

SANDRA HELENA INOUE ODA

**VARIAÇÕES MOLECULARES DO GENE
CODIFICADOR DA PROTEÍNA RECEPTORA DE
RIANODINA E A OCORRÊNCIA DE CARNES PSE
(*Pale, Soft, Exudative*) EM FRANGOS**

Londrina

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SANDRA HELENA INOUE ODA

**VARIAÇÕES MOLECULARES DO GENE
CODIFICADOR DA PROTEÍNA RECEPTORA DE
RIANODINA E A OCORRÊNCIA DE CARNES PSE
(*Pale, Soft, Exudative*) EM FRANGOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina como cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Massami
Shimokomaki.

Londrina

2006

Oda, Sandra Helena Inoue.

Variações moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e a ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos / Sandra Helena Inoue Oda. - Londrina, PR : 2006.

f.

Orientador: Dr. Massami Shimokomaki.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina.

Bibliografia: 167 f.

1.PSE. 2.Frango. 3.Expressão gênica. I.. II. Universidade Estadual de Londrina.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Embrapa Soja

Profa. Dra. Alice Murakami
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Amauri Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Sandra Helena Prudêncio-Ferreira
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 04 de agosto de 2006

DEDICATÓRIA

*Ao meu amado Thomaz,
Morada de minha Alma e
Expressão Maior da minha Felicidade.*

*A meus pais, Teruo e Kikue,
Elementos essenciais nesta trajetória
e meus eternos Exemplos de Vida.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Massami Shimokomaki,
Exemplo do Amor e Prática da Ciência pelo Conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki, pela orientação, amizade, confiança e motivação, minha eterna e profunda gratidão, e o respeito pelo grande profissional.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, da Embrapa Soja, pela oportunidade, valiosa orientação e por sua generosidade em partilhar sempre suas idéias e amplos conhecimentos em Genética Molecular.

Ao CNPq, Fundação Capes, PRODETAB/EMBRAPA e Fundo Bunka de Apoio a Pesquisa, pelo suporte financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Mônica Correa Ledur, da Embrapa Suínos e Aves, que nos recebeu em seu grupo de pesquisa, pelo apoio e sugestões.

Ao Dr. Gale M. Strasburg, da MSU, pela receptividade, acolhida e oportunidade.

A Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, da Embrapa Soja, por sua dedicação, gentileza e contribuição.

Ao Dr. Jorge Antonio Ferreira de Lara, que iniciou esta linha de pesquisa em nosso grupo, por sua solicitude de sempre e gentileza.

A Silvana R. R. Marin, do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja, cuja dedicação e conhecimento técnico são admiráveis. Muito obrigada.

Pelo aprendizado adquirido e discussões tão importantes, convivência e lembranças queridas, agradeço a todos e a cada um dos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja, em especial, as *pretenders* Renata Stolf, Magda Beneventi Lizandra Catelli e Noelle G. Lemos, aos sempre doces César, Dr. Naoki Yamanaka e Verinha, Renata Fuganti, Dr. Eliseu Binneck, Águida, Danielle, Livia, Nilson Vieira, Adriana Polizel, André, Selma e Camila.

A Universidade Estadual de Londrina, aos Professores e Funcionários do TAM e amigos da Equipe do Prof. Massami Shimokomaki, pela acolhida e oportunidade de crescimento proporcionado, e auxílio técnico.

Aos meus pais, meus queridos irmãos Marcio e André, a minha doce cunhada Patrícia, e ao meu adorável sobrinho Guilherme, pelo amor incondicional.

Ao Thomaz, por todo o seu amor e dedicação em minha Vida, ensinando-me e

sempre me demonstrando que “Deus mora nos detalhes” (Mies Van Der Rohe).

A todos que, com boa intenção, colaboraram para realização e finalização desta Tese.

A Deus, pela graça da Vida!

*S e as coisas são inatingíveis...
Ora! não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a mágica presença das estrelas!*

Mário Quintana

ODA, S.H.I. **Variações moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e a ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos.** 2006. 167 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram: identificar variações na seqüência genômica da α -RyR de uma população de frangos desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves; avaliar diferenças nos níveis de expressão dos genes α -ryr e β -ryr em duas linhagens de frangos diferentes, possivelmente relacionadas à ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*); e avaliar diferenças de atributos sensoriais entre filés de peito (*P. major*) PSE ($L^*_{24h} > 53,0$ e $pH_{24h} < 5,8$) e Normais ($44,0 \leq L^*_{24h} \leq 53,0$). Na primeira etapa, o DNA foi extraído a partir de amostras de sangue coletadas no abate, de 10 indivíduos previamente selecionados que apresentaram carne PSE e outros 10 que resultaram em carne normal. Desenharam-se 3 conjuntos de *primers* para exons hipotéticos do domínio *pfam 00520*, da α -RyR. Os produtos de PCR foram purificados e as seqüências comparadas com a base de dados BLAST. As estruturas primárias dos fragmentos obtidos foram preditas no mesmo programa. Não foram encontradas alterações nos 313 nucleotídeos avaliados. A segunda etapa, consistiu da avaliação através de PCR em tempo real (RT-PCR), da diferença na expressão dos genes α -ryr e β -ryr em peitos de frango PSE e Normais. Foram abatidos 204 frangos de duas linhagens diferentes (corte - TT, e postura - CC), classificados segundo parâmetros de cor e pH, descritos anteriormente. Foram então selecionados 4 indivíduos de cada linhagem para esta análise. Os níveis de expressão observados através da Quantificação Relativa (RQ) foram inferiores ($P < 0,05$) para o gene β -ryr em frangos PSE das duas linhagens quando comparadas aos frangos Normais, por outro lado, não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão do gene α -ryr, independentemente da linhagem. Considerando-se as propriedades de cada canal iônico, os resultados de RQ do gene da α -RyR indicariam, em músculos (*P. major*) PSE de frangos, um aumento da proporção (1:1) da α -RyR/ β -RyR normalmente encontrada em aves. A expressão diferenciada desta isoforma, poderia acarretar em aumento da disponibilidade de Ca^{2+} citosólico e, finalmente, à ocorrência da anomalia PSE, sem entretanto que haja uma correlação aparente. No terceiro experimento, a avaliação sensorial foi realizada empregando a metodologia Comparação Pareada-Preferência em filés de frango PSE e Normais, utilizando-se de 40 provadores. Outros itens avaliados, foram: Cor (CIELAB), pH, para caracterização de PSE e Normais seguindo parâmetros estabelecidos neste laboratório, Perda de Peso por Cozimento (PPC), Força de Cisalhamento (FC) e Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI). Os resultados demonstraram que a coloração dos filés *in natura* PSE é diferenciada da coloração dos filés Normais e, embora após a cocção, os filés PSE tenham apresentados maciez inferior ($P < 0,05$) em relação aos Normais, não foram encontradas preferências significativas para os atributos de textura (mastigabilidade, maciez, suculência) avaliados.

Palavras-chave: PSE; filés de frango; proteína receptora de rianodina.

ODA, S.H.I. **Molecular variations in ryanodine receptor coding sequence and the PSE (Pale, Soft, Exudative) chicken meat occurrence.** 2006. 167 p. Thesis (Doctor of Food Science) – Londrina State University.

ABSTRACT

The objectives of this work were: to identify differences in the genomic sequence of $\hat{\alpha}$ -RyR in a chicken population developed by EMBRAPA Swine and Poultry; to identify variations in $\hat{\alpha}$ and $\hat{\alpha}$ -ryr gene expression levels possibly related to chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat occurrence and also, to determine differences in sensory attributes between PSE ($L^*_{24h} > 53.0$ and $pH_{24h} < 5.8$) and Non-PSE ($44.0 < L^*_{24h} < 53.0$) chicken breast (*P. major*) fillets. In the first step, DNA was extracted from blood samples collected at the slaughtering step, from 10 PSE and 10 Non-PSE chickens. A total of 3 PCR primers were designed to hypothetical exons of pfam 00520 domain sequence, from $\hat{\alpha}$ -RyR. The PCR product sequences were purified and the sequences were compared to the BLAST data base. The primary structures were predicted and compared by the same program. There was no alteration in the 313 nucleotides evaluated. In the second step, differences in $\hat{\alpha}$ and $\hat{\alpha}$ -ryr gene expression levels, by real-time RT-PCR approach, were evaluated in chicken breast PSE and Non-PSE. A total of 204 chickens, from two lines (broiler – TT and layers – CC), was slaughtered. Then, 8 chickens, being 4 PSE and 4 Non-PSE from each line were selected for this analysis. The gene expression levels checked by Relative Quantification (RQ) means, were lower ($P < 0.05$) for $\hat{\alpha}$ -ryr gene in PSE chickens from both lines when compared to non-PSE chickens. There was no differences ($P > 0.05$) in $\hat{\alpha}$ -ryr gene expression regardless of line studied. Considering that each ion channel present distinct properties, the $\hat{\alpha}$ -ryr RQ results would indicate that, in PSE chicken muscles (*P major*) there was an alteration at the regular ratio (1:1) of $\hat{\alpha}$ -RyR/ $\hat{\alpha}$ -RyR normally found in avian muscles. The differential expression of this isoform could result in a feasible increased Ca^{2+} availability at the cell milieu. In the third step, sensory evaluations were done by Paired Comparison between Non-PSE and PSE breast chicken fillets. Other items evaluated were: Color (CIELAB), pH, Cooking Loss, Shear Force and Myofibrillar Fragmentation Index (MFI). The color intensity evaluation in Normal fillets was considered higher ($P < 0.05$) in relation to PSE fillets in natura. Although, after cooking the PSE fillets showed decreased tenderness ($P < 0.05$) in relation to Normal fillets, there were no differences ($P > 0.05$) in texture attributes preferences evaluated.

