

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E
MIOSTINA ASSOCIADA COM O DESEMPENHO E
QUALIDADE DA CARNE EM OVINOS**

Autora: Adriana Bagatoli
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E
MIOSTINA ASSOCIADA COM O DESEMPENHO E
QUALIDADE DA CARNE EM OVINOS**

Autora: Adriana Bagatoli
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2011

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver."

Martin Luther King

Dedico este estudo aos meus pais, Taciano e Mística, ao meu irmão, Fábio, pelo apoio, incentivo, amor e carinho que recebi nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças em todos os momentos de minha caminhada em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, Taciano e Mística, que iluminaram os meus pensamentos dando-me apoio e incentivo para a realização desta conquista, e pela compreensão nos momentos de dificuldades durante este percurso. Ao meu irmão, Fábio, que de forma especial e carinhosa me deu força, coragem, apoio, acreditando na realidade do meu sonho.

À orientadora, Professora Dra. Eliane Gasparino, por me auxiliar neste grande projeto, que será essencial na minha vida, proporcionando os conhecimentos para que eu conseguisse alcançar o sucesso, através de ensinamentos passados. Obrigada pela amizade, paciência, compreensão e por sua brilhante orientação.

À Professora Dra. Maria Amélia Menck Soares, ao Mestrando Odair Scatolin Rossafa Garcia, e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela ajuda e importante participação para a concretização deste projeto, bem como do incentivo e conhecimentos transmitidos.

À professora Dra. Simone Elisa Facionni Guimarães e à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às amigas que colaboraram para o desenvolvimento desta etapa tão importante na minha vida, Ana Paula, Stefânia e Liégie. Em especial, ao Msc. Rafael Marzall do Amaral e ao professor Dr. Francisco de Assis Fonseca de Macedo, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos meus amigos de hoje e sempre que fizeram parte da minha vida, aos meus amigos de Maringá, que me motivaram a continuar em busca desta conquista, a todos os que fizeram parte de minha vida, direta ou indiretamente, por me fazerem continuar e não desistir mesmo com todas as dificuldades. Agradeço pelas risadas, por todos os momentos juntos e principalmente pela amizade verdadeira.

Aos meus amigos que estão longe, aos que já se foram, e principalmente àqueles que continuarão ao meu lado independentemente da distância.

Agradeço a todos os professores e à Universidade Estadual de Maringá, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal e pelo incentivo a buscar mais conhecimentos.

Aos meus colegas.

E a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

ADRIANA BAGATOLI, filha de Taciano Bagatoli e Mística Zanluca Bagatoli, nasceu em Cascavel – PR, em 19 de junho de 1987.

No ano de 2005, iniciou no Curso de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, concluindo em dezembro de 2008.

Em março de 2009, iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, especificamente em Melhoramento Genético Animal, concluindo em março de 2011.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
I. INTRODUÇÃO	12
II. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. <i>Ovinocultura de corte</i>	13
2.2. <i>Desenvolvimento corporal e qualidade da carne</i>	16
2.3. <i>Maciez da carne e escolha dos genes para estudos de expressão por PCR em tempo real</i>	19
2.4. <i>PCR quantitativo em tempo real</i>	23
2.5. <i>Literatura Citada</i>	26
III. OBJETIVO	32
IV. EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E MIOSTINA ASSOCIADA COM O DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE EM OVINOS	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
<i>Composição da Amostra</i>	36
<i>Extração do RNA total</i>	37
<i>Síntese de cDNA</i>	38
<i>PCR em tempo real</i>	38
<i>Análise estatística</i>	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Sequência de primers, temperatura de anelamento e tamanho de fragmentos para CAST, GDF-8 e GAPDH respectivamente.	40
TABELA 2. Médias e desvios padrões para as variáveis estudadas para características de desempenho.	41
TABELA 3. Expressão do gene GAPDH nas diferentes raças de ovinos e diferentes espessuras de gordura abdominal pela técnica da RT-PCR em tempo real. Média e desvio-padrão dos valores de Ct obtidos nas amostras de tecido muscular para análise de expressão da Calpastatina e da Miostatina.....	48
TABELA 4. Equação de regressão e R-quadrado (R^2) das reações de amplificação de cada gene alvo.	48
TABELA 5. Médias e desvios padrões dos valores de expressão do mRNA (em unidades arbitrárias) a partir das análises de RT-PCR	50
TABELA 6. Desdobramento da interação para o gene CAST, a partir dos valores de expressão do mRNA (em unidades arbitrárias).	51
TABELA 7. Valores de correlações e nível de significância para as variáveis estudadas.	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Esquema de distribuição dos animais nos fatores avaliados: grupos genéticos e espessuras de gordura (2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm).....	37
FIGURA 2. Gráfico da força de cisalhamento para os grupos genéticos e espessura de gordura.	45
FIGURA 3. Gráfico das características de desempenho para os grupos genéticos, em que SI obteve pior desempenho quando comparada a ½D-SI e ½WD-SI	46
FIGURA 4. Gráfico das características de desempenho para as espessuras de gordura (2,0 mm, 2,5 mm e 3,0 mm), com melhor desempenho para todas as características para 3,0 mm.	46
FIGURA 5. Curva de dissociação para o gene GAPDH.	49
FIGURA 6. Gráfico dos valores da expressão do mRNA (em unidades arbitrárias) obtidos para os genes CAST e GDF-8 para os grupos genéticos e espessuras de gordura.....	52

RESUMO

A calpastatina (*CAST*) é um inibidor endógeno das calpaínas, cuja principal função é modular a ação proteolítica destas enzimas responsáveis pelo enfraquecimento miofibrilar *post-mortem*. O gene da Miostatina (*GDF-8*) age como um regulador negativo do crescimento muscular esquelético. A expressão desses dois genes, bem como a sua interação, afeta a qualidade da carne, especialmente o fenótipo de maciez. O objetivo deste estudo foi avaliar cordeiros das raças Santa Inês, ½ Dorper - Santa Inês e ½ White Dorper - Santa Inês, abatidos com 2,0 mm, 2,5 mm e 3,0 mm de espessura de gordura comparando às características de desempenho de peso de carcaça quente, peso de carcaça fria, rendimento comercial de carcaça, cobertura de gordura, área de olho de lombo, força de cisalhamento, ganho de peso, consumo no período, consumo médio diário, ganho médio diário, conversão alimentar, peso vivo médio e peso vivo ao abate, bem como a expressão dos genes *CAST* e *GDF-8* e as suas interações. Os resultados apresentaram valores significativos ($p < 0,05$) para a maior expressão da Calpastatina e da Miostatina para o grupo genético Santa Inês, sem influência da espessura de gordura. O grupo ½ Dorper - Santa Inês foi o que apresentou menor expressão desses genes quando os animais são abatidos em 2,0 mm e 2,5 mm de espessura de gordura. Foi possível concluir que a raça Santa Inês obteve o fenótipo de menor maciez da carne, e a raça ½ Dorper - Santa Inês teve melhor desempenho para esta característica. Confirmou-se que as maiores expressões dos genes *CAST* e *GDF-8* estão envolvidos com a menor maciez da carne ovina e que a maciez está relacionada ao desenvolvimento e crescimento muscular.

Palavras-chave: cordeiros, desenvolvimento muscular, PCR em tempo real

ABSTRACT

Calpastatin (CAST) is an endogenous calpain inhibitor which main function is to module proteolysis action of those enzymes responsible for the post-mortem myofibril deterioration. Myostatin gene (GDF-8) acts as a negative regulator of the skeleton muscular growth. These two genes expressions, as well as their interaction, affect meat quality, specially the tenderness phenotype. The objective of this study was to evaluate Santa Ines, ½ Dorper - Santa Inês and ½ White Dorper - Santa Inês lamb meat, slaughtered with 2.0 mm, 2.5 mm and 3.0 mm of fat thickness, comparing the weight performance characteristic of fresh carcass, cold carcass weight, carcass' commercial yield, fat content, ribeye area, shear strength, weight gain, intake in the period, average daily intake, average daily return, feed conversion, average live weight and live weight at slaughter, as well as CAST and GDF-8 gene expression and their interactions. Results showed significant values ($p < 0.05$) for the highest expression of Calpastatin and Myostatin for Santa-Ines genetic group without influencing fat thickness. The ½ Dorper - Santa Ines group showed the lowest expression of this gene when slaughter with 2.0 mm and 2.5 mm of fat thickness. It was possible to conclude that Santa Ines breed obtained the phenotype of lower meat tenderness, and ½ Dorper – Santa Ines breed showed the best performance for this characteristic. It is confirmed that the largest expressions for CAST and GDF-8 genes are involved with the lowest tenderness of lamb meat and that tenderness is related to muscular growth and development.

Key words: lamb, muscular development, real time PCR.

I. INTRODUÇÃO

A atividade da ovinocultura no Brasil é caracterizada por apresentar alto potencial rentável, em vista de sua adaptabilidade às condições locais de manejo e ser uma cultura altamente exploratória na cadeia produtiva. No entanto, os rebanhos brasileiros são inexpressivos, quando comparados ao rebanho bovino, não só em número de cabeças, mas também de sistemas de produção eficientes, qualidade do abate, cortes padronizados de carcaça e outros fatores que influenciam na qualidade da carne e no preço final do produto (Simplício et al., 2004).

Para que o crescimento do mercado de ovinos de corte seja impulsionado no contexto da agropecuária do país, é importante utilizar ferramentas que permitirão o favorecimento desta atividade ou que facilitem o conhecimento para novas formas de seleção de rebanhos. Logo, a genética molecular e quantitativa são potentes ferramentas para o melhoramento, que podem ser utilizadas através de direcionamentos de acasalamento com o objetivo de aumentar a frequência de um alelo na população e potencializar a característica de interesse (Lôbo & Lôbo, 2007). Além de que, para auxiliar o melhoramento animal são necessárias informações, a partir dos valores fenotípicos, de relação de parentesco, variâncias genéticas e variações do ambiente, que possam levar ao aumento da frequência dos alelos favoráveis (Lôbo, 2008).

Os marcadores moleculares têm desempenhado uma grande função nesses programas de estudo genéticos e têm permitido importantes resultados sobre a caracterização individual e a constituição genética das populações em estudo. Um importante mecanismo que vem sendo utilizado através da quantificação da expressão gênica é a técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*),

ou PCR quantitativo em tempo real, que permite avaliar a resposta biológica para um determinado gene no seu tecido de atuação específico (Heid et al., 1996).

O uso dessa técnica e a seleção de genes candidatos serão importantes ferramentas para correlacionar a quantidade e qualidade de produção ao seu fenótipo final. Sabendo que a qualidade da carne é a relação entre as características sensoriais de sabor, suculência, textura e maciez, interligados à quantidade de gordura e músculo, o conceito geral será o de aprimorar a cadeia produtiva de ovinos de corte pela qualidade da carne, e principalmente do fenótipo de maciez (Silva Sobrinho et al., 2005).

Logo, com o objetivo de avaliar as características de expressão gênica relacionadas à qualidade e desenvolvimento da musculatura da carne ovina, os genes para a calpastatina (*CAST*) e miostatina (*GDF-8*) serão excelentes genes candidatos por agirem diretamente no músculo esquelético, onde ocorre a resposta biológica para a maciez, podendo servir como marcadores moleculares.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovinocultura de corte

No Brasil, a ovinocultura demorou a ganhar espaço na pecuária, sendo considerada uma atividade de menor importância por muito tempo. Apenas no século XX, essa atividade conseguiu competir no mercado com o crescimento da produtividade e melhoria da qualidade da lã, inicialmente em propriedades do Rio Grande do Sul. Foi nesse período que os programas de melhoramento genético tiveram início, mas ainda assim sem produzir qualquer ganho genético ou sensibilização por parte dos produtores. Quando houve a crise no mercado da lã no país, a ovinocultura de corte impulsionou sua produção (Pereira, 2008). Atualmente cerca de 53% dos rebanhos de ovinos se encontram nos países em desenvolvimento, onde a economia se baseia nessa produção (Sousa, 2002). O rebanho nacional foi calculado em quatro milhões de cabeças na região Sul e 10 milhões na região Nordeste (Pereira, 2008), o que é pouco quando comparado com o território total. Em contraste, no estado do Paraná esta atividade foi a

que mais cresceu nos últimos 20 anos, com taxa média anual superior a 6% (Barbosa et al., 2001).

A ovinocultura é uma atividade que vem se desenvolvendo com grande distribuição e alta adaptabilidade dos diferentes grupos genéticos, em que o melhoramento das raças de ovinos tem crescido ao longo da história (Pereira, 2008), e que apesar de lento, é um processo progressivo de especialização no que diz respeito à produção de corte (Sousa, 2002). Durante muitos anos alguns países criaram métodos para potencializar as raças por meio da seleção, mas que não foram suficientes para aumentar o tamanho efetivo da população (Pereira, 2008).

Apesar de haver uma ampliação gradativa nas atividades de ovinocultura no Brasil, estas de maneira geral, não têm crescido de modo proveitoso. Isso porque trabalhos de níveis tecnológicos como os de melhoramento animal e outras formas de seleção, ainda são recentes, e os produtores acabam por focar nesta atividade apenas um negócio lucrativo e, de forma a satisfazer somente um mercado consumidor superficial, ou seja, aquele que não seleciona os rebanhos da maneira adequada (Sousa, 2002). Os rebanhos são apenas selecionados de acordo com seu tamanho em um ambiente diferente daquele em que serão criados, os animais são descendentes da primeira geração (Pereira, 2008).

A produtividade da ovinocultura de corte ainda é baixa, considerando a extensão territorial do nosso país, bem como as condições ambientais ideais para tal atividade. (Aro et al., 2007). O baixo consumo da carne é decorrente da pouca qualidade do produto ofertado, que é resultado de métodos de seleção inadequados, bem como da baixa qualidade da estocagem até o momento da venda (Zapatta et al., 1995). Isso ocorre em razão dos fatores que afetam a comercialização da carne. A falta de padronização de carcaças, irregularidades no fornecimento de carne ao mercado, abate clandestino, elevados preços e métodos de seleção impróprios impossibilitam a competitividade do produto. Assim, as carnes deixam de ser apresentáveis ao consumidor e mostram características sensoriais desagradáveis como sabor e odor ativos e também a falta de maciez, que são fatores imprescindíveis na escolha da carne para o consumo (Zapatta et al., 2000). Segundo Garcia (2004), o consumo *per capita/ano* de carne ovina no Brasil é de apenas 0,7 Kg, o que é pouco representativo quando comparado às outras carnes como bovina, suína, aves e peixe e, além disso, é necessário a importação para o abastecimento do mercado interno.

