

ALESSANDRA ALVES DA SILVA

**ESTUDO MIOGÊNICO DE PROGÊNIES PROVENIENTES DE MATRIZES SUÍNAS:
EFEITO DO CLORIDRATO DE RACTOPAMINA E DO GRUPO GENÉTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S586e
2015
Silva, Alessandra Alves da, 1991-
Estudo miogênico de progênies provenientes de matrizes
suínas : efeito do cloridrato de ractopamina e do grupo genético /
Alessandra Alves da Silva. – Viçosa, MG, 2015.
x, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.30-40.

1. Suíno - Alimentação e ração. 2. Anatomia veterinária.
3. Fisiologia veterinária. 4. Músculos - Desenvolvimento.
5. Carne - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

ALESSANDRA ALVES DA SILVA

**ESTUDO MIOGÊNICO DE PROGÊNIES PROVENIENTES DE MATRIZES SUÍNAS:
EFEITO DO CLORIDRATO DE RACTOPAMINA E DO GRUPO GENÉTICO**

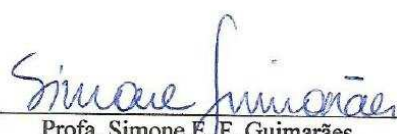
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 28 de Julho de 2015.


Prof. Márvio Lobão Teixeira de Abreu


Prof. Alyssen Saraiva
(Coorientador)


Prof. Márcio de Souza Duarte
(Coorientador)


Prof. Simone E.F. Guimarães
(Orientadora)

Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir
uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita
que as outras, enquanto o imenso oceano da
verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Ao grande companheiro e minha família, Delvan.

Aos grandes pais Joana e Adail. Aos irmãos, Rosimary,
Adail Júnior, e especialmente ao meu irmão Alexandre (in memoriam),
com todo o carinho!!!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus sempre presente.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela oportunidade de realização da Pós Graduação em Zootecnia!

À orientadora Simone E.F. Guimarães. Por me receber desde o estágio supervisionado de conclusão de curso de graduação e pela orientação durante o mestrado!

Ao Coorientador Alysson Saraiva pela orientação, apoio e sugestões na execução deste trabalho!

Ao Coorientador Márcio S. Duarte por todo ensinamento, paciência e apoio. Com certeza aprendi muito!

Ao Professor Fabyano Fonseca e Silva pelos ensinamentos em estatística!

À granja de melhoramento de suínos –GMS por fornecer a estrutura para condução do experimento!

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal – Labtec do DZO por fornecer a estrutura para condução das análises!

Ao Laboratório de Qualidade de Carne do DZO por fornecer a estrutura para condução das análises!

Ao Laboratório de Histologia da Biologia Geral por fornecer a estrutura para condução de análises histológicas!

Ao Seu Zé, Edinaldo, Leandro e a todos funcionários da GMS que ajudaram na condução dos animais!

Aos estagiários Susana, Amon, Leandro, Layla e Lethícia e toda equipe GMS por todo auxílio na condução do experimento!

Ao amigos, Walmir, André, Margareth, Vanessa, Karine, Darlene, Renata, Evelyze, Elcer, Regina, Leticia, Ivan e a turma toda do labtec, pela amizade, pelos auxílios nas análises e sugestões!

Aos membros da banca avaliadora Prof. Dr. Alysson Saraiva, Prof. Dr. Márvio L.T. Abreu e Prof. Dr. Márcio S. Duarte pela avaliação e conselhos!

Aos professores Paulo Sávio e Moysés Nascimento pela atenção e disponibilidade em serem suplentes na banca de dissertação!

À minha grande família, mãe Joana Alves da Silva, pai Adail Januário da Silva! A eles serei eternamente grata!

Aos irmãos Alexandre (in memoriam), Adail Júnior, Rosimary e ao cunhado Mário. Pelo constante apoio e pelas grandes emoções nessa família!!! Aos meus queridos sobrinhos Victor e Janete pela alegria que trazem a família!!!

Ao Delvan Alves da Silva, minha família. Por antes de tudo, uma grande amizade, pelo grande apoio e estar sempre ao meu lado!

À Dona Geralda, Seu David, Denival, Dalva e João Paulo. Pelo constante apoio, preocupação e amizade! Os admiro muito!

À Denise, Patricia e Nyanne. Pela grande amizade e apoio mesmo a distância e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos!

Aos amigos Giovani e Rosa pela amizade, preocupação e sempre apoiarem!

Aos amigos do Capril, Nadson, Vinicius, Hugo, Hinayah, Sirlene, Lais, William, Bárbara, Naila, Otávio e a toda equipe do Capril, pela amizade e oportunidade de experiência!

Ao GenMelhor, pela oportunidade de experiência!

Ao Professor Cláudio Vieira de Araújo, pelos ensinamentos, conselhos e amizade!

Ao corpo docente de Pós graduação em Zootecnia que muito contribuíram para minha formação!

BIOGRAFIA

Alessandra Alves da Silva, filha de Adail Januário da Silva e Joana Alves da Silva, nasceu em 18 de fevereiro de 1991, na cidade de Tupã, São Paulo.

Em março de 2009 ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, Mato Grosso, com conclusão em julho de 2013.

Em agosto de 2013 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com linha de pesquisa em Biotecnologia Animal e submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação para obtenção do título de Magister Scientiae em Zootecnia em julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
Raça Piau.....	3
Efeitos da placentação em suínos	3
Miogênese	4
Crescimento pós natal	6
Cloridrato de Ractopamina	7
MATERIAL E MÉTODOS	11
Animais, desenho experimental, dieta e coleta de material biológico	11
Análise histológica.....	13
Análise de qPCR.....	14
Avaliação de parâmetros qualitativos da carne	15
Força de Cisalhamento.....	16
Quantificação do teor de gordura intramuscular.....	16
Análise Estatística.....	16
RESULTADOS	18
Resultados para fase Pré natal.....	18
Resultados para fase Pós natal.....	19
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	41

RESUMO

SILVA, Alessandra Alves da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Estudo miogênico de progênies provenientes de matrizes suínas: efeito do cloridrato de Ractopamina e do grupo genético.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientadores: Alysson Saraiva e Márcio de Souza Duarte.

Objetivou-se com este estudo estudar desenvolvimento muscular fetal e a qualidade da carne da progênie de grupos genéticos distintos (Piau e linhagem Comercial) com inclusão de cloridrato de ractopamina (RAC) fornecido na dieta das matrizes suínas, no período de 30-60 dias de gestação. Foram utilizadas 10 matrizes suínas de 1ª e 2ª ordem de partos, (quatro matrizes da raça local Piau e seis matrizes da linhagem comercial) (Large White x Pietrain). As matrizes foram identificadas por meio de brincos e receberam manejos alimentares, reprodutivos e sanitários semelhantes. Aos 60 dias de gestação foram abatidas 4 matrizes (duas comerciais e duas Piau) e coletados 6 fetos (3 machos e 3 fêmeas) por matriz (n=24 fetos). Foram retiradas amostras do músculo Longissimus dorsi (LD) para análise histológica e perfil de expressão gênica. As demais matrizes foram acompanhadas até o momento do parto, sendo suas progênies monitoradas até atingirem 140 dias de idade, e então abatidos 12 animais Piau, (seis machos e seis fêmeas) e 24 animais de linhagem comercial (12 machos e 12 fêmeas) foram retiradas amostras do músculo LD para análise histológica e perfil de expressão gênica. Após 24 horas de resfriamento das carcaças, foram coletadas amostras de carne da região das três últimas costelas para avaliação de parâmetros qualitativos da carne. Verificou-se para contagem de números de fibras musculares secundárias que fetos fêmeas da raça Piau apresentaram acréscimo ($P < 0,001$) em média de 40% no número de fibras musculares secundárias em relação aos machos. Para os resultados de expressão gênica para o gene beta 2 Adrenergic Receptor (ADRB2) verificou-se diferença ($P = 0,008$) entre grupo genético, sendo que fetos da raça Piau expressaram 4,35 vezes a mais o gene em relação a fetos da linhagem comercial. No entanto, para o gene (MYHC IIA), observou-se que animais da linhagem comercial expressaram 1,83 vezes mais ($P = 0,04$) o gene em relação animais da raça Piau. Não se verificou diferenças nos parâmetros qualitativos de carne (extrato etéreo e força de cisalhamento). A inclusão de RAC na dieta de fêmeas suínas gestantes durante o período de 30-60 dias de gestação promoveu respostas fenotípicas

diferentes entre animais não melhorados (Piau) e animais melhorados (Comercial) quando contrastados a literatura.

ABSTRACT

SILVA, Alessandra Alves da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2015. **Myogenic study of progeny from sows: effect of Ractopamine hydrochloride and genetic group.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Advisers: Alysson Saraiva and Márcio de Souza Duarte.

We aimed this study is fetal muscle development and progeny meat quality distinct genetic groups (Piau and Commercial line) with inclusion of ractopamine hydrochloride (RAC) supplied in the diet of sows in the period of 30-60 days gestation. 10 sows were used first and second order births (four arrays of local breed Piau-six arrays of commercial line) (Large White x Pietrain). The arrays were marked with earrings and received food, reproductive health and similar managements. After 60 days of gestation were slaughtered 4 matrices (two and two commercial Piau) and collected six fetuses (3 males and 3 females) per array ($n = 24$ fetuses). Samples were taken from the Longissimus dorsi (LD) for histological analysis and gene expression profile. The other mothers were followed up until the moment of birth, and their progeny monitored until they reach 140 days of age, and then slaughtered 12 Piau animals (six males and six females) and 24 animals of commercial line (12 males and 12 females) were LD muscle samples taken for histology and gene expression profile. After 24 hours of cooling carcasses, meat samples were collected from the region of the last three ribs for qualitative parameters of the meat. It was found for counting muscle fibers secondary numbers of female fetuses Piau race showed an increase ($P < 0.001$) average of 40% in the number of secondary muscle fibers compared to males. For the results of gene expression for gene beta 2 Adrenergic Receptor (ADRB2) there was difference ($P = 0.008$) between genetic group, and race fetuses Piau expressed 4.35 times more the gene regarding the lineage of fetuses commercial. However, for the gene (MyHC IIA), it was found that animals of commercial strain expressed 1.83 times more ($P = 0.04$) compared the gene Piau breed animals. There were no differences in meat quality parameters (lipids and shear force). The inclusion of RAC in the diet of pregnant sows during the 30-60 days of gestation promoted different phenotypic responses between unimproved animals (Piau) and improved animal (Commercial) when contrasted literature.

INTRODUÇÃO

Raças de suínos melhoradas geneticamente (linhagem Comercial) e não melhoradas (Piau) têm diferença genética significativa na taxa de crescimento muscular e de gordura. Animais de linhagem comercial de forma geral, são caracterizados pela alta porcentagem de carne magra, crescimento rápido e elevado peso corporal (Newcom et al., 2004; Li et al., 2003). Em contraste, a raça Piau é caracterizada pelo crescimento muscular lento, baixo peso corporal e altos índices de gordura subcutânea (Guimarães e Lopes, 2001). As diferenças nos termos de crescimento muscular entre animais de linhagem Comercial e Piau caracterizam um bom modelo para estudar o mecanismo subjacente desenvolvimento muscular e diferenças fenotípicas.

Em tecido muscular esquelético de suínos as fibras primárias são formadas a partir de 35 dias de gestação e sua quantidade pode aumentar até os 60 dias de gestação. Por outro lado, a formação das fibras secundárias ocorre a partir de do 54 dias de gestação finalizando o processo de hiperplasia próximo aos 90 dias de gestação (Wigmore & Stichland, 1983).

No período compreendido entre 50 e 80 dias de gestação as células do tecido muscular esquelético fetal podem ser influenciadas pelo status nutricional materno, o que pode alterar o número de fibras ao nascimento. Tal susceptibilidade se dá principalmente em virtude da menor prioridade de desenvolvimento do tecido muscular esquelético durante a fase de organogênese fetal, o que faz com que alterações no status nutricional da matriz durante a gestação afete de forma contundente o desenvolvimento muscular esquelético (Zhu et al., 2008). Dessa forma, intervenções nutricionais durante a gestação possibilitam a manipulação intrauterina da formação do tecido muscular esquelético e consequentemente alterações das condições de crescimento e desenvolvimento durante a fase pós-natal do animal.