Key-words: PSE; chicken fillets; ryanodine receptor protein.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito do pH final na coloração da carne	10
FIGURA 2 - Componentes da fibra muscular esquelética	20
FIGURA 3 - Mecanismo de excitação-contração muscular do músculo esquelético de aves	23
FIGURA 4 - Estrutura tri-dimensional da RyR1 e principais domínios estruturais	26
FIGURA 5 - Etapas envolvidas na expressão dos canais iônicos	34
FIGURA 6 - Esquema representativo das etapas que constituem cada ciclo de amplificação na reação de PCR.....	36
FIGURA 7 - Sistema <i>SYBR Green</i>	39
FIGURA 8 - Curva de amplificação da PCR em tempo real.....	41
FIGURA 9 - Domínios específicos do gene <i>â-ryr</i> , de <i>Gallus gallus</i> (GI:46048743).....	57
FIGURA 10 - Seqüências contíguas do <i>â-ryr</i> de <i>Gallus gallus</i>	58
FIGURA 11 - Gel de agarose 1% para verificação de qualidade do RNA total da musculatura peitoral	65
FIGURA 12 - Distribuição das amostras e reagentes do <i>Master Mix</i> na placa de 96 poços para análise por PCR em tempo real	68
FIGURA 13 - Produtos de PCR para o fragmento 3ryr3	82
FIGURA 14 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 1 – <i>pFam 00520</i> em gel de agarose 1% (amostras PSE).....	89
FIGURA 15 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 2 – <i>pFam 00520</i> em gel de agarose 1% (amostras Normais).....	89
FIGURA 16 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 3 – <i>pFam 00520</i> em gel de agarose 1% (amostras Normais).....	90
FIGURA 17 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 4 – <i>pFam 00520</i> em gel de agarose 1% (amostras PSE).....	90
FIGURA 18 - Diagrama dos fragmentos estudados do gene da proteína receptora de rianodina (<i>â-RyR</i>).....	96
FIGURA 19 - Correlação entre os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} das amostras de carnes de frango PSE e Normais	100

FIGURA 20 - Resultado da amplificação por PCR em tempo-real do gene α -ryr.....	101
FIGURA 21 - Resultado da amplificação por PCR em tempo-real do gene $\hat{\alpha}$ -ryr.....	102
FIGURA 22 - Resultado da amplificação por PCR em tempo-real do gene $\hat{\alpha}$ -actina.....	103
FIGURA 23 - Curvas de <i>melting</i> do produto amplificado para o gene α -ryr.....	103
FIGURA 24 - Curvas de <i>melting</i> do produto amplificado para o gene $\hat{\alpha}$ -ryr.....	104
FIGURA 25 - Curvas de <i>melting</i> do produto amplificado para o gene $\hat{\alpha}$ -actina.....	104
FIGURA 26 - Gel de agarose 1% para verificar a especificidade de amplificação dos primers α -ryr, $\hat{\alpha}$ -ryr e $\hat{\alpha}$ -actina	106
FIGURA 27 - Correlação entre os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} das amostras de carnes de frango PSE e Normais	111
FIGURA 28 - Gel de SDS-PAGE com amostras de CSR extraídos de <i>Pectoralis major</i> de perus	118
FIGURA 29 - Gel de SDS-PAGE com amostras de CSR	119
FIGURA 30 - Gel de SDS-PAGE com amostras de <i>kettin</i> , CSR de suínos e perus	120
FIGURA 31 - Gel de poliácridamida com amostras de proteínas extraídas do RS e submetidas à solubilização	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentrações e volumes dos reagentes empregados na PCR.....	46
TABELA 2 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do fragmento 3ryr3 do gene <i>â-ryr</i> de frangos.....	46
TABELA 3 - Seqüência de nucleotídeos que compõe o domínio <i>pFam 00520</i>	59
TABELA 4 - <i>Primers</i> desenhados para os exons hipotéticos do domínio <i>pFam 00520</i> contidos no contig gb[AADN01003326.1].....	59
TABELA 5 - Concentrações e volume dos reagentes empregados na PCR.....	60
TABELA 6 - <i>Primers</i> selecionados para os genes <i>á-ryr</i> , <i>â-ryr</i> e <i>â-actina</i>	66
TABELA 7 - Concentrações e volume dos reagentes empregados na solubilização de proteínas do RS	77
TABELA 8 - Seqüências concensos dos contigs obtidos no fragmento 3ryr3.....	83
TABELA 9 - Seqüência de DNA do fragmento 3ryr3 comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743)	84
TABELA 10 - Tradução em aminoácidos – Blastx para o fragmento 3ryr3 das amostras que apresentaram alterações nas seqüências de nucleotídeos	86
TABELA 11 - Classificação das amostras de carne de frango normais e PSE da população F3 utilizadas na análise de seqüenciamento	88
TABELA 12 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 1, do gene <i>â-ryr</i> , comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743)	92
TABELA 13 - Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 1	92
TABELA 14 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 2 que apresentou uma alteração na posição de uma base, do gene <i>â-ryr</i> , comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743)	93
TABELA 15 - Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 2 da amostra que apresentou alteração na seqüência de nucleotídeos	93
TABELA 16 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 3, do gene <i>â-ryr</i> , comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743)	94

TABELA 17 - Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 3 das amostras que apresentaram alterações na seqüência de nucleotídeos	95
TABELA 18 - Médias e erros-padrão da expressão dos genes <i>á-ryr</i> e <i>â-ryr</i> em músculo <i>Pectoralis major</i> de frangos de duas linhagens (TT e CC).....	107
TABELA 19 - Médias e erros-padrão dos valores de L*, a* e b* _{24h} e pH _{24h} encontrados em peitos de frango	110
TABELA 20 - Médias e erros-padrão dos valores do exsudato e perda de peso por cozimento (PPC) encontrados em filés de peito de frango	113
TABELA 21 - Médias e erros-padrão dos valores de <i>Drip Loss</i> , PPC, FC e MFI em filés de peito de frango	115
TABELA 22 – Dados sobre as extrações de proteínas do RS	117

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Qualidade da Carne de Aves.....	5
2.2 Fatores que Influenciam a Qualidade de Carnes	5
2.3 Transformação do Músculo em Carne	6
2.4 Determinação da Qualidade da Carne.....	9
2.4.1 Cor	9
2.4.2 Maciez.....	11
2.4.3 Perda de peso por cozimento (PPC).....	13
2.5 Análise Sensorial.....	14
2.6 Anomalias Encontradas em Carnes.....	14
2.7 Carne PSE em Aves.....	16
2.8 O Mecanismo de Excitação-Contração (EC) Muscular	19
2.9 O mecanismo de EC Muscular de Aves	21
2.10 Proteínas Receptoras de Rianodina (RyR).....	23
2.11 Mutações na RyR.....	27
2.12 Melhoramento Genético	29
2.13 Conseqüências da Seleção Genética em Frangos Comerciais	30
2.14 Processo e Regulação da Expressão Gênica.....	31
2.15 PCR.....	35
2.16 PCR em Tempo Real.....	37
2.16.1 A técnica.....	37
2.16.2 Formas de detecção do sinal de fluorescência	37
2.16.3 Níveis de expressão (RQ).....	39
2.16.4 <i>Melting curve</i>	41
2.16.5 Análise dos dados na PCR em tempo real.....	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Etapa 1: Extração de DNA das Aves Parentais (F₀), Amplificação	

por PCR e Seqüenciamento do Fragmento 3ryr3.....	44
4.1.1 Matéria-prima.....	45
4.1.2 PCR.....	45
4.1.3 Separação e purificação das bandas.....	47
4.1.4 Clonagem.....	47
4.1.5 Reação de ligação.....	48
4.1.6 Eletroporação e plaqueamento de células competentes.....	48
4.1.7 Extração do DNA plasmidial.....	49
4.1.8 Digestão.....	51
4.1.9 Eletroforese.....	51
4.1.10 Seqüenciamento.....	51
4.1.10.1 PCR.....	52
4.1.10.2 Precipitação alcoólica do DNA.....	52
4.1.10.3 Separação dos fragmentos amplificados.....	53
4.1.10.4 Análises dos resultados.....	53
4.2 Etapa 2: Seqüenciamento do Produto de PCR do Domínio <i>pFam 00520</i>.....	54
4.2.1 Matéria-prima.....	54
4.2.2 Determinação de carne PSE.....	54
4.2.3 Medida do pH <i>post mortem</i>	55
4.2.4 Análise de cor (L*, a*, b*).....	55
4.2.5 Extração de DNA.....	56
4.2.6 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos <i>primers</i>	56
4.2.7 PCR.....	59
4.2.8 Separação e purificação das bandas.....	60
4.2.9 Seqüenciamento.....	61
4.2.9.1 PCR.....	61
4.2.9.2 Precipitação alcoólica do DNA.....	62
4.2.9.3 Separação dos fragmentos amplificados.....	62
4.2.9.4 Análise dos resultados.....	63
4.3 Etapa 3: Análise da Expressão dos Genes <i>á-ryr</i> e <i>â-ryr</i> em Duas Linhagens de Frangos.....	63
4.3.1 Matéria-prima.....	63
4.3.2 Abate.....	64
4.3.3 Análise de pH.....	64
4.3.4 Análise de cor (L*, a*, b*).....	64
4.3.5 Extração de RNA total.....	65
4.3.6 Isolamento do RNA mensageiro.....	66
4.3.7 Primers.....	66
4.3.8 PCR em tempo real.....	67