A carne ovina compete no mercado com outros tipos de carne, por influência de vários fatores, o maior consumo pode ser decorrente do aspecto histórico de uma região, cujas tradições dê preferência para este tipo de carne, e por causa das facilidades locais de produção e as formas de consumo. No entanto, por essa carne ainda ser de baixo consumo e com altas exigências de produção, ela tem um custo elevado, mesmo em países desenvolvidos. É por isso que o mercado produtor apresenta oportunidades de comércio às carnes mais baratas e, os procedimentos voltados para sua melhoria estão restritos às poucas tecnologias (Simplicio et al., 2004).

O valor comercial da carne de ovinos está diretamente ligado a sua aceitação pelo consumidor, dependendo também de suas características físicas e organolépticas. O que fez com que o consumo deste produto aumentasse foram suas próprias características nutricionais, de baixo teor de colesterol, gordura saturada e caloria (Madruga et al., 2005). No entanto esses parâmetros não são suficientes para a escolha desta carne pelo consumidor. Além das características descritas, a maciez é outro fator a ser levado em consideração. O consumidor utiliza-se dos atributos e os correlaciona com a qualidade, sendo que a melhor é comparada em termos de maciez e suculência (Borges et al., 2006).

Logo, para que a ovinocultura comece a ganhar espaço no mercado nacional e internacional, representando uma boa alternativa de renda e lucratividade, é necessário que haja uma reformulação dos modelos tradicionais, desenvolvendo novas tecnologias e métodos de seleção através do melhoramento (Costa et al., 2008). A baixa produtividade, que ainda é considerável no Brasil, reflete a necessidade da incorporação dessas novas técnicas com métodos economicamente viáveis. Visto isso, conseguir-se-á assegurar maior lucratividade e aumento da renda para os envolvidos nesse setor. Com maiores exigências vindas do consumidor e da indústria para melhorar a qualidade da carne, é provável que novos métodos de criação e seleção mais eficientes sejam intensificados para a melhoria da qualidade do corte (Sousa, 2002).

O melhoramento, portanto, deve ter como principais objetivos o aumento da produção, redução de custos e facilidade do manejo visando alcançar uma situação mais vantajosa, sendo que a expansão do mercado para a ovinocultura de corte está intensamente associada a sua qualidade. Para o melhoramento da carne ovina as principais características a serem consideradas são o ganho de peso diário, a idade ao abate e o rendimento de carcaça, além de problemas básicos que interferem na

produção, caracterizados por alta mortalidade relacionada com baixas taxas de parição e prolificidade (Pereira, 2008).

Para este estudo, podemos relacionar características genéticas com quantidade e qualidade de produção, avaliando genes candidatos que podem se relacionar aos principais fatores de produção da carne ovina, principalmente à característica de maciez. Alguns exemplos da utilização de genes candidatos relacionados com características de interesse econômico na produção animal são os genes halotano, envolvido com a qualidade da carne em suínos (Culau et al., 2002), e miostatina, relacionada à qualidade da carne e da carcaça associada à formação de musculatura dupla em bovinos, ovinos e até mesmo em aves e peixes (Teixeira et al., 2006). As mutações encontradas nos genes já são comercializadas como marcadores moleculares com o objetivo de selecionar animais para melhor maciez da carne, como é o exemplo da empresa australiana *Pfizer*, que faz o estudo desses marcadores e dispõem para seus clientes as previsões genômicas para o rebanho.

Portanto, a identificação dos genes candidatos à maciez da carne, assim como o estudo das relações de expressão gênica por técnicas moleculares, associando esses resultados com a qualidade de desempenho de cada animal permitirá a compreensão e melhoramento da característica de interesse tendo como consequência o fenótipo final esperado.

2.2. Desenvolvimento corporal e qualidade da carne

No processo de produção da carne ovina, é importante considerar as características morfológicas e fisiológicas de crescimento dos tecidos que compõe a carcaça, sobretudo a musculatura. Tais informações levarão a melhor forma de produção de cordeiros em que seja otimizada a relação de alta proporção de músculo menos rígido e adequada distribuição de gordura (Santos & Tozzetti, 2007).

Para a determinação da qualidade de carcaças é importante avaliar as relações de desenvolvimento dos tecidos em conjunto, do crescimento de osso, músculo e gordura, de acordo com idade, sexo, raça e características de produção (Sainz, 1996). Santos & Tozzetti (2007) avaliaram o crescimento relativo desses tecidos em cortes comerciais de ovinos Santa Inês e concluíram que com o aumento do peso de abate também se eleva a quantidade de gordura na carcaça, o que em quantidade alta significaria qualidade de

carne de caráter inferior. Além disso, o aumento da idade compromete as características de maciez, sabor e solubilidade de colágeno muscular.

Para cada raça o desenvolvimento e velocidade do crescimento dos tecidos serão relacionados a um peso econômico ótimo de abate de acordo com a proporção esperada de músculo, osso e gordura (Roque et al., 1999). Os animais selecionados para o abate devem apresentar boa deposição de massa muscular e cobertura de gordura para a proteção da carcaça durante o resfriamento, mas sem excessos, evitando perdas com o elevado custo de produção. Dentro dos grupos raciais, os animais de médio porte são os que apresentam melhores proporções para essas características, com bom desenvolvimento da massa muscular em um período de tempo não muito elevado (Gomes & Jorge, 2007).

Segundo Corradello (1988), entre os ovinos, a raça Santa Inês, mesmo sendo uma raça leiteira, é a que se tem adequadamente melhor à produção de carne por seu alto rendimento de carcaça e grande resistência as doenças ambientais, além de ter grande velocidade de crescimento, quando comparada a outras raças deslançadas. No entanto, Santello et al. (2006) sugerem que cordeiros Santa Inês apresentam desempenho e características de carcaça inferiores, quando comparados às raças de corte, mas o cruzamento pode produzir crias com maior potencial para ganho de peso em menor tempo para o abate e custo reduzido. Nessa raça a deposição de gordura intramuscular ocorre precocemente, visto que com maior peso de abate, maior será a elevação do teor de lipídeos, com redução do teor de umidade e cinza (Perez et al., 2002).

Para Barros (2005) a raça Dorper é caracterizada pelo bom desempenho, já que esta apresenta alta velocidade de crescimento, carcaça de boa conformação, comportamento de poliêstria contínua, precocidade sexual, altas taxas de prolificidade, 90% de sobrevivência das crias e rendimento de carcaça de 48,8% a 52,6%. Sendo que, é esperado um bom desempenho para mestiços Dorper x Santa Inês para um máximo de ganho de peso e economicamente viáveis. Segundo Cezar et al. (2004), essa raça é uma boa alternativa para programas de cruzamento com rebanho Santa Inês nativo. Os cruzamentos tendem para maior eficiência reprodutiva da raça, maior velocidade de crescimento e nível de nutrição (Garcia et al., 2000).

As raças Dorper e White Dorper se originaram de cruzamentos feitos a partir das raças Dorset Horn e da Blackhead Persian que contribuíram com a boa conformação e adequada deposição da gordura na carcaça (Snowder & Duckett, 2003; De Waal & Combrinck, 2000). Ambas apresentam o mesmo padrão racial exceto quanto a

coloração e pigmentação, que em Dorper o corpo é todo branco e a cabeça preta e em White Dorper é inteiramente branco (Milne, 2000).

Bonagurio et al. (2003) analisaram as características em grupos genéticos Santa Inês puro e cruzas com Texel. Foram estimadas as características físico-químicas da carne, pH, cor, perda de peso por cozimento e força de cisalhamento para ambos os sexos dos grupos, abatidos com diferentes pesos. Os autores verificaram que com o aumento do peso a qualidade da carne melhorou, e que todos os parâmetros estudados tiveram influência dos fatores sexo e raça.

O tipo da dieta influencia a susceptibilidade dos animais aos efeitos ambientais de forma que, as interações entre o tipo de alimento, consumo, ambiente e características fisiológicas visam melhorar o desempenho produtivo (Neiva et al., 2004). Sendo assim, a eficiência alimentar será um fator primordial para a síntese e degradação de proteínas que levarão às características produtivas ideais. A eficácia de uma dieta alimentar para se obter uma carne de qualidade está em grande parte relacionada ao genótipo do animal (Ferraz, 2009), pois entre os fatores *ante-mortem*, o genótipo está altamente correlacionado à maciez (Silva Sobrinho et al., 2005).

Alguns trabalhos comprovaram o efeito dos genes da calpastatina (Duckett et al., 1998) e calpaína na maciez da carne (Koochmaraie et al., 2002). No entanto, esta relação nem sempre será favorável. Segundo Pariacote (1998), a característica genética pode ser antagônica para qualidade e quantidade de produção de carne. Este autor observou, por exemplo, correlações genéticas altas e positivas entre o peso da carcaça quente com o rendimento de carcaça (0,65) e correlações negativas com marmoreio, espessura de gordura e quantidade de gordura abdominal.

Atualmente, a comercialização de cordeiros é baseada no peso vivo do animal, em que a determinação do peso ideal se torna um importante fator para um bom rendimento de carcaça. No entanto, em função da falta de um sistema adequado de classificação e seleção através de um programa de melhoramento genético precursor, a produtividade não é levada aos seus maiores níveis de qualidade propostos para os ovinos. O aumento do peso pode elevar o rendimento das carcaças, mas pode também estar associado com grandes porcentagens de gordura ou baixos teores dos componentes não constituintes da carcaça (Garcia et al., 2004).

Portanto, pode-se afirmar que, as características fenotípicas que levam a uma carne de qualidade estão relacionadas não somente a um bom desempenho da eficiência nutricional para o desenvolvimento e crescimento dos animais para um adequado

rendimento de carcaça, mas também está relacionado intimamente com as características genotípicas.

2.3. Maciez da carne e escolha dos genes para estudos de expressão por PCR em tempo real

São muitas as características levadas em consideração quando da escolha de uma carne com qualidade. Especialmente para o consumidor a maciez é a de maior importância. A causa da variabilidade da maciez da carne ovina se relaciona tanto com a constituição genética do animal como com as variações do ambiente. Os processos *ante* e *post-mortem* envolvem fatores que criam um balanço que resulta no fenótipo final de maciez. Isso ocorre através de processos opostos que, ou são capazes de reduzir a maciez, como no complexo actina-miosina e encurtamento do sarcômero pela ativação da calpastatina, ou são capazes de aumentar, através da proteólise de proteínas miofibrilares pelo antagonismo das calpaínas (Soria & Corva, 2004). Além disso, outras características podem afetar esse balanço da maciez da carne, como os que ocorrem no processo *ante-mortem*, como a genética do animal, idade, sexo, nutrição, e como os que ocorrem no processo *post-mortem*, em razão do *rigor mortis*, por estimulação elétrica, esfriamento de carcaça, maturação, pH e cozimento. Essa variação do fenótipo também está associada às diferenças entre e dentro das raças (Asghar & Pearson, 1980).

Independentemente do genótipo do animal as transformações bioquímicas na musculatura ocorrem após o abate e dão início a uma cascata de processos que são os responsáveis pela modificação em carne propriamente dita. Esses acontecimentos são dependentes dos fatores *ante-mortem* que indicam a resposta para expressão gênica e geram as proteínas formadoras dos complexos envolvidos na qualidade da carne. No entanto, a grande variabilidade nas características de maciez tem sido atribuída não só a constituição genética do animal, como também as diferenças ambientais (Soria & Corva, 2004). Conforme revisado por Ferraz (2009), a característica de maciez pode ser avaliada objetivamente por medida de força de cisalhamento ou por índice de fragmentação das miofibrilas, e subjetivamente por degustadores treinados, cujos métodos de análise são altamente correlacionados.

A maciez e qualidade da carne têm sido relacionadas também aos fatores *post-mortem* e essencialmente a estrutura e a atividade do complexo miofibrilar e de gordura intramuscular. A fibra muscular é o primeiro ponto a ser levado em consideração para

entender o mecanismo da fisiologia celular envolvida no desenvolvimento muscular e de maturação (Moody et al., 1970). A miofibrila é a unidade básica formadora do complexo de contração muscular que levará ao estágio final de maturação da carne (Guyton & Hall, 2002). Tal processo só é possível pela presença de energia (ATP) e estímulos que são ocasionados pela entrada de cálcio nas células, os quais regulam a contração. Após a morte do animal a musculatura entra num estado de contração irreversível, denominado de *rigor mortis*, que só é interrompido quando as fontes de ATP e cálcio se esgotam e ativam um complexo proteolítico de calpaínas (Powers & Howley, 2000). Este sistema se compõe de três moléculas, sendo duas proteases cálcio-dependentes, a m-calpaína e a μ -calpaína, que requerem diferentes quantidades de Ca^{+2} para sua ativação, e uma inibidora do sistema, a calpastatina (Bucci et al., 2005).

O sistema proteolítico cálcio-dependente de calpaínas tem sido considerado o maior complexo proteolítico citossólico, responsável pela maciez da carne *post-mortem* (Fortes, 2007). O que indica esta relação é sua função em degradar os miofilamentos em alguns pontos da molécula, no sarcômero (Andrighetto et al., 2006). Goll et al. (2003) estimaram que essas estruturas do miofilamento, localizadas no músculo esquelético, seriam degradadas em aproximadamente 5 minutos se toda a calpaína estivesse proteoliticamente ativa na fibra. Nesse caso, a maioria das calpaínas deve ser inativa por quase todo o tempo. A atividade da calpaína é então regulada pela alteração na concentração de cálcio. No entanto, as concentrações de cálcio intracelular *post-mortem* são altas o suficiente para ativar a μ -calpaína, mas não a m-calpaína. A μ -calpaína, ou calpaína do tipo I, requer baixas concentrações de cálcio e é ativada quando há uma diminuição de pH. A m-calpaína, ou calpaína do tipo II, requer níveis mais elevados de cálcio (Volpelli et al., 2004). Logo, a atividade da μ -calpaína reflete uma relação com a proteólise e maciez da carne. A atividade da calpastatina é mais intensa nas primeiras 24 horas no período *post-mortem*, indicando que ela seja, provavelmente, uma reguladora primária da μ -calpaína (Morgan et al., 1993). As carnes com alta atividade de calpastatina neste período se tornam menos macias (Rubensam et al., 1998).