Diversos estudos têm sido realizados em animais de produção com intuito de alterar a trajetória de desenvolvimento muscular fetal por meio de manipulação da dieta de matrizes durante a gestação (Tong et al., 2009; Duarte et al., 2014; Reed et al., 2014). Neste contexto, o uso do cloridrato de ractopamina (RAC) em dietas de matrizes gestantes tem sido sugerido como forma de manipulação de crescimento/desenvolvimento muscular fetal (Garbossa et al., 2015). O cloridrato de ractopamina tem por função geral, quando fornecido em animais de terminação, inibir a ligação da insulina no receptor

adrenérgico dos adipócitos, e assim, antagonizar a ação da insulina diminuindo a síntese e deposição de gordura nos suínos e aumento da síntese proteica (Agostini et al., 2011). Assim, é possível que o fornecimento de RAC em dieta de fêmeas gestantes altere positivamente a trajetória de desenvolvimento muscular durante a fase fetal por meio do aumento do número de fibras musculares nos fetos durante a gestação. Conseqüentemente, a progênie apresentaria alto potencial de crescimento muscular durante a fase pós-natal. A pesquisa do complexo mecanismo de desenvolvimento muscular subjacente é benéfico para o melhoramento genético para porcentagem de carne magra e qualidade da carne.

Assim, objetivou-se estudar o desenvolvimento muscular fetal e a qualidade da carne da progênie de grupos genéticos distintos (Piau e linhagem Comercial) com inclusão de cloridrato de ractopamina (RAC) fornecido na dieta das matrizes suínas, no período de 30-60 dias de gestação.

REVISÃO DE LITERATURA

Raça Piau

As raças naturalizadas brasileiras tiveram sua origem nas raças introduzidas pelos colonizadores portugueses no século XVI, entre elas destacam-se o Piau, Tatu, Canastra, Nilo, Caruncho, Pereira e Pirapitinga (Egito et al., 2002).

O Piau foi a primeira raça nativa a ser registrada, em 1989, com origem nos Estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Sua pelagem é ovejuna (branca-creme com manchas pretas) com orelhas intermediárias entre Ibéricas e Asiáticas, é considerada a mais importante raça nacional (Sarcinelli et al., 2007).

O suíno Piau é caracterizado por baixo desempenho, pequeno tamanho de leitegada, rusticidade, adaptabilidade às condições pobres de manejo e alimentação e destaca-se pelo grande acúmulo de gordura subcutânea (Guimarães e Lopes, 2001).

Efeitos da placentação em suínos

A ocupação do espaço uterino disponível é importante para a manutenção da gestação. Por volta do 13º dia de gestação, o alongamento está quase terminado e o concepto se posiciona de forma que favoreça a associação com as pregas do endométrio. Entre os dias 15 a 16 de gestação, este processo se concretiza pela interdigitação das microvilosidades do endométrio e do concepto (Dantzer & Winther, 2001). Este evento é essencial para demarcar o espaço uterino disponível para cada concepto competir pelos nutrientes fundamentais para sua sobrevivência (Geisert & Yelich, 1997).

Em leitegadas numerosas o espaço uterino pode ser um fator limitante, pois a redução da área da superfície endometrial por feto reduz o crescimento placentário, comprometendo o peso ao nascer (Geisert & Yelich, 1997) por exemplo em leitegadas de 11 leitões apresentaram média de 1590g de peso ao nascimento, ao aumentar 5 leitões por leitegada verificaram que a média de peso ao nascimento caiu para 1260g (Quiniou et al., 2002).

De acordo com os autores Dantzer & Winther, (2001); Thompson, (2006), a vascularização da placenta é fundamental para o desenvolvimento das células e sua principal função é a manutenção de trocas gasosas, resíduos e nutrientes entre a matriz e

o conceito, como glicose, aminoácidos, vitaminas hidrossolúveis (Complexo B e vitamina K) e esteroides, sendo essencial para a capacidade uterina.

A restrição do crescimento intra-uterino (RCIU), refere-se ao crescimento prejudicado do embrião/feto ou seus órgãos durante a gestação e é considerado grave em suínos em função da insuficiência placentária, afetando o peso ao nascer, de modo que 15-20% dos leitões apresentam um peso ao nascimento inferior a 1100g, podendo causar um efeito de nanismo permanente, além de reduzir a sobrevivência neonatal, também compromete o desenvolvimento muscular e dos órgãos (Wu et al., 2006).

Wang et al. (2008), verificaram que a RCIU afeta a composição do músculo e a distribuição do tipo de fibra muscular, verificando alterações em 12 proteínas, consequência de redução da síntese de polipeptídeo o que induz ao estresse oxidativo e prejudica a saúde dos leitões recém nascidos. Os autores mencionam ainda que estes podem ser os principais fatores responsáveis pela absorção anormal, bem como o crescimento reduzido do intestino delgado, fígado e do músculo em leitões com RCIU.

Miogênese

O desenvolvimento muscular é um processo complexo. Os mioblastos células progenitoras miogênicas que se originam a partir de células precursoras mesenquimais e desenvolvem-se em fibras musculares multinucleadas, em um processo denominado miogênese (Parker et al., 2003; Te Pas et al., 2005; Tang et al., 2007; Zhao et al., 2011). Esse processo ocorre em duas fases, sendo elas a determinação e a diferenciação. A determinação é a fase em que as células mesenquimais que estão se multiplicando se diferenciam em mioblastos, seguida da proliferação dos mioblastos e vários mioblastos se fundem para formar os miotubos alongados (Buckingham et al., 2003). Moyses & Schulte (2010) detalharam os eventos de células satélites crescidas em cultura, no primeiro dia quando as células satélites entram no programa miogênico, induzidas pelo hormônio IGF-II, os mioblastos começam a expressar um conjunto de proteínas que atuam como ativadores transcricionais, esses fatores incluem proteínas da família fatores de regulação miogênica fatores de regulação miogênica MFRs, que estimulam a expressão de genes que codificam proteínas musculares específicas, como miosina II, alfa-actina e troponinas. Os mioblastos individuais são estimulados por hormônios a se fundirem para formar os miotubos multinucleados.

A diferenciação acontece quando os genes dos miotubos iniciam sua expressão músculo-específica, dessa forma os mioblastos param de se multiplicar, então as fibras musculares passam a crescer principalmente em volume (Buckingham et al., 2003; Zhao et al., 2011), processo conhecido como hipertrofia e caracteriza o crescimento muscular pós natal.

Durante o processo de miogênese, ocorrem duas grandes ondas de geração de fibras, que originam as fibras primárias que se formam nos primeiros estágios da fusão dos mioblastos durante a primeira onda e as fibras secundárias que são formadas durante a segunda onda de diferenciação dos mioblastos fetais (Beermann et al., 1978; Te Pas, 2005). Ainda pode ocorrer uma terceira população de mioblastos (Te Pas et al., 2005) que não formam fibras musculares, mas ficam localizadas próximas as fibras, denominadas de células satélites, responsáveis pela manutenção do tecido (Junqueira & Carneiro, 2013).

O conhecimento dos mecanismos de regulação envolvidos no processo de miogênese tem apresentado boa evolução nos últimos anos, destacando-se avanços no conhecimento de fatores de regulação miogênica fatores de regulação miogênica (MRFs), responsáveis pelo controle da expressão coordenada de genes responsáveis pela diferenciação de mioblastos em miócitos maduros (Sabourin & Rudnicki, 2000). Conforme Bergstrom & Tapscott (2001). Os fatores de regulação miogênica (MRFs) são é compostos por quatro genes, sendo eles diferenciação miogênica 1 (MyoD), fator miogênico 5 (Myf-5), Miogenina (MYOG) e fator miogênico 6 (Myf-6) ou (MRF4). Enquanto que (MyoD) e (Myf-5) apresentam participação na determinação da linhagem dos mioblastos a (MYOG) e o (MRF-4) são importantes para a diferenciação e manutenção do estado terminal diferenciado (Perry & Rudnick, 2000; Sabourin & Rudnicki, 2000; Kollias e McDermott, 2008).

Muráni et al. (2007) em estudos de transcriptoma do músculo esquelético na fase pré-natal nas raças Pietrain e Duroc identificaram novos genes (GATA3, HMGA2, NRAP, SMC6L1, SPP1, RABZ6IP2 e TJP1) não previamente associadas com miogênese. Outros estudos tem encontrado uma variedade de genes e fatores de transcrição envolvidos na diferenciação miogênica (*PAX3*, *PAX7*, β -catenina, *SOX15* e *SOX17*) (Messina & Cossu, 2009; Hutcheson et al., 2009; Savage et al., 2009). Zhao et al. (2011), identificaram 595 genes diferencialmente expressos de importância para a miogênese, mostrando o quão complexo seu sistema de regulação pode ser.

De acordo com Wigmore & Stichland (1983), em suínos as fibras primárias estão presentes a partir dos 35 dias de gestação e sua quantidade pode aumentar até os 60 dias de gestação, já a formação das fibras secundárias ocorre por volta do 54 a 90 dias de gestação, finalizando o processo de hiperplasia próximo aos 90 dias.

A formação das fibras secundárias sobrepõe parcialmente à formação de adipócitos intramusculares e fibroblastos. Juntos, esses tipos de miócitos, adipócitos e fibroblastos produzem 3 tipos celulares que constituem a estrutura básica do músculo esquelético (Du et al., 2010; Yan et al., 2013), e a indução de formação de uma dessas linhagens celulares pode ser feita durante a fase de gestação via nutrição (Duarte et al. 2014).

De acordo com sua estrutura e sua composição molecular, as fibras musculares podem ser classificadas em tipo I e tipo II. As fibras do tipo I são originadas pela fibra primária, já as fibras tipo II são originadas pelas fibras secundárias (Junqueira & Carneiro, 2013).

As fibras do tipo I apresentam grande quantidade de sarcoplasma contendo mioglobina de coloração vermelho escura, elas são adaptadas para contrações continuadas, sua energia é provinda em maior parte dos ácidos graxos e expressam tipos específicos de proteínas: isoformas de proteínas do filamento grosso (miosina, cadeias leves da miosina), filamentos finos (troponina e tropomiosinae maquinaria de transporte de íons). As fibras do tipo II são adaptadas para contrações rápidas e descontínuas, contêm pouca mioglobina, por isso apresentam coloração vermelho claro. São subdivididas em tipos IIA, IIB e IIC (Junqueira & Carneiro, 2013).

Crescimento pós natal

Numa condição pré-natal, classicamente se conhece que o número de fibras pode ser afetado pelas condições às quais o ambiente uterino está sendo submetido, em geral condições nutricionais, maternas e de inervação, entretanto, tais condições podem ter um efeito extensivo no período pós natal, comprometendo o índice de crescimento (Silva, 1999).

O potencial de crescimento pós-natal de animais de produção de carne é limitado pela hipertrofia de suas fibras musculares, processo caracterizado pelo aumento em volume individual de cada célula. A hipertrofia é atingida quando as fibras musculares

alcançam em máximo tamanho que pode ser limitado a genética do animal (Handel & Stickland, 1988).

Animais que possuem fibras musculares grandes representam animais de crescimento muscular rápido. Borosky et al. (2010) verificaram que para contagem total de fibras musculares, híbridos comerciais e suínos cruzados Large White x Landrace apresentaram maior número de fibras no músculo Longissimus dorsi que animais do grupo isento de seleção.

A extensão da hipertrofia da fibra muscular e, conseqüentemente, a capacidade do músculo esquelético em crescer, depende também do número de fibras musculares que é determinado na fase pré-natal. Isso tem mostrado que o tamanho da fibra muscular é inversamente proporcional ao número de fibras, o que implica em dizer que o potencial de crescimento de cada fibra muscular é menor quando há um alto número de fibras, e que o potencial de cada fibra muscular poderá ser maior quando o número de fibras é menor (Rehfeldt et al., 2000).

Assim, o crescimento potencial do tecido magro depende primeiramente do número de fibras musculares formadas no período pré-natal, seguida do processo hipertrófico na fase pós-natal (Rehfeldt et al., 2000).

Cloridrato de Ractopamina

O cloridrato de ractopamina (RAC) é um agonista β - adrenérgico que tem sido utilizado nas dietas de suínos por proporcionar melhorias significativas no desempenho e nas características de carcaça, proporcionando redução na gordura da carcaça e em consequência o aumento da carne magra (Smith, 1998; Agostini et al., 2011).

O modo de ação de beta adrenérgicos no tecido adiposo estão bem documentados (Mills et al., 1990; Mersmann, 2002; Agostini et al., 2011). Em contraste, pouco se sabe sobre a ação desses repartidores nas vias de sinalização intracelular no músculo esquelético.