4.3.9 Análise estatística	69
4.4 Etapa 4: Análise Sensorial de Filés de Peito de Frango PSE e Normais	70
4.4.1 Condições ambientais e experimentais	70
4.4.2 Cor	70
4.4.3 pH	71
4.4.4 Perda de peso por cozimento (PPC)	71
4.4.5 Análise sensorial.....	72
4.4.6 Perda de umidade no descongelamento (<i>Drip Loss</i>)	72
4.4.7 Textura instrumental.....	73
4.4.8 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)	73
4.4.9 Análise estatística	74
4.5 Etapa 5: Ensaio para Separação das Isoformas α-RyR e $\hat{\alpha}$-RyR por imunoprecipitação	75
4.5.1 Extração de proteínas do retículo sarcoplasmático (RS).....	76
4.5.2 Solubilização das proteínas do RS	77
4.5.3 Géis de agarose e de poliacrilamida.....	78
4.5.4 <i>Western blotting</i>	78
4.5.5 Ensaio de imunoprecipitação.....	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Etapa 1	81
5.1.1 Análise da eletroforese em gel de agarose 1%	81
5.1.2 Análise de seqüenciamento e da estrutura primária do fragmento 3ryr3.....	82
5.2 Etapa 2	86
5.2.1 Extração do DNA	86
5.2.2 Análise da eletroforese em gel de agarose 1%	87
5.2.3 Análise de seqüenciamento e da estrutura primária dos fragmentos estudados no gene da $\hat{\alpha}$ -RyR.....	91
5.3 Etapa 3	98
5.3.1 Determinação de carne PSE: Análises do valor L^*_{24h} e de pH_{24h}	98
5.3.2 Extração de RNA total.....	100
5.3.3 PCR em tempo real.....	100
5.3.4 Análise de expressão dos genes α -ryr, $\hat{\alpha}$ -ryr e $\hat{\alpha}$ -actina	105
5.4 Etapa 4	110
5.4.1 Cor (L^* , a^* e b^*) e pH 24h <i>post mortem</i>	110
5.4.2 Medida do exsudato e da perda de peso por cozimento (PPC)	112
5.4.3 Análise sensorial.....	113
5.4.4 Perda de umidade no descogelamento (<i>Drip Loss</i>), PPC, força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI).....	114
5.5 Etapa 5	116

6 CONCLUSÕES	123
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXO I.....	146
ANEXO II.....	147
ANEXO III.....	149
ANEXO IV	150
ANEXO V	152
ANEXO V	153
ANEXO VII.....	154
ANEXO VIII.....	156
ANEXO IX	159

1 INTRODUÇÃO

De janeiro a novembro de 2005 foram produzidas no Brasil 8.463.080 t de carne de frango, das quais 2.524.950 t foram exportadas em suas várias formas de comercialização (corte, inteiro e industrializado). Estes valores representaram um aumento de 14,92 % no volume embarcado em relação ao mesmo período do ano anterior (AVEWORLD, 2006). A causa principal do aumento expressivo dos números da produção e da exportação brasileira nesse período foi decorrente de problemas sanitários (BSE, *influenza* aviária, moléstias suínas) que estiveram presentes em países concorrentes do Brasil, tais como Japão, Tailândia, China, Indonésia, Coréia do Sul, Malásia, Hong-Kong, Paquistão e Estados Unidos (MULDER, 2005).

Os números relativos ao consumo de carne de frango no mercado interno brasileiro também mostraram aumento expressivo no mesmo ano, com um crescimento total de 4,69 % (ABEF, 2006). Esta expansão foi estimulada pelas dietas de baixo carboidrato, com a opção dos consumidores pela carne de frango, associada a aspectos de saúde e conveniência. O fato da carne de frango não ser submetida a nenhuma restrição religiosa, como as carnes bovina e suína, contribuiu de maneira significativa para o aumento de seu consumo (MULDER, 2005).

É importante lembrar que a indústria avícola nacional é integrada verticalmente e que apresenta alta competitividade tecnológica. Contribuem para isso, os baixos custos relativos da produção de rações e também de mão-de-obra no Brasil. Segundo o USDA (2005), os custos de produção no país de um frango inteiro e eviscerado são os mais baixos do mundo (US\$ 0,48/ kg).

O aumento no consumo de produtos processados evidenciou a

ocorrência de problemas na qualidade de carne, associadas à dureza, baixa coesividade, cor e capacidade de retenção de água (DRANSFIELD e SOSNICKI, 1999; OLIVO et al. 2001; SOSNICK e WILSON, 1991). Tais problemas são decorrentes dos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de aves com crescimento rápido e com um grande rendimento do peito (*Pectoralis major*) em relação ao peso corporal. Neste tipo de seleção genética, observam-se nos animais melhorados, o concomitante aumento do número de fibras de contração rápida (metabolismo glicolítico) e redução do número de fibras de contração lenta (metabolismo oxidativo); vascularização limitada; glicólise *post mortem* acelerada e maior susceptibilidade ao estresse (LE BIHAN-DUVAL et al., 1999; LONERGAN et al., 2003; MITCHELL e SANDERCOCK, 2004; QUIAO et al., 2002; SANTÉ et al., 1991). Além disso, estudos comprovaram que este aumento no crescimento e na deposição de massa muscular é decorrente de um catabolismo protéico reduzido (CORÓ et al., 2002; DRANSFIELD e SOSNICK, 1999; SCHEURS et al., 1995).

A carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*) que significa pálida, flácida e exsudativa representa um obstáculo à indústria avícola na elaboração de produtos competitivos, pois são observados problemas tecnológicos como: aumento nas perdas de rendimento no cozimento, aumento do exsudato e baixa capacidade de retenção de água. A ocorrência desse fenômeno se deve à combinação do rápido declínio do pH *post mortem* com a temperatura da carcaça acima do desejável, resultando em desnaturação protéica, e na conseqüente perda de qualidade (BARBUT et al., 1997a,b; OLIVO et al., 2001; OWENS et al., 2000; WOELFEL et al., 2002).

No Brasil, a ocorrência do PSE na indústria já foi relatada, com índices de 15,86 % (SOARES et al., 2002). Os autores utilizaram como parâmetro de

classificação dos peitos de frango, o valor de L^* medido 24 h após o abate: $L^* > 53$ (PSE), $L^* < 44$ (análogo ao DFD) e $44 \leq L^* \leq 53$ (normal). Na análise de cor realizada pelo Sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*), medida com colorímetro, o valor de L^* , situado no eixo vertical do diagrama de Hunter, mede a luminosidade ou percentagem de reflectância, variando de 0 (branco) para 100 (preto). O valor de a^* , situado no eixo horizontal, mede a variação entre a cor vermelha a verde (valor a^*) e o valor b^* mede a variação entre o amarelo e o azul (SHIMOKOMAKI et al., 2006).

A genética provavelmente é o fator mais importante na ocorrência da anomalia PSE, que por sua vez é desencadeada por fatores estressantes no manejo pré-abate (jejum, dieta hídrica, apanha, transporte, tempo de descanso, pendura, imobilização, atordoamento e o abate do animal) capazes de alterar os metabolismos de carboidratos e de lipídios dos animais (BARBUT, 1998; GUARNIERI et al, 2002, 2004). Recentemente, foi constatado que a atividade da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2) é aumentada nas carnes de frango com PSE, comprometendo a integridade da membrana celular (MILLS et al., 1999; SOARES et al., 2003). A PLA_2 é uma enzima lipolítica dependente de Ca^{2+} que catalisa a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolipídios das membranas das células, liberando ácido araquidônico (20:4, n-6) e lisofosfolipídios (MURAKAMI e KUDO, 2002).