A calpastatina depende da presença de Ca^{+2} para se associar aos domínios da calpaína e inibir sua atividade (Méndez, 2007). Segundo Goll et al. (2003), a calpastatina contém subunidades A e C as quais se ligam aos domínios IV e VI da calpaína, respectivamente. A molécula de calpastatina tem sido descrita como uma estrutura de quatro sequências repetidas e homólogas, chamadas de domínios I, II, III e

IV. Essas regiões são altamente conservadas dentro dos domínios de 1 a 4 neste gene, sendo responsáveis pela inibição da atividade proteolítica da calpaína.

Cada domínio no gene apresenta uma capacidade diferente de inibir a μ - ou m-calpaína, seguindo uma ordem de eficiência, domínio I > domínio IV > domínio III > domínio II. Nele também se encontra um domínio designado como L, possuindo uma região N terminal alcalina. Zhou & Hickford (2007) estudaram e caracterizam polimorfismos no éxon 6 do gene da calpastatina em ovinos e descreveram cinco sequências alélicas. A análise desses alelos revelou a substituição do aminoácido glicina por leucina. É sugerido que nesta porção, no domínio L, ocorre a regulação da entrada de íons cálcio, importante por modular a enzima calpaína e interferir na atividade da calpastatina, e conseqüentemente no fenótipo de maciez da carne. O domínio L sozinho não apresenta efeito inibitório, mas é importante por regular os canais de cálcio pertencentes à membrana celular (Goll et al., 2003). A região N terminal, denominada XL, possui sítios para a fosforilação do AMP cíclico (Méndez, 2007).

Assim como o gene da calpastatina, o gene da miostatina também é predominantemente expresso no músculo esquelético, e seus receptores podem se localizar em outros tecidos. A miostatina faz parte da família das supercitocinas dos TGF- β (*Transforming growth factor β*) e sua função é controlar a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares (Cieslak et. al., 2003), atuando como regulador autócrino negativo (Rong et. al., 2007). A estrutura molecular deste gene é altamente conservada e a sequência de aminoácidos da porção terminal carboxil da molécula ativa é idêntica entre as espécies de mamíferos e aves. Esse gene é constituído de três éxons e dois íntrons, que codifica um precursor de aproximadamente 375 aminoácidos (Guizoni et al., 2010). A proteína é sintetizada no músculo na sua forma latente e secretada em associação a um propeptídeo. O peptídeo sinal, que após clivagem do domínio carboxi-terminal forma um homodímero, tornando a miostatina ativa, liga receptores quinases, serina-treonina, para iniciar uma cascata de sinalização (Baumann et al., 2003). Uma mutação pode levar a uma disfunção da proteína e conseqüentemente alterar a estrutura muscular. Uma diminuição da expressão de *GDF-8* como em animais *knockout* para este gene, apresenta aumento de três vezes na sua massa muscular, efeito que causa hipertrofia, enquanto uma superexpressão leva à hiperplasia das células musculares (Lee & Mcpherron, 2001).

Além de efeitos sobre a musculatura, a miostatina também é capaz de atuar como regulador da adipogênese. A deleção do gene que a codifica ocasiona menor acúmulo

de gordura em decorrência da sua ação direta. A atividade da miostatina pode ser inibida por diferentes proteínas, sendo que a follistatina é sua principal antagonista e tem capacidade de se unir à miostatina e inibir sua habilidade para se ligar aos receptores celulares. Quando ocorre a superexpressão da follistatina o processo de atrofia muscular é inibido ativado pela miostatina (Guizoni et al., 2010).

Economicamente, animais com a chamada musculatura dupla, ou hipertrofia muscular, caracterizam-se por melhores rendimentos de carcaça. Quando comparados aos cordeiros normais, a eficiência alimentar é superior e a composição da carcaça é 30% maior (Teixeira et al., 2006), com aumento na conversão alimentar, cerca de 20% a mais na proporção de músculos e menor proporção de ossos e gordura. Em algumas raças de bovinos, como a Belgian Blue, Charolês e Piemontês, essa condição é frequentemente observada (Canesin, 2009). Mas, apesar de esta característica ser visada por produtores, também apresenta problemas com a redução de fertilidade e estresse (Arthur, 1995). Esta é uma condição hereditária modulada recessivamente pelo gene da miostatina (Lee & McPherron, 2001). Cockett et al. (1994) propuseram que isso ocorreria em *locus* único na região subcentromérica do cromossomo 18 em ovinos, com sobredominância polar e que somente afetaria heterozigotos cujo alelo para esta característica fosse herdado do pai (Freking et al., 2002).

McPherron e Lee (1997) identificaram uma deleção de 11 pares de base (pb) no éxon 3 do gene para a raça Belgian Blue, uma transversão de C – A no éxon 1 e uma transição de G – A no éxon 3 para a raça Piemontês. Em outro estudo com ovinos da raça Texel, Kijas et al. (2007) identificaram a transição de uma guanina na região 3' não traduzida do gene, indicando a presença de um alelo mutante, cuja formação de um octâmero reconhece microRNAs e QTLs que atuam na repressão da tradução do gene, que contribuiria para a hipertrofia muscular. Esse resultado confirma que o mecanismo de inibição do *GDF-8* em ovinos ocorre como em outras espécies de mamíferos. Mesmo trazendo muitas vantagens para a produção animal, a maior desvantagem do efeito gênico discutido acima, chamado fenótipo *callipyge*, são os efeitos negativos em relação à maciez da carne, considerada mais dura que a normal, já que a atividade da calpastatina, nesse caso, acaba sendo superexpressa e inibe a proteólise (Koohmaraie et al., 1995).

Logo, para a variação do fenótipo de maciez se tem considerado a atividade da calpastatina, assim como o conteúdo de gordura intramuscular, espessura de gordura, comprimento do sarcômero, composição do colágeno no músculo, entre outros. No

entanto, a calpastatina é a que tem ganhado maior destaque por agir inibindo a degradação miofibrilar no *post-mortem*, reduzindo a velocidade de maturação da carne logo após o abate e inibindo a atividade das calpaínas, responsáveis pela proteólise fibrilar no *rigor mortis* (Soria & Corva, 2004) e a miostatina, por agir no músculo esquelético, controlando a proliferação dos mioblastos e a formação de fibras musculares (Cieslak et. al., 2003). Portanto, uma vez que a característica do fenótipo maciez está intimamente associada à ação de genes que atuam no músculo, a técnica de RT-PCR será capaz de analisar o padrão de expressão desses genes, da atividade da calpastatina e da miostatina, e as respostas possibilitarão o melhoramento genético nesta população a fim de que os resultados obtidos sejam precursores para uma futura seleção de matrizes.

2.4. PCR quantitativo em tempo real

Existe uma série de metodologias usadas para a identificação e isolamento de genes expressos diferencialmente. A medição da expressão gênica tem sido amplamente utilizada para o monitoramento de respostas biológicas a estímulos através da técnica de PCR quantitativo em tempo real. A reação de amplificação em tempo real representa grande avanço nos métodos moleculares por facilitar a quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica, sobretudo de quantidades mínimas de ácidos nucleicos (Heid, 1996).

Esta técnica se baseia na transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) por fluorescência, capaz de comparar, em uma ampla faixa, diferentes quantidades de RNA sem a necessidade de um processamento pós-PCR, tornando a resposta quantitativa correspondente à resposta qualitativa (Bustin et al., 2005), de forma mais rápida e precisa que a PCR, que apresenta somente resultados qualitativos (Ferraz, 2009).

Dois métodos mais comumente usados para as análises do PCR quantitativo em tempo real são de quantificação absoluta, que gera uma curva padrão relacionada ao sinal de PCR que determina o número de cópias do transcrito de interesse, e de quantificação relativa, que mostra a diferença de expressão entre a transcrição alvo do grupo de interesse e um grupo controle ou referência (Livak & Schmittgen, 2001).

O primeiro passo para o início da reação do PCR quantitativo em tempo real é converter uma molécula de RNA em um cDNA, o qual é sintetizado a partir de *primers* aleatórios, de oligo-dT, de *primers* específicos da sequência alvo ou de uma combinação de *primers* aleatórios e oligo-dT (Bustin et al., 2005).

A reação da PCR em tempo real permite avaliar a resposta da expressão dos genes através da sensibilidade de fluorescência a diversos estímulos. Esta técnica consegue controlar a produção dos resultados da amplificação durante cada ciclo da reação da PCR. A reação gera cópias de um molde de DNA de forma exponencial, que é a chamada “fase de *plateau*”, e cada produto destas reações irá gerar uma resposta diferente. Através desta razão é que será possível medir a quantidade de produto da PCR. Durante a fase exponencial o método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. O sinal de fluorescência é determinado por uma altura limiar em que todas as amostras serão comparadas. A quantidade do número de ciclos para a amplificação necessária que seja capaz de gerar este sinal de fluorescência em um limiar é determinado como “Ciclo Threshold” ou Ct (Ginzinger, 2002). Ela mostra o quanto de um determinado gene foi expresso em valores de Ct obtidos, ou seja, quantos ciclos de amplificação foram necessários para se obter um limiar de resposta para cada gene. Assim, para menores valores de Ct, maior será a expressão do mRNA em valores arbitrários. Logo, quanto maior a quantidade de cópias do transcrito alvo no início da reação, menor número de ciclos serão necessários para gerar um número alto de *amplicons* e assim, com poucos ciclos de amplificação a fluorescência atinge seu limiar de detecção (Bustin et al., 2005).

Para quantificar essas mudanças relativas na expressão gênica é necessário se utilizar de alguns métodos para determinar equações que validem as hipóteses. Um dos métodos utilizado é o ΔCt , que determina o efeito do tratamento na expressão de um gene a partir de um gene controle. Para o cálculo dos valores de expressão das amostras relativos ao tecido muscular é estimado o ΔCt , que é dado pela diferença do Ct da amostra de cada gene e o Ct do controle endógeno da amostra (Livak & Schmittgen, 2001).

Para a análise de quantificação relativa da expressão é necessário se utilizar de um controle endógeno interno, que comparado com o gene de interesse diretamente através dos valores de Ct, normalizará os resultados obtidos, corrigindo as diferenças nas concentrações de cDNA nas reações de PCR e efeito da presença de inibidores da

amplificação. A escolha do gene candidato a controle endógeno requer presença constante em todas as amostras testadas e que não se expresse, ou varie pouco, por influência a outros estímulos ou mudanças no metabolismo celular. Determinando-se um nível de fluorescência e o número de ciclos necessários para amplificar quantidades diferentes de cDNA inicial é possível correlacionar esses fatores. O valor de R^2 gera o fator de correlação entre os pontos de diluição e o Ct obtido, e a inclinação da reta (*slope*) determinam a eficiência de amplificação da reação. Na reação em que ocorre a duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo (100 % de eficiência) a inclinação será de -3,32 e coeficiente de correlação de -1, sendo que todos os pontos da curva coincidam ao Ct esperado (Livak & Schmittgen, 2001).

O gene referência é utilizado para minimizar o erro a PCR em tempo real. A normalização destes genes, denominados de genes "housekeeping", controlam a entrada das quantidades de RNA na transcrição reversa. Os mais comumente usados incluem a β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e 18S do RNA ribossomal (Huggett et al., 2005).

2.5. LITERATURA CITADA

www.pfizeranimalgenetics.com.au. Acessado em 19 de janeiro de 2011

ANDRIGHETTO, D. D.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O.; SARTORI, D. R.; RODRIGUES, E.; BIANCHINI, W. Maturação da carne bovina. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.7, n.6, 2006.

ARO, D. T.; POLIZER, K. A.; PENA, S.B. O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil. *Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária*, v.9, p.1679-7353, 2007.

ARTHUR, P. F. Double muscling in cattle: A review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.46, p.1493-1515, 1995.

ASGHAR, A., PEARSON, A.M. Influence of ante and postmortem treatments upon muscle composition and meat quality. **Advanced Food Research**, v.26, p.53-213, 1980.

BARBOSA, O. R.; MACEDO, F. A. F.; GROES, R. V.; GUEDES, J. M. F. Zoneamento Bioclimático da Ovinocultura no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30(2), p.454-460, 2001.

BARROS, N. N.; VASCONCELOS, V. R.; WANDER, A. E.; ARAÚJO, M. R. A. Eficiência bioeconômica de cordeiros F₁ Dorper x Santa Inês para produção de carne. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.825-831, 2005.

BAUMANN, A. P.; IBEUNJO, C.; GRASSER, W. A.; PARALKAR, V. M. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v.3(1), p.8-16, 2003.

BONAGURIO, S.; PÉREZ, J.R.O.; GARCIA, I.F.F. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com Texel abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.6, p.1981-1991, 2003.

- BORGES, A. S.; ZAPATA, J. F. F.; GARRUTI, D. S. Medições instrumentais e sensoriais de dureza e suculência na carne caprina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p. 891-896, 2006.
- BUCCI, M.; VINAGRE, E. C.; CAMPOS, G. E. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.13, n.1, p. 17-28, 2005.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p.597–601, 2005.
- CANESIN, M. R. **Hipertrofia muscular em raças bovinas de corte**. Revisão de literatura apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.
- CEZAR, M. F.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H.; PIMENTA FILHO, E. C.; TAVARES, G. P.; MEDEIROS, G. X. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.614-620, 2004.
- CIESLAK, D.; BLICHARSKI, T.; KAPELANSKI, W.; PIERZCHALA, M. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Czech Journal of Animal Science**, v.48(2), p.69–75, 2003.
- COCKETT, N. E.; JACKSON, S. P.; SHAY, T.L.; NIELSEN, D.; MOORE, S. S.; STEELE, M. R.; BARENDSE, W.; GREEN, R. D.; GEORGES, M. Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.3019–3023, 1994.
- CORRADELLO, E.F.A. **Criação de ovinos: antiga e contínua atividade lucrativa**. São Paulo: Ícone. 124p, 1988.
- COSTA, R. G.; ALMEIDA, C. C.; PIMENTA FILHO E. C.; HOLANDA JUNIOR E. V.; SANTOS, N. M. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do Estado da Paraíba, Brasil., **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.218, p.195-205, 2008.
- CULAU, P. O. V.; LÓPEZ, J.; RUBENSAM, J. M.; LOPES, R. F. F.; NICOLAIEWSKY, S. A contribuição do gene halotano sobre as características de qualidade da carne suína. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.115-119, 2002.
- DE WAAL, H. O., & COMBRINCK, W. J. The development of the Dorper, its nutrition and a perspective of the grazing ruminant on veld. **Small Ruminant Research**, v.36, p.103–117, 2000.
- DUCKETT, S.K.; KLEIN, T.A.; LECKIE, R.K. et al. Effect of freezing on calpastatin activity and tenderness of callipyge lamb. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1869-1874, 1998.