Quando fornecido em animais de terminação, esse agonista atua como agente de repartição, redirecionando os nutrientes da síntese lipídica para a deposição de tecido muscular (Watkins et al., 1990; Agostini et al., 2011). De maneira geral esta substância se liga aos receptores β -adrenérgicos presentes nos tecidos adiposo e muscular (Moody et al., 2000).

Os receptores β -adrenérgicos encontrados na membrana plasmática das células de diversos tecidos são agrupados em 3 tipos, sendo eles β_1 , β_2 e β_3 . Porém, os aditivos desenvolvidos para uso em animais são específicos para os receptores β_1 e β_2 . Em sua estrutura primária os receptores podem possuir mais de 400 aminoácidos, e presença de sete domínios transmembrana de natureza hidrofóbica, que por sua vez ancoram os receptores à membrana (Smith et al., 1990; Moody, 2000).

Com a ligação do agonista aos β -receptores, estes se fixam à proteína Gs formando um complexo. A proteína Gs faz parte de uma família de proteínas homólogas e triméricas, composta por 3 subunidades, α , β , e γ (Moura & Vidal, 2011). A subunidade α da proteína Gs por sua vez é responsável por ativar a Adenilato Ciclase, transformando o ATP em Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc), esta por sua vez se liga à subunidade regulatória da proteína quinase A (PKA), ativando-a (Hauache, 2001; Moura & Vidal, 2011). Essa enzima é composta por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R₂C₂. A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da haloenzima inibida e consequente ativação da PKA, que em seguida pode fosforilar diversas estruturas intracelulares, obtendo uma resposta específica ao estímulo agonista (Silva et al., 2009; Moura & Vidal, 2011).

Em decorrência da estimulação contínua das células com agonista beta-adrenérgico, alterações podem ocorrer, e são denominadas dessensibilização e promovem redução na responsividade celular, podendo ser dividido em dessensibilização homóloga e heteróloga (Pinto et al., 2005). A dessensibilização refere-se à redução temporária na densidade dos beta-receptores presentes na superfície celular onde há o desacoplamento da proteína G e a ligação da beta-arrestina (proteína citoplasmática), com alta afinidade às moléculas de clatrina, iniciando a internalização (endocitose) em vesículas recobertas por essas moléculas e posteriormente para compartimentos endossômicos (Mills, 2002). A ressensibilização destes receptores pode ser feita com a retirada do agonista. Assim os beta-AR são desfosforilados por fosfatases, dissociados da beta-arrestina e reciclados para membranas plasmáticas para reiniciar sua atividade, enquanto que o processo de down-regulation implica na diminuição do número total destes receptores por meio da internalização, com posterior degradação dos beta-AR nos lisossomas (Alberts et al., 2004).

No último estágio dessa cascata há a fosforilação da proteína perilipina A como a enzima lipase sensível a hormônio (HSL), estimulando a mobilização dos triglicerídeos estocados nos adipócitos culminando na lipólise (Mersmann, 2002), e na inativação de enzimas lipogênicas, envolvidas na síntese de novo de ácidos graxos e triglicerídeos, como a Acetil-CoA carboxilase. A atividade anti-lipogênica da PKA também é resultado da inativação de transportadores de glicose e da redução na expressão de genes lipogênicos (Mersmann, 1998), acarretando na redução da síntese e deposição de gordura subcutânea (Cantarelli et al., 2009) quando fornecidos em animais em terminação. Halsey et al., (2011), estudando a relação da RAC com o tecido adiposo em suínos pré-abate, com administração de 0, 20 e 60ppm, com períodos de alimentação em 14, 28 e 42 dias, verificaram sua influência na expressão de genes lipogênicos envolvidos na via Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC), verificaram a redução na expressão de FAS no período de fornecimento de 14 dias com 60ppm de ractopamina e no período de 28 e de 42 dias para as doses de 20 e 60ppm e GLUT-4, no período de 14 dias com dose de 60ppm e no período de 28 dias nas doses de 20 e 60ppm, também foi constatado a redução na abundância para SREBP-1 e *PPAR* γ 2 nos períodos de 28 e 42 dias.

Há ainda ação nas células protéicas musculares, onde ocorre aumento da síntese de proteína a partir dos nutrientes que seriam destinados à lipogênese (Mills et al., 1990; Gunawan et al., 2007; Sanches et al., 2010), entretanto esse mecanismo de ação não é totalmente documentado na literatura embora alguns autores têm demonstrado que a administração de RAC resulta no estímulo da síntese protéica principalmente de actina e miosina (Bergen et al., 1989; Shappel et al., 2000).

Esse mecanismo de ação é menos compreendido ainda quando o fornecimento é feito em porcas gestantes com objetivo de verificar seu efeito na progênie. A estimulação “in vitro” do músculo esquelético por agonista beta-adrenérgico, por meio da modulação na concentração de AMPC, está envolvido na regulação da diferenciação deste tecido. Há indícios que a administração de um agonista beta-adrenérgico durante a gestação possa afetar, por meio da concentração de AMPC, o desenvolvimento pré-natal do músculo esquelético (Kim et al., 1994).

Alguns trabalhos têm sido propostos com o objetivo de verificar os efeitos da RAC em progênies de fêmeas tratadas com o aditivo durante a gestação. Entre eles, Hoshi et al., (2005a), que avaliaram a administração de 20ppm de RAC em 4 períodos da gestação (1^a 25-50 dias; 2^a 50-80; 3^a 25-80 e 4^a sem RAC) em fêmeas suínas, verificaram aumento de 6.85% de fibras no músculo Semitendinoso, o estudo demonstrou que os

leitões nascidos de matrizes tratadas com RAC durante o período de 25-50 dias de gestação apresentaram taxas de crescimento mais elevada do que leitões do grupo controle. Garbossa et al. (2015) ao compararem (dieta 1: controle; dieta 2: arginina; dieta 3: 20ppm de RAC durante 25-53 dias de gestação; dieta 4:arginina+RAC) verificaram redução de 4,58% no número de fibras e para diâmetro um aumento de 16,34% em relação ao grupo controle ao fornecer 20ppm de RAC durante o período de 25-53 dias de gestação no M. Semitendinosus, entretanto, a combinação de arginina+RAC não influenciou o diâmetro ou o número de fibras musculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os métodos envolvendo o manejo dos animais e os procedimentos experimentais, neste estudo, foram feitos de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP-UFV), processo 16/2014 (Anexo A).

Animais, desenho experimental, dieta e coleta de material biológico

Os animais foram provenientes da Granja de Melhoramento de Suínos (GMS) e as análises conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec), Laboratório de Análises de Carne ambos do Departamento de Zootecnia da UFV e no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral da UFV.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (dois grupos genéticos, Piau e Comercial; dois sexos, machos castrados e fêmeas), desbalanceado.

Foram utilizadas 10 matrizes suínas de 1ª e 2ª ordem de partos, (quatro matrizes da raça local Piau e seis matrizes da linhagem comercial) (Large White x Pietrain). As matrizes foram identificadas por meio de brincos e receberam manejos alimentares, reprodutivos e sanitários semelhantes. As fêmeas foram inseminadas, seguindo protocolo de 12-24 horas após identificação do estro. As doses inseminantes dos machos (Pietrain) utilizados foram distribuídos de forma a ser preservado o uso de diferentes machos sendo, portanto, isolado o efeito do macho.

Foram utilizados dois tratamentos constituídos de uma ração basal (Controle _CoN) e ração (Ractopamina, RAC), com adição de 20ppm de RAC em substituição ao milho. As rações (Tabela 1), foram formuladas para atender as exigências nutricionais de fêmeas suínas gestantes de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2011). As rações experimentais foram fornecidas durante o período de 30 a 60 dias de gestação, na quantidade de 2kg divididos em dois arraçoamentos diários e água fornecida à vontade durante todo o período de gestação. A partir dos 60 dias de gestação o fornecimento de dietas contendo RAC foi cessado e todas as matrizes passaram a receber a dieta CON.

Tabela 1 Composição centesimal e valores nutricionais das rações fornecidas às matrizes gestantes que receberam cloridrato de ractopamina dos 30 aos 60 dias de gestação.

Ingrediente (%)	Controle	Com Ractopamina
Milho	58,356	58,256
Farelo de soja	13,00	13,00
Farelo de trigo	25,00	25,00
Fosfato bicálcico	1,630	1,630
Calcário	1,271	1,271
Cloreto de colina	0,100	0,100
Sal	0,443	0,443
Mistura vitamínica ¹	0,100	0,100
Mistura mineral ²	0,100	0,100
Ractopamina ³	0,000	0,100
Total	100,00	100,00
Composição nutricional calculada⁴		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2953	2956
Proteína bruta (%)	14,37	14,37
Lisina digestível (%)	0,550	0,550
Treonina digestível (%)	0,445	0,445
Met + cis digestível (%)	0,435	0,435
Sódio (%)	0,195	0,195
Cálcio (%)	0,962	0,962
Fósforo disponível (%)	0,448	0,448

¹Conteúdo/kg do produto: vitamina A: 10000000UI; Vitamina D3: 1400000UI; Vitamina E: 30000mg; Vitamina K3:2800mg; Vitamina B1: 1800mg; Vitamina B2: 5600mg; Vitamina B6: 1600mg; Vitamina B12: 18000mg; cálcio: 20g; Niacina: 30g; Ácido Fólico: 1000mg; Biotina: 240mg; Selênio: 200mg; B.H.T.: 5000mg.

²Conteúdo/kg do produto: Ferro (mín.): 80g; Cobre (Mín.): 12g; Cobalto (mín.): 1000mg; Manganês (mín.): 40g; Zinco (mín.): 100g;

³Conteúdo/kg do produto: 20g de cloridrato de ractopamina.

⁴Composição nutricional calculada com base nas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno et al., 2005).

Durante toda a gestação as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais (2,20 x 0,6 x 1m) com comedouro e bebedouro do tipo canaleta. Aos 60 dias de gestação duas fêmeas Piau e duas fêmeas comerciais foram abatidas de acordo com as regras para abate humanitário (WSPA, 2010), para se ter acesso ao músculo de fetos suínos de 60 dias. Foram coletados 6 fetos de cada matriz, totalizando 12 fetos comerciais (seis machos e seis fêmeas) e 12 fetos Piau (seis machos e seis fêmeas).

As demais matrizes, duas fêmeas Piau e quatro comerciais, aos 109 dias de gestação foram transferidas para a maternidade e alojadas em gaiolas individuais (2,20 x 0,6 x 1m) contendo comedouros manuais, bebedouros automáticos tipo concha e escamoteadores aquecidos para os leitões e no dia do parto não receberam alimento. Os partos foram monitorados e os leitões identificados individualmente por meio de brincos

e pesados. O número de mumificados e natimortos foi registrado. O manejo na maternidade foi realizado seguindo protocolo de rotina da Granja, os leitões machos foram castrados no 10^a dia de vida, desmamados aos 21 dias de idade e foi registrado o peso à desmama.

Aos 140 dias de idade, 12 animais Piau (seis machos e seis fêmeas) e 24 animais comerciais (12 machos e 12 fêmeas) foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, com água à disposição e pesados novamente. Foram abatidos seguindo os mesmos procedimentos adotado para o abate das matrizes aos 60 dias de gestação.

De cada feto e de cada animal abatido aos 140 dias de idade foram coletadas duas amostras do músculo Longissimus dorsi (LD), do lado direito e do lado esquerdo da carcaça. Uma das amostras foi fixada em solução tamponada de paraformaldeído (4% v/v, pH = 7,4), armazenada por pelo menos 24 horas, e posteriormente, conservada em álcool 70% para posterior análise histológica. A segunda amostra foi fragmentada em dimensões iguais de 0,5cm x 2,0cm e imediatamente imersos em tubos contendo 5 ml de RNAHolder ® (BioAgency, São Paulo, Brasil), numa relação peso:volume de 1:5, conforme recomendado pelo fabricante, identificadas e armazenadas a -20°C para subsequente extração de RNA. Para os animais aos 140 dias de idade, após 24 horas de resfriamento das carcaças, foram retiradas amostras de carne da região compreendida entre as três últimas costelas para avaliação de parâmetros qualitativos da carne. A gordura subcutânea aparente presente nas amostras foi removida logo após estas serem tiradas da carcaça. Em seguida, as amostras foram embaladas à vácuo em sacos plásticos específicos para este fim. As amostras foram então congeladas a -20°C até a realização das análises.