A ocorrência do PSE também está relacionada com falhas no funcionamento de uma proteína reguladora da liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma, o receptor de rianodina (WERNER et al., 2005). Em suínos, foi encontrada uma mutação de ponto, com a substituição de uma arginina por uma cisteína na posição 615 na seqüência de aminoácidos da proteína RyR1 (FUJII et al., 1991). Esta mutação está presente nos animais com PSS

(*Porcine Stress Syndrome*) e ausente nos normais, e sua descoberta resultou no desenvolvimento de um teste não invasivo, baseado em PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase - polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição), que permite diferenciar três genótipos: HalNN (normal, dominante), HalNn (heterozigoto) e Halnn (sensível, recessivo) e com este material é possível, atualmente, fazer estudos de frequência do gene halotano, nas diferentes raças de suínos, para que melhores estratégias de cruzamentos sejam traçadas (CULAU et al., 2002).

A ocorrência do fenômeno PSE foi reportada recentemente em perus e frangos e, embora a participação da proteína RyR na ocorrência desta anomalia em carnes de aves ainda não esteja comprovada, vários autores assumem uma origem semelhante à encontrada em suínos (CHIANG et al., 2004; LARA et al., 2003, 2004; OWENS et al., 2000; STRASBURG e CHIANG, 2003; WANG et al., 1999; ZHANG et al., 2000).

Nosso grupo vem tentando avaliar a relação do gene do receptor da rianodina com a manifestação da anomalia de forma semelhante ao realizado em suínos (LARA et al., 2003, 2004; DROVAL, 2004). O estudo desta relação genética em aves é pertinente e imperativo, sendo que até o momento foi possível seqüenciar aproximadamente 5% do gene da isoforma α do receptor da rianodina (α -RyR) sem que mutações relacionadas a ocorrência da síndrome fossem encontradas. O resultado deste trabalho poderá contribuir de maneira direta para o aumento da competitividade em um setor da agroindústria nacional em franca expansão, caso sejam desenvolvidas ferramentas que facilitem a identificação rápida de animais com potencial para o desenvolvimento de PSE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade da Carne de Aves

O conceito “qualidade da carne” é definido por características objetivas (propriedades físicas, químicas, morfológicas, microbiológicas e nutricionais) e também subjetivas (aspectos sensoriais, de apresentação e de exposição do produto) (ING, 1989; DE SOUZA, 2005). A aparência, a textura, a suculência, a firmeza, a maciez, o odor e o sabor estão entre os atributos de maior influência no julgamento da qualidade e na decisão de aquisição ou não do produto cárneo pelo consumidor (ANADÓN, 2002). O estabelecimento de parâmetros quanto aos aspectos positivos e negativos varia em função da região geográfica, das classes sócio-econômicas e dos pontos-de-vista industrial e comercial (SAMS, 2005; HUALLANCO, 2004).

O sistema mundial de classificação de qualidade da carne de aves é baseado somente na estética (perdas de partes, presença de cortes na pele, de manchas ou hematomas) e não de acordo com as propriedades funcionais da mesma. Este sistema beneficia o mercado de carne *in natura*, porém não contribui para a aquisição de matéria-prima de qualidade pelas indústrias processadoras, às quais características como alta Capacidade de Reteção de Água (CRA) e boa textura teriam maior relevância (BARBUT, 1998; HUALLANCO, 2004; McCURDY et al., 1996).

Os fatores reconhecidamente capazes de afetar a composição da carne e influenciar os aspectos de cor, de textura e de sabor são semelhantes, independentemente da espécie que a originou (PRICE & SCHWEIGERT, 1994),

dentre eles podem ser citados: a idade, o sexo e o estado nutricional do animal, a temperatura ambiente, os processos de apanha e transporte dos animais, e os tempos de jejum e de descanso da chegada ao frigorífico a que foram submetidos (BRESSAN, 1998; GUARNIERI et al., 2004; LARA et al., 2002; LYON et al., 2004; SAMS, 1999). Da mesma forma, a utilização de diferentes tecnologias de abate e de pós-abate, como o tempo de resfriamento, o tempo e a temperatura de maturação e a estimulação elétrica, influenciam nas reações metabólicas na carne que ocorrem antes, durante e depois do *rigor mortis* (KRIESE, 2005; SANTOS et al., 2004).

2.2 Fatores que influenciam a Qualidade de Carnes

Atualmente, também existe uma grande preocupação na comunidade científica com relação ao bem-estar dos animais e com isso o estresse pré-abate passou a ser mais bem estudado e a indústria terá de adaptar os sistemas de produção a fim de não ser avaliada negativamente pelos consumidores (MENDES, 2001).

O estresse térmico pré-abate acelera o desenvolvimento do *rigor mortis*, reduz a capacidade de retenção de água (CRA) e aumenta a palidez na carne de aves (McKEE e SAMS, 1997). GUARNIERI et al. (2004) recomendaram a adoção do descanso pré-abate das aves, acompanhado de banho e ventilação, como um procedimento para a melhorar da qualidade de filés de peito de frango.

A retirada de ração em condições normais de abate e processamento é feita de 6 a 8 h antes da apanha das aves, resultando em um período total de jejum de 8 a 12 h antes do abate, a fim de proporcionar o esvaziamento do intestino e diminuir a contaminação no abatedouro. Entretanto, a

desidratação da carcaça começa imediatamente após o seu início e assim, períodos prolongados de jejum podem afetar o pH das diversas partes do intestino, aumentando a presença de microorganismos patogênicos (MENDES, 2001). CHEN et al. (1991) reportaram a diminuição da extensão do declínio de pH *post mortem* e ocorrência de carnes de características escuras, firmes e secas (DFD), em patos, em decorrência do jejum e do exercício forçado. Da mesma forma, em um estudo conduzido por 3 semanas durante o inverno, em abatedouro na cidade de Londrina (PR), foi encontrada aproximadamente 25 % de filés de frango DFD (dados não divulgados). Mais tarde, foi verificado que para alguns lotes, o tempo decorrido da retirada da alimentação, do transporte, até a chegada na plataforma de desembarque haviam decorrido períodos de até 20 h.

A insensibilização é um procedimento que pode ter profundos efeitos na qualidade da carne, podendo ser aplicada de duas formas: a) passagem de corrente elétrica pelo corpo das aves, da cabeça (em contato com a água) em direção aos pés (presos a nória), tornando-as insensíveis à dor e ao estresse e, conseqüentemente, evitando-se a aceleração no desenvolvimento do *rigor mortis* (SAMS, 1999) e b) exposição das aves a gases anestésicos, alternativa que apresenta algumas vantagens, como: melhor eficiência de sangria, devido aos batimentos cardíacos não serem interrompidos, e minimização dos danos de carcaça (LINDHOLST, 1991, citada por CONTRERAS e BERAQUET, 2001). No Brasil, não há uma especificação legal com relação aos valores de corrente elétrica e voltagem aplicados. Em um estudo comparativo dos efeitos da aplicação de diferentes voltagens e freqüências sobre a eficiência de insensibilização e qualidade de peitos de frangos, CONTRERAS e BERAQUET (2001) concluíram que a aplicação de correntes a 1000 Hz/ 40 V resultou no aumento da maciez das

amostras.

A maturação (*aging*) é um procedimento que consiste na estocagem de carcaças inteiras ou peitos, em metades, por várias horas sob temperaturas de refrigeração antes da desossa para permitir o desenvolvimento completo do *rigor mortis*. Atualmente, recomenda-se estocar carcaças inteiras por, no mínimo 4 h/ 4 °C, antes da desossa (DAWSON et al., 1987; LYON et al., 1985; SOUZA et al., 2005). McKEE et al (1997) observaram a necessidade de 3 dias a mais de estocagem, sob refrigeração, para que a carne desossada ainda na fase de *pré-rigor* fosse considerada macia pelos consumidores.

A estimulação elétrica (ES) consiste na passagem de corrente elétrica sobre a carcaça (0-200 mA/ ave ou 350-500 mA/ ave) imediatamente após a morte, causando contrações generalizadas com efeitos no desenvolvimento do *rigor mortis* e na textura final da carne (SAMS, 1999). São postuladas três hipóteses sobre sua forma de atuação: a) aceleração no consumo do ATP, resultaria na prevenção do *cold shortening*; b) a aceleração do declínio do pH *post mortem* com a temperatura da carcaça ainda alta, possibilitaria o aumento da atividade de proteases endógenas e c) o amaciamento da carne seria causado pelo rompimento das fibras musculares (CROSS, 1979). Estudos em suínos e perus demonstraram que a ES não promove necessariamente a cor pálida, a baixa CRA ou textura inadequada (ALVARADO e SAMS, 1999).