- FERRAZ, A. L. J. **Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e a maciez da carne.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia como conclusão de curso (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, 2009.
- FORTES, M. R. S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal como conclusão de curso (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FREKING, B. A.; MURPHY, S. K.; WYLIE, A. A. et al. Identification of the Single Base Change Causing the Callipyge Muscle Hypertrophy Phenotype, the Only Known Example of Polar Overdominance in Mammals. **Genome Research**, v.12, p.1496-1506, 2002.
- GARCIA, C. A. Ovinocultura e Caprinocultura. Marília: Universidade de Marília, 22 f., 2004.
- GARCIA, I. F. F.; PEREZ, J. R. O.; BONAGURIO, S.; et al. Desempenho de Cordeiros Santa Inês Puros e Cruzas Santa Inês com Texel, Ile de France e Bergamácia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1591-1603, 2004.
- GARCIA, I. F. F.; PEREZ, J. R. O.; OLIVEIRA, M. V. Características de Carcaça de Cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês Puros, Terminados em Confinamento, com Casca de Café como Parte da Dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.253-260, 2000.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p.503–512, 2002.
- GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; HONGQI L.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system, **Physiological Reviews**, v.83, p.731-801, 2003.
- GOMES, H. F. B.; JORGE, A. M. **Contribuição das proteinases do músculo para a maciez da carne.** Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2007.
- GUIZONI, D. M.; LIMA, A. R. R.; MARTINEZ, P. F.; DAMATTO, R. L.; CEZAR, M. D. M.; BONOMO, C.; OKOSHI, K.; PAI-SILVA, M. D.; OKOSHI, M. P. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n.3, p.266-71, 2010.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 10^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p.986-994, 1996.

- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v.6, p.279–284, 2005.
- KIJAS, J. W.; McCULLOCH, R.; EDWARDS, J. E. H.; ODDY, V. H.; LEE, S. H.; WERF, J. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the *Ovine* GDF8 locus. **BMC Genetics**, v.8, n.80, 2007.
- KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHACKELFORD, S.D. et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v.62, p.345-352, 2002.
- KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; LONERGAN, S. M.; DOUMIT, M. E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3596-3607, 1995.
- LEE, Se-J.; McPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.16, p.9306–9311, 2001.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LÔBO, R. N. B.; LÔBO, A. M. B. O. Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.247-253, 2007.
- LÔBO, A. M. B. O. **Estudo genético de características de importância econômica em uma população multirracial de ovinos de corte: uma abordagem quantitativa e molecular**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produção e Melhoramento Genético Animal como conclusão de curso (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- MADRUGA, M. S.; NARAIN, N.; DUARTE, T. F.; SOUSA, W. H.; GALVÃO, M. S.; CUNHA, M. G. G.; RAMOS, J. L. F. Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRD e mestiços de Bôer, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, 2005.
- McPHERRON, A. C., S. Lee. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.12457, 1997.
- MÉNDEZ, J. H. B. **Segregación de polimorfismos identificados em los genes de μ -calpaina y calpastatina y su relación con el crecimiento corporal y características de La canal de bovinos para carne en Puerto Rico**. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Indústria Pecuária – Universidade de Porto Rico, Mayagüez, 2007.
- MILNE, C. The history of the Dorper sheep. **Small Ruminant Research**, v.36, p.99-102, 2000.

- MOODY, W. G.; TICHENOR, D. A.; KEMP, J. D.; FOX, J. D. Effects of weight, castration and rate of gain on muscle fiber and fat cell diameter in two ovine muscles. **Journal of Animal Science**, v.31, p.676-680, 1970.
- NEIVA, J. N. M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S. H. N. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região litorânea do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.668-678, 2004.
- PARIACOTE, F.; VAN VLECK, L. D.; HUNSLEY, R. E. Genetic and phenotypic parameters for carcass traits of American Shorthorn beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2584-2588, 1998.
- PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 5ª ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008.
- PEREZ, J. R. O.; BRESSAN, M. C.; BRAGAGNOLO, N.; PRADO, O. V.; LEMOS, A. L. S. C.; BONAGURIO, S. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e Bergamácia sobre o perfil de ácidos graxos, colesterol e propriedades químicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.11-18, 2002.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3ª ed., São Paulo: Manole, 2000.
- RONG, D. U.; XIAORONG, A. N.; YONGFU, C. H. E. N.; JIAN, Q. I. N. Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep. **Science in China Series C-Life Sci**, v.50, n.5, p.648-654, 2007.
- ROQUE, A. P.; OSÓRIO, J. C. S.; JARDIM, P. O.; et. al.; Produção de carne em ovinos de cinco genótipos. 6. Desenvolvimento relativo. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p.549-553, 1999.
- RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, 1998.
- SAINZ, R.D. Qualidade de carcaças e de carne de ovinos e caprinos. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Fortaleza, v.33, p.3-14, 1996.
- SANTELLLO, G. A.; MACEDO, F. A. F.; MEXIA, A. A.; SAKAGUTI, E. S.; DIAS, F. J.; PEREIRA, M. F. Características de carcaça e análise do custo de sistemas de produção de cordeiras ½ Dorset Santa Inês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1852-1859, 2006.
- SANTOS, T. A. B.; TOZZETTI, D. S. Avaliação alométrica da carcaça de ovinos: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, n. 8, 2007.

- SILVA SOBRINHO, A. G.; PURCHAS, R. W.; KADIM, I. T.; YAMAMOTO, S. M. Características de Qualidade da Carne de Ovinos de Diferentes Genótipos e Idades ao Abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.1070-1078, 2005
- SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. E.; LEITE, E. R.; LOPES, E. A. A Caprino-ovinocultura de Corte como Alternativa para a Geração de Emprego e Renda. **Sobral: Embrapa Caprinos**, 2004.
- SNOWDER, G. D.; DUCKETT, S. K. Evaluation of the South African Dorper as a terminal sire breed for growth carcass, and palatability characteristics. **Journal Animal Science**, v.81, p.368-375, 2003.
- SORIA, L. A.; CORVA, P. M. Factores genéticos y ambientales que determinan La terneza de la carne bovina. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.12, n.2, p.73-88, 2004.
- SOUSA, W. H. Programa de melhoramento dos caprinos de corte no Nordeste do Brasil e suas perspectivas, **Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2002.
- TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla: II – Determinação genética. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.14, n.1, p.17-23, 2006.
- VOLPELLI, L. A.; FAILLA S.; SEPILERI, A.; et al. Calpain system in vitro activity and miofibril fragmentation index, in fallow deer effects of age and supplementation. **Meat Science**, p.1-4, 2004.
- ZAPATTA, J. F. F.; SEABRA, L. M. J.; NOGUEIRA, C. M.; BARROS, N. Estudo da qualidade da carne ovina do Nordeste Brasileiro: propriedades físicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, 2000.
- ZAPATTA, J. F. F.; BARROS, N.N.; VASCONCELOS, N. M. S. Carcass tissue distribution and composition of the lean meat from kids fed na iron supplemented diet. **Annual International Congress of Meat Science and Technology**, p.40-42, 1995.
- ZHOU, H.; HICKFORD, J. G. H.; GONG, H. Polymorphism of the ovine calpastatin gene, **Molecular and Cellular Probes**, v.21, p.242-244, 2007.

III. OBJETIVO GERAIS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos genes da calpastatina e da miostatina no músculo *Longissimus lumborum* através do uso de PCR em tempo Real e associar a expressão desses genes a qualidade da carne em cordeiros puros e cruzados (Santa Inês (SI), ½ Dorper -Santa Inês (½D-SI) e ½ White Dorper - Santa Inês (½WD-SI)), considerando três espessuras de gordura abdominal para o abate.

IV. EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E MIOSTINA ASSOCIADA COM O DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE EM OVINOS

RESUMO: A calpastatina (*CAST*) é um inibidor endógeno das calpaínas, cuja principal função é modular a ação proteolítica destas enzimas responsáveis pelo enfraquecimento miofibrilar *post-mortem*. O gene da Miostatina (*GDF-8*) age como um regulador negativo do crescimento muscular esquelético. A expressão desses dois genes, bem como a sua interação, afeta a qualidade da carne, especialmente o fenótipo de maciez. O objetivo deste estudo foi avaliar cordeiros das raças Santa Inês, ½ Dorper - Santa Inês e ½ White Dorper - Santa Inês, abatidos com 2,0 mm, 2,5 mm e 3,0 mm de espessura de gordura comparando às características de desempenho de peso de carcaça quente, peso de carcaça fria, rendimento comercial de carcaça, cobertura de gordura, área de olho de lombo, força de cisalhamento, ganho de peso, consumo no período, consumo médio diário, ganho médio diário, conversão alimentar, peso vivo médio e peso vivo ao abate, bem como a expressão dos genes *CAST* e *GDF-8* e as suas interações. Os resultados apresentaram valores significativos ($p < 0,05$) para a maior expressão da Calpastatina e da Miostatina para o grupo genético Santa Inês, sem influência da espessura de gordura. O grupo ½ Dorper - Santa Inês foi o que apresentou menor expressão desses genes quando os animais são abatidos em 2,0 mm e 2,5 mm de espessura de gordura. Foi possível concluir que a raça Santa Inês obteve o fenótipo de menor maciez da carne, e a raça ½ Dorper - Santa Inês teve melhor desempenho para esta característica. Confirmou-se que as maiores expressões dos genes *CAST* e *GDF-8* estão envolvidos com a menor maciez da carne ovina e que a maciez está relacionada ao desenvolvimento e crescimento muscular.

PALAVRAS-CHAVE: cordeiros, desenvolvimento muscular, PCR em tempo real

CALPASTATIN AND MYOSTATIN GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH THE PERFORMANCE AND MEAT QUALITY IN SHEEP

ABSTRACT: Calpastatin (CAST) is an endogenous calpain inhibitor which main function is to modulate proteolysis action of those enzymes responsible for the post-mortem myofibril deterioration. Myostatin gene (GDF-8) acts as a negative regulator of the skeleton muscular growth. These two genes expressions, as well as their interaction, affect meat quality, specially the tenderness phenotype. The objective of this study was to evaluate Santa Ines, ½ Dorper - Santa Inês and ½ White Dorper - Santa Inês lamb meat, slaughtered with 2.0 mm, 2.5 mm and 3.0 mm of fat thickness, comparing the weight performance characteristic of fresh carcass, cold carcass weight, carcass' commercial yield, fat content, ribeye area, shear strength, weight gain, intake in the period, average daily intake, average daily return, feed conversion, average live weight and live weight at slaughter, as well as CAST and GDF-8 gene expression and their interactions. Results showed significant values ($p < 0.05$) for the highest expression of Calpastatin and Myostatin for Santa-Ines genetic group without influencing fat thickness. The ½ Dorper - Santa Ines group showed the lowest expression of this gene when slaughter with 2.0 mm and 2.5 mm of fat thickness. It was possible to conclude that Santa Ines breed obtained the phenotype of lower meat tenderness, and ½ Dorper – Santa Ines breed showed the best performance for this characteristic. It is confirmed that the largest expressions for CAST and GDF-8 genes are involved with the lowest tenderness of lamb meat and that tenderness is related to muscular growth and development.

KEY WORDS: lamb, muscular development, real time PCR.

INTRODUÇÃO

A causa da variabilidade da maciez da carne ovina se relaciona tanto com a constituição genética do animal como com as variações do ambiente. Os processos *ante* e *post-mortem* envolvem fatores que criam um balanço o qual resultam no fenótipo final. Essa característica tem-se atribuído essencialmente à estrutura e à atividade do complexo miofibrilar cujo mecanismo fisiológico envolvido no desenvolvimento muscular e maturação dependem da composição celular e presença de energia e estímulos que são ocasionados pela entrada de cálcio nas células (Moody et al., 1970).

Após a morte do animal a musculatura entra no estado de *rigor mortis* e ativa o complexo de calpaínas, considerado o maior complexo proteolítico citossólico responsável pela maciez da carne *post-mortem* (Powers & Howley, 2007), por degradar os miofilamentos em alguns pontos da molécula, no sarcômero (Andrighetto et al., 2006). Este sistema se compõe de duas proteases cálcio-dependentes, e a inibidora do sistema, a calpastatina (Bucci et al., 2005). As carnes com alta atividade de calpastatina neste período tornam-se menos macias (Rubensam et al., 1998).

O gene da miostatina também é expresso no músculo esquelético, controlando a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares, além de ser importante na adipogênese (Guizoni et al., 2010; Cieslak et al., 2003). A superexpressão desse gene pode levar a uma disfunção das células musculares, como em animais *knockout* que apresentam aumento de três vezes na sua massa muscular (Lee & Mcpherron, 2001). Animais com mutação no GDF-8 têm melhores rendimentos de carcaça, mas são caracterizados por apresentar efeitos negativos para a maciez da carne pela alta atividade da calpastatina (Koochmaraie et al., 1995).

Com isso, objetivou-se estudar a expressão dos da Calpastatina e Miostatina, por PCR em tempo real, associando os resultados ao desempenho produtivo em relação à maciez da carne em cordeiros puros e cruzados (Santa Inês (SI), ½ Dorper -Santa Inês (½D-SI) e ½ White Dorper - Santa Inês (½WD-SI)), considerando três espessuras de gordura abdominal para o abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Composição da Amostra

O experimento de campo foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, de julho a setembro de 2009. Neste período foram utilizados 36 cordeiros machos não castrados, desmamados com 60 dias de idade, sendo doze de cada grupo racial: Santa Inês (SI), $\frac{1}{2}$ Dorper-Santa Inês ($\frac{1}{2}$ D-SI) e $\frac{1}{2}$ White Dorper-Santa Inês ($\frac{1}{2}$ WD-SI).