Análise histológica

Na porção média de cada amostra de LD previamente armazenadas em álcool 70%, foram feitos cortes transversais a orientação das fibras musculares. Posteriormente, estas amostras foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de álcool e incluídas em resina plástica, com corte de 5µm de espessura em micrótomo de resina, seguida da montagem da lâmina histológica. Os cortes de LD dos fetos coletados aos 60 dias de gestação foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) e os cortes de LD dos suínos aos 140 dias de idade foram corados em azul de toluidina e as lamínulas montadas utilizando-se resina sintética Entellan® (Merck).

Para estimar o número de fibras musculares e mensurar o diâmetro das fibras musculares foram fotografadas em foto-microscópio EVOS® xl (AMG, WA, USA) o mínimo de 10 imagens por animal. As imagens foram analisadas utilizando-se o software ImageJ® (NIH, USA) para ambas as avaliações. Para contagem do número de fibras musculares foi utilizado o comando Cell Counter do ImageJ® (NIH, USA). Para análise de diâmetro foram medidas 120 fibras por animal utilizando a ferramenta Polygon selections do ImageJ®(NIH, USA). Todas as imagens foram analisadas em ampliação de 400X.

Análise de qPCR

A extração de RNA total (1 ug) foi realizada a partir de 0,5 g de amostras de tecido muscular usando Trizol® (Invitrogen™). A concentração do RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Munique, Alemanha), observando-se as razões A260/A230 e A260/A280 entre 1.8 e 2.1 como controle de pureza. A qualidade e integridade do RNA extraído foram verificadas usando-se gel de agarose 1%. Na sequência tratada com DNase e reversamente transcrito em cDNA utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription (RT) (Promega, Madison, WI) seguindo recomendação do fabricante.

Os conjuntos de primers utilizados são descritos na Tabela 2. As reações de PCR foram efetuadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA), utilizando o kit Gotaq® qPCR Master Mix (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Antes da análise de expressão, para cada gene a eficiência de amplificação foi calculada (Livak & Schmittgen, 2001) através da utilização de diferentes concentrações dos primers (100, 200 e 400 nM) e cDNA (1, 10, 20 e 40 ng). A eficiência de amplificação foi de 0,85-0,99.

Em cada reação foi utilizado 12,5µL de Power SYBR®GREEN , 0,5µL de cada primer (forward and reverse), 5µL de cDNA e água MilliQ (ultrapura) para completar o volume de 25µL. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: para desnaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados de expressão gênica foram registrados como valores de Ct (threshold cycle).

O valor obtido em Ct foi normalizado (Δ Ct) utilizando um gene de referência. Para este estudo utilizou-se como gene de referência o beta-actina β -ACTIN, uma vez que

não foi detectada nenhuma diferença de β -ACTIN entre os tratamentos estudados, além de apresentar melhores valores no teste de eficiência.

Tabela 2 - Primers para os genes analisados por qPCR

Genes	Sequências	Código de Acesso -NCBI
ADRB2	F: CTCTTCCATCGTGTCTTCTAC R: CCTCAGACTTGTCGATCTTCTG	NM_001128436.1
MYOD1	F: CCGACGGCATGATGGATTATAG R: CGACACCGCAGCATTCTT	NM_001002824.1
MYHC IIA	F: AACACCCTGACCAAAGCTAAA R: TCCTCTTGGCTCTCTCTAAGTC	AB025256
MYHC IIB	F: ATGAAGAGGAACACATTA R: TTATTGCCTCAGTAGCTTG	AB025261 (Wimmers et al., 2008)
MYHC I	F: AAGGGCTTGAACGAGGAGTAGA R: TTATTCTGCTTCCCTCAAAGGG	AB053226 (Wimmers et al., 2008)
MYHC IIX	F: AGAAGATCAACTGAGTGAAC R: AGAGCTGAGAACTAACGTG	AB025262 (Wimmers et al., 2008)
Genes Referência:		
β-ACTIN	F: CTCTTCCATCGTGTCTTCTAC R: CCTCAGACTTGTCGATCTTCTG	U07786.1
GAPDH	F: CAAGTGGACATTGTCGCCATCA R: GCTTCCCATTCTCAGCCTGACT	NM_001206359
HPRT1	F: GCTGACCTGCTGGATTACAT R: CCCGTTGACTGGTCATTACA	NM_001032376.2

Avaliação de parâmetros qualitativos da carne

As amostras de LD foram coletadas 24 horas após o abate e congeladas após serem embaladas à vácuo. As amostras ainda congeladas foram subamostradas em bifes com 2,54 cm de espessura com auxílio de serra frigorífica para maior exatidão quanto à espessura dos bifes obtidos. Foram subamostrados o total de 2 bifes, 1 destinado a análise de força de cisalhamento e o outro para análise de extrato etéreo. Os bifes foram embalados a vácuo e descongelados a medida em que as análises foram realizadas.

Força de Cisalhamento

Para determinação da força de cisalhamento foi utilizado o procedimento proposto por AMSA (1995). Os bifes de 2,54 cm de espessura (um de cada animal) foram descongelados sob refrigeração (4°C) durante 16 horas. Logo após o descongelamento, os bifes foram assados em forno elétrico preaquecido a 150°C. No procedimento de cozimento foi introduzido no centro geométrico de cada bife um termoacoplador ligado em termômetro tipo K, para monitoramento da temperatura interna até que essa atinja 71°C. Os bifes foram então colocados em resfriamento (4°C) durante 16 horas. Decorrido esse tempo, foram retiradas oito amostras cilíndricas com 1,27 cm de diâmetro cada, paralelamente a orientação das fibras musculares, utilizando-se um amostrador de aço inox devidamente afiado. As amostras cilíndricas foram cisalhadas perpendicularmente à orientação das fibras musculares, utilizando-se lâmina de corte em V, com angulação de 60°, 1,016 mm de espessura e velocidade fixa de 20 cm/min, acoplada ao texturômetro Warner-Bratzler® (G-R Electrical Manufacturing Company, Manhattan – KS, USA).

Quantificação do teor de gordura intramuscular

A quantificação do teor de gordura intramuscular foi realizada por meio da análise de extrato etéreo em extrator de gordura (Ankom® modelo XT10) (Ankom, 2009) de acordo com método Am 5-04 (AOCS, 2005).

Análise Estatística

Para análise de expressão gênica os dados de Ct foram analisados usando o QPCR-mixed macro no SAS, baseado em modelos mistos de acordo com Steibel et al., (2009). O modelo adotado foi:

$$Y_{gijk} = \mu + P_k + T_{gi} + G_{gj} + TxG_{gij} + e_{gijk},$$

onde Y_{gijk} corresponde ao valor de Ct obtido para o gene g (referência ou alvo) para cada animal submetido no tratamento i (tratamento materno com e sem RAC) no grupo genético j (Piau e comercial) e k-ésima placa; T_{gi} refere-se ao efeito do i-ésimo tratamento materno na expressão do g-ésimo gene; P_k refere-se ao efeito fixo de k-ésima placa; G_{gj} refere-se ao efeito do j-ésimo grupo genético na expressão do g-ésimo gene; TxG_{gij} : Ao efeito da interação na expressão do gene g no tratamento i no genótipo j. E e_{gij} : efeito

aleatório do erro associado a cada repetição. Não se verificou efeito de sexo, assim este foi removido do modelo.

As diferenças e interações entre as classes de expressão dos genes foram calculadas por meio de ($\Delta\Delta CT$) normalizado para o gene endógeno β -ACTIN pelo teste t. Os valores de Fold Change (FC) foram estimados seguindo a fórmula: $FC: 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Para análise estatística das variáveis número e diâmetro de fibras musculares, peso ao nascimento, peso aos 140 dias e parâmetros qualitativos de carne, o modelo matemático adotado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + L(P)_l + S_i + G_j + (GS)_{ij} + \epsilon_{ijk},$$

onde: Y_{ijk} refere-se a variável resposta; μ : média geral; $L(P)_l$: efeito associado a l-ésimo número de leitões nascidos por leitegada L aninhado ao efeito aleatório de porca P; S_i : efeito do i-ésimo sexo; G_j : efeito do j-ésimo grupo genético (Piau e Comercial); $(GS)_{ij}$: interação j-ésimo grupo genético com i-ésimo sexo; ϵ_{ijk} : Erro aleatório associado a cada repetição.

A análise de variância e a comparação de médias (Tukey, $\alpha = 0,05$) foram realizadas utilizando o procedimento PROC MIXED do programa estatístico computacional SAS (Statistical Analysis System, 2009).

RESULTADOS

Resultados para fase Pré natal

Para contagem do número de fibras musculares primárias de fetos aos 60 dias houve interação dupla ($P = 0,001$) entre grupo genético (Piau e Comercial) e sexo. Ao comparar o sexo dentro de grupo genético, não se verificou diferenças ($P = 0,08$) entre fetos machos e fêmeas para a raça Piau. Para animais da linhagem comercial, fetos machos apresentaram acréscimo ($P < 0,001$) de em média 24,53% no número de fibras musculares primárias em relação às fêmeas (Figura 1 A).

Para contagem do número de fibras musculares secundárias em fetos aos 60 dias houve interação dupla ($P = 0,002$) entre grupo genético (Piau e Comercial) e sexo. Ao comparar o sexo dentro de grupo genético verificou-se que fetos fêmeas da raça Piau apresentaram acréscimo ($P < 0,001$) em média de 40% no número de fibras musculares secundárias em relação aos machos. Para fetos da linhagem comercial não se verificou diferenças ($P = 0,83$) entre sexo para fibras musculares secundárias (Figura 1 B).

Para o gene Myogenic Differentiation 1 (MYOD1) em tecido muscular dos fetos não foi verificado efeito de interação ($P = 0,47$) entre grupo genético e sexo. Ao analisar os fatores independentemente, não foram observadas diferenças ($P = 0,14$) de expressão entre fetos da raça Piau e fetos da linhagem Comercial. De forma similar, também não foram observadas diferenças ($P = 0,93$) no perfil de expressão de (MYOD1) entre os sexos (Figura 4A).

Para os resultados de expressão gênica para o gene beta 2 Adrenergic Receptor (ADRB2) não houve efeito de interação ($P = 0,06$) entre grupo genético e sexo. Ao analisar os fatores independentemente, verificou-se diferença ($P = 0,008$) entre grupo genético, sendo que fetos da raça Piau expressaram 4,35 vezes a mais o gene em relação a fetos da linhagem comercial. No entanto, não foram observadas diferenças ($P = 0,40$) no perfil de expressão de (ADRB2) entre os sexos (Figura 4A).

Resultados para fase Pós natal

Para contagem do número de fibras musculares aos 140 dias de idade não houve efeito de interação ($P = 0,68$) entre grupo genético e sexo. Ao considerar somente grupo genético (Piau e Comercial), animais da raça Piau apresentaram acréscimo ($P = 0,006$) em média de 25,53% no número de fibras musculares em relação à animais da linhagem Comercial. Ao considerar somente o sexo, machos apresentaram acréscimo ($P = 0,01$) em média de 5,41% no número de fibras musculares em relação as fêmeas (Figura 2A).

Para a variável tamanho de fibra muscular houve interação dupla ($P < 0,001$) entre grupo genético (Piau e Comercial) e sexo. Ao comparar sexo dentro de grupo genético verificou-se que machos Piau apresentaram acréscimo ($P = 0,005$) em média de 8,16% no tamanho das fibras musculares em relação as fêmeas Piau. Enquanto que para a linhagem Comercial verificou-se que as fêmeas apresentaram acréscimo ($P = 0,01$) em média de 4,4% no tamanho das fibras musculares em relação aos machos (Figura 2B).

Para a variável peso ao nascimento houve efeito de interação ($P = 0,001$). Ao comparar o sexo dentro de grupo genético, verificou-se que fêmeas Piau foram em média 21,61% ($P = 0,001$) mais pesadas ao nascimento em relação aos machos Piau. Para animais da linhagem comercial os machos foram em média 7,55% ($P = 0,006$) mais pesados ao nascimento em relação as fêmeas (Figura 3A).

Para a variável peso aos 140 dias houve efeito de interação ($P < 0,01$). Ao comparar sexo dentro de grupo genético não se verificou diferenças ($P = 0,92$) entre machos e fêmeas da raça Piau. Enquanto que para animais da linhagem comercial, os machos foram média 5,70% ($P = 0,001$) mais pesados aos 140 dias em relação as fêmeas (Figura 3B).