2.3 Transformação do Músculo em Carne

A transformação do músculo em carne compreende três fases bioquímicas (*pré-rigor*, *rigor* e *post-rigor*) que se diferenciam com relação às

reservas de energia e produtos finais destas reações. As fontes intracelulares de energia disponíveis para o metabolismo são: o ATP, a fosfocreatina e o glicogênio. Porém, tanto o ATP como a fosfocreatina encontra-se em baixas concentrações no músculo, sendo, portanto, o glicogênio a principal fonte de energia para a glicólise. A glicólise é responsável, no *post mortem* pela transformação das reservas de glicogênio muscular em lactato. Dessa maneira, o acúmulo do ácido láctico e a queda do pH no *post mortem* dependem fundamentalmente da quantidade de glicogênio no momento do sacrifício. Segundo FORREST et al. (1979), baixas reservas de glicogênio são responsáveis por uma baixa extensão da glicólise, instalação do *rigor mortis* superficial e pH final elevado. No músculo vivo, o lactato é transportado pelo sistema circulatório ao fígado, onde é convertido em glicose na via da neoglicogênese (PEARSON, 1994).

Segundo CULAU (1991), a glicólise desenvolve-se lentamente no *post mortem* e o pH muscular passa de 7,2 a 5,5-5,8 em 24 horas. Em carne de aves, este processo é relativamente rápido. Os músculos de frango podem entrar em *rigor mortis* 1 hora após o abate, podendo ocorrer variações em um mesmo lote (OLIVO et al., 2001). Entretanto, a extensão e a velocidade do declínio do pH no *post mortem* dependem de inúmeros fatores, enumerados anteriormente.

2.4 Determinação da Qualidade da Carne

2.4.1 Cor

A cor é o principal atributo considerado na avaliação da aparência da carne pelos consumidores, sendo associada ao seu frescor e influenciando de forma

direta a decisão de compra do produto (YANG e JIANG, 2005). Por exemplo, uma bandeja exposta na gôndola do supermercado, com filés de peito de frango com grande variação na coloração, estaria sujeita a rejeição de todo o conjunto pelo consumidor (NORTHCUTT, 1997).

Dentre os fatores que podem afetar a cor da carne, podemos citar a idade, sexo, dieta e algumas outras variáveis de processamento e de linhagem (DEBUT, 2003). A temperatura e o pH *post mortem* são determinantes no grau de desnaturação protéica e na aparência física da carne, onde se observa uma relação inversa dos valores de pH e dos índices de birrefringência (figura 1), com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa (LAWRIE, 1991; OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2001).

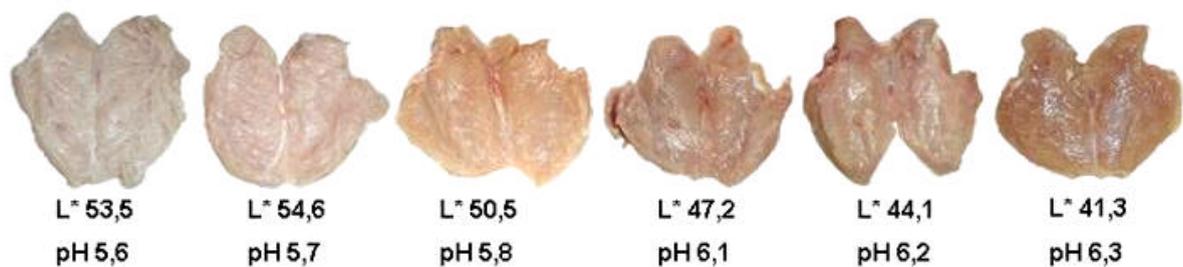


Figura 1 - Efeito do pH final na coloração da carne.
Fonte: ODA et al. (2003)

Este atributo de qualidade também é dependente da presença de pigmentos do músculo (mioglobina, hemoglobina e citocromo c) (FRONING, 1995). A quantidade de Mioglobina (Mb) varia com a espécie, sexo, idade, localização

anatômica do músculo e atividade física. A Mb é formada por uma porção protéica denominada globina e uma porção não protéica denominada grupo heme (DE SOUZA, 2005). O anel heme tem estrutura química plana, na qual o átomo de ferro (localizado no centro) possui um de seus seis sítios de ligação disponível para ligar-se a vários grupos químicos. O estado de oxidação do ferro e o grupo químico que irá ligar-se ao sítio são os principais fatores que determinarão a cor da carne. Quando o ferro encontra-se no estado ferroso (Fe^{++}), sem a presença de um composto ligado ou ligado a uma molécula de água, nos referimos à deoximioglobina, de cor vermelho púrpura, característica de carnes frescas. Entretanto, se a mioglobina ferrosa é exposta ao ar, átomos de oxigênio irão ligar-se no sexto sítio de ligação do ferro, originando a oximioglobina, de cor vermelho-cereja brilhante. Se, no entanto, existem baixas concentrações de oxigênio, o ferro oxida-se, passando de Fe^{++} para Fe^{+++} , originando a metamioglobina, de coloração amarronzada, rejeitada pelos consumidores (DABÉS, 2001).

2.4.2 Maciez

A textura (maciez) da carne é um dos atributos de qualidade mais importantes considerados pelos consumidores e é determinada principalmente pela presença de proteínas do tecido conjuntivo e das miofibrilas. A formação e a estabilidade de pontes cruzadas da molécula de colágeno estabelecidos com o avanço da idade do animal dificultam a desnaturação das moléculas de colágeno e a digestão enzimática ou tratamento térmico, resultando no endurecimento da carne (CORÓ et al., 1999; SHIMOKOMAKI et al., 2006).

Outros fatores que influenciam a maciez da carne, são: a espécie, a

genética, o sexo, a maturidade, a alimentação e o acabamento do animal, a resolução do rigor, o pH final, a velocidade de resfriamento da carcaça, o tamanho e tipo de fibra muscular, o tratamento térmico aplicado e o processo de maturação da carne por enzimas proteolíticas (CORÓ et al., 1999; FELÍCIO, 1999; SHIMOKOMAKI et al., 2006).

O declínio do pH *post mortem* com o acúmulo de ácido láctico resulta em desnaturação protéica, perda da solubilidade e uma redução geral dos grupos reativos disponíveis. Quando o pH muscular atinge o ponto isoelétrico, as cargas positivas e negativas se igualam e prejudicam a habilidade de ligação das proteínas à água (WISMER-PERDERSEN, 1986). A maciez da carne de peito de frangos de corte está associada à capacidade de retenção de água (CRA) apresentada pelo músculo, a qual é dependente de vários fatores como o estresse térmico e os fatores pré-abate (BERRI, 2000; FRONING et al., 1978).

Na operação de resfriamento, se as carcaças são expostas ao frio antes da completa resolução do *rigor mortis*, acontece um processo denominado *cold shortening*, que consiste de uma contração brusca e irreversível das fibras musculares, com redução no comprimento do sarcômero (LOCKER e HAGYARD, 1963). Embora músculos com maior percentual de fibras brancas sejam menos propensos a ocorrência deste fenômeno em relação aos de maior proporção de fibras vermelhas (BENDALL, 1973; BRESSAN, 1998), o fenômeno foi reportado também em carnes de peitos de frango (WOOD e RICHARDS, 1974, BILGILI et al., 1989).

A textura pode ser avaliada por métodos subjetivos e objetivos, como a medição de pH da carne, perda de peso por cozimento e força de cisalhamento (KOOHMARAIE, 1994). Sua grande variabilidade é considerada um

problema e embora seja ampla a faixa de aceitação de maciez pelos consumidores, é certo que há vantagens para as carnes mais macias quando outros fatores são constantes (BLATZER, 1976). Na literatura há discordância em relação aos valores limites de força de cisalhamento para considerar a carne de peito de frango como macia. LYON et al. (1985) e SIMPSON et al. (1974) utilizaram como referência de limite, valores de 7,5 kgf/ g e 8,0 kgf/ g, respectivamente. Acima destes valores, a carne seria considerada dura.

2.4.3 Perda de peso por cozimento (PPC)

A Perda de peso no cozimento (PPC) é uma medida importante de qualidade pois está associada ao rendimento da carne no momento do consumo (PARDI et al., 1993). Essa característica é influenciada pela capacidade de retenção de água nas estruturas da carne (BOUTON et al., 1971). De acordo com PARDI et al. (1993), a gordura existente na carne é derretida quando sofre ação do calor, como no caso da cocção e é considerada também como perda.

As mudanças que ocorrem no interior de uma peça de carne durante seu aquecimento, em termos de aumento na força de cisalhamento, foram estabelecidas da seguinte forma: a) primeiramente, ocorre uma lenta perda de fluido correspondente à desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, de 40-53 °C, sem que seja observado um concomitante encolhimento, b) a perda de água pelas proteínas miofibrilares aumenta quando a temperatura passa a 60 °C e observa-se o encolhimento do colágeno, c) com a temperatura entre 64-90 °C ocorre o encolhimento do endomísio, perimísio e epimísio, decréscimo no diâmetro da miofibrila e aumento na perda de peso por cozimento e, finalmente, d) durante o

aquecimento prolongado o colágeno se gelatiniza e diminui a força de cisalhamento (BENDALL e RESTALL, 1983, citados por LAWRIE, 1991).

2.5 Análise Sensorial

A análise sensorial é definida como disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características de alimentos ou materiais quando são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (IFT, 1981).