Os animais foram distribuídos em baias individuais cobertas, com piso ripado suspenso, recebendo água à vontade durante todo o período experimental e alimentados com ração completa peletizada, formulada para ganho de peso diário de 0,300 kg (NRC, 2007). Os tratamentos em número de três foram definidos como espessura de gordura para o abate dos cordeiros, em 2,0; 2,5 e 3,0 mm, avaliados por ultrassonografia, entre a 12^a e 13^a costelas. A dieta foi fornecida uma vez ao dia, à vontade, de maneira a proporcionar sobras diárias de aproximadamente 10%. As avaliações por ultrassonografia e pesagens foram realizadas a cada sete dias. Para obtenção da espessura de gordura subcutânea (EGSU) e profundidade do músculo *Longissimus lumborum* (PMLU) foi utilizado o equipamento da marca HONDA, modelo HS-1500 VET, com transdutor linear multifrequencial de 50 mm de largura, utilizando frequência de 7,5 MHz.

Para a realização das medidas os cordeiros foram imobilizados manualmente, sendo realizada tricotomia nas áreas de medição assim como aplicada mucilagem para o melhor acoplamento da probe à pele. A pressão da cabeça do transdutor foi mantida mínima para evitar a compressão da gordura. Todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo técnico, do lado esquerdo a quatro centímetros da coluna vertebral.

Os cordeiros foram abatidos conforme atingiam a espessura de gordura predeterminada, 2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm, independentemente do peso. Sendo que para o abate, após 18 horas sob jejum de sólidos, os animais foram pesados para determinação do peso vivo ao abate (PVA), em seguida insensibilizados por meio de descarga elétrica de 220 V por 0,8 segundos. As carcaças foram pesadas para obtenção do peso da carcaça quente (PCQ), permanecendo por aproximadamente duas horas em temperatura ambiente, sendo transferidas para uma câmara frigorífica a 4°C por 24

horas, penduradas pelo tendão gastrocnêmico em ganchos apropriados e após este período, foi computado o peso da carcaça fria (PCF).

A partir do corte denominado lombo (no músculo *Longissimus lumborum* entre a última vértebra torácica e a primeira lombar), tomou-se a área transversal em transparência para posterior determinação da área de olho de lombo, através do *software* AUTOCAD®. Na mesma secção, sob o músculo *Longissimus lumborum*, utilizando-se paquímetro, foram feitas quatro medidas: LML - largura máxima do músculo *Longissimus lumborum*; PML - profundidade do músculo *Longissimus lumborum*; EGS - espessura de gordura subcutânea sobre o músculo, continuação do PML; EGSM - espessura de gordura subcutânea máxima no perfil do lombo (continuação da LML).

Os lombos foram então identificados, embalados individualmente em papel alumínio e saco plástico, armazenados em *freezer* a -18°C , sendo posteriormente dissecados para determinação da proporção de músculo: gordura: osso.

O esquema mostrado na figura 1, representa a distribuição dos animais, que foram analisados entre as diferentes espessuras de gordura (2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm) para cada raça estudada, totalizando 36 animais sob avaliação.

Uma fração de 1 g de tecido, músculo *Longissimus lumborum*, foi coletada para extração de RNA total e para análises posteriores. O material foi armazenado a -80°C .

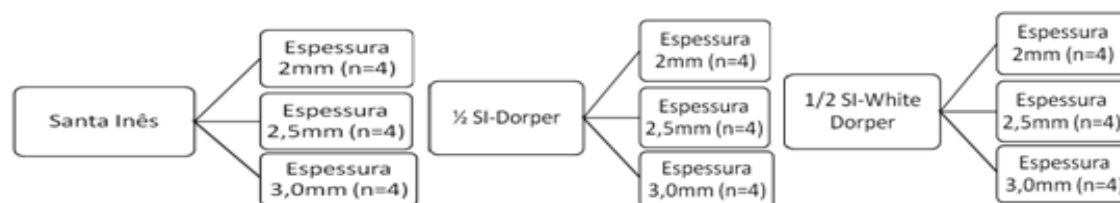


FIGURA 1. Esquema de distribuição dos animais nos fatores avaliados: grupos genéticos e espessuras de gordura (2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm).

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. O procedimento consistiu em triturar o tecido com homogenizador elétrico Polytron até a completa dissociação, logo após adicionar 200 μL de clorofórmio e homogeneizar manualmente por 1 minuto. Centrifugou-se o material por 15 minutos a

12.000 rpms, a 4°C, coletou-se a fase líquida transferindo-a para tubo limpo e adicionando 500 µL de isopropanol em cada tubo. Novamente o material foi homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpms, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado é lavado com 1 mL de etanol 75%. Por último, a amostra foi centrifugada novamente a 12.000 rpms por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, deixando secar o *pellet* por 15 minutos e sendo ressuspensionado em água ultrapura livre de RNase.

A concentração foi mensurada via espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta.

Síntese de cDNA

Para confecção do cDNA foi utilizado o *kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil)* de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e RNA *free* foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)₂₀) e 1 µL de tampão de anelamento (Annealing buffer). A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Foi adicionado em seguida 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa *SuperScript III* e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para a síntese do DNA complementar. A reação foi então incubada por 5 minutos a 85°C e imediatamente colocada sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Inicialmente foram feitas curvas de amplificação com quantidades conhecidas de cDNA para determinar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos e nível de expressão de cada variante. É importante que todas as reações da PCR ocorram de forma similar em condições ótimas. Para testar a eficiência de amplificação de cada um dos genes os resultados da reação (dados pelo valor de Ct) foram tabelados para os cálculos da equação de regressão e do R-quadrado.

PCR em tempo real

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente SYBR GREEN (*SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)*) quando em solução apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do

corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta a formação dos *amplicons*, podendo desta forma ser detectada e quantificada. Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes da calpastatina (CAST) e miostatina (GDF-8) depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 1).

Os valores de Ct dos gene da Calpastatina e Miostatina para cada amostra foi normalizado em relação ao Ct do controle endógeno de cada amostra e os valores de Ct do tecido muscular foram comparados. O controle endógeno utilizado foi o gene do GAPDH, sendo que todas as análises foram realizadas em um volume de 25 μ L e em duplicatas.

Análise estatística

Para realização das análises estatísticas das características quantitativas foi utilizado o procedimento GLM do SAS. Realizou-se a análise de variância considerando o nível de significância de 5%, como a seguir:

$Y_{ij} = \mu + GR_i + EG_j + GR \times EG_{ij} + e_{ij}$, em que:

Y_{ij} = observação referente ao grupo racial i , que foi abatido com a espessura j

μ = constante geral;

GR_i = efeito do grupo racial i ; sendo $i = 1, 2$ e 3 ;

EG_j = efeito da espessura de gordura ao abate j ; sendo $j = 1, 2$ e 3 ;

$GR \times EG_{ij}$ = efeito da interação entre o grupo racial e a espessura de gordura ao abate;

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ij} .

Para análise estatística dos dados provenientes do *real time*, foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados (PROC GENMOD) (SAS Institute INC., 2002) uma vez que os dados de expressão gênica, não apresentaram distribuição normal. Os dados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no modelo foram considerados os efeitos dos grupos genéticos (Santa Inês (SI), $\frac{1}{2}$ Dorper- Santa Inês ($\frac{1}{2}D-SI$) e $\frac{1}{2}$ White Dorper- Santa Inês ($\frac{1}{2}WD-SI$)) e espessura de gordura subcutânea (2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm) e a interação entre estes fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

TABELA 1. Sequência de *primers*, temperatura de anelamento e tamanho de fragmentos para CAST, GDF-8 e GAPDH respectivamente.

Gene	Primer	T ^o C de Anelamento	Fragmento (pb)
Calpastatina	<i>Forward:</i> TGCCCTGGATCAACTTTCTG <i>Reverse:</i> GGTATTTAGGTGGGATGGTGTC	60	149
Miostatina	<i>Forward:</i> ACCCATGAAAGACGGTACAAG <i>Reverse:</i> CAATGCTCTGCCAAATACCAG	60	86
GAPDH	<i>Forward:</i> CCAGGCAGAGAACGGGAAG <i>Reverse:</i> GCCTTCTCCATGGTAGTGAAG	60	78

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, as características de desempenho foram comparadas em relação às raças SI, ½D-SI e ½WD-SI e às espessuras de gordura subcutânea 2,0 mm; 2,5 mm e 3,0 mm.

Na Tabela 2, são apresentados os valores médios \pm desvio padrão das características de peso de carcaça quente (Kg), peso de carcaça fria (Kg), rendimento comercial de carcaça (%), cobertura de gordura, área de olho de lombo (cm²), força de cisalhamento (Kgf/cm²), ganho de peso (Kg), consumo no período (Kg), consumo médio diário (Kg), ganho médio diário (Kg), conversão alimentar, peso vivo médio (Kg) e peso vivo ao abate (Kg).

Entre os grupos genéticos foi possível notar diferenças significativas entre as características de peso de carcaça quente, ganho médio diário e conversão alimentar, enquanto as espessuras de gordura diferiram estatisticamente para peso de carcaça fria, cobertura de gordura, ganho de peso, consumo no período e consumo médio diário. Para as outras características não houve influência dos grupos raciais e espessura de gordura.

TABELA 2. Médias e desvios padrões para as variáveis estudadas para características de desempenho.

Variáveis	Raças			Espessura de Gordura		
	SI	½D-SI	½WD-SI	2,0 mm	2,5 mm	3,0 mm
Peso de carcaça quente (Kg)	11,58 ± 1,79 ^b	13,49 ± 2,44 ^{ab}	13,60 ± 2,46 ^a	11,78 ± 1,75	12,66 ± 2,13	14,23 ± 2,66
Peso de carcaça fria (Kg)	11,27 ± 1,73	13,17 ± 2,43	13,37 ± 2,44	11,53 ± 1,75 ^b	12,34 ± 2,04 ^{ab}	13,94 ± 2,70 ^a
Rendimento comercial de carcaça (%)	46,71 ± 2,27	47,41 ± 2,42	48,82 ± 1,71	47,18 ± 2,84	47,48 ± 1,95	48,28 ± 1,97
Cobertura de gordura ¹	2,42 ± 0,51	2,75 ± 0,58	2,75 ± 0,40	2,37 ± 0,43 ^b	2,58 ± 0,36 ^{ab}	2,96 ± 0,58 ^a
Área de olho de lombo (cm ²)	11,21 ± 3,11	12,86 ± 2,31	13,19 ± 1,63	11,51 ± 1,90	12,14 ± 2,72	13,61 ± 2,56
Força de cisalhamento (Kg)	3,84 ± 1,08	3,33 ± 0,68	3,15 ± 0,66	3,37 ± 0,83	3,37 ± 0,68	3,61 ± 1,09
Ganho de peso (Kg)	8,37 ± 2,56	9,45 ± 3,74	8,66 ± 2,44	6,76 ± 1,74 ^b	8,67 ± 2,10 ^{ab}	11,06 ± 3,10 ^a
Consumo no período (Kg)	33,90 ± 10,57	33,70 ± 15,56	31,89 ± 11,52	24,31 ± 6,18 ^b	33,20 ± 10,74 ^{ab}	42,00 ± 12,83 ^a
Consumo médio diário (Kg)	0,94 ± 0,20	1,08 ± 0,19	1,14 ± 0,25	0,97 ± 0,15 ^b	1,01 ± 0,20 ^{ab}	1,18 ± 0,26 ^a
Ganho médio diário (Kg)	0,24 ± 0,54 ^b	0,31 ± 0,58 ^a	0,32 ± 0,76 ^a	0,28 ± 0,83	0,27 ± 0,48	0,32 ± 0,79
Conversão alimentar ² (Kg/Kg)	4,14 ± 0,16 ^a	3,52 ± 0,45 ^b	3,65 ± 0,67 ^{ab}	3,65 ± 0,75	3,80 ± 0,57	3,80 ± 0,49
Peso vivo médio (Kg)	21,96 ± 2,66	25,11 ± 3,76	25,34 ± 4,13	22,82 ± 2,83	23,79 ± 3,24	25,80 ± 4,75
Peso vivo ao abate (Kg)	24,05 ± 2,95	27,67 ± 4,14	27,32 ± 4,41	24,36 ± 2,69	25,95 ± 3,89	28,73 ± 4,58

Médias (± erro padrão) seguidas de letras diferentes indicam que houve diferença pelo teste de Tukey (P > 0,05).

¹ Cobertura de gordura = 1,00 para muito magra e 5,00 para muito gorda.

² Conversão alimentar = Kg de matéria seca / Kg de ganho de peso.

Os cordeiros que alcançaram maior ganho de peso obtiveram maior espessura de gordura. Isso ocorreu pelo fato das espessuras terem sido estipuladas como tratamentos e assim, para que alcançassem o tamanho desejado foi necessário que os animais permanecessem maior tempo em confinamento. Segundo Warriss (2000) o tecido adiposo é o último a tornar-se maduro, o que leva a um depósito desigual de gordura e torna necessário o aumento do ganho de peso até a maturidade tecidual para posterior deposição de gordura subcutânea.

A análise de ganho de peso para os grupos genéticos mostrou que os cordeiros cruzados $\frac{1}{2}$ White Dorper – Santa Inês ($\frac{1}{2}$ WD-SI) e $\frac{1}{2}$ Dorper – Santa Inês ($\frac{1}{2}$ D-SI) foram superiores aos animais puros Santa Inês (SI). Em condições de campo, os ovinos cruzados com Dorper apresentaram ganho de peso médio de 310 g/dia e ovinos com White Dorper cerca de 320 g/dia, ou seja, 25% a mais do que os ganhos para SI, que obteve média de 240g/dia. Segundo Marais et al. (1991), o crescimento compensatório ocorre pela habilidade dessas raças em manterem um bom estado corporal e terem altos ganhos principalmente por períodos de restrição alimentar. Além disso, quanto maior o peso corporal desses animais maior será sua ingestão alimentar e conseqüentemente maior será a deposição de gordura. Essa afirmação concorda com os resultados encontrados que mostraram maior ganho de peso, respectivamente, para $\frac{1}{2}$ D-SI e $\frac{1}{2}$ WD-SI de 9,45 Kg e 8,66 Kg, consumo médio diário de 1,08 Kg e 1,14 Kg e cobertura de gordura de 2,75 para ambos, enquanto SI obteve 8,37 Kg para ganho de peso, consumo médio de 0,94 Kg/dia e cobertura de gordura de 2,42.