Para a variável força de cisalhamento (Kgf) não houve efeito de interação ($P = 0,06$) entre grupo genético e sexo. Ao considerar os fatores independentemente, para grupo genético não se verificou diferenças ($P = 0,85$) entre Piau e comercial. De forma similar, ao considerar somente sexo não foram observadas diferenças ($P = 0,89$) para força de cisalhamento (Tabela 4, Anexo C).

Para porcentagem de extrato etéreo não foi verificado efeito de interação ($P = 0,36$). Ao considerar os fatores independentemente, para grupo genético não se verificou diferenças ($P = 0,31$) entre Piau e Comercial. De forma similar, ao considerar somente sexo não foram observadas diferenças ($P = 0,28$) nas porcentagens de extrato etéreo (Tabela 5, Anexo C).

Para os genes das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC), não se verificou efeito de interação entre grupo genético e sexo para os genes (MYHC IIA) ($P = 0,19$), (MYHC IIB) ($P = 0,41$) e (MYHC I) ($P = 0,94$). Ao analisar os efeitos independentemente, não se verificou diferenças na expressão dos genes (MYHC IIB) para grupo genético (Piau e Comercial) ($P = 0,95$) e sexo ($P = 0,15$), (MYHC I) ($P = 0,83$) e ($P = 0,67$), respectivamente. No entanto, para o gene (MYHC IIA), observou-se que animais da linhagem comercial expressaram 1,83 vezes mais ($P = 0,04$) o gene em relação animais da raça Piau e para sexo não se verificou diferenças ($P = 0,60$) na expressão de (MYHC IIA). Para o gene (MYHC IIX) houve efeito de interação ($P = 0,008$) entre grupo genético (Piau e comercial) e sexo. Ao comparar o sexo dentro de grupo genético, não foram observadas diferenças ($P = 0,26$) entre sexo para animais da raça Piau. De forma similar também não foram observadas diferenças ($P = 0,90$) entre sexos para animais de linhagem comercial (Figura 4).

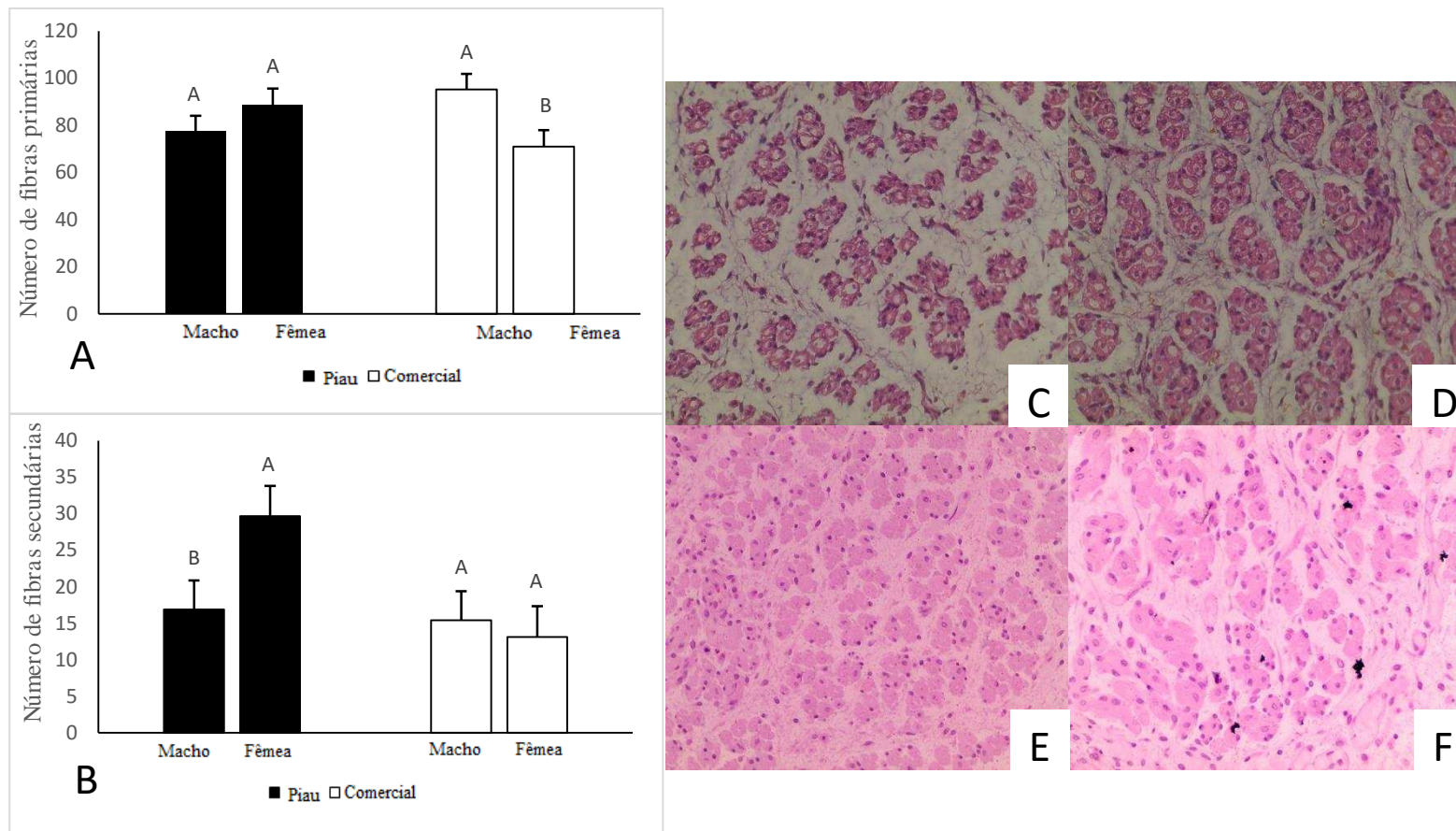


Figura 1. A_ Número de fibras musculares primárias de fetos aos 60 dias. B_ Número de fibras musculares secundárias de fetos aos 60 dias. C_ Imagem histológica de fibras musculares de Piau macho por área em aumento de 400x. A seta aponta fibras musculares primárias com núcleo em posição central. D_ Imagem histológica de feto Piau fêmea de 60 dias corados em Hematoxilina e Eosina; E_ Imagem histológica de feto macho de linhagem Comercial aos 60 dias; F_ Imagem histológica de feto fêmea de linhagem Comercial.

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-kramer.

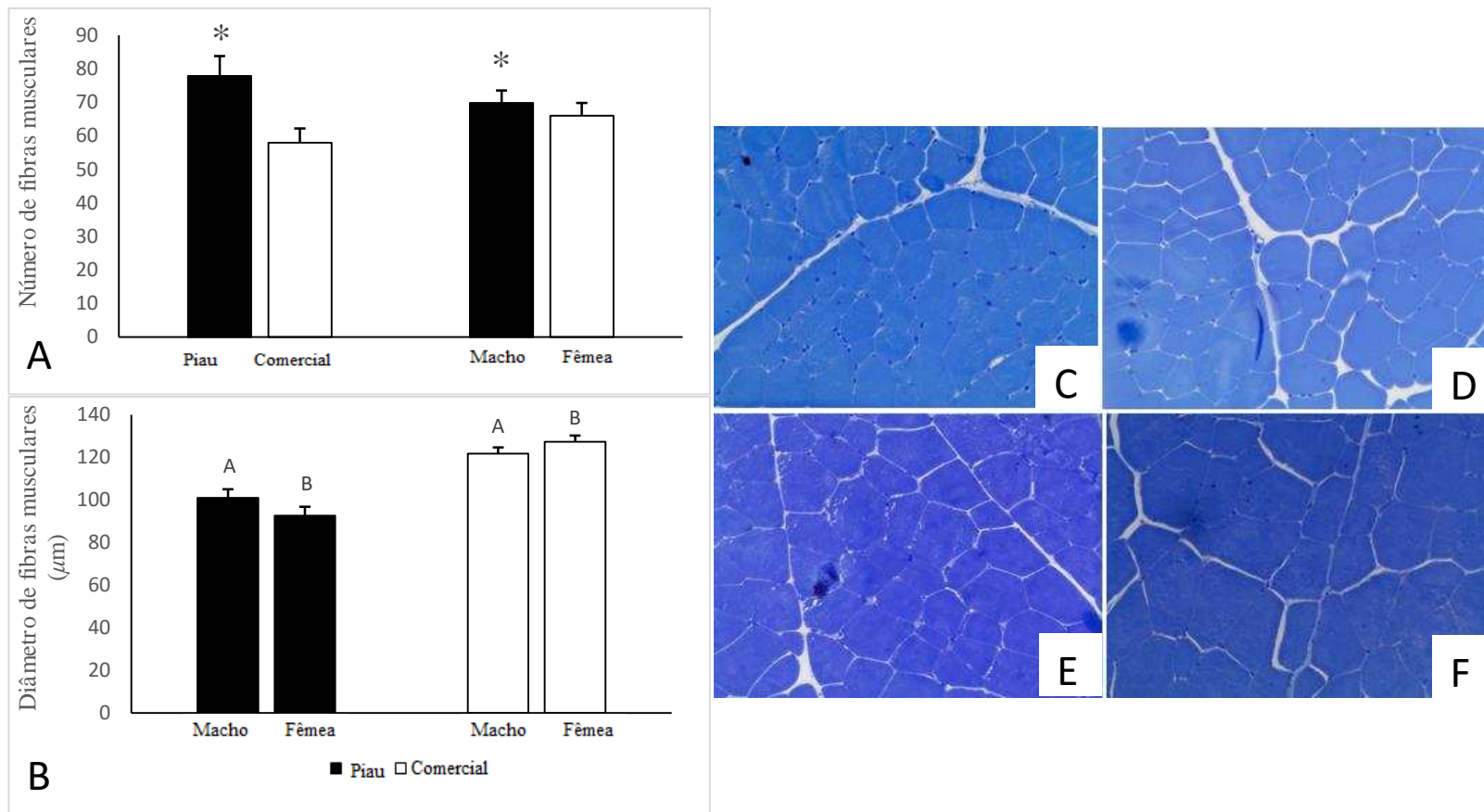


Figura 2. Dados de análise histológica para suínos aos 140 dias; A_ Número de fibras musculares de suínos aos 140 dias. B_ Diâmetro (μm) de fibras musculares de suínos aos 140 dias, medidos em aumento de 400x. C_ Imagem histológica de macho Piau aos 140 dias, corados em azul de toluidina em aumento de 400x. D_ Imagem histológica de fêmea Piau aos 140 dias de idade; E_ Imagem histológica de macho comercial aos 140 dias; F_ Imagem histológica de fêmea comercial aos 140 dias de idade.

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-kramer.

*Significativo a $P < 0.05$.

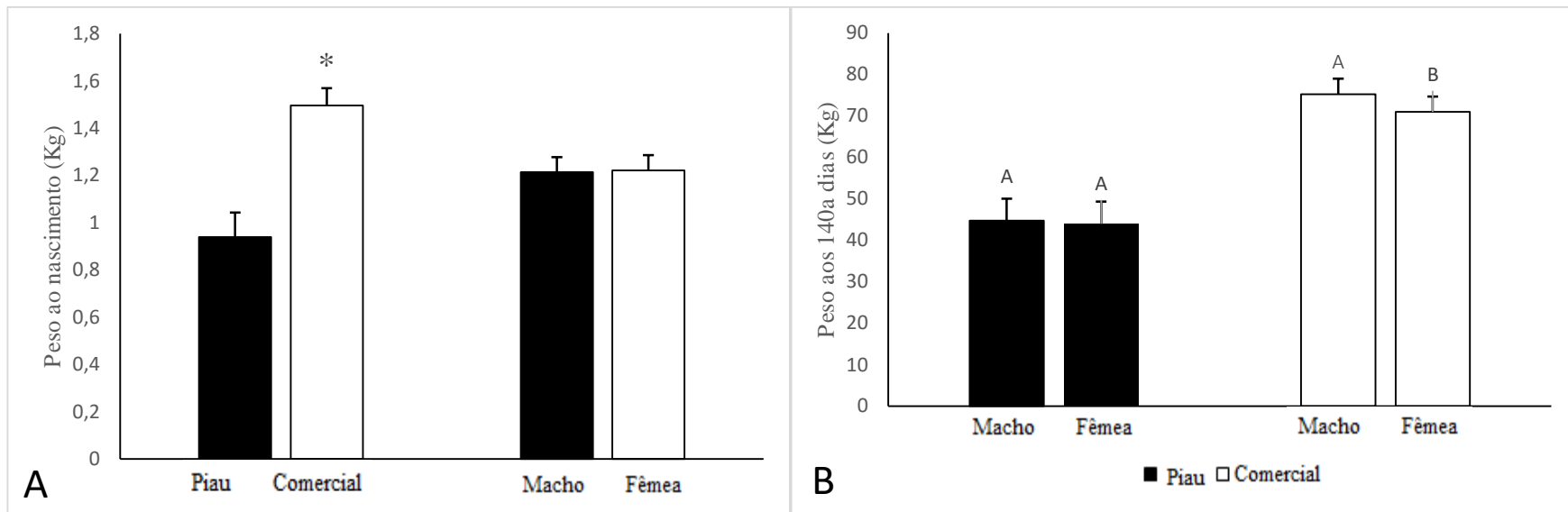


Figura 3. Dados de médias de peso ao nascimento e médias de peso aos 140 dias de idade de suínos. A_ Médias de peso ao nascimento de suínos. B_ Médias de peso aos 140 dias de idade para a interação grupo genético e sexo.