Os métodos sensoriais podem ser classificados em analíticos, que necessitam de equipe treinada para realizar avaliação objetiva, e afetivos, onde os avaliadores não precisam de treinamento e podem expressar suas opiniões pessoais ou preferências. Os testes analíticos são classificados em: a) teste de diferença: comparação pareada, triangular, duo-trio, ordenação e comparação múltipla e b) testes descritivos, perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa. Os testes afetivos de preferência ou aceitação são classificados em: comparação pareada, ordenação, escala hedônica e escala do ideal (FERREIRA, 1999, citado por CARVALHO et al., 2005).

Os métodos sensoriais vêm se tornando fundamentais devido à ampla difusão que esta ciência tem alcançado. Os testes que consideram uma resposta objetiva devem utilizar provadores treinados segundo a exigência do teste e o problema estudado. Os que utilizam respostas subjetivas podem ser realizados com pessoas não treinadas em técnicas de avaliação sensorial. Estes podem ser utilizados para avaliar a aceitabilidade e a preferência dos produtos (DE PENNA, 1999).

Nos Testes de Comparação Pareada coloca-se um produto em competição direta com outro. São fornecidas duas amostras codificadas ao julgador para que seja determinada qual das duas possui o um atributo sensorial em maior intensidade que a outra amostra (DUTCOSKY, 1996). Além disso, segundo MEILGAARD et al. (1999), este teste pode também ser utilizado para medir a preferência, onde o provador é forçado a escolher uma amostra em detrimento de outra.

2.6 Anomalias Encontradas em Carnes

Na década de 40 foram identificadas alterações severas nas características de qualidade de carne suína, dos tipos PSE (*Pale, Soft, Exudative*) ou DFD (*Dry, Firm, Dark*) em músculos *Longissimus dorsi* e *semimembranosus*. Estas alterações foram relacionadas à alta mortalidade dos animais acometidos de PSS. Após um longo período, foram realizados os primeiros trabalhos com perus demonstrando que fatores estressantes, como aquecimento e agitação, influenciavam diretamente o declínio de pH e a qualidade final da carne de peito (FRONING et al., 1978; MA e ADDIS, 1973).

A terminologia “estresse” corresponde a uma interação entre o indivíduo e o meio ambiente, com uma série de respostas adaptativas que se contrapõe aos efeitos dos estímulos na tentativa de restabelecer a homeostasia (FURLAN et al., 2005). Caso o animal seja incapaz de mantê-la, a consequência direta será um eventual prejuízo ao seu bem-estar, podendo refletir no desenvolvimento das reações bioquímicas *post mortem* e na qualidade final da carne (LAWRIE, 1991).

O estresse pré-abate em suínos causa diminuições bruscas de pH do músculo no *post mortem* (rápida instalação do *rigor mortis*) que combinado à temperatura elevada da carcaça (> 35 °C) resulta em carnes PSE, flácidas, não coesivas e exsudativas (HONIKEL e FISCHER, 1977). Por outro lado, se o animal é abatido em fase de adaptação ao estresse, as reservas de energia reduzidas ocasionam músculos com baixa extensão de glicólise anaeróbica *post mortem*, instalação do *rigor mortis* superficial, pH final elevado e, conseqüentemente, carnes DFD (FORREST et al., 1979).

Em aves, anomalias semelhantes ao PSE foram descritas em perus e em frangos (BARBUT, 1997b; FRONING et al., 1978 e VAN HOOFF, 1979, citados por BARBUT, 1998; McCURDY et al., 1996; SANTE et al., 1991; GREASER, 1986; OLIVO, 1999; STRASBURG e CHIANG, 2004). Da mesma forma, há relatos da ocorrência do DFD em aves por diversos autores (ALLEN et al, 1998; CHEN et al., 1991; MALLIA et al., 2000a,b; QIAO et al., 2001, 2002, WOOD E RICHARDS, 1975).

2.7 Carne PSE em Aves

Com uma série de mudanças nos hábitos de consumo, como o grande aumento observado na demanda por produtos industrializados (de alto valor agregado) de carne de frango, recentemente o fenômeno PSE em aves tornou-se aparente e despertou a atenção da indústria e de pesquisadores (BARBUT, 1998; CASTILLO, 2001; OLIVO et al., 1998; SHIMOKOMAKI et al., 1997; SOSNICKI et al., 1998). Da mesma forma, características sensoriais de cada corte, como aparência e maciez puderam ser mais bem percebidas e reconhecidas pelo consumidor (BERAQUET, 1999), embora os estudos que avaliem a percepção dos

consumidores quanto aos desvios de qualidade da carne ainda sejam bastante escassos.

Atualmente, as medidas adotadas pela indústria para contornar o problema e melhorar a qualidade da carne PSE de perus, como a realização de alterações no processamento da carne (ALVARADO e SAMS, 2002) ou nos esquemas de transporte (OWENS e SAMS, 2000), mostraram-se ineficazes e paliativas. O teste de halotano (exposição das aves, com 4 semanas de vida, ao halotano 3 % por 5 minutos), proposto como método de identificação de perus predispostos a desenvolver carnes PSE (sensíveis ao halotano/ HAL +) ou normais (sem resposta ao halotano/ HAL -), também se revelou um método prognóstico limitado (OWENS et al., 2000b).

O PSE é causado por uma aceleração extrema na glicólise, logo após o abate, acompanhada de acúmulo de ácido láctico e alto consumo de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). SANTÉ et al. (1991) estudaram o desenvolvimento das reações glicolíticas *post mortem* no músculo *Pectoralis superficialis* e reportaram que em peitos pálidos, as reservas energéticas foram esgotadas rapidamente aos 30 minutos do abate. Dentre os fatores capazes de influenciar as reservas de glicogênio muscular, responsável pelo desenvolvimento das reações bioquímicas *post mortem*, estão: o estresse térmico, o manejo pré-abate, envolvendo jejum, dieta hídrica, apanha, transporte, tempo de descanso, pendura, imobilização, atordoamento e abate do animal (GUARNIERI, 2002).

A classificação de carnes PSE é feita através da relação dos resultados obtidos para as propriedades funcionais da matéria-prima (cor, pH, capacidade de retenção de água e textura). BARBUT (1997b) encontrou correlações significativas ($p < 0,01$) entre pH e CRA ($r = -0,87$) e entre valor L^* e CRA ($r = -0,71$).

Desta forma, o valor de L^* permitiria às indústrias processadoras determinar a melhor aplicação para a matéria-prima disponível, dentro dos requerimentos de qualidade de seus produtos. Entretanto, são encontradas diversas faixas de valores para a classificação da cor de filés na literatura, como por exemplo, QUIAO et al. (2001) que utilizaram valores de L^* iguais a 45,68, 51,32 e 55,95 para separar os filés escuros, normais e pálidos, respectivamente, e VAN LAACK et al. (2000) que utilizaram valores de 55,1 e 60,0 na classificação de filés normais e pálidos, entre outros autores (BARBUT, 1997a,b; BOULIANNE e KING, 1995; WOEFEL et al., 1998).

Ainda que não tenha sido estabelecida uma relação genética direta para a ocorrência de carnes PSE em frangos, estudos preliminares em perus já vinham sugerindo a existência, em variados graus, da possibilidade de predisposição genética ao PSE (CHIANG et al., 2004; OWENS et al., 2000a; WANG et al., 1999; ZHANG et al., 2000).

Aos 8 de dezembro de 2005, Chiang, Strasburg e Linz patentearam um novo método de detecção de perus predispostos ao desenvolvimento de carnes PSE (U.S. Pat. No. 2005/0272362). Os autores realizaram inicialmente a clonagem e o seqüenciamento do cDNA da α -RyR, homóloga à proteína receptora de rianodina do tipo 1, da região referente aos nucleotídeos de números 1231-1947. Foram identificadas 3 variantes dos transcritos da α -RyR (referidos como W, AS-81 e AS-193), onde a variante W partilhou 70% de semelhança ao cDNA da RyR1 de mamíferos, e as demais variantes foram caracterizadas pela deleção de 81 pb (variante AS-81, nucleotídeos de número 1350-1430) e 193 pb (variante AS-193, nucleotídeos de número 1350-1542). Os pesquisadores propuseram a existência de 2 alelos (formas alternativas de um gene, responsáveis por diferentes manifestações

fenotípicas do caráter) que poderiam ser expressos em qualquer uma das três variantes. A partir destas informações, os autores caracterizaram o padrão de expressão das variantes transcritas para estes dois alelos e estabeleceram a correlação existente entre as características de qualidade de carne com os genótipos dos animais. Este novo método permitiria selecionar os animais a partir da genotipagem de amostras de ácidos nucleicos extraídos do peito de perus, obtidas de animais vivos, identificando-os como sendo homozigotos para a α -RyRII (que seriam utilizados no melhoramento para a produção de carnes), homozigotos para a α -RyRI, heterozigoto para α -RyRII e heterozigoto para α -RyRI. Por exemplo, são sugeridas a utilização de técnicas como *Western Blotting*, de imunohistoquímica e de seqüenciamento de nucleotídeos e aminoácidos, para a identificação da proteína α -RyRII.