No entanto, para as espessuras de gordura 2,0, 2,5 e 3,0 mm o ganho de peso médio diário não foi significativo, com média de 0,292 Kg/dia, o que mostra que os estágios de maturidade e desenvolvimento próximos, bem como das idades dos cordeiros não foram suficientes para uma diferença no ganho de peso.

Com o aumento do peso vivo ocorre maior consumo diário de matéria seca, porém quando expresso em porcentagem o consumo reduz de forma linear de acordo com o aumento do peso vivo (Cabral et al., 2008). Para as raças que tiveram maior peso vivo médio ($\frac{1}{2}$ WD-SI > $\frac{1}{2}$ D-SI > SI) o consumo diário também foi maior, mas o consumo no período teve decréscimo e o maior valor foi apresentado por SI. Isso é explicado pelo fato de que animais que tenham menor peso corporal terão maior superfície corporal relativa e terão maior necessidade de energia por unidade de peso metabólico, o que levaria ao aumento da conversão alimentar, ou maior necessidade da ingestão do alimento para maior ganho de peso. Isso comprova os resultados significativos

apresentados para os cordeiros $\frac{1}{2}$ D-SI que mostraram melhor conversão alimentar que o grupo SI com melhor aproveitamento do alimento fornecido. As espessuras de gordura não tiveram relação com a conversão alimentar, possivelmente pela proximidade de variação entre elas.

O aumento do peso vivo dos animais também leva ao aumento na proporção de gordura da carcaça (Sainz, 1996), e a espessura de gordura acaba por ser correlacionada com o peso total de gordura da carcaça. Por isso os cordeiros que tiveram o abate com maior espessura de gordura também tiveram maior peso vivo médio e maior peso vivo ao abate. Para espessura de 3,0 mm os animais tiveram peso médio de 25,80 Kg, para 2,5 mm 23,79 Kg e para 2,0 mm 22,82 Kg e peso vivo ao abate de 28,73 Kg, 25,95 Kg e 24,36 Kg, ou seja, quanto mais pesados maior grau de maturidade e maior espessura de gordura subcutânea que animais mais leves e conseqüentemente será também maior o consumo médio diário e o consumo no período, que tiveram respostas significativas para este tratamento.

Os valores médios de peso de carcaça quente foram de 11,58 Kg, 13,49 Kg e 13,60 Kg para SI, $\frac{1}{2}$ D-SI e $\frac{1}{2}$ WD-SI respectivamente, o que levou a porcentagens de rendimento comercial de carcaça de 46,71; 47,41 e 48,82. Os valores de rendimento de carcaça concordam com os encontrados por Marques (2007), que obteve média de 46,33% para carcaça quente em ovinos Santa Inês tratados com diferentes níveis de feno de flor-de-seda na dieta com média de 28,67 Kg ao abate. Lombardi et al. (2010) tiveram resultados similares, com 48,63% para rendimento comercial. Neto et al. (2006) encontraram 42,17% de rendimento de carcaça quente para cruzas de Santa Inês com média de peso vivo ao abate de 28,87 Kg. A variação dos resultados pode estar envolvida com os diferentes tipos raciais e peso ao abate dos animais. Segundo Figueiró & Benavides (1990) ao se elevar o peso do abate há também um acréscimo no rendimento da carcaça.

A perda por resfriamento é relacionada, sobretudo, à diferença de peso pós-resfriamento de carcaça em função da quantidade de cobertura de gordura e perda de umidade. A maciez pode sofrer influência do encurtamento pelo frio (*cold shortening*) devido ao rápido resfriamento da carne. Tal fato levaria à dificuldade das organelas sarcoplasmáticas em reter o cálcio intracelular e que na presença de ATP resultaria numa forte contração, levando à redução de maciez (Dabés, 2001). No entanto, segundo Martins et al. (2000), perdas por resfriamento de em média 2,5% são consideradas normais, o que está de acordo com os nossos resultados que apresentaram média de

perda de peso de 2,24% para os grupos genéticos e 2,23% para as espessuras de gordura. Porém, a característica de espessura de gordura apresentou correlação com o rendimento de carcaça fria, o que concorda com a relação perda de peso por resfriamento com a quantidade de gordura, ou seja, quanto maior o espessamento de gordura menor perda de peso de carcaça fria. As características de peso de carcaça quente e rendimento de carcaça também apresentaram aumento quando a espessura da gordura era maior.

A característica de cobertura de gordura não diferiu ($P>0,05$) para os três grupos genéticos, os quais apresentaram valor médio de 2,65. Tal resultado se deve pelas mesmas espessuras de gordura a que os cordeiros foram abatidos e com mesmo número de repetições, apresentando semelhante deposição de gordura. Segundo Osório (2002), se as carcaças tiverem pesos e quantidade de gordura próximos, quase todas as regiões do corpo terão proporções similares, independentemente da raça. Os cordeiros abatidos com 3,0 mm de espessura de gordura tiveram maior ($P<0,05$) cobertura de gordura, o que é avaliado subjetivamente em suas carcaças. A gordura subcutânea contribui com a proteção da carcaça da desidratação e escurecimento dos músculos, mas se não estiver em excesso aumenta a proporção comestível da carcaça (Müller, 1980). Além disso, para Roça (1993), a gordura intramuscular será importante por impedir a perda de suco muscular durante o cozimento aumentando a retenção de água pela carne e também a maciez.

Segundo Palsson (1939), a espessura da gordura de cobertura tem alta correlação com a gordura subcutânea total da carcaça, sendo que a profundidade do músculo *longissimus dorsi* indica a musculatura total da carcaça e esta é considerada uma medida representativa da quantidade e distribuição das massas musculares e qualidade da mesma. Neste estudo, a área de olho de lombo apresentou maior valor para ½D-SI, de 12,86 cm², e ½WD-SI, 13,19 cm², que para SI, 11,21 cm², assim como, maior tamanho quando do aumento da espessura de gordura, respectivamente de 11,51 cm², 12,14 cm² e 13,61 cm². Esses dois grupos tiveram maior peso vivo médio e maior peso vivo ao abate, assim como aumento do peso para o aumento da espessura de gordura, o que leva a maiores valores para área de olho de lombo. Porém, os resultados não foram significativos.

De acordo com Alves et al. (2005), a maciez da carne pode ser medida objetivamente através de um texturômetro que mede a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal da carne, e através da força utilizada sabe-se o

grau de maciez dado pelo corte da mesma. As amostras submetidas à força de cisalhamento não tiveram resultados significativos para grupo genético e espessura de gordura. No entanto, a raça Santa Inês foi a que apresentou maior valor nesta análise resultando em carne de pior textura, ou seja, mais dura. Este grupo racial apresentou quase 13,3% de kgf/cm² menor em relação aos cruzamentos ½D-SI e cerca de 18% em relação à ½WD-SI. Para espessura de gordura de 3,0 mm a força de cisalhamento foi maior, mas sem diferenças estatísticas (Figura 2).

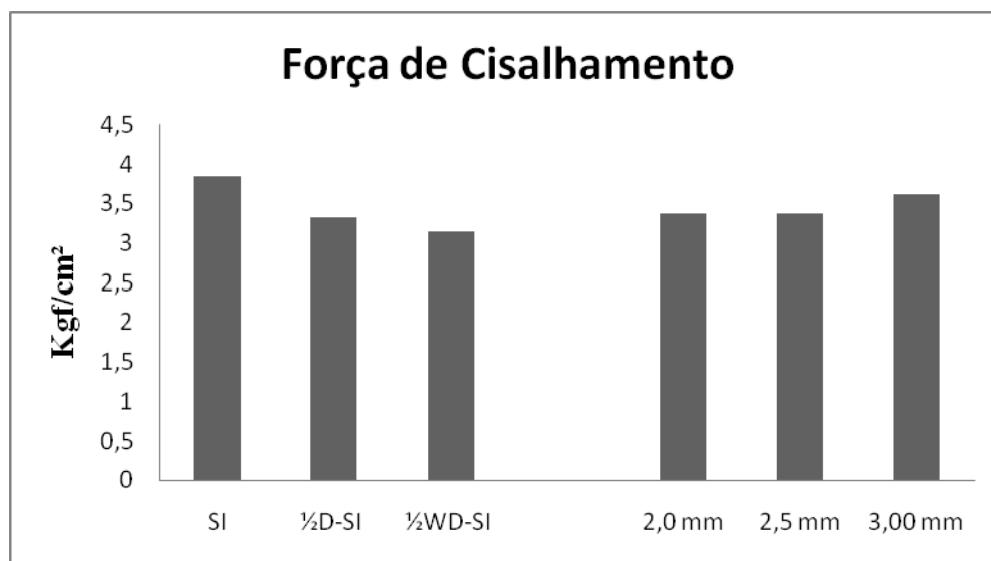


FIGURA 2. Gráfico da força de cisalhamento para os grupos genéticos e espessura de gordura.
SI = Santa Inês, ½D-SI = ½ Dorper - Santa Inês, ½WD-SI = ½ White Dorper – Santa Inês.

Com relação à maciez da carne vários trabalhos têm mostrado diferença entre grupos genéticos. Sá et al. (2004) relataram em seus estudos que cordeiros Santa Inês apresentaram uma carne mais dura e mais seca que cordeiros Hampshire Down.

Quando avaliados pelo teste de médias, apenas três características de desempenho para as raças apresentaram diferenças estatísticas. Percebe-se que para duas destas (peso de carcaça quente e ganho médio diário), a raça Santa Inês mostrou valores menores, sendo que o cruzamento ½ White Dorper – Santa Inês apresentou melhor desempenho. Para conversão alimentar SI teve melhor resultado, cuja média foi de 4,14 kg MS/ Kg GDP, enquanto ½ D-SI teve média de 3,52 kg MS/ Kg GDP e ½ WD-SI alcançou média de 3,65 kg MS/ Kg GDP. A raça Santa Inês só mostrou valores maiores para características de força de cisalhamento (Figura 2), consumo no período e para conversão alimentar. Na figura 3, são apresentados os resultados das características de desempenho em que SI obteve piores médias quando comparada a ½ D-SI e ½ WD-SI.

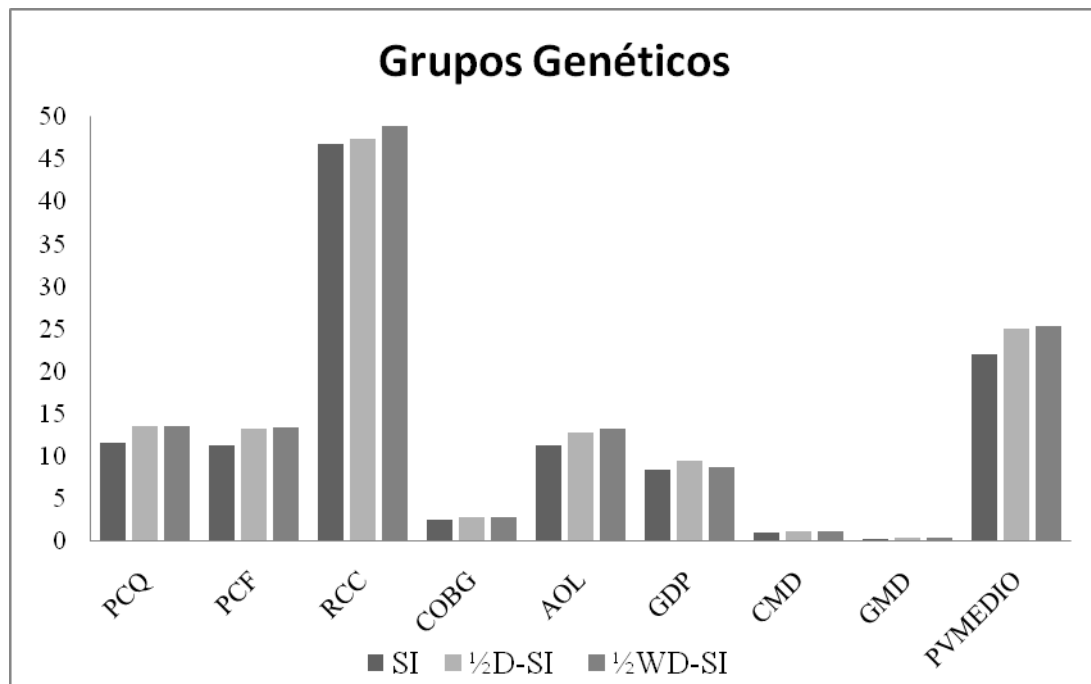


FIGURA 3. Gráfico das características de desempenho para os grupos genéticos, em que SI obteve pior desempenho quando comparada a 1/2D-SI e 1/2WD-SI .
 SI = Santa Inês, 1/2D-SI = 1/2 Dorper - Santa Inês, 1/2WD-SI = 1/2 White Dorper – Santa Inês.
 PCQ = Peso de carcaça quente, PCF = Peso de carcaça fria, RCC = Rendimento comercial de carcaça, COBG = Cobertura de Gordura, AOL = Área de olho de lombo, GDP = Ganho de peso, CMD = Consumo médio diário, GMD = Ganho médio diário, PVMEDIO = Peso vivo médio