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-kramer.

*Significativo a $P < 0.05$.

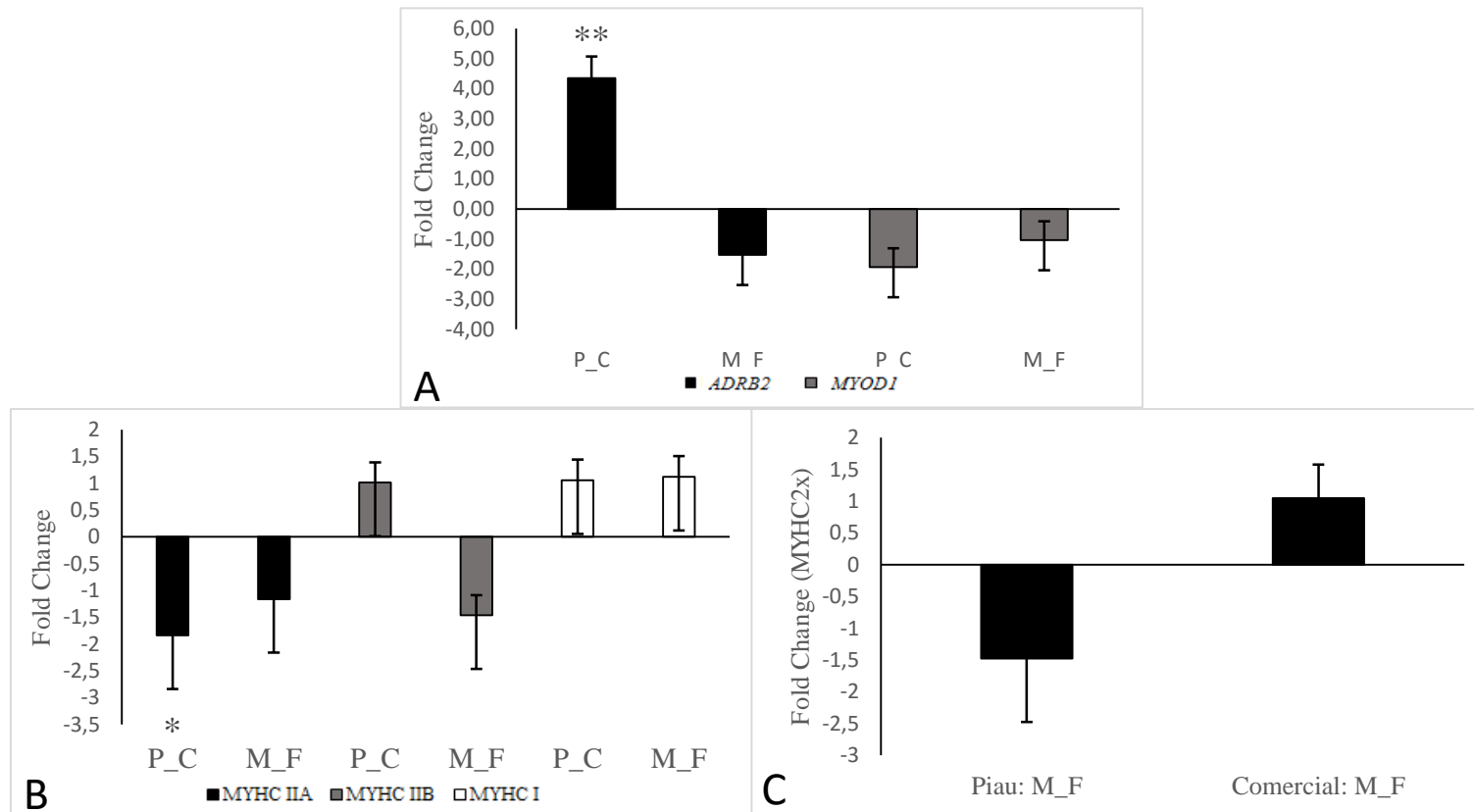


Figura 4. A_ Perfil de Expressão gênica para os genes Myod1 e ADRB2 em Fold Change para fetos suínos aos 60 dias. B_ Perfil de Expressão do gênica para os genes da cadeia pesada da miosina (MYHC IIA), (MYHC IIB), (MYHC I) em Fold Change para suínos aos 140 dias de idade. C_ Perfil de expressão gênica em Fold Change para a interação entre grupo genético e sexo para o gene (MYHC IIx).

* P_C: Comparação entre Piau e Comercial; M_F: Comparação entre machos e fêmeas. Para interação grupo genético (Piau e Comercial) e sexo, Piau: M_F: Comparação entre os sexos na raça Piau; Comercial: M_F: Comparação entre os sexos na linhagem Comercial.

*Significativo a $P < 0.05$.

DISCUSSÃO

Neste estudo, não se verificou diferenças no número de fibras musculares primárias entre os grupos genéticos (Figura 1). Sabe-se que as fibras musculares primárias sofrem pouca influência do ambiente e que mesmo que ocorra alguma influência seu impacto será pequeno em comparação a manipulação das fibras musculares secundárias (Wigmore & Stickland, 1983). Verificou-se maior número de fibras musculares secundárias para fêmeas Piau (Figura 1), sugerindo que essa diferença tenha impactado o peso ao nascimento, pois fêmeas Piau foram em média 20% mais pesadas ao nascimento que os machos (Figura 3). Diversos estudos têm demonstrado relação entre peso ao nascimento, número de fibras musculares, taxa de crescimento e massa muscular (Maltin et al., 2008).

Em contra partida, fêmeas Piau apresentaram menor medidas de diâmetro de fibras musculares aos 140 dias de idade (Figura 2) e foram mais leves nesta idade que os machos (Figura 3), sugerindo que o tamanho do diâmetro tenha contribuído para o maior peso aos 140 dias.

Encontram-se na literatura relatos contraditórios de administração de RAC a matrizes gestantes e seus efeitos na progênie. Hoshi et al., (2005a), verificaram aumento não significativo de 6,85% de fibras no músculo Semitendinoso, de leitões desmamados (Large White x Landrace), o estudo demonstrou que os leitões nascidos de matrizes tratadas com RAC durante o período de 25-50 dias de gestação apresentaram taxas de crescimento mais elevada do que leitões do grupo controle. Em trabalho mais recente, Garbossa et al. (2015) verificaram redução de 4,58% no número de fibras musculares e aumento de 16,34% para diâmetro no M. Semitendinosus de leitões coletados no nascimento, cujas matrizes receberam 20ppm de RAC durante o período de 25-53 dias de gestação. Entretanto, não há relatos na literatura sobre os efeitos da RAC nas comparações entre suínos não melhorados e melhorados geneticamente.

Entre os subtipos de β -AR, o β_1 -AR é o mais predominante expresso em suínos, no entanto alguns estudos comprovam que a ação da RAC seja mediada pelo subtipo β_2 -AR (Gunawan et al., 2007; Mills, 2002; Mills et al., 2003). Há evidências de que o fornecimento contínuo de agonistas beta - adrenérgicos durante a fase de terminação ocasionam redução no perfil de expressão gênica dos receptores β_2 -AR (ADRB2) (Sato et al., 2010). Neste estudo houve diferenças na de expressão de receptores β_2 (ADRB2) entre

os grupos genéticos (Figura 4A), sugerindo que a ação da RAC quando fornecida durante o período de gestação possa ser mais evidente em animais da raça Piau por apresentarem maior abundância relativa de mRNA em tecido muscular de fetos. Não há relatos na literatura sobre a ação transplacentária da RAC ao ser fornecida durante a gestação. Hoshi et al. (2005b) ao estudarem o mecanismo de ação da RAC em matrizes suínas gestantes por meio de medidas de parâmetros sanguíneos não verificaram aumentos de glicose sanguínea naquelas tratadas com RAC, mas verificaram que níveis de colesterol total e triglicérides foram aumentados, provavelmente por causa do efeito lipolítico do fármaco, o que resultou no aumento dos níveis de HDL.

O desenvolvimento do músculo esquelético fetal é suscetível à flutuação de nutrientes (Rehfeldt et al., 2004; Zhu et al., 2008). O aumento no aporte de glicose pelos fetos pode promover a liberação de IGF fetal (Insulina como fator de crescimento) que tem efeito direto sobre os mioblastos (Hoshi et al., 2005b), sugerindo que o mecanismo de ação da RAC se inicia nas matrizes gestantes.

Com o possível aumento nos níveis de glicose, provavelmente aumentou a diferenciação de células mesenquimais em miócitos. Yan et al., (2013) sugeriram que a diferenciação de células-tronco mesenquimais para a linhagem miogênica, linhagens adipogênicas ou fibrogênicas pode ser considerada um processo competitivo, e é controlado por numerosos reguladores indutivos. Assim, ao aumentar o número de células para a linhagem miogênica provavelmente poderia reduzir a densidade de células para as linhagens adipogênicas ou fibrogênicas (Tong et al., 2009). Há evidências de que a nutrição materna pode influenciar no comprometimento das células mesenquimais para alguma linhagem específica em ruminantes (Yan et al. 2013; Duarte et al. 2014). No entanto, não há relatos na literatura que evidencie esse processo quando há adição de aditivos beta-adrenérgicos à nutrição materna de fêmeas suínas.

Neste sentido, poderia ocasionar alteração na expressão dos fatores de transcrição miogênicos (MFRs) como resposta positiva à miogênese nos fetos. Para este estudo não se verificou diferenças de expressão para o gene (*Myod1*) entre os grupos genéticos (Figura 2A). Zhao et al. (2011) em estudos de transcriptoma de raças suínas verificaram que a expressão de (*MyoD1*) atingiu um pico maior em fetos Landrace de 35 dias, em seguida, uma redução com pico de expressão em fetos de 63 dias Lantang (obesa), sugerindo que o perfil de expressão de (*MYOD1*) é diferente em raças obesas e magras. Assim, estes resultados nos permitem sugerir que a ausência de significância

entre os grupos genéticos para expressão de (MYOD1) em tecido muscular de fetos possa ser um efeito da inclusão da RAC na dieta das matrizes durante a gestação.

Alguns estudos têm revelado que MRFs podem não ser alterados durante o desenvolvimento muscular de suínos e que a miogênese pode depender do saldo de fatores de diferenciação e fatores de inibição de diferenciação (Muráni et al., 2007; Te Pas et al., 2005). A ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina aumenta a estabilidade de β -catenina, que entra nos núcleos formando um complexo com o fator de células T/linfóide (TCF/LEF) da família de fatores de transcrição, podendo aumentar a expressão dos fatores (Myf5) e (Myod1), auxiliando na miogênese (Cossu & Mavilio, 2000). Zhao et al. (2011) em estudos de sequenciamento de transcriptoma do músculo de suínos obesos (Lantang) e magros (Landrace) identificaram 595 genes diferencialmente expressos com importância para a miogênese, sugerindo que outros genes devem ser relacionados com os efeitos da RAC quando fornecida durante a gestação.

Neste estudo houve diferença de expressão entre os grupos genéticos para os genes das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC) aos 140 dias de idade, apenas para o gene (MyHC IIA), com maior expressão para animais de linhagem Comercial (Figura 4). Na literatura, proporções do tipo reduzido I, do tipo IIA e maiores proporções do tipo IIX, são observados em animais obesos o que pode indicar uma redução global na capacidade oxidativa (Maltin et al., 2008; Oberbach, et al., 2006; Tanner et al., 2002), sugerindo que a ausência de significância entre os grupos genéticos para os demais genes possa ser um efeito da inclusão de RAC na dieta durante a fase de gestação.

Embora o processo não seja completamente compreendido, a RAC quando fornecida em animais na fase de terminação altera a proporção da composição do tipo de fibra muscular. Entre os estudos descritos na literatura, Gunawan et al. (2007) ao fornecerem RAC (28 dias) para suínos em fase de terminação constataram redução significativa no perfil de expressão para (MyHC IIX) e aumento significativo no perfil de expressão no tipo (MyHC IIB). Contrariamente, Paulk et al. (2014) verificaram aumento no percentual de (MyHC IIX) ao fornecer RAC para suínos. Almeida et al. (2015) verificaram redução no perfil de expressão de (MyHC I) de suínos alimentados com RAC (28 dias), sugerindo que, embora os resultados possam apresentar efeitos diferentes, os genes da cadeia pesada da miosina (MyHC) podem ser regulados pela RAC, provavelmente porque o efeito da RAC quando fornecida na fase de terminação seja mediado pela alteração da expressão de genes específicos do tipo de fibra muscular por meio do receptor β_2 -AR.

Não houve diferenças entre grupo genético para os parâmetros qualitativos de carne, extrato etéreo e força de cisalhamento de progênes aos 140 dias de idade, quando fornecida durante a gestação (Figura 5), embora esperasse que a carne de animais da raça Piau fosse mais macia que animais de linhagem comercial, porque animais de linhagem comercial são selecionados para alto crescimento, musculosidade e consequente redução da gordura de marmoreio, portanto apresentam diâmetro de fibras musculares maiores e de acordo com Silva et al. (2013) maiores diâmetros aumentam a resistência ao corte. Sobre os efeitos da RAC diversos estudos comprovam que não há interferência da RAC em parâmetros qualitativos de carne quando fornecida durante a fase de terminação em suínos (Almeida et al., 2010; Boler et al., 2014; Amin et al., 2014), embora sugira-se que maiores diâmetros possam aumentar a resistência ao corte (Silva et al., 2013).

Em conclusão, a inclusão de RAC na dieta de fêmeas suínas gestantes durante o período de 30-60 dias de gestação promoveu respostas fenotípicas diferentes entre animais não melhorados (Piau) e animais melhorados (Comercial) quando contrastados a literatura. Embora seja reconhecido o papel da RAC na mobilização de nutrientes e que este beta-adrenérgico pode afetar o desenvolvimento pré-natal dos leitões, seu mecanismo de ação precisa ser melhor compreendido.

CONCLUSÃO

A inclusão de RAC na dieta de fêmeas suínas gestantes durante o período de 30-60 dias de gestação promoveu respostas fenotípicas diferentes entre animais não melhorados (Piau) e animais melhorados (Comercial) quando contrastados a literatura. Embora seja reconhecido o papel da RAC na mobilização de nutrientes e que este beta-adrenérgico pode afetar o desenvolvimento pré-natal dos leitões, seu mecanismo de ação precisa ser melhor compreendido

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, P.S; SILVA, C.A.; BRIDI, A.M.; ABRAMI, R.A.M.; PACHECO, G.D.; LOZANO, A.P.; YWAZAKI, M.S.; DALTO, D.B.; GAVIOLA, D.F.; OLIVEIRA, E.R.; BONAFÉ, E.G.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Efeito da ractopamina na performance e na fisiologia do suíno. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p.659-670, 2011.
- ALBERTS, B. JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Comunicação celular. In: Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (Ed.) *Biologia Molecular da Célula*. São Paulo: Artmed, 2004, cap. 15, p.831-906.
- ALMEIDA, V.V.; BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; BRAZ, D.B.; MLYADA, V.S. Ractopamina, cromo-metionina e suas combinações como aditivos modificadores do metabolismo de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.1969-1977, 2010.
- ALMEIDA, V.V.; NUÑEZ, A.J.C.; SCHINCKEL, A.P.; WARD, M.G.; ANDRADE, C.; SBARDELLA, M.; BERENCHTEIN, B.; COUTINHO, L.L.; MIYADA, V.S. Gene expression of beta-sdrenergic receptors and myosin heavy chain isoforms induced by ractopamine feeding duration in pigs not carrying the ryanodine receptor mutation. **Livestock Science**, v.172, p.91-95, 2015.
- AMIN, M.; KIEFER, C.; FEIJÓ, G.L.D.; GONÇALVES, L.M.P.; SOUZA, K.M.R.; RODRIGUES, G.P. Níveis de energia líquida e ractopamina na qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de saúde e produção animal**, v.15, n.2, p.484-492, 2014.
- AMSA. Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation and instrumental measurements of Fresh Meat. National Cattlemen's Beef Assoc. Centennial, Colo, 1995.
- ANKOM, Operator's manual – ANKOM^{XT10} extraction system. Macedon, 2009, p.21.

- AOCS, American Oil Chemists' Society. Official Method Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 2005.
- BEERMANN, D.H.; CASSENS, R.G.; HAUSMAN, G.J. A second look at fiber type differentiation in porcine skeletal muscle. **Journal animal Science**, v.46, p.125-132, 1978.
- BERGEN, W. G., S. E. JOHNSON, D. M. SKJAERLUND, A. S. BABIKER, N. K. AMES, R. A. MERKEL, AND D. B. ANDERSON. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **Journal Animal Science**. v.67, p.2255-2262, 1989.
- BERGSTROM, D.A.; TAPSCOTT, S.J. Molecular Distinction between Specification and Differentiation in the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, n.7, p.2404-2412, 2001.
- BOLER, D.D.; MCKEITH, F.K.; PULS, C.L.; ELLIS, M.; WOOD-FOLLIS, S.L.; MILLER, R.W.; VANIMISSETTI, H.B.; MOSELEY, W.M.; SCHROEDER, A.L.; DILGER, A.C. Effects of generic ractopamine (Engain) on the growth performance. **Professional Animal Scientist**, v.30, n.6 p.625-636, 2014.
- BOROSKY, J.C.; ROCHA, M.A.; OBA, A.; PINHEIRO, J.W.; BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. Longissimus dorsi miofibre characteristics and meat quality in four pork lines. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.1-10, 2010.
- BUCKINGHAM, H.; BAJARD, G.; CHANG, T., DAUBAS, P., HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, v.202, n.1, p.59-68, 2003.
- CANTARELLI, V.S.; FIALHO, E.T.; ALMEIDA, E.C. et al. Características da carcaça e viabilidade econômica do uso de cloridrato de ractopamina para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.844-851, 2009.

- COSSU, G.; MAVILIO, F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective. **The Journal of clinical Investigation**, v.105, n.12, p.1669-1674, 2000.
- DANTZER, V.; WINTHER, H. Histological and immunohistochemical events during placentation in pigs. **Reproduction**, Suppl. v.58, p.209-222, 2001.
- DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J.; UNDERWOOD, K.R.; ZHU, M.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal of Animal Science**, v.88 (E.suppl.), p.E51-E60, 2010.
- DUARTE, M.S.; GIONBELLI, M.P.; PAULINO, P.V.R.; SERÃO, N.V.L.; NASCIEMNTO, C.S.; BOTELHO, M.E.; MARTINS, T.S.; FILHO, S.C.V.; DODSON, M.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; DU, M. Maternal overnutrition enhances mRNA expression. Of adipogenic markers and collagen deposition in skeletal muscle of beef cattle fetuses. **Journal Animal Science**, v.92, p.3846-3854, 2014.
- EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p. 39-52, 2002.
- GARBOSSA, C.A.P.; CARVALHO JÚNIOR, F.M.; SILVEIRA, H.; FARIA, P.B.; SCHINCKEL, A.P.; ABREU, M.L.T.; CATARELLI, V.S. Effects of ractopamine and arginine dietary supplementation for sows on growth performance and carcass quality of their progenies. **Journal Animal Science** v. 93, p. 2872-2884, 2015.
- GEISERT, R.D.; YELICH, J.V. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. **Journal Reprotudcion and Fertility**, v.52, p.133-149, 1997.
- GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S. Uso de recursos genéticos nativos no mapeamento genético de suínos. **Ação Ambiental**, v.15, p.27- 28, 2001.

- GUNAWAN, A.M.; RICHERT, B.T.; SCHINCKEL, A.P.; GRANT, A.L.; GERRARD, D.E. Ractopamine induces differential gene expression. In porcine skeletal muscles. **Journal Animal Science**, v.85, p.2115-2124, 2007.
- HALSEY, C. H. C.; WEBER, P. S.; REITER, S. S.; STRONACH, B. N.; BARTOSH, J. L.; BERGEN, W. G. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 89 n.4, p.1011-1019, 2011.
- HANDEL, S.E.; STICKLAND, N.C. Catch-up growth in pigs: a relationship with muscle cellularity, **Journal of Animal Production**. v.7, n.4, p. 291-295, 1988.
- HAUACHE, O.M. Receptores Acoplados à proteína G: Implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia** v.45, n.3, p.228-239, 2001.
- HOSHI, E.H.; FONSECA, N.A.N.; PINHEIRO, J.W.; BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. Muscle fiber number and growth performance of pigs from sows treated with ractopamine. **Journal Animal of Science**, v.18, n.10, p.1492-1497, 2005a.
- HOSHI, E.H.; FONSECA, N.A.N.; PINHEIRO, J.W.; MARÇAL, W.S.; SILVA, C.A. Effects of the use of ractopamine in pregnant sows on reproductive and blood parameters. **Journal of Agricultural Research**, v.3, n.2, p.213-219, 2005b.
- HUTCHESON, D.A.; ZHAO, J.; MERRELL, A.; HALDAR, M.; KARDON, G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for b-catenin. **Genes & Development**, v. 23, p. 997-1013, 2009.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2013, 524p.

- KIM, Y.S.; SAINZ, R.D.; FERLAZZO, J. et al., Effect of maternal administration of salbutamol to sows on postnatal growth and carcass characteristics in the progeny. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.45, n.2, p.271-278, 1994.
- KOLLIAS, H.D; MCDERNOTT, J.C. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied. Physiology** 104:579-587, 2008.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M M. **Principles of biochemistry** 2Ed. Worth, New York. 1993, 1013p.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene Expression data using Real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. **Methods**, v.24, p.402-408, 2001.
- MERSMANN, H.J. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. **Journal of Animal Science**, v.80, n.1, p.24-29, 2002.
- MERSMANN, H.J. Overview of the effects of β -adrenergic agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, v.76, p.160-172, 1998.
- MESSINA, G.; COSSU, G. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. **Genes Development**, v.23, p.902-905, 2009.
- MILLS, S.E. Biological basis of the ractopamine response. **Journal of animal Science**, Champaign, v.77, n.3, p.611-621, 1999.
- MILLS, S.E. Implications of feedback regulation of beta-adrenergic signaling. **Journal of animal Science**, Champaign, v.80, suppl. 1, p. E30-E35, 2002.
- MILLS, S.E.; KISSEL, J.; BIDWELL, C.A.; SMITH, D.J. Stereoselectivity of porcine B-adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. **Journal of Animal Science**, v.81, n.1, p.122-129, 2003.

- MILLS, S.E.; LIU, C.Y.; SCHINCKEL, A.P. Effects of ractopamine on adipose tissue metabolism and insulin binding in finishing hogs. Interaction with genotype and slaughter weight. **Domestic animal Endocrinology**. v.7, p.251-264, 1990.
- MOODY, D.E.; HANCOCK, D.L.; ANDERSON, D.B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: Mello, J.P.F.D. (Ed.). Farm animal metabolism and nutrition. New York: CAB, p.65-95, 2000.
- MOURA P.R; VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre a proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.
- MOYSES, C.D.; SCHULTE, P.M. 2010. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2ª.Ed. Artmed. 756p.
- MURÁNI, E.; MURANIOVA, M.; PONSUKSILI, S.; SCHELLANDER, K.; WIMMERS, K. Identificação de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento pré-natal de músculo esquelético em duas raças de suínos em diferentes musculosidade. **BMC Development Biology**, v.7, n.109, 2007.
- PARKER, M.H.; SCALE, P.; RUDNICKI, M.A. Looking back to the embryo defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.497-507, 2003.
- PAULK, C.B.; TOKACH, M.D.; NELSEN, J.L.; BURNETT, D.D.; VAUGHN, M.A.; PHELPS, K.J.; DRITZ, S.S.; DEROCHEY, J.M.; GOODBAND, R.D.; WOODWORTH, J.C.; HOUSER, T.A.; HAYDON, K.D.; GONZALEZ, J.M.. Effect of dietary zinc and ractopamine hydrochloride on pork chop muscle fiber type distribution, tenderness, and color characteristics. **Journal Animal Science**, v.92, p. 2325-2335, 2014.
- PERRY, R.S.R.; RUDNICKI, M.A. Myogenic Determination and Differentiation. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.750-767, 2000.