A ocorrência de carnes PSE resulta em prejuízos econômicos para a indústria de carnes em geral, com perdas durante o processamento e diminuição da qualidade em termos de propriedades funcionais (SHIMOKOMAKI et al., 2006). Na indústria canadense de carnes, por exemplo, estima-se que esse prejuízo em decorrência do PSE seja de US\$ 20 milhões/ ano (SHAND et al., 1995). A incidência de PSE em linhagens comerciais de perus e frangos tem sido reportada com valores variando de 5 a 40% (BARBUT, 1997a; McCURDY et al., 1996; OWENS et al., 2000a; WOEFEL et al., 1998), causando um prejuízo à indústria processadora de até 4,4 milhões de dólares por ano, em carnes (SAMS, 2002).

2.8 O Mecanismo de Excitação-Contração (EC) Muscular

Cada fibra muscular é constituída por uma célula única,

multinucleada, longa, cilíndrica e rodeada por uma membrana nuclear chamada sarcolema (figura 2). Ela contém proteínas contráteis dispostas paralelamente nas miofibrilas, a miosina e a actina, que compõe os filamentos grossos e finos, respectivamente. As miofibrilas, por sua vez, estão também paralelamente arranjadas e apresenta um padrão de bandas claras e escuras, dispostas em série, que dão o caráter de estrias às fibras musculares. Os limites laterais da unidade contrátil, chamada de sarcômero, são dados pelos discos Z, que contém duas bandas-I e uma banda-A central, separando-as (FERREIRA, 2005; GANONG, 1999).

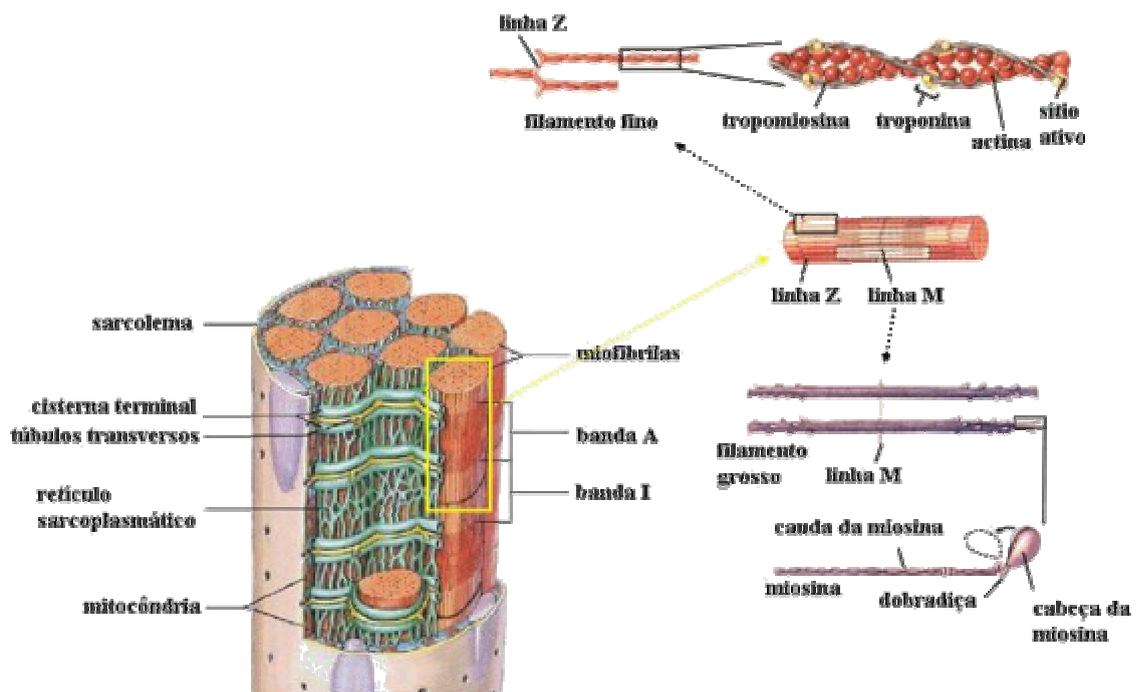


Figura 2 - Componentes da fibra muscular esquelética.
 Fonte: EKV (2006)

A contração é definida como a ativação das fibras musculares com a tendência destas se encurtarem (FERREIRA, 2005). A seqüência de eventos que a inicia é a seguinte: o sarcolema é despolarizado por um potencial de ação que se

propaga para o interior da fibra muscular, pelos túbulos-T, onde os receptores de dihidropiridina (DHP) têm a sua conformação alterada e transmitida aos podócitos (projeções citoplasmáticas do RyR) resultando, finalmente, na abertura do canal iônico. A mudança de conformação da RyR é transmitida à outra proteína ligada a este receptor, chamada triadina. A triadina mobiliza o cálcio ligado a parvalbumina, calsequestrina e reticulina, todas localizadas no interior do retículo sarcoplasmático (RS) e em contato entre si. Então, com a abertura do canal da RyR, há a liberação de íons cálcio do retículo para o citoplasma da fibra muscular, elevando a concentração de 10^{-7} M para 10^{-6} M, ou mais, em poucos milisegundos. Os canais de cálcio, então, se fecham. A maior parte do cálcio no mioplasma liga-se rapidamente a troponina, induzindo a uma alteração na conformação e mudança na posição da molécula de tropomiosina, eliminando o bloqueio estrutural que impedia a rotação das “cabeças” de miosina contra os filamentos de actina. Durante uma única contração, cada ponte cruzada liga-se, arrasta-se e desliga-se muitas vezes à medida que ela progride ao longo do filamento de actina, em direção ao disco Z. Finalmente, as bombas de cálcio (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases ou SERCA) da membrana do RS transportam ativamente o cálcio do mioplasma de volta para o RS. À medida que a concentração de cálcio livre no mioplasma cai, o cálcio ligado a troponina é liberado, permitindo a tropomiosina inibir novamente o local de ligação da miosina e o músculo permanece relaxado até a próxima despolarização (GANONG, 1999).

O funcionamento deste mecanismo pode ser influenciado por inúmeros fatores, como a presença de halotano, cafeína, íons cálcio e magnésio (nM), procaína e espermina (μM) (MICKELSON e LOUIS, 1996). Eventuais falhas neste processo relacionadas a distúrbios na liberação de cálcio e consumo elevado

de glicogênio, resultam na ocorrência de carnes PSE.

2.9 O Mecanismo de Excitação-Contração (EC) Muscular de Aves

Existem diferenças nos mecanismos de EC muscular dos músculos esqueléticos de aves e mamíferos. No caso das aves (figura 3), a despolarização dos túbulos-T induz a liberação dos íons de Ca^{+2} através da α -RyR, que está fisicamente ligada à proteína receptora de dihidropiridina (DHP). O local de aumento da concentração dos íons de Ca^{+2} resulta na indução e liberação de Ca^{+2} pela β -RyR.

Já nos mamíferos, o fluxo dos íons de Ca^{+2} é controlado pelos receptores de rianodina tipo 1 (RyR1) (STRASBURG e CHIANG, 2003). Assim, diz-se que a ativação do canal de cálcio da RyR1 é feita por um mecanismo dependente de voltagem, enquanto a ativação do canal de cálcio da RyR3 se faz pela presença, em determinadas concentrações, de íons cálcio no sarcoplasma (CICR) (SUTKO e AIREY, 1996).

Pode-se afirmar, portanto, que o controle do fluxo de cálcio e a conseqüente ocorrência ou não de PSE pode ser regulado pelas duas isoformas em frangos, diferindo-se da anomalia clássica estudada em suínos, que por sua vez, é originada unicamente pela mutação encontrada na proteína receptora de rianodina 1. Provavelmente outras regiões cromossômicas estejam envolvidas nesta função de controle e de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático para o lúmem.