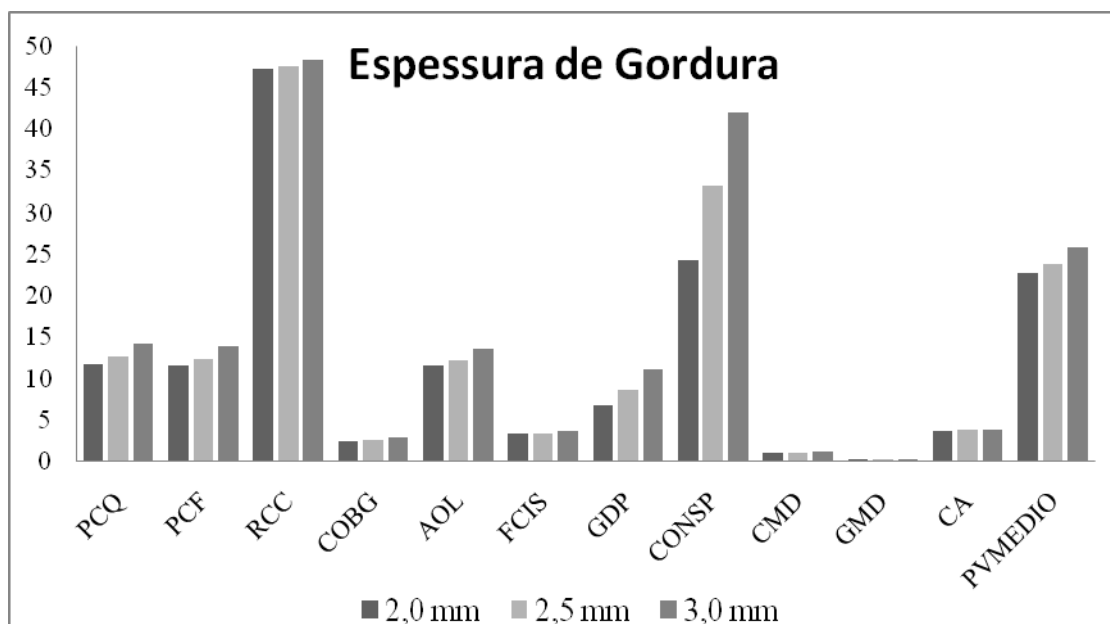


FIGURA 4. Gráfico das características de desempenho para as espessuras de gordura (2,0 mm, 2,5 mm e 3,0 mm), com melhor desempenho para todas as características para 3,0 mm.
 PCQ = Peso de carcaça quente, PCF = Peso de carcaça fria, RCC = Rendimento comercial de carcaça, COBG = Cobertura de Gordura, AOL = Área de olho de lombo, FCIS = Força de cisalhamento GDP = Ganho de peso, CONSP = Consumo no período CMD = Consumo médio diário, GMD = Ganho médio diário, CA = Conversão alimentar, PVMEDIO = Peso vivo médio

Para as diferentes espessuras de gordura, houve significância para cinco das características avaliadas (PCF, COBG, GDP, CMD e CONSP). Na figura 4, é possível verificar que os cordeiros abatidos com 3,0 mm de espessura de gordura apresentaram valores maiores para todas as características de desempenho.

Portanto, observando as características de desempenho, os cordeiros das raças $\frac{1}{2}$ Dorper-Santa Inês e $\frac{1}{2}$ White Dorper-Santa Inês obtiveram melhores resultados que poderão estar relacionados ao fenótipo de maciez da carne.

Atualmente, o mercado consumidor apresenta elevada exigência quanto à qualidade das características físicas da carne, sobretudo as características de carcaça, maciez e principalmente o peso. A qualidade pode então ser avaliada pela determinação de algumas características de desempenho que estejam correlacionadas ao ganho de peso, bem como da deposição de gordura, fatores de maciez e outras características de rendimento comercial (Sá et al., 2004). Além da qualidade da carne ovina também ser caracterizada pela constituição proteica que a compõe, ela deve ser avaliada pela deposição e quantidade de gordura intramuscular, força de cisalhamento, rendimento de carcaça, correlacionados ao ganho de peso e às diferentes raças, considerando a resposta genética de expressão para as proteínas que formam o complexo responsável pelo fenótipo de maciez.

Resultados da Expressão dos genes da Calpastatina e Miostatina

Como parâmetro de comparação para os resultados de expressão dos genes da Calpastatina e Miostatina, utilizou-se neste trabalho o gene de referência, GAPDH, para normalizar a amplificação dos genes-alvo. Na tabela 3, são apresentados os valores de Ct para este gene, que apresentou quantidade similar em todas as amostras, sem diferença estatística entre elas (teste *t* de Student, $\alpha = 0,05$) o que é desejável e necessário para utilização do controle endógeno.

TABELA 3. Expressão do gene GAPDH nas diferentes raças de ovinos e diferentes espessuras de gordura abdominal pela técnica da RT-PCR em tempo real. Média e desvio-padrão dos valores de Ct obtidos nas amostras de tecido muscular para análise de expressão da Calpastatina e da Miostatina.

Raça	Gene alvo		
	Espessura de Gordura	Calpastatina	Miostatina
SI	2,0 mm	26,813 ± 5,036	26,790 ± 5,071
	2,5 mm	20,578 ± 1,750	20,309 ± 1,770
	3,0 mm	22,185 ± 2,243	21,188 ± 2,478
½D-SI	2,0 mm	27,227 ± 4,841	27,228 ± 4,840
	2,5 mm	29,447 ± 7,754	29,103 ± 7,332
	3,0 mm	26,423 ± 6,506	23,104 ± 2,877
½WD-SI	2,0 mm	25,944 ± 6,739	25,822 ± 6,789
	2,5 mm	26,500 ± 5,822	26,435 ± 5,824
	3,0 mm	25,601 ± 7,373	25,332 ± 7,552

Sabendo-se que para o máximo de eficiência de amplificação da reação é necessário que a inclinação da reta da equação de regressão seja de -3,32 e o coeficiente de correlação seja de 1, é possível verificar através dos cálculos das equações de regressão (Tabela 4), que houve boas condições de amplificação, com valores de inclinação entre -3,746 e -3,809 e coeficiente de determinação de no mínimo 0,987.

TABELA 4. Equação de regressão e R-quadrado (R^2) das reações de amplificação de cada gene alvo.

Gene	Equação de regressão	R^2
Calpastatina	$y = -3,809x + 38,561$	$R^2 = 0,9956$
Miostatina	$y = -3,8055x + 38,792$	$R^2 = 0,9870$
GAPDH	$y = -3,7465x + 30,728$	$R^2 = 0,9975$

Além disso, para determinar a especificidade dos produtos da PCR formados foi feita uma curva de dissociação ou *melting*, realizada após a reação de RT-PCR. Essa curva avaliou a dissociação da dupla fita de DNA com o aumento da temperatura, e o produto da reação foi específico para apenas uma única temperatura encontrada. As reações não deveriam apresentar curvas de dissociação com picos de temperatura menores que o produto de PCR específico (formação de dímeros de *primer*) ou com

mais de um pico (formação de produtos não específicos). A curva de dissociação para o controle endógeno GAPDH é apresentada na Figura 5.

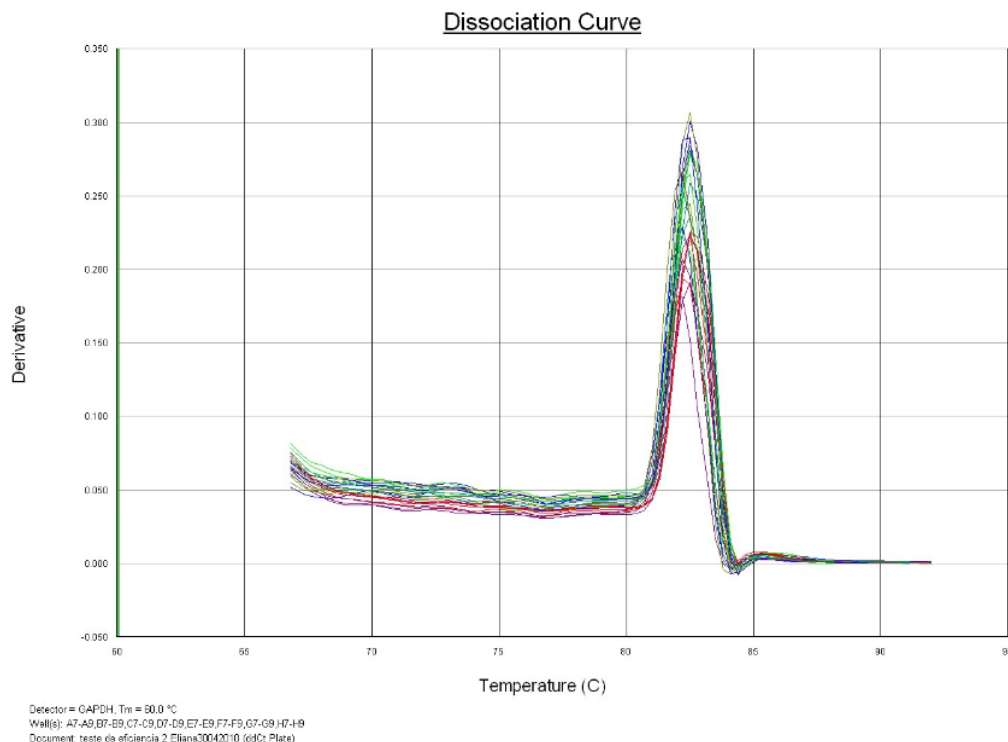


FIGURA 5. Curva de dissociação para o gene GAPDH.

Os resultados do estudo de expressão dos genes da Calpastatina (*CAST*) e Miostatina (*GDF-8*) por RT-PCR estão apresentados na Tabela 5. Os dois genes se mostraram diferencialmente expressos para o fator raça, e para espessura de gordura somente a *CAST* foi significativo.

O gene da Calpastatina está relacionado com o fenótipo de menor maciez da carne, já que esse gene está envolvido com a inibição do complexo das calpaínas, principais enzimas responsáveis pela degradação dos miofilamentos no período *post-mortem* (Koochmaraie, 1998). Este gene apresentou maiores níveis de mRNA para a raça Santa Inês, ou seja, para este grupo a expressão do gene *CAST* foi 39,65% maior e ½ White Dorper - Santa Inês foi 25% maior que para ½ Dorper - Santa Inês. A resposta à expressão considera que para a raça Santa Inês a maior produção da enzima levaria à maior inibição das calpaínas e promoveria menor maciez da carne.

TABELA 5. Médias e desvios padrões dos valores de expressão do mRNA (em unidades arbitrárias) a partir das análises de RT-PCR

Raças	Variáveis	
	CAST	GDF-8
Santa Inês	5,53 ± 0,84 ^a	8,73 ± 1,60 ^a
½ Dorper-Santa Inês	3,96 ± 1,65 ^{ab}	6,41 ± 2,11 ^b
½ White Dorper-Santa Inês	4,95 ± 1,25 ^b	7,29 ± 1,11 ^{ab}
Espessura de Gordura		
2 mm	4,23 ± 1,66 ^b	6,82 ± 1,58
2,5 mm	4,81 ± 1,49 ^{ab}	7,25 ± 2,25
3 mm	5,41 ± 0,78 ^a	8,36 ± 1,50

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas estatisticamente.
 CAST = Calpastatina, GDF-8 = Miostatina

Ao contrário, os outros dois grupos tiveram menor expressão do gene, e assim uma diminuição na produção de calpastatina e consequentemente, maior maciez. Apesar da força de cisalhamento não ter sido significativa, esta pode ser associada com a expressão da calpastatina. Alguns autores consideram a maior atividade da calpastatina na força de cisalhamento relacionada à menor maciez no músculo (Wheeler et al., 1990; Shackelford et al., 1991). Para a raça SI a força de cisalhamento foi maior, bem como a expressão de mRNA desse gene, concordando com o fenótipo de menor maciez. Para as espessuras de gordura é possível observar um aumento da expressão do gene com o aumento da espessura. Para 2,0 mm de gordura, a expressão do gene foi, em valor arbitrário de mRNA, de 4,23, para 2,5 mm de 4,81 e para 3,0 mm de 5,41, considerando que o fenótipo da carne para maior espessura de gordura seja mais dura. Segundo Osório et al. (2009), a gordura subcutânea influi sobre a maciez provocando a redução da velocidade da queda de temperatura e do pH, durante o esfriamento pós-morte, o que diminuiria a possibilidade do encurtamento pelo frio, mas os músculos podem apresentar diferenças na capacidade de retenção de água, o que poderia explicar as diferenças na expressão para a característica de espessura de gordura.

Analisando a interação entre os grupos genéticos e as espessuras de gordura (Tabela 6), o gene da Calpastatina foi mais expresso para cordeiros da raça SI quando abatidos com 2,5 mm de espessura de gordura, considerando-o com a carne de menor maciez, apesar de não haver diferenças estatísticas entre as espessuras para este grupo. O segundo grupo a considerar o fenótipo de menor maciez da carne é para o grupo ½D-

SI para 3,0 mm de espessura de gordura, avaliado com diferença estatística significativa. A expressão do mRNA de CAST foi menor para ½D-SI entre as espessuras de gordura de 2,0 e 2,5 mm, concordando com a relação dos resultados para força de cisalhamento que foi menor para este grupo. Isso sugere que ½D-SI apresentam a carne mais macia que os outros grupos avaliados.

TABELA 6. Desdobramento da interação para o gene CAST, a partir dos valores de expressão do mRNA (em unidades arbitrárias).

Raças	Espessura de Gordura			Geral
	2,0 mm	2,5 mm	3,0 mm	
SI	5,51 ^{aA}	5,95 ^{aA}	5,14 ^{aA}	5,53
½D-SI	2,62 ^{bB}	3,42 ^{bB}	5,85 ^{aA}	4,16
½WD-SI	4,56 ^{aA}	5,06 ^{aAB}	5,23 ^{aA}	4,95
Geral	4,23	5,01	5,41	

*Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas estatisticamente.

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas estatisticamente.

O gene da Miostatina também é responsável por influenciar o fenótipo de maciez. Além de ser um gene que controla a proliferação dos mioblastos e formação das fibras musculares, sua superexpressão leva a hiperplasia muscular que é altamente relacionada com a expressão da Calpastatina. McPherron & Lee (1997) sugeriram que a miostatina regula negativamente o crescimento muscular esquelético, limitando o tamanho do músculo. Na tabela 5, são mostrados os valores da expressão do mRNA desse gene, em unidades arbitrárias. O padrão de expressão é apresentado da mesma maneira que para CAST (Figura 6), confirmando a correlação entre os genes, como apresentado na tabela 7, através do estudo de correlação entre as características.

A superexpressão do GDF-8 leva à maior porcentagem de deposição de gordura, por sua ação direta na adipogênese (Guizoni et al., 2010), que é apresentado, em valores arbitrários de mRNA, os seguintes resultados de 8,36 para 3,0 mm de espessura de gordura, 7,25 para 2,5 mm e 6,82 para 2,0 mm. Para a característica de espessura de gordura os resultados caracterizam a maior expressão da Miostatina para 3,0 mm, porém, não foi significativo.

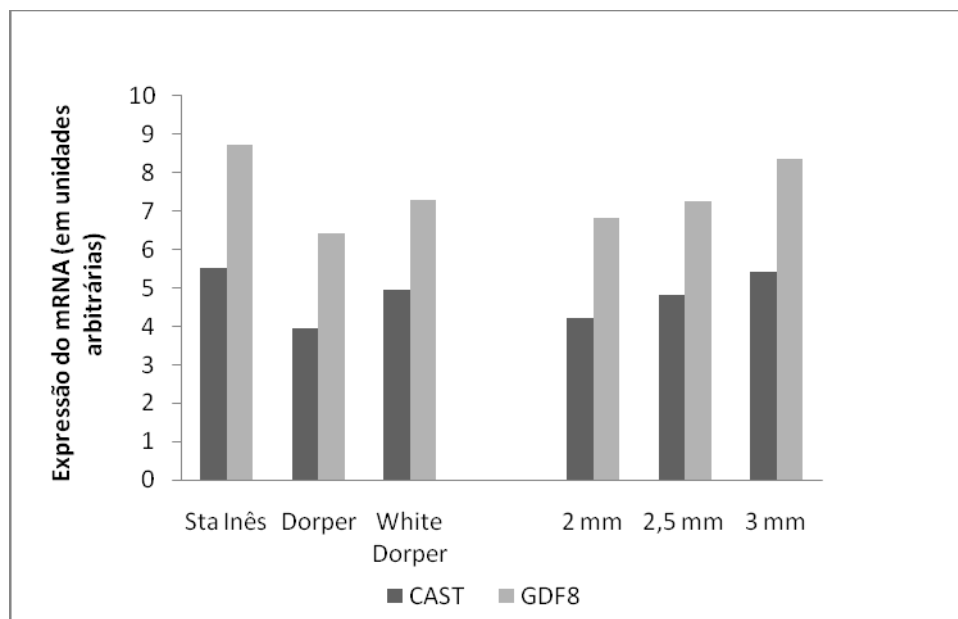


FIGURA 6. Gráfico dos valores da expressão do mRNA (em unidades arbitrárias) obtidos para os genes CAST e GDF-8 para os grupos genéticos e espessuras de gordura. CAST = Calpastatina; GDF-8 = Miostatina.

As análises de correlações entre os parâmetros estudados estão apresentadas na Tabela 7. Foram avaliadas as correlações de Pearson entre as características de desempenho e a expressão dos genes.

Nos resultados apresentados, ficam evidentes as correlações positivas entre as características de desempenho, as quais são relacionadas ao desenvolvimento e crescimento muscular. É possível observar a interação dos valores para peso vivo médio e peso de carcaça quente, peso de carcaça fria, rendimento de carcaça, área de olho de lombo, consumo médio diário e ganho médio diário, além das outras correlações entre as características.

O maior peso vivo médio dos animais é altamente e positivamente correlacionado com o consumo médio diário e ganho médio diário, o que concorda com Marais et al. (1991) que afirmam que quanto maior o peso corporal dos animais, conseqüentemente maior será sua ingestão alimentar e também a deposição de gordura, como apresentado na tabela 7, em que os resultados apresentaram correlação com nível de significância menor que 0,01%. Além disso, a maior ingestão alimentar, ou o consumo alimentar, que leva ao maior ganho de peso diário e ao maior peso vivo médio, sugere que a carne seja mais maciez.

Para peso vivo médio, consumo no período e ganho médio diário os resultados foram negativamente correlacionado com o gene da Miostatina, a qual é fortemente correlacionada com a Calpastatina. Tal fato sugere a existência de uma relação entre o crescimento muscular e maciez da carne. Ou seja, melhores correlações entre as características de desempenho, como peso vivo médio, consumo alimentar e ganho de peso, sugerem que o desenvolvimento do animal seja melhor, e por ser opostamente correlacionados aos genes responsáveis pela rigidez da carne, essas características levariam à maior maciez.

Therkildsen et al. (2002) sugerem que a taxa de crescimento pode afetar a maciez da carne através do aumento da fragmentação miofibrilar no período *postmortem*, sendo que para maiores níveis de desenvolvimento muscular haverá uma tendência em produzir carne mais macia.

Um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a maciez da carne é a força de cisalhamento que, apesar de não ter apresentado valores significativos estatisticamente, obteve resultados próximos ao nível de 5% sugerindo uma possível correlação positiva aos genes da Calpastatina e da Miostatina.

TABELA 7. Valores de correlações e nível de significância para as variáveis estudadas.

	CAST	GDF8	PCQ	PCF	RCC	COBG	AOL	FCIS	GDP	CONSP	CMD	GMD	CA	PVMEDIO	PVA
CAST	1,0000	0,7797 < 0,0001	0,0545 0,3761	0,0645 0,3544	0,1931 0,1296	0,1024 0,2762	0,0367 0,4159	0,2699 0,0613	0,1767 0,1512	0,1718 0,1582	-0,0557 0,3735	-0,1001 0,2806	0,0715 0,3394	-0,0269 0,4381	0,0127 0,4708
GDF-8		1,0000	-0,1588 0,1774	-0,1545 0,1842	0,0379 0,4131	-0,1285 0,2285	-0,1834 0,1422	0,2381 0,0875	0,1218 0,2396	0,1380 0,2111	-0,2936 0,0411	-0,2781 0,0500	0,0679 0,3470	-0,2777 0,0500	-0,2117 0,1076
PCQ			1,0000	0,9973 < 0,0001	0,7121 < 0,0001	0,7224 < 0,0001	0,7972 < 0,0001	0,0798 0,3268	0,5182 0,0006	0,4628 0,0022	0,8702 < 0,0001	0,7435 < 0,0001	-0,0662 0,3506	0,9347 < 0,0001	0,9779 < 0,0001
PCF				1,0000	0,7195 < 0,0001	0,7289 < 0,0001	0,7973 < 0,0001	0,0859 0,3145	0,5023 0,0009	0,4463 0,0032	0,8674 < 0,0001	0,7484 < 0,0001	-0,0727 0,3368	0,9395 < 0,0001	0,9786 < 0,0001
RCC					1,0000	0,5579 0,0002	0,6493 < 0,0001	0,0297 0,4337	0,2399 0,0794	0,1023 0,2763	0,4402 0,0036	0,5873 0,0001	-0,3992 0,0079	0,5792 0,0001	0,5654 0,0002
COBG						1,0000	0,6934 < 0,0001	0,1730 0,1640	0,5047 0,0008	0,4586 0,0025	0,5653 0,0002	0,4761 0,0017	-0,0070 0,4839	0,6399 < 0,0001	0,7029 < 0,0001
AOL							1,0000	0,0768 0,3331	0,6131 < 0,0001	0,5111 0,0007	0,6714 < 0,0001	0,6337 < 0,0001	-0,1492 0,1925	0,6524 < 0,0001	0,7663 < 0,0001
FCIS								1,0000	-0,0377 0,4161	0,0216 0,4518	0,0363 0,4192	-0,0991 0,2885	0,2154 0,1106	0,0695 0,3481	0,0764 0,3339
GDP									1,0000	0,9213 < 0,0001	0,5032 0,0009	0,3545 0,0169	0,0408 0,4067	0,2619 0,0614	0,5268 0,0005
CONSP										1,0000	0,4792 0,0016	0,1081 0,2652	0,4130 0,0062	0,2468 0,0733	0,4994 0,0010
CMD											1,0000	0,7816 < 0,0001	0,0520 0,3816	0,8760 < 0,0001	0,9064 < 0,0001
GMD												1,0000	-0,5525 0,0002	0,7186 < 0,0001	0,7201 < 0,0001
CA													1,0000	-0,0103 0,4762	0,0230 0,4469
PV MEDIO														1,0000	0,9504 < 0,0001
PVA															1,0000

CAST = Calpastatina, GDF-8 = Miostatina, PCQ = Peso de Carcaça Quente, PCF = Peso de Carcaça Fria, RCC = Rendimento Comercial de Carcaça, COBG = Cobertura de Gordura, AOL = Área de Olho de Lombo, FCIS = Força de Cisalhamento, GDP = Ganho de Peso, CONSP = Consumo no Período, CMD = Consumo Médio Diário, GMD = Ganho Médio Diário, CA = Conversão Alimentar, PVMEDIO = Peso Vivo Médio, PVA = Peso Vivo ao Abate.
Valores de significância $p < 0,05$.

CONCLUSÃO

A raça Santa Inês apresentou o menor desenvolvimento muscular, caracterizado pelos menores resultados de desempenho de carcaça, maior resultado para força de cisalhamento, associado com os resultados de maior expressão do mRNA dos genes da calpastatina e miostatina, a qual levou ao fenótipo de menor maciez da carne, independentemente da espessura de gordura.

A menor expressão dos genes da Calpastatina e da Miostatina para o grupo racial $\frac{1}{2}$ Dorper - Santa Inês mostra que este grupo apresentou melhor desempenho para o fenótipo de maciez da carne, quando abatido com 2,0 ou 2,5 mm de espessura de gordura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

www.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em 01 de abril de 2010

- ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.135-149, 2005.
- ANDRIGHETTO, D. D.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O.; SARTORI, D. R.; RODRIGUES, E.; BIANCHINI, W. Maturação da carne bovina. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.7, n.6, 2006.
- BUCCI, M.; VINAGRE, E. C.; CAMPOS, G. E. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.13, n.1, p. 17-28, 2005.
- CABRAL, L. S.; SANTOS, J. W.; ZERVOUDAKIS, J. T.; ABREU, J. G.; SOUZA, A. L.; RODRIGUES, R. C. Consumo e eficiência alimentar em cordeiros confinados. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p.703-714, 2008.
- CIESLAK, D.; BLICHARSKI, T.; KAPELANSKI, W.; PIERZCHALA, M. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Czech Journal of Animal Science**, v.48(2), p.69–75, 2003.
- DABÉS, A.C. Propriedades da carne fresca. **Revista Nacional da Carne**, v.25, n.288, p.32-40, 2001.
- FIGUEIRÓ, P.R.P., BENAVIDES, M.V. Produção de carne ovina. In: **Caprinocultura e ovinocultura**. Piracicaba : Sociedade Brasileira de Zootecnia/FEALQ, p. 15-31, 1990.
- GUIZONI, D. M.; LIMA, A. R. R.; MARTINEZ, P. F.; DAMATTO, R. L.; CEZAR, M. D. M.; BONOMO, C.; OKOSHI, K.; PAI-SILVA, M. D.; OKOSHI, M. P. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n.3, p.266-71, 2010.
- KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; LONERGAN, S. M.; DOUMIT, M. E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3596-3607, 1995.
- LEE, Se-J.; McPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.16, p.9306–9311, 2001.
- LOMBARDI, L.; JOBIM, C. C.; BUMBIERIS JUNIOR, V. H.; CALIXTO JUNIOR, M.; MACEDO, F. A. F. Características da carcaça de cordeiros terminados em confinamento recebendo silagem de grãos de milho puro ou com adição de girassol ou ureia. *Acta Scientiarum*, **Animal Sciences**, v.32, n.3, p.263-269, 2010.

- MARAIS, P. G. VAN DER MERWE, H. J.; DU TOIT, J. E. J. The efficiency of protein and fat deposition during growth in Dorper sheep. **South African Tydskrif Veek**, v.21, n.2, 1991.
- MARQUES, A. V. M. S.; COSTA, R. G.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; LIRA FILHO, G. E. Rendimento, composição tecidual e musculabilidade da carcaça de cordeiros Santa Inês alimentados com diferentes níveis de feno de flor-de-seda na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.610-617, 2007.
- MARTINS, R.C.; OLIVEIRA, N.; OSORIO, J.C.S. et al. **Peso vivo ao abate como indicador do peso e das características quantitativas e qualitativas das carcaças em ovinos jovens da raça Ideal**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 29p, 2000.
- McPHERRON, A. C., S. Lee. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.12457, 1997.
- MOODY, W. G.; TICHENOR, D. A.; KEMP, J. D.; FOX, J. D. Effects of weight, castration and rate of gain on muscle fiber and fat cell diameter in two ovine muscles. **Journal of Animal Science**, v.31, p.676-680, 1970.
- MÜLLER, L. *Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos*. Santa Maria: UFSM, 1980.
- National Research Council - NRC. **Nutrients requeriments of small ruminants**. 1. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 362 p., 2007.
- NETO, E. P.; BESERRA, F. J.; SANTOS FILHO, J. M.; RONDINA, D., COSTA, M. M.; SELAIVE-VILLAROEEL, A. Características quantitativas e qualitativas de carcaças de ovinos Dorper x sem raça definida e Santa Inês x sem raça definida abatidos aos 12 ou 14 meses de idade. **Ciência Animal**, v.16, n.1, p7-15, 2006.
- OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.292-300, 2009.
- OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.; OSÓRIO, M.T.M. et al. Produção de carne em cordeiros cruza Border Leicester com ovelhas Corriedale e Ideal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1469-1480, 2002.
- PALSSON, H. Meat qualities in sheep with special reference to Scottish breed and sample joint as indice of quality and composition. **Journal of Agricultural Science**, v.29, p.544-625, 1939.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3ª ed., São Paulo: Manole, 2000.

- ROÇA, R. O. Alternativas de aproveitamento da carne ovina. **Revista Nacional da Carne**, v.18, n.201, p.53-60, 1993.
- RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, 1998.
- SÁ, J. L.; SIQUEIRA, E. R.; ROÇA, R. O.; SÁ, C. O.; FERNANDES, S. Características sensoriais da carcaça de cordeiros Hampshire Down e Santa Inês submetidos a dois fotoperíodos na fase de terminação em confinamento. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Campo Grande, 2004.
- SAINZ, R.D. Qualidade de carcaças e de carne de ovinos e caprinos. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Fortaleza, v.33, p.3-14, 1996.
- SAS Institute. User's guide: statistics, version 9.1. Cary. SAS Institute, 2002.
- SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, n.1, p.171-177, 1991.
- THERKILDSEN, M. et al. Effect of growth rate on tenderness development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, v.74, p.253-264, 2002.
- WARRISS, P. D. **Meat Science**: An introductory text. Weybridge: CABI Publishing, 2000.
- WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROOS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, n.12, p.4206-4220, 1990.