- PINTO, W.J.; GUIDA-CARDOSO, S.M.; Areas, M.A. Fisiologia dos adrenoreceptores cardíacos. **Revista de Ciências Médicas, Campinas**, v.14, n.1 p.77-96, 2005.
- QUINIQU N.; DAGORN, J.; GAUDRÉ, D. Variation of piglet's birth weight and consequences on subsequent performance. **Livestock Production Science**. v.78, p.63-70, 2002.
- REED, S.A.; RAJA, J.S.; HOFFMAN, M.L.; ZINN, S.A.; GOVONI, K.E. Poor maternal nutrition inhibits muscle development in ovine offspring. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v.5, n.43, p122-132, 2014.
- REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; DIETL, G.; ENDER, D. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science** v. 66, p.177-188, 2000.
- REHFLDAT, C.; NISSEN, P.M.; KUHN, G.; VESTERGAARD, M. ENDER, K.; OKBJERG, N. Effects of maternal nutrition and porcine growth hormone (pGH) treatment during gestation on endocrine and metabolic factors in sows, fetuses and pigs, skeletal muscle development, and postnatal growth. **Dom. Anim. End.** v.27, p.267-285, 2004.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição dos alimentos e exigências nutricionais 3 ed. Viçosa, MG: UFV, 2001, 252p.
- SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v.57, n.1, p.16-25, 2000.
- SANCHES, J.F.; KIEFER, C.; MOURA, M.S.; SILVA, C.M.; LUZ, M.F.; CARRIJO, A.S. Níveis de ractopamina para suínos machos castrados em terminação e mantidos sob conforto térmico. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.403-408, 2010.

SARCINELLI, M.F.; VENTURINI, K.S.; SILVA, L.C. Produção de Suínos – Tipo Carne. Coletim Técnico – PIE-UFES:00507, 2007.

SAS/STAT. **User's guide**. Versão 9.3. Cary: SAS Institut Inc., 2009.

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

SAVAGE, J.; CONLEY, A.; BLAIS, A.; SKERJANC, I.S. SOX15 and SOX17 differentially regulate the myogenic program in P19 cells. **Stem Cells**, v.27, p.1231-1243, 2009.

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

SILVA B.V., HORTA B.A.C, ALENCASTRO R.B., et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**. v.32, p.453-62, 2009.

SILVA, C.A. Aspectos da relação desenvolvimento pre-natal sobre o peso ao nascimento e o crescimento pós-natal em suínos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.16-24, 1999.

SILVA, R.A.M.; PACHECO, G.D.; AGOSTINI, P.S.; VINOKUROVAS, S.L.; OLIVEIRA, E.R.; GAVIOLI, D.F.; LOZANO, A.P.; BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. Desempenho, qualidade de carcaça e carne de suínos alimentados com dietas contendo antioxidantes e ractopamina. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.3971-3982, 2013.

- SMITH, C. K., II, D. E. LEE, L. L. COUTINHO. Quantitative analysis of the selectivity of ractopamine for β -adrenergic receptor subtypes. **Journal Animal Science**, v.68(Suppl. 1), p.284, 1990.
- SMITH, D. J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β - adrenergic agonists in livestock. **Journal Animal Science**, v.76, p.173–194, 1998.
- STEIBEL, J.P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M.; A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v.94, n.2 p.146-152, 2009.
- TANG, Z.; LI, Y.; WAN, P.; LI, X.; ZHAO, S.; LIU, B.; FAN, B.; ZHU, M.; YU, M.; LI, K. LongSAGE analysis of skeletal muscle at three prenatal stages in Tongcheng and Landrace pigs Análise. **Genoma Biology**, v.8, n.6, R115, 2007.
- TE PAS, M.F.W.; DE WIT, A.A.W.; PRIEM, J.; CAGNAZZO, M.; DAVOLI, R.; RUSSO, V.; POOL, M.H. Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.26, p.157-165, 2005.
- THOMPSON, F.N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: Reece, W.O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 926p.
- TONG, J.F.; YAN, X.; ZHU, M.J.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ, P.W.; DU, M. Maternal obesity downregulates myogenesis and β -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *Am Journal Physiol Endocrinol Metab*, v.296, p.E917-E924, 2009.
- WANG, J.; CHEN, L.; LI, D.; YIN, Y.; WANG, X.; LI, P.; DANGOTT, L.J.; HU, W.; WU, G. Intrauterine Growth Restriction Affects the Proteomes of the Small Intestine, Liver, and Skeletal Muscle in Newborn Pigs. **Journal of Nutrition**, v.138, p.60-66, 2008.

- WATKINS, L.E.; JONES, D.J.; MOWREY, D.H.; ANDERSON, D.B.; VEENHUIZEN, E.L. The effect of various levels of ractopamine hydrochloride on the performance and carcass characteristics of finishing swine. **Journal of Animal Science**, v.68, p.3588-3595, 1990.
- WIGMORE, P.M.C.; STICKLAND, N.C. Muscle development in large and small pig fetuses. **Journal of Anatomy**, v.137, n2, p.235-245, 1983.
- WIMMERS, K.; NGU, N.T.; JENNEN, D.G.J.; TESFAYE, D. MURANI, E.; SCHELLANDER, K.; PONSUKSILI, S. Relationship between myosin heavy chain isoform expression and muscling in several diverse pig breeds. **Journal of Animal Science**, v.86, n.4, p.795-803, 2008.
- WSPA BRASIL, SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO ANIMAL. Abate humanitário de suínos/ LUDTKE, C.B.; CIOCCA, J.R.P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P.C.; VILELA, J.A.; COSTA, O.A.D. Rio de Janeiro: WSPA, 2010, 132p.
- WU, G.Y.; BAZER, F.W.; WALLACE, J.M.; SPENCER, T.E. Board invited review: Intrauterine growth retardation, implications for the animal sciences. **Journal Animal Science**, v.84, 16-37, 2006.
- YAN, X.; ZHU, M.; DODSON, M.V., DU, M. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. **Journal of Genomics**, 1:29-38, 2013.
- ZHAO, X.; DELIN, M.; ANNING, L.; GONG, W.; XIAO, S.; ZHANG, Y.; QIN, L.; NIU, Y.; GUO, Y.; LIU, X.; CONG, P.; ELE, Z.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, Y. Comparative analyses by sequencing of Transcriptomes during Skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. **Plos One**. v.6, n.5, e19774, 2011.
- ZHU, M.J.; HAN, B.; TONG, J.; MA, C.; KIMZEY, J.M.; UNDERWOOD, K.R.; XIAO, Y.; HESS, B.W.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ, K.R.; DU, M. AMP-activated

protein kinase signalling pathways are down regulated and skeletal muscle development impaired in fetuses of obese, overnourished sheep. **Journal of Physiology** v.586, n.10, p.2651-2664, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da comissão de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa CEUAP/UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900 - Telefone: (31) 3899.3275 - e-mail: ceuap@ufv.br - site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 17/04/2014

CERTIFICADO

A comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa certifica que o **processo n° 16/2014**, intitulado **“Efeito da ractopamina em dietas de fêmeas suínas gestantes no desenvolvimento muscular e na qualidade da carne da progênie”**, coordenado pelo **prof(a). Alysson Saraiva**, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em **15/Abr/2014**.

CERTIFICATE

The ethic commission in use of production animals of universidade federal de viçosa certifies that the **process number 16/2014**, named **“Effect of ractopamine in the diet of pregnant sows on muscle development and meat quality of the progeny”**, coordinated by **prof(a). Alysson Saraiva**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and with actual Brazilian legislation, and was approved by this commission on **Apr, 15th, 2014**.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mário Luiz Chizzotti'.

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV

Anexo B - Tabela 2 Resultados das análises estatísticas para cada contraste para os genes ADRB2 e Myod 1.

Contrastes	$\Delta\Delta Ct$	Fold Change	Erro Padrão	Pvalor
ADRB2				
genotipo:1-2	2.1224	4.354176833	0.7168	0.0084
sexo:1-2	-0.6073	-1.52340549	0.7168	0.408
genotipo:1-2 sexo=1	1.8179	3.525676242	1.0137	0.0897
genotipo:1-2 sexo=2	2.4269	5.377367233	1.0137	0.0278
sexo:1-2 genotipo=1	-0.9118	-1.881391381	0.9665	0.358
sexo:1-2 genotipo=2	-0.3028	-1.233536154	1.0587	0.7781
MYOD1				
genotipo:1-2	-0.9495	-1.931203238	0.6246	0.148
sexo:1-2	-0.05331	-1.037642877	0.6246	0.933
genotipo:1-2 sexo=1	-0.6229	-1.539967602	0.8834	0.4908
genotipo:1-2 sexo=2	-1.276	-2.421666168	0.8834	0.1679
sexo:1-2 genotipo=1	0.2733	1.208569132	0.7901	0.734
sexo:1-2 genotipo=2	-0.3799	-1.301251656	0.9677	0.6998

* genótipo 1: Piau; genótipo 2: Comercial; sexo 1: macho, sexo 2: fêmea.

Anexo B - Tabela 3 Resultados das análises estatísticas para cada contraste para os genes da cadeia pesada da miosina MyHC (MYHC IIA), (MYHC IIB), (MYHC I) (MYHC 2x).

Comparação	$\Delta\Delta Ct$	Fold Change	Erro Padrão	Pvalor
MYHCIIA				
genotipo:1-2	-0.879	-1.8391	0.4062	0.0416
sexo:1-2	-0.2158	-1.16135	0.4062	0.6006
genotipo:1-2 sexo=1	-1.0743	-2.1057	0.5933	0.0839
genotipo:1-2 sexo=2	-0.6837	-1.60625	0.555	0.231
sexo:1-2 genotipo=1	-0.411	-1.32961	0.555	0.4667
sexo:1-2 genotipo=2	-0.0205	-1.01431	0.5933	0.9727
MYHCIIB				
genotipo:1-2	0.02283	1.01595	0.376	0.9521
sexo:1-2	-0.549	-1.46307	0.376	0.1583
genotipo:1-2 sexo=1	-0.2724	-1.20782	0.5491	0.6248
genotipo:1-2 sexo=2	0.3181	1.246688	0.5137	0.5421
sexo:1-2 genotipo=1	-0.8442	-1.79527	0.5137	0.1145
sexo:1-2 genotipo=2	-0.2537	-1.19226	0.5491	0.6486
MYHC CI				
genotipo:1-2	0.07926	1.056476	0.3848	0.8387
sexo:1-2	0.1651	1.121244	0.3848	0.6721
genotipo:1-2 sexo=1	-0.07517	-1.05349	0.562	0.8948
genotipo:1-2 sexo=2	0.2337	1.175847	0.5257	0.661
sexo:1-2 genotipo=1	0.01065	1.007409	0.5257	0.984
sexo:1-2 genotipo=2	0.3195	1.247898	0.562	0.5754
MYHC 2x				
genotipo:1-2	-1.3379	-2.52783	0.3611	0.0012
sexo:1-2	-0.2473	-1.18698	0.3611	0.5007
genotipo:1-2 sexo=1	-1.6522	-3.14313	0.5275	0.0048
genotipo:1-2 sexo=2	-1.0237	-2.03313	0.4934	0.0499
sexo:1-2 genotipo=1	-0.5615	-1.4758	0.4934	0.2673
sexo:1-2 genotipo=2	0.067	1.047536	0.5275	0.9001

* genótipo 1: Piau; genótipo 2: Comercial; sexo 1: macho, sexo 2: fêmea.

Anexo C - Tabela 4 Médias para variável força de cisalhamento (kgf).

Grupo Genético		
Piau	Comercial	Pvalor
3.2591±0.3454	3.3368±0.2449	0.85
Sexo		
Macho	Fêmea	
3.3065±0.2203	3.2893±0.2231	0.89

Anexo C - Tabela 5 Médias para variável extrato etéreo (%MS).

Grupo Genético		
Piau	Comercial	Pvalor
3.2956±0.5701	4.0162±4.0162	0.31
Sexo		
Macho	Fêmea	
3.9168±0.409	3.395±0.4301	0.28