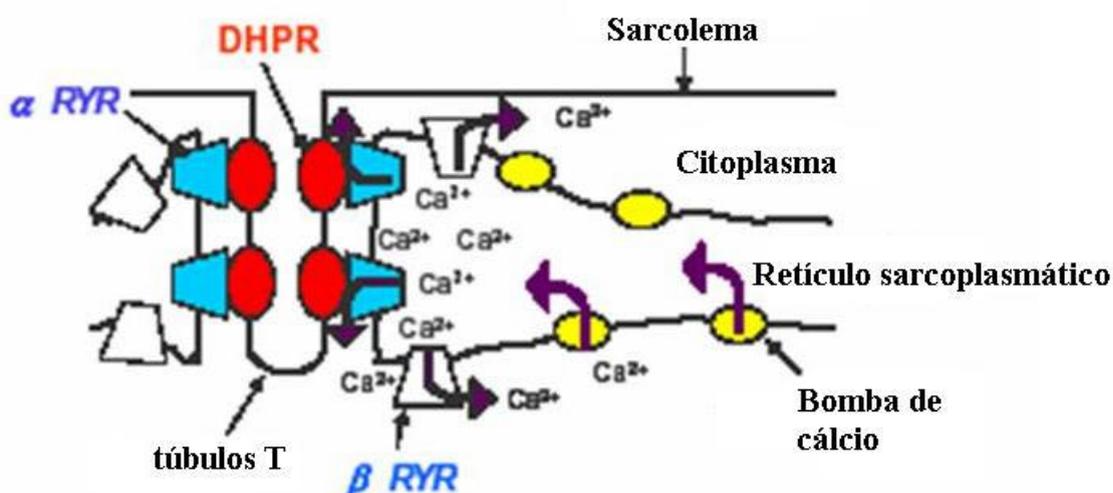


Figura 3 - Mecanismo de excitação-contracção muscular do músculo esquelético de aves. A α -RyR (azul) é ativada a partir da despolarização do túbulo-T e da alteração de conformação da DHPR. O aumento da concentração local de íons Ca^{2+} resulta na indução e liberação de Ca^{+2} pela β -RyR (branco), na periferia do RS. O Ca^{+2} é sequestrado durante o relaxamento muscular pelas bombas de Ca^{+2} (amarelo).

Fonte: STRASBURG e CHIANG (2003)

2.10 Proteínas Receptoras de Rianodina (RyR)

As proteínas receptoras de rianodina (RyR) têm participação conhecida na regulação da contracção muscular esquelética, sendo expressas também em outros tecidos onde eventualmente múltiplas isoformas podem ser co-expressas (ROSSI e SORRENTINO, 2004). O controle do fluxo de íons cálcio pelas RyRs durante este evento poderia explicar definitivamente os mecanismos envolvidos na ocorrência do PSE.

A denominação receptora de rianodina é decorrente da sua capacidade de ligação irreversível ao alcalóide neutro rianodina, isolado do talo de *Ryania speciosa*. É um agente paralisante que produz contracção irreversível da

musculatura esquelética, onde se liga aos sítios de alta afinidade do canal de cálcio, bloqueando-o no estado aberto. Porém, quando em alta concentração, liga-se ao sítio de baixa afinidade fixando o canal no estado fechado. As RyRs foram identificadas pela primeira vez em 1970, por Clara Franzini-Armstrong, em micrografias eletrônicas nas regiões das tríades (associação das cisternas terminais e túbulos-T). Esta localização garante a interação direta entre as proteínas receptoras de rianodina (RyR1 e RyR2) e os receptores de dihidropiridina (DHP), essenciais na ativação do mecanismo de contração (ROSSI e SORRENTINO, 2004). As β -RyRs, em músculo esquelético de sapos e peixes, embora também tenham sido descritas em uma região muito próxima às membranas das tríades, não estão em interação direta com as DHP (FELDER e FRANZINI-ARMSTRONG, 2002; FRANZINI-ARMSTRONG, 2004).

Anteriormente, o grande desafio compreendia o entendimento da relação entre estrutura e função dos receptores de rianodina, a localização dos sítios regulatórios dentro da estrutura quaternária do canal, além da identificação de alterações conformacionais nos diferentes estados do canal. Importantes ferramentas como a microscopia eletrônica e a computação gráfica permitiram a predição da estrutura tri-dimensional da RyR1 em alta resolução (figura 4) (SORRENTINO e REGGIANI, 1999).

O gene que codifica a RyR se organiza em uma elaborada estrutura tetramérica, composta de 4 sub-unidades de cerca de 560 kDa cada, formando o canal de liberação de cálcio do RS do músculo esquelético (KOSSUGUE et al., 2005). A estrutura da proteína é muito semelhante à de outro canal intracelular de liberação de cálcio, o receptor de inositol trifosfato (InsP₃), e conta com uma grande região N-terminal citosólica, um domínio central modulatório e um domínio C-

terminal. Este último contém segmentos de transmembrana que formam o poro do canal (ROSSI e SORRENTINO, 2004).

Diversas proteínas, como a gliceraldeído-3'-fosfato-desidrogenase, aldolase, calmodulina, calsequestrina, proteína de ligação FK506 e triadina, ligam-se diretamente a RYR podendo afetar as propriedades do canal (BERCHTOLD et al., 2000). Alguns dos sítios de ligação da RyR1, como os da calmodulina e da FK506, além de coordenarem a atividade do canal, estabilizam a conformação aberta e mantêm o estado de condutância completa (MARKS, 1996).

Nos mamíferos são conhecidos três tipos de canais de cálcio: RyR1, encontrado em músculo esquelético; RyR2, no tecido cardíaco e RyR3, no tecido cerebral, todos codificados por genes diferentes, *ryr1*, *ryr2* e *ryr3*, respectivamente (SUTKO E AIREY, 1996). Entretanto, quando se compara este padrão de distribuição com o de outros vertebrados (como aves e anfíbios) observam-se diferenças significativas nesta distribuição, em particular no músculo esquelético, onde a concentração de RyR3 é semelhante à de RyR1 (1:1) (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997; GIANNINI et al, 1995; OGAWA et al., 1999; SUTKO e AIREY, 1996). Na ausência da RyR1, a RyR3 não é capaz de sustentar o mecanismo de EC (FRANZINI-ARMSTRONG, 2004), como observado em indivíduos mutantes crooked neck dwarf (AIREY et al., 1993).

Em músculo esquelético de frangos, foram encontradas duas isoformas desta proteína, denominadas α -RyR e β -RyR, equivalentes as RyR1 e RyR3, respectivamente (OTTINI et al., 1996). Ambas foram expressas, em diferentes níveis, em vários tecidos de frango. Uma terceira isoforma, reconhecida por anticorpos para a RyR2 de mamíferos, foi recentemente detectada em corações de frangos (BERS, 2002, citado por ROSSI e SORRENTINO, 2004). O seqüenciamento

parcial do gene *a-ryr* (GI:1212909) é representado por uma seqüência de 2031 pares de base (pb) e do gene *b-ryr* (GI:46048743), de 15.089 pb (NCBI, 2005).

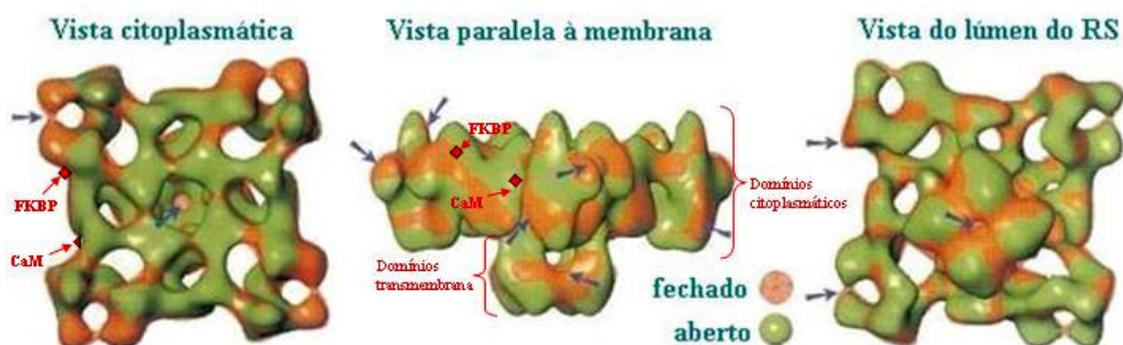


Figura 4 - Estrutura tri-dimensional da RyR1 e principais domínios estruturais. As flechas pretas indicam os pontos de variação de densidade nas conformações aberta (verde) e fechada (marrom).

Fonte: adaptados de WAGENKNECHT et al. (1997); SORRENTINO e REGGIANI, (1999)

2.11 Mutações na RyR

Estudos moleculares utilizando o suíno como modelo animal, contribuíram significativamente para a localização do principal gene envolvido na Hipertermia Maligna (HM) humana (VAINZOF et al., 2005). Em suínos, a Síndrome do Estresse Suíno (*Porcine Stress Syndrome*) foi relacionada a uma mutação de ponto no gene *ryr1*, com a substituição de uma arginina por uma cisteína na posição 615 na seqüência de aminoácidos da proteína RyR1 (FUJII et al., 1991). Os mecanismos que conduzem a ocorrência do PSE na carne de frango ainda não estão esclarecidos e podem realmente estar relacionado com alterações no gene do receptor de rianodina, considerando-se que ele é altamente conservado entre as

espécies.

Em humanos, o fenômeno PSE é denominado Hipertermia Maligna e atinge 1 em cada 15.000 crianças e 1 em cada 50.000 pacientes adultos submetidos a agentes anestésicos (halotano), cafeína, rianodina e relaxantes musculares não despolarizantes (FUJII et al., 1991; JURKAT-ROTT et al., 2000; McLENNAN e PHILLIPS, 1992; WINGERTZAHN e OCHS, 1998). A anomalia está relacionada a falhas no funcionamento dos canais de cálcio do RS, levando a liberação excessiva de íons cálcio e o subsequente aