELLIS, M.; CARR, S.N.; RITTER, M.J.; ARMSTRONG, T.A.; MCKEITH, F.K.; KILLEFER, J. Ractopamine (Paylean) Response in Heavy-Weight Finishing Pigs. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 26, n. 2, p. 243-249, 2010.

LEACH, L.M.; ELLIS, M.; SUTTON, D.S.; MCKEITH, F.K.; WILSON, E.R. The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 934-943, 1996.

LEFKOWITZ, R.J. Seven transmembrane receptors - A brief personal retrospective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1768, n. 4, p. 748-755, 2007.

LEICK, C.M.; PULS, C.L.; ELLIS, M.; KILLEFER, J.; CARR, T.R.; SCRAMLIN, S.M.; ENGLAND, M.B.; GAINES, A.M.; WOLTER, B.F.; CARR, S.N.; MCKEITH, F.K. Effect of distillers dried grains with solubles and ractopamine (Paylean) on quality and shelf-life of fresh pork and bacon. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 8, p. 2751-2766, 2010.

MacRAE, J.C.; SKENE, P.A.; CONNELL, A.; BUCHAN, V.; LOBLEY, G.E. The action of the β -agonist clenbuterol on protein and energy metabolism in fattening wether lambs. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 59, n. 3, p. 457-465, 1988.

MERSMANN, H.J. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 160-172, 1998.

MILLS, S.E.; KISSEL, J.; BIDWELL, C.A.; SMITH, D.J. Stereoselectivity of porcine β -adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 122-129, 2003.

MILLS, S.E.; SPURLOCK, M.E.; SMITH, D.J. β -Adrenergic receptor subtypes that mediate ractopamine stimulation of lipolysis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 662-668, 2003.

MIMBS, K.J.; PRINGLE, T.D.; AZAIN, M.J.; MEERS, S.A.; ARMSTRONG, T.A. Effects of ractopamine on performance and composition of pigs phenotypically sorted into fat and lean groups. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1361-1369, 2005.

MOORE, K.L.; DUNSHEA, F.R.; MULLAN, B.P.; HENNESSY, D.P.; D'SOUZA, D.N. Ractopamine supplementation increases lean deposition in entire and immunocastrated male pigs. **Animal Production Science**, Collingwood, v. 49, n. 12, p. 1113-1119, 2009.

MOSER, R.L.; DALRYMPLE, R.H.; CORNELIUS, S.G.; PETTIGREW, J.E.; ALLEN, C.E. Effect of cimaterol (CL 263, 780) as a repartitioning agent in the diet for finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, p. 21-26, 1986.

OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. The effects of breed and halothane sensitivity on pig meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 35, n. 1, p. 105-118, 1993.

POLETO, R.; ROSTAGNO, M.H.; RICHERT, B.T.; MARCHANT-FORDE, J.N. Effects of a "step-up" ractopamine feeding program, sex, and social rank on growth performance, hoof lesions, and Enterobacteriaceae shedding in finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 304-313, 2009.

RICKARD, J.W.; WIEGAND, B.R.; POMPEU, D.; HINSON, R.B.; GERLEMANN, G.D.; DISSELHORST, R.; BRISCOE, M.E.; EVANS, H.L.; ALLEE, G.L. The effect of corn distiller's dried grains with solubles, ractopamine, and conjugated linoleic acid on the carcass performance, meat quality, and shelf-life characteristics of fresh pork following three different storage methods. **Meat Science**, Barking, v. 90, n. 3, p. 643-652, 2012.

RICKE, E.A.; SMITH, D.J.; FEIL, V.J.; LARSEN, G.L.; CATON, J.S. Effects of ractopamine HCl stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 701-707, 1999.

RIKARD-BELL, C.; CURTIS, M.A.; VAN BARNEVELD, R.J.; MULLAN, B.P.; EDWARDS, A.C.; GANNON, N.J.; HENMAN, D.J.; HUGHES, P.E.; DUNSHEA, F.R. Ractopamine hydrochloride improves growth performance and carcass composition in immunocastrated boars, intact boars, and gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 11, p. 3536-3543, 2009.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.

SCHINCKEL, A.P.; RICHERT, B.T.; HERR, C.T. Variation in the response of multiple genetic populations of pigs to ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, suppl. 2, p. E85-E89, 2002.

SCHINCKEL, A.P.; LI, N.; RICHERT, B.T.; PRECKEL, P.V.; EINSTEIN, M.E. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1106-1119, 2003a.

SCHINCKEL, A.P.; HERR, C.T.; RICHERT, B.T.; FORREST, J.C.; EINSTEIN, M.E. Ractopamine treatment biases in the prediction of pork carcass composition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 16-28, 2003b.

SEE, M.T.; ARMSTRONG, T.A.; WELDON, W.C. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 2474-2480, 2004.

SHAPPELL, N.W.; FEIL, V.J.; SMITH, D.J.; LARSEN, G.L.; MCFARLAND, D.C. Response of C2C12 mouse and turkey skeletal muscle cells to the beta-adrenergic agonist ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 3, p. 699-708, 2000.

SPURLOCK, M.E.; CUSUMANO, J.C.; JI, S.Q.; ANDERSON, D.B.; SMITH, C.K.; HANCOCK, D.L.; MILLS, S.E. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 75-80, 1994.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT**.: guide of personal computers. Version 9.0. Cary, 2002. 1 v.

WATANABE, P.H.; THOMAZ, M.C.; PASCOAL, L.A.F.; RUIZ, U.S.; DANIEL, E.; CRISTANI, J. Ractopamine in diets for finishing gilts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 4, p. 827-833, 2011.

WEBSTER, M.J.; GOODBAND, R.D.; TOKACH, M.D.; NELSEN, J.L.; DRITZ, S.S.; UNRUH, J.A.; BROWN, K.R.; REAL, D.E.; DEROUCHÉY, J.M.; WOODWORTH, J.C.; GROESBECK, C.N.; MARSTELLER, T.A. Interactive effects between ractopamine hydrochloride and dietary lysine on finishing pig growth performance, carcass characteristics, pork quality, and tissue accretion. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 23, n. 6, p. 597-611, 2007.

WILLIAMS, N.H.; CLINE, T.R.; SCHINCKEL, A.P.; JONES, D.J. The impact of ractopamine, energy intake, and dietary fat on finisher pig growth performance and carcass merit. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 12, p. 3152-3162, 1994.

ZAMMIT, P.S. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? **Journal of Cell Science**, London, v. 121, n. 18, p. 2975-2982, 2008.

3 EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS E DAS ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA INDUZIDA PELA RACTOPAMINA EM SUÍNOS NÃO PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE DO RECEPTOR DE RIANODINA DO TIPO 1

Resumo

A ractopamina (RAC) é referida frequentemente como agente repartidor de energia, uma vez que redireciona os nutrientes que seriam destinados à acumulação de gordura para serem utilizados na deposição muscular. Como o aumento da massa muscular pode refletir variações no nível de expressão proteica das distintas isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC), alterações na expressão gênica destas isoformas podem ser esperadas com a suplementação de RAC. Para entender este processo, os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre a expressão gênica dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) e das isoformas MyHC no músculo *Longissimus dorsi* de suínos não portadores da mutação no gene do receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1) foram avaliados. Oitenta suínos, machos castrados, com peso vivo (PV) médio inicial de $69,42 \pm 1,24$ kg, foram utilizados em um delineamento em blocos completos casualizados com cinco tratamentos, oito repetições por tratamento e dois animais por unidade experimental (baia). Os tratamentos consistiram de rações compostas principalmente por milho e farelo de soja sem RAC (controle) ou com 10 ppm de RAC fornecidas por 7, 14, 21 ou 28 dias antes do abate. As dietas foram formuladas com base no conceito de proteína ideal para conter 0,88% de lisina digestível e 3.233 kcal de energia metabolizável/kg. No final do período experimental, os animais (PV médio final = $102,46 \pm 1,44$ kg) foram abatidos, e amostras de pelos e do músculo *Longissimus dorsi* foram coletadas. As amostras de pelos foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para identificação da mutação no gene do RYR1. A transcrição reversa seguida pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para quantificar os níveis de RNAm dos β -AR (subtipos β_1 e β_2), bem como os níveis de RNAm das isoformas MyHC (I, IIa, IIx/d e IIb) nas amostras do músculo *Longissimus dorsi*. As análises estatísticas foram realizadas apenas com os animais homozigotos dominantes para a mutação no gene do RYR1. Os níveis de expressão gênica relativa foram normalizados pela expressão do gene referência 18S rRNA. Não foram detectados efeitos da suplementação de RAC ($P > 0,05$) sobre a abundância relativa do RNAm dos β_1 -AR, porém o aumento no período de fornecimento de RAC tendeu a reduzir linearmente ($P = 0,08$) os níveis de RNAm dos β_2 -AR. As abundâncias dos transcritos das isoformas MyHC IIa e MyHC IIx/d não foram afetadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos. Embora os níveis de RNAm da isoforma MyHC I tenham sido reduzidos linearmente ($P < 0,01$), a expressão gênica da isoforma MyHC IIb aumentou linearmente ($P < 0,01$) com o aumento da duração do tratamento com RAC. Estes resultados sugerem que a ação da RAC no músculo esquelético de suínos pode estar relacionada com a população de β_2 -AR, e que o aditivo alterou o perfil de expressão gênica das isoformas MyHC, estimulando o aumento dos níveis de RNAm da isoforma MyHC IIb.

Palavras chave: Agonista β -adrenérgico; Crescimento muscular; Suíno

Abstract

Ractopamine (RAC) is often referred to as an energy repartitioning agent by diverting nutrients from fat accumulation to muscle accretion. Because the increase in muscle mass may reflect variations in protein expression level of the distinct isoforms of myosin heavy chain (MyHC), the changes in gene expression of these isoforms may be expected with RAC supplementation. To understand this process, the effects of RAC feeding duration on β -adrenergic receptors (β -AR) and myosin heavy chain (MyHC) isoforms gene expression in Longissimus dorsi muscle of pigs without the mutation of the ryanodine receptor type 1 (RYR1) gene were evaluated. Eighty barrows with average initial body weight (BW) of 69.42 ± 1.24 kg were used in a randomized complete block design with five treatments, eight replicates per treatment, and two animals per experimental unit (pen). The dietary treatments consisted of corn-soybean meal-based diets containing no RAC (control) or 10 ppm RAC fed for 7, 14, 21, or 28 days before slaughter. The diets were formulated based on ideal protein concept to contain 0.88% digestible lysine and 3,233 kcal metabolizable energy/kg. At the end of the experimental period, pigs (average final BW = 102.46 ± 1.44 kg) were slaughtered, and hair and Longissimus dorsi muscle samples were collected. Hair samples were subjected to polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis to identify the RYR1 gene mutation. Reverse-transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to quantify the mRNA levels of β -AR (β_1 - and β_2 -subtypes) as well as the mRNA levels of MyHC isoforms (I, IIa, IIx/d, and IIb) in the Longissimus dorsi muscle samples. Statistical analyses were performed using only the homozygous dominant pigs for the RYR1 gene mutation. The relative gene expression levels were normalized to housekeeping gene 18S rRNA expression. No effects of RAC feeding ($P > 0.05$) were detected for β_1 -AR mRNA abundance, but increasing RAC feeding period tended to linearly decrease ($P = 0.08$) β_2 -AR mRNA expression. The transcript abundances of MyHC IIa and MyHC IIx/d isoforms were not affected ($P > 0.05$) by treatments. Even though the mRNA levels of the MyHC I isoform decreased linearly ($P < 0.01$), gene expression of the MyHC IIb isoform increased linearly ($P < 0.01$) as RAC treatment duration was increased. These results suggest that the RAC action in the pig skeletal muscle may be related to the β_2 -AR population, and that the additive altered the profile of MyHC isoforms gene expression by stimulating the increase of the mRNA levels of MyHC IIb isoform.

Keywords: β -adrenergic agonist; Muscle growth; Pig

3.1 Introdução

Considerável atenção tem sido focada ao uso do agonista β -adrenérgico ractopamina (RAC) com a finalidade de estimular o crescimento da musculatura esquelética em suínos na fase de terminação. Sabe-se que a cascata de sinalização é iniciada pelo acoplamento da RAC aos receptores β -adrenérgicos (β -AR) presentes na membrana plasmática das células. Ambos os subtipos de β -AR, β_1 e β_2 , estão envolvidos na transmissão dos sinais extracelulares para o interior das células alvo, entretanto, ainda permanece inconclusivo se a RAC ativa uma população específica de β -AR. Sendo assim, a investigação

de como o aumento na duração do tratamento com RAC altera o padrão de expressão gênica dos β -AR pode contribuir para o melhor entendimento da resposta animal ao agonista.

De forma similar à RAC, a mutação no gene que codifica para o receptor de rianodina do tipo 1 (RYR1) é de interesse comercial pois melhora a eficiência alimentar dos animais (LEACH et al., 1996), aumenta a quantidade de carne e diminui a deposição de gordura na carcaça (OLIVER; GISPERT; DIESTRE, 1993). O teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), permite a detecção de três genótipos: HAL^{NN} , animal normal ou homozigoto dominante; HAL^{Nn} , heterozigoto; HAL^{nn} , animal sensível ou homozigoto recessivo (FUJII et al., 1991). Sabendo que suínos com genótipo HAL^{Nn} apresentam vantagens em termos de eficiência alimentar e carcaças mais magras em comparação àqueles com genótipo HAL^{NN} (LEACH et al., 1996), a remoção dos efeitos dos animais portadores da mutação (HAL^{Nn} e HAL^{nn}) é fundamental em estudos que abordem o uso de RAC a fim de garantir que a resposta animal seja definida apenas pelo agonista.

A miosina sarcomérica, proteína motora com atividade ATPase e conhecida por seu importante papel na geração de força no processo de contração muscular, é um hexâmero constituído por duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves (WEISS; LEINWAND, 1996). Quatro isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC), incluindo uma isoforma com velocidade de contração lenta (MyHC I) e três isoformas com velocidade de contração rápida (MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC IIb), são as mais estudadas por serem amplamente expressas no músculo esquelético de mamíferos adultos (PETTE; STARON, 2000, 2001). Além disso, as isoformas MyHC I, IIa, IIx/d e IIb correspondem aos tipos de fibras musculares definidos histoquimicamente como I, IIA, IIX/D e IIB, respectivamente (HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1995).

Modelos experimentais utilizados para atestar a capacidade das fibras musculares em responder a estímulos específicos, tais como atividade física, envelhecimento e mudanças no nível hormonal, indicaram que a alteração na expressão proteica das isoformas MyHC pode ser o principal processo adaptativo do músculo esquelético diante de estímulos variados (CANEPARI et al., 2010). Em estudo envolvendo a utilização de RAC, demonstrou-se que o aditivo induziu a abundância da proteína MyHC tipo IIB com concomitante supressão das demais isoformas MyHC de contração rápida no músculo esquelético de suínos em terminação (DEPREUX et al., 2002). Uma vez que mudanças na expressão proteica das isoformas MyHC podem ser reflexos de modificações que operam no nível pós-transcricional (BALDWIN; HADDAD, 2002; SCHIAFFINO; REGGIANI, 1996), variações nos níveis de

RNA mensageiro (RNAm) podem ser esperados com o uso de RAC. Portanto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos do tempo de fornecimento de RAC sobre a expressão gênica dos β -AR (subtipos β_1 e β_2) e das isoformas MyHC (I, IIa, IIx/d e IIb) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos não portadores da mutação no gene que codifica para o RYR1.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido na instalação experimental de crescimento e terminação do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUAP) da ESALQ/USP.

3.2.1 Animais e delineamento experimental

Oitenta suínos, machos castrados, da linha genética Topigs, com peso vivo (PV) médio inicial de $69,42 \pm 1,24$ kg, foram adquiridos de uma granja comercial e utilizados em um experimento de 28 dias. Ao chegarem à instalação experimental, os animais foram pesados individualmente e distribuídos nas baias. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos completos casualizados para controlar as diferenças no PV inicial dos animais, com cinco tratamentos, oito repetições por tratamento e dois animais por unidade experimental. A unidade experimental foi representada pela baia.

3.2.2 Tratamentos

Os seguintes tratamentos foram avaliados:

- RAC 0 (controle): dieta basal fornecida do 1º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 7: dieta basal fornecida do 1º ao 21º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 22º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 14: dieta basal fornecida do 1º ao 14º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 15º ao 28º dia de experimentação;

- RAC 21: dieta basal fornecida do 1º ao 7º dia e dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 8º ao 28º dia de experimentação;
- RAC 28: dieta basal com 10 ppm de RAC fornecida do 1º ao 28º dia de experimentação.

A dieta basal, compostas principalmente por milho e farelo de soja, suplementada com minerais e vitaminas, foi formulada para atender as exigências nutricionais mínimas descritas por Rostagno et al. (2005), com exceção dos níveis de lisina, treonina, metionina e triptofano digestíveis. Embora Rostagno et al. (2005) sugiram 0,679% de lisina digestível verdadeira para suínos machos castrados de alto potencial genético com PV de 70 a 100 kg, o nível de 0,883% de lisina digestível verdadeira foi estabelecido em virtude da maior exigência deste aminoácido quando há suplementação de RAC na dieta (SCHINCKEL et al., 2003; WEBSTER et al., 2007). Uma vez que o nível de lisina digestível verdadeira foi acrescido em 30%, os níveis dos demais aminoácidos essenciais (treonina, metionina e triptofano) também foram aumentados na mesma proporção de forma a manter constante a relação entre os estes aminoácidos e a lisina digestível verdadeira. Para avaliação das relações aminoacídicas das dietas, foram utilizadas as relações na proteína ideal para suínos na fase de terminação, preconizadas por Rostagno et al. (2005). A composição percentual e os valores calculados da dieta basal estão apresentados no item 2.2.2 (Tabela 2.1).

3.2.3 Coleta das amostras

No final do período experimental (PV médio final = $102,46 \pm 1,44$ kg), os animais foram encaminhados ao abatedouro experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – FZEA/USP, Pirassununga, SP, para serem abatidos. Logo em seguida ao procedimento de sangria dos animais, amostras de pelos com bulbos intactos foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos para serem analisadas quanto à presença ou ausência da mutação no gene do RYR1. Além disso, imediatamente após a sangria, amostras do músculo *Longissimus dorsi* foram coletadas entre a 10ª e 11ª costela, no lado direito do animal. As amostras de tecido muscular foram acondicionadas em microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80 °C para posterior análise da expressão gênica no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP.

3.2.4 Detecção da mutação no gene do RYR1

A identificação da mutação no gene que codifica para o RYR1 foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP, de acordo com metodologia descrita no item 2.2.5. Os três genótipos (HAL^{NN} , HAL^{Nn} , HAL^{nn}) foram identificados por meio da PCR-RFLP.

Com base nesta análise, o genótipo HAL^{nn} não foi detectado na população animal do presente estudo. Entretanto, cinco animais com genótipo HAL^{Nn} foram identificados na população estudada. Desta forma, estes animais foram removidos das análises estatísticas, sendo considerados somente os animais com genótipo HAL^{NN} .

3.2.5 Expressão gênica

3.2.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído a partir das amostras do músculo *Longissimus dorsi* com o uso do reagente TRIzol (*Invitrogen*), segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, devidamente tratados para serem utilizados em análises com RNA. O tecido triturado (50 a 100 mg) foi homogeneizado em 1 mL de TRIzol, agitado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, 20 mL de clorofórmio foram acrescentados e as amostras foram agitadas e incubadas novamente por 5 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a $11.000 \times g$ por 15 minutos a $4^{\circ}C$, removeu-se a fase aquosa para microtubos estéreis e foram adicionados 500 μL de isopropanol 100%. Em seguida, as amostras foram agitadas, incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 minutos a $4^{\circ}C$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA (*pellet*) foi lavado com etanol (75%) gelado, preparado com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras foram, então, centrifugadas a $9.000 \times g$ por 5 minutos a $4^{\circ}C$. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e após a remoção completa do etanol por meio de secagem por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente, o precipitado de RNA foi ressuscitado em 20 μL de água DEPC (0,01%) para posterior determinação da concentração de RNA total.

3.2.5.2 Quantificação e integridade do RNA total

A concentração de RNA total foi avaliada por espectrofotômetro NanoDrop (*ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer*), utilizando-se 1 μL de RNA total concentrado. O grau de pureza da amostra foi estimado pela razão entre as absorbâncias medidas no comprimento de onda de 260 nm (A260) e 280 nm (A280). Todas as amostras de RNA extraídas apresentaram razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0, indicando pureza das mesmas.

A integridade do RNA total extraído foi confirmada mediante eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), aplicando-se 1 μL de RNA total concentrado, 2 μL de tampão de corrida e 0,5 μL de GelRed (Biotium). As bandas ribossomais 18S, 28S e 5S foram visualização em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para visualização das bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) em amostras do músculo *Longissimus dorsi* de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina pré-abate

3.2.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Diluídas com água DEPC para a concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, as amostras de RNA total foram submetidas ao tratamento com a enzima deoxiribonuclease I (DNase I) (Fermentas), a fim de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. A reação foi conduzida com volume final de 10 μL , contendo 1 μg do RNA total diluído, 1 μL de *buffer* 10X com MgCl_2 , 1 U da enzima DNase I e 6 μL de água DEPC. As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 30 minutos. Em seguida, para inibir a reação, foi adicionado 1 μL EDTA 50 mM e, posteriormente, as amostras sofreram nova incubação a 65°C por 10 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada com o *Kit ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega), conforme as especificações do fabricante. Assim, após a retirada das amostras tratadas com DNase I do termociclador, adicionou-se 0,5 µg de *primer* oligo (dT) e procedeu-se o aquecimento das mesmas por 5 minutos a 70°C, sendo resfriadas em gelo logo em seguida. Subsequentemente, a mistura constituída por 4 µL de *buffer* 5X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 0,5 µL de inibidor de ribonucleases (RNasin), 1 µL da enzima transcriptase reversa e 0,3 µL de água livre de nucleases, totalizando volume final de 20 µL, foi incorporada às amostras. A transcrição reversa foi realizada a 25°C por 5 minutos, seguida de 42°C por 60 minutos e, por fim, procedeu-se a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos.

3.2.5.4 Desenho dos *primers*

Os pares de *primers* utilizados para amplificação dos genes referência [GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), 18S rRNA (18S RNA ribossomal) e β -actina] e dos genes alvo (β_1 -AR, β_2 -AR e MyHC I) foram desenhados com base na sequência do RNAm de suínos disponíveis no banco de dados *GenBank* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), com o uso do programa *Primer3Plus* (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) (Tabela 3.1). Posteriormente, os pares de *primers* foram testados quanto à especificidade com o uso da ferramenta BLAST do *GenBank*, e também quanto à qualidade pelo programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html). Por fim, as sequências de bases nitrogenadas foram enviadas à Sinapse Biotecnologia Ltda para a síntese dos *primers* (direto e reverso).

Os genes alvo (MyHC IIa, IIx/d e IIb) foram amplificados com os pares de *primers* desenhados por Da Costa et al. (2002) (Tabela 3.1). A especificidade e a qualidade destes *primers* foram verificadas com as ferramentas mencionadas anteriormente.

Tabela 3.1 – Sequência dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado expresso em pares de bases (pb), temperatura de anelamento para cada par de *primer* e número de acesso (Gene ID) no *GenBank* do NCBI

Gene ¹	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Tamanho do fragmento, pb	Temperatura de anelamento, °C	Gene ID
β -actina	Direto: TCCCTGGAGAAGAGCTACGAG Reverso: CATGATCGAGTTGAAGGTGGTC	147	58	U07786.1
GAPDH	Direto: GCATCCTGGGCTACACTGAG Reverso: CCCAGCATCAAAGGTAGAAGAG	80	59	U82261.1
18S rRNA	Direto: CCTACGGAAACCTTGTTACGAC Reverso: GTCGCTACTACCGATTGGATG	142	59	AY265350.1
β_1 -AR	Direto: CTCTGCTGGCTACCCTTCTTC Reverso: GCAGTAGATGATGGGGTTGA	132	58	NM_001123074.1
β_2 -AR	Direto: CTTCTTCACCAACCAGCCTTAC Reverso: GAAAGACCCTGGAGTAGACGAA	95	59	AY526088.1
MyHC I	Direto: GACAAAGAGGAGTTCGTCAAGG Reverso: AACTTGGGTGGATTCTGCTG	128	60	L10129.1
MyHC IIa	Direto: TTAAAAAGCTCCAAGAACTGTTTCA Reverso: CCATTTCTGGTCGGAAGCTC	100	58	U11772.1
MyHC IIx/d	Direto: AGCTTCAAGTTCTGCCCCACT Reverso: GGCTGCGGGTTATTGATGG	76	60	U90719.1
MyHC IIb	Direto: CACTTTAAGTAGTTGTCTGCCTTGAG Reverso: GGCAGCAGGGCACTAGATGT	80	60	U90720.1

¹GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 18S rRNA: 18S RNA ribossomal; β_1 -AR: receptor β_1 -adrenérgico; β_2 -AR: receptor β_2 -adrenérgico; MyHC: cadeia pesada de miosina.

3.2.5.5 Otimização dos *primers*

Com o intuito de definir a temperatura ideal de anelamento dos *primers*, foram realizadas PCR com volume total de 10 μ L, contendo 1 μ L do *pool* de cDNA diluído 1:10, 1 μ L de PCR *buffer* 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de cada dNTP, 0,1 μ M de cada *primer* (direto e reverso), 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 6,95 μ L de água filtrada autoclavada. As condições de termociclagem consistiram em: 1) desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 2) 40 ciclos de a) desnaturação a 94°C por 30 segundos; b) anelamento dos *primers* numa dada temperatura estabelecida por gradiente de temperatura variando de 56 a 60°C em intervalos de 1°C por 30 segundos (Tabela 3.1); c) extensão a 72°C por 1 minuto; 3) extensão final e estabilização do produto a 72°C por 15 minutos.

A amplificação e a especificidade de cada gene foram verificadas por corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3), aplicando-se 5 μ L do produto de PCR, 2 μ L de tampão de corrida e 0,5 μ L de GelRed (Biotium). As bandas foram visualizadas em luz UV e o gel foi fotodocumentado (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para verificação da amplificação e especificidade de cada gene estudado. Coluna 1: Padrão de tamanho 25 pares de bases (pb) DNA Step Ladder (Promega); Coluna 2: β -actina; coluna 3: GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); Coluna 4: 18S rRNA (18S RNA ribossomal); Coluna 5: β_1 -AR (receptor β_1 -adrenérgico); Coluna 6: β_2 -AR (receptor β_2 -adrenérgico); Coluna 7: MyHC (cadeia pesada de miosina) I; Coluna 8: MyHC IIa; coluna 9: MyHC IIx/d; Coluna 10: MyHC IIb. Os tamanhos dos fragmentos do padrão em pb são indicados à direita

3.2.5.6 PCR quantitativa em tempo real

Para as reações de PCR quantitativa em tempo real, foram utilizados o *Kit LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) e o equipamento *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche). Com volume final de 10 μ L, cada reação foi preparada com 2 μ L de cDNA diluído 1:20, 5 μ L de *SYBR Green I Master 2X* (Roche), 0,4 μ M de cada *primer* (direto e reverso) e 1,4 μ L de água livre de nucleases. Após desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, as amplificações foram realizadas com 45 ciclos constituídos das seguintes etapas: 1) desnaturação a 95°C por 10 segundos, 2) temperatura de anelamento do gene por 10 segundos ou 15 segundos para o gene MyHC IIa, 3) extensão a 72°C por 11 segundos ou 20 segundos para o gene MyHC IIa. Todas as reações de PCR em tempo real incluíram um controle negativo (água ao invés de cDNA) e um calibrador, sendo o último a amplificação de um gene conhecido (β -actina) a partir de uma alíquota do *pool* de cDNA diluído 1:20. Os resultados de expressão gênica foram gerados e registrados como valores de Ct (*threshold cycle*).

Ao término de cada reação de PCR em tempo real, a curva de desnaturação (*melting curve*) foi determinada para cada gene estudado de forma a confirmar a especificidade do produto amplificado. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de *melting* ou de dissociação de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Por definição, a temperatura de *melting* é aquela em que 50% da fita dupla do DNA se dissocia, tornando-se fita simples. O amplificado presente na reação é considerado específico quando apenas um pico ou temperatura de *melting* é gerado. A seguir, são apresentadas uma das curvas de desnaturação obtida neste estudo (Figura 3.3) e as temperaturas de *melting* dos genes estudados (Tabela 3.2).

Figura 3.3 – Curva de desnaturação do gene calibrador (β -actina) e da isoforma da cadeia pesada de miosina (MyHC) IIb gerada no presente estudo

Tabela 3.2 – Temperatura de *melting* dos genes estudados

Gene ¹	Temperatura de <i>melting</i> , °C
β -actina	87,6
GAPDH	80,9
18S rRNA	84,8
β_1 -AR	83,2
β_2 -AR	82,6
MyHC I	85,2
MyHC IIa	81,4
MyHC IIx/d	81,7
MyHC IIb	81,2

¹GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 18S rRNA: 18S RNA ribossomal; β_1 -AR: receptor β_1 -adrenérgico; β_2 -AR: receptor β_2 -adrenérgico; MyHC: cadeia pesada de miosina.

3.2.5.7 Cálculo da eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação de cada amostra foi determinada com o uso do programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) que, por meio de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR em tempo real, estabelece a quantidade de RNAm e a eficiência de amplificação individual. Logo, os dados de fluorescência obtidos no

equipamento *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche) foram exportados para o programa computacional LinRegPCR para a análise de cada reação.

3.2.5.8 Quantificação relativa da expressão gênica

A razão da expressão gênica relativa foi calculada de acordo com a equação proposta por Pfaffl (2001). Os resultados são expressos em unidades arbitrárias, sendo em relação ao gene referência escolhido e um grupo calibrador. Como grupo calibrador foi utilizado os animais não suplementados com RAC, sendo considerados como uma unidade arbitrária. A eq. (1) ilustra o método de quantificação escolhido.

$$\text{Razão} = \frac{E(\text{gene alvo})^{\Delta Ct(\text{Ct médio do grupo controle} - \text{Ct médio do grupo tratamento})}}{E(\text{gene referência})^{\Delta Ct(\text{Ct médio do grupo controle} - \text{Ct médio do grupo tratamento})}} \quad (1)$$

Em que:

E = eficiência de amplificação;

Ct = *threshold cycle*.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o uso do procedimento GLM do programa estatístico computacional SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002). Além de cinco animais apresentarem genótipo HAL^{Nn}, houve a morte de um animal durante o período experimental. Logo, os resultados destes seis animais foram retirados das análises estatísticas.

As premissas para a análise de variância (ANOVA), normalidade e homogeneidade das variâncias, bem como a presença de *outliers*, foram testadas. Em seguida, os resultados foram submetidos à ANOVA, sendo os efeitos de bloco e tratamentos incluídos no modelo matemático. No caso de Teste F significativo ($P < 0,05$) para o fator período de fornecimento de RAC, efetuou-se a análise de regressão polinomial (linear e quadrática). As médias dos tratamentos foram ajustadas pelo comando LSMEANS do SAS. Tendências foram discutidas quando $0,05 < P < 0,10$.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Escolha do gene referência para normalização dos dados

A normalização dos dados para um gene referência é uma estratégia fundamental para controlar diferenças na quantidade e qualidade do material inicial, diferenças no preparo do RNA e na síntese de cDNA, e também variações na eficiência de amplificação (AL-BADER; AL-SARRAF, 2005; BUSTIN et al., 2005). Sabe-se que o gene referência ideal deve apresentar padrão de expressão constante nos diferentes tecidos do organismo e em todas as fases do desenvolvimento animal, além de não ser afetado pelos tratamentos experimentais. No presente estudo, foram testados três genes referência: β -actina, GAPDH e 18S rRNA, sendo o 18S rRNA escolhido para normalização dos dados, pois apresentou menor coeficiente de variação e a ANOVA não detectou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3.3). Após a normalização dos dados, a razão da expressão gênica relativa foi calculada, conforme descrita no item 3.2.5.8.

Tabela 3.3 – Valores de *threshold cycle* (Ct) mínimo, médio e máximo para os genes referência β -actina, GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e 18S rRNA (18S RNA ribossomal)

Gene referência	Mínimo	Médio	Máximo	CV ¹ , %	P
β -actina	25,58	32,49	37,22	8,19	0,20
GAPDH	26,48	30,94	35,04	6,43	0,09
18S rRNA	18,10	21,99	25,53	5,87	0,34

¹Coeficiente de variação.

3.3.2 Expressão gênica relativa

No presente estudo, embora não tenha sido detectado efeito ($P > 0,05$) sobre a expressão gênica dos β_1 -AR (Tabela 3.4, Figura 3.4A), o aumento no período de fornecimento de RAC tendeu a reduzir linearmente ($P = 0,08$) os níveis de RNAm dos β_2 -AR (Tabela 3.4, Figura 3.4B). É possível que a ação da RAC esteja relacionada com a população de β_2 -AR, uma vez que os níveis de RNAm dos β_1 -AR no músculo esquelético dos suínos foram irresponsivos ao agonista. No entanto, estudos adicionais que abordem a integração de dados de transcriptoma e proteoma são necessários para confirmar se mudanças na expressão gênica e proteica dos β_2 -AR ocorrem simultaneamente.

Tabela 3.4 – Expressão gênica relativa dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR), receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) e das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) I, MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC IIb no músculo *Longissimus dorsi* de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate¹

Gene	Período de fornecimento de RAC pré-abate, dias					Efeito ²	P
	0	7	14	21	28		
β_1 -AR	1,00 ± 0,39	1,11 ± 0,39	1,71 ± 0,42	1,72 ± 0,39	1,26 ± 0,39	NS	0,59
β_2 -AR	1,00 ± 0,12	0,56 ± 0,19	0,59 ± 0,17	0,55 ± 0,17	0,40 ± 0,17	*	0,08
MyHC I	1,00 ± 0,11	0,61 ± 0,12	0,46 ± 0,12	0,47 ± 0,11	0,40 ± 0,12	L	<0,01
MyHC IIa	1,00 ± 0,33	0,90 ± 0,41	1,15 ± 0,42	0,78 ± 0,46	1,66 ± 0,46	NS	0,66
MyHC IIx/d	1,00 ± 0,23	0,70 ± 0,25	1,12 ± 0,25	1,28 ± 0,23	0,87 ± 0,25	NS	0,51
MyHC IIb	1,00 ± 0,14	3,58 ± 0,17	3,22 ± 0,14	4,81 ± 0,16	6,45 ± 0,16	L	<0,01

¹Os valores (média ajustada pelo comando LSMEANS ± erro padrão) são apresentados como unidades arbitrárias da razão da expressão gênica relativa entre o gene alvo e o gene referência 18S rRNA.

²Efeito linear (L); tendência linear (*); efeito não significativo (NS).

Figura 3.4 – Expressão gênica relativa dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR) – A e dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) – B no músculo *Longissimus dorsi* de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate. As barras de erros representam o erro padrão

Mediante o uso de agonistas e antagonistas seletivos, foi possível subdividir os β -AR nos subtipos β_1 -AR, β_2 -AR e β_3 -AR (SILVA; ZANESCO, 2010). Vale lembrar também que a densidade dos β -AR varia entre os diferentes tecidos e de acordo com a espécie animal (MILLS, 2002). Enquanto os β_3 -AR apresentam limitado padrão de expressão nos tecidos suínos, o subtipo predominantemente expresso é o β_1 -AR, representando 73 e 60% do total dos β -AR presentes no tecido adiposo e no músculo esquelético, respectivamente (McNEEL; MERSMANN, 1999). Logo, a utilização de agonistas seletivos para a população de β_1 -AR é fundamental para potencializar o ganho de massa magra (LIANG; MILLS, 2002). Resposta a uma população específica de β -AR foi claramente demonstrada por Moody, Hancock e Anderson (2000), pois estes autores reportaram que a RAC exibe seletividade para os β_1 -AR.

Por outro lado, estudo conduzido com receptores clonados demonstrou que a ativação da enzima adenil ciclase pela RAC ocorreu com maior eficiência via β_2 -AR em relação aos β_1 -AR (MILLS et al., 2003). Recentemente, o estudo do mecanismo molecular da ação da RAC revelou que suínos suplementados com 20 ppm de RAC durante 28 dias pré-abate apresentam redução na abundância relativa de RNAm dos β_2 -AR no músculo *Longissimus dorsi* durante os últimos 14 dias do período experimental, o que sugere que a resposta à RAC provavelmente seja mediada pelos β_2 -AR (GUNAWAN et al., 2007a).

Ao avaliarem o número de β -AR presentes nos adipócitos suínos, Spurlock et al. (1994) atribuíram ao processo de *down-regulation* dos β -AR a redução de 53% na densidade dos mesmos após oito dias de tratamento com RAC. Há claras evidências de que o fornecimento contínuo de outros agonistas β -adrenérgicos, tais como cimaterol e clenbuterol, ocasionam redução tanto na densidade total dos β -AR (KIM et al., 1992) como na expressão do RNAm dos β_2 -AR (SATO et al., 2010) no músculo esquelético de ratos. Além do mais, a atenuação dos efeitos anabólicos do cimaterol foi atribuída à redução na densidade total dos β -AR (KIM et al., 1992). De forma contrastante, Spurlock et al. (1994) não detectaram diminuição na densidade total dos β -AR no tecido muscular de suínos com o fornecimento de RAC por 24 dias. Portanto, a exploração mais detalhada da expressão gênica e proteica dos β -AR, sendo investigadas em associação com as respostas produtivas dos animais, é necessária para o completo entendimento da atuação da RAC no músculo esquelético suíno a fim de estabelecer estratégias nutricionais que otimizem a resposta animal ao agonista.

Houve declínio linear ($P < 0,01$) na abundância relativa de RNAm da isoforma MyHC I à medida que aumentaram os dias de fornecimento de RAC, de forma que o menor nível de expressão do gene foi observado para os animais alimentados com dietas contendo RAC por 28 dias antes do abate (Tabela 3.4, Figura 3.5A). Estes resultados diferem daqueles obtidos por Gunawan et al. (2007a), cuja abundância relativa dos transcritos da isoforma MyHC I não foi afetada em suínos suplementados com 20 ppm de RAC durante quatro semanas. Com base em ensaio de distribuição dos β -AR em vários músculos que compõem a musculatura estriada esquelética de ratos, foi demonstrado que a densidade dos β -AR é duas vezes maior nos músculos constituídos principalmente por fibras do tipo I (JENSEN; BRØRS; DAHL, 1995). Ademais, a densidade dos β -AR apresentou correlação positiva significativa com a percentagem de fibra do tipo I no músculo esquelético de ratos (JENSEN et al., 2002). Diante do exposto, a redução nos níveis de RNAm dos β_2 -AR pode estar associada com a diminuição gradativa na expressão gênica da isoforma MyHC I observada no músculo *Longissimus dorsi* dos animais do presente estudo. Contudo, é difícil inferir se existe

relação direta entre a expressão gênica da isoforma MyHC I e os níveis de RNAm dos β_2 -AR, pois não há estudos disponíveis na literatura que identifiquem qual subtipo de β -AR prevalece em fibras do tipo I na musculatura esquelética de suínos.

Figura 3.5 – Expressão gênica relativa das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) I – A, MyHC IIa – B, MyHC IIx/d – C e MyHC IIb – D no músculo *Longissimus dorsi* de suínos submetidos a períodos de fornecimento de ractopamina (RAC) pré-abate. As barras de erros representam o erro padrão

Em razão da existência de correlação positiva significativa entre os níveis de RNAm das isoformas MyHC e as correspondentes proteínas, a análise de expressão gênica pode ser uma alternativa válida ao clássico método histoquímico para a classificação das fibras musculares (GUNAWAN et al., 2007b; PARK et al., 2009). Nesse sentido, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que a ação hipertrófica da RAC pode ser acompanhada pela redução na quantidade de fibras do tipo I, indicando que fibras musculares de contração lenta e metabolismo oxidativo possivelmente apresentam pouca contribuição para o aumento da massa muscular. Consistente com esse argumento, Beermann et al. (1987)

observaram declínio na percentagem de fibras do tipo I no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos submetidos ao tratamento com cimaterol. De forma contrastante, alterações na abundância relativa da proteína MyHC I não foram detectadas com o uso da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em suínos suplementados com 60 ppm de RAC por até 62 dias (DEPREUX et al., 2002).

As abundâncias relativas dos transcritos das isoformas MyHC IIa e MyHC IIx/d não foram afetadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 3.4, Figuras 3.5B e 3.5C), mas os períodos crescentes de fornecimento de RAC aumentaram linearmente ($P < 0,01$) a expressão gênica da isoforma MyHC IIb no músculo *Longissimus dorsi* dos animais (Tabela 3.4, Figura 3.5D). De modo semelhante, os níveis de RNAm da isoforma MyHC IIb presentes no músculo esquelético de suínos aumentaram a partir das primeiras 12 horas de administração de 20 ppm de RAC, mantendo-se elevados durante as quatro semanas do estudo (GUNAWAN et al., 2007a).

De modo geral, alterações na incidência de uma dada fibra muscular podem estar associadas às mudanças na expressão proteica das isoformas MyHC (CANEPARI et al., 2010), que segue a via de transição sequencial e reversível: MyHC I $\leftrightarrow$ MyHC IIa $\leftrightarrow$ MyHC IIx/d $\leftrightarrow$ MyHC IIb (PETTE; STARON, 2001). Embora os resultados do presente estudo não sejam suficientes para descrever esta via de transição entre os tipos de fibras, outras pesquisas baseadas no ensaio imunoenzimático ELISA e no método imunohistoquímico indicaram que a RAC predispõe à interconversão das isoformas MyHC de contração lenta para aquelas de contração rápida (DEPREUX et al., 2002; GONZALEZ et al., 2008).

3.4 Conclusão

É provável que a ação da RAC esteja relacionada com a população de β_2 -AR. Além disso, alterações nos níveis de RNAm das isoforma MyHC no tecido muscular de suínos são dependentes do tempo de fornecimento de RAC, sendo favorecido o aumento nos níveis de RNAm da isoforma MyHC IIb quando os suínos receberam 10 ppm de RAC por 28 dias pré-abate.

Referências

AL-BADER, M.W.; AL-SARRAF, H. A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat – validation by semi-quantitative RT-PCR. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 38-45, 2005.

BALDWIN, K.M.; HADDAD, F. Skeletal muscle plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, Baltimore, v. 81, suppl. 1, p. S40-S51, 2002.

BEERMANN, D.H.; BUTLER, W.R.; HOGUE, D.E.; FISHELL, V.K.; DALRYMPLE, R.H.; RICKS, C.A.; SCANES, C.G. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 65, n. 6, p. 1514-1524, 1987.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CANEPARI, M.; PELLEGRINO, M.A.; D'ANTONA, G.; BOTTINELLI, R. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 199, n. 4, p. 465-476, 2010.

DA COSTA, N.; BLACKLEY, R.; ALZUHERRI, H.; CHANG, K.C. Quantifying the temporospatial expression of postnatal porcine skeletal myosin heavy chain genes. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 353-364, 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 of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1888-1894, 2002.

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

GONZALEZ, J.M.; DIJKHUIS, R.D.; JOHNSON, D.D.; CARTER, J.N.; JOHNSON, S.E. Differential response of cull cow muscles to the hypertrophic actions of ractopamine-hydrogen chloride. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 12, p. 3568-3574, 2008.

GUNAWAN, A.M.; RICHERT, B.T.; SCHINCKEL, A.P.; GRANT, A.L.; GERRARD, D.E. Ractopamine induces differential gene expression in porcine skeletal muscles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2115-2124, 2007a.

GUNAWAN, A.M.; PARK, S.K.; PLEITNER, J.M.; FELICIANO, L.; GRANT, A.L.; GERRARD, D.E. Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 5, p. 1247-1256, 2007b.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 30, n. 5, p. 381-389, 1995.

JENSEN, J.; BRØRS, O.; DAHL, H.A. Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Copenhagen, v. 76, n. 6, p. 380-385, 1995.

JENSEN, J.; BRENNESVIK, E.O.; BERGERSEN, L.; OSELAND, H.; JEBENS, E.; BRØRS, O. Quantitative determination of cell surface β -adrenoceptors in different rat skeletal muscles. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Berlin, v. 444, n. 1-2, p. 213-219, 2002.

KIM, Y.S.; SAINZ, R.D.; SUMMERS, R.J.; MOLENAAR, P. Cimaterol reduces beta-adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 115-122, 1992.

LEACH, L.M.; ELLIS, M.; SUTTON, D.S.; MCKEITH, F.K.; WILSON, E.R. The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 934-943, 1996.

LIANG, W.; MILLS, S.E. Quantitative analysis of beta-adrenergic receptor subtypes in pig tissues. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 4, p. 963-970, 2002.

McNEEL, R.L.; MERSMANN, H.J. Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 611-621, 1999.

MILLS, S.E. Biological basis of the ractopamine response. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, suppl. 2, p. E28-E32, 2002.

MILLS, S.E.; KISSEL, J.; BIDWELL, C.A.; SMITH, D.J. Stereoselectivity of porcine β -adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 122-129, 2003.

MOODY, D.E.; HANCOCK, D.L.; ANDERSON, D.B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. New York: CABI Publishing, 2000. chap. 4, p. 65-95.

OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. The effects of breed and halothane sensitivity on pig meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 35, n. 1, p. 105-118, 1993.

PARK, S.K.; GUNAWAN, A.M.; SCHEFFLER, T.L.; GRANT, A.L.; GERRARD, D.E. Myosin heavy chain isoform content and energy metabolism can be uncoupled in pig skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 2, p. 522-531, 2009.

PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 50, n. 6, p. 500-509, 2000.

PETTE, D.; STARON, R.S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 115, n. 5, p. 359-372, 2001.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.

SATO, S.; NOMURA, S.; KAWANO, F.; TANIHATA, J.; TACHIYASHIKI, K.; IMAIZUMI, K. Adaptive effects of the β_2 -agonist clenbuterol on expression of β_2 -adrenoceptor mRNA in rat fast-twitch fiber-rich muscles. **Journal of Physiological Sciences**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 119-127, 2010.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 76, n. 2, p. 371-423, 1996.

SCHINCKEL, A.P.; LI, N.; RICHERT, B.T.; PRECKEL, P.V.; EINSTEIN, M.E. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1106-1119, 2003.

SILVA, A.S.R.; ZANESCO, A. Physical exercise, β -adrenergic receptors, and vascular response. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 47-56, 2010.

SPURLOCK, M.E.; CUSUMANO, J.C.; JI, S.Q.; ANDERSON, D.B.; SMITH, C.K.; HANCOCK, D.L.; MILLS, S.E. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 75-80, 1994.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT**: guide of personal computers. Version 9.0. Cary, 2002. 1 v.

WEBSTER, M.J.; GOODBAND, R.D.; TOKACH, M.D.; NELSEN, J.L.; DRITZ, S.S.; UNRUH, J.A.; BROWN, K.R.; REAL, D.E.; DEROUCHÉ, J.M.; WOODWORTH, J.C.; GROESBECK, C.N.; MARSTELLER, T.A. Interactive effects between ractopamine hydrochloride and dietary lysine on finishing pig growth performance, carcass characteristics, pork quality, and tissue accretion. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 23, n. 6, p. 597-611, 2007.

WEISS, A.; LEINWAND, L.A. The mammalian myosin heavy chain gene family. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 417-439, 1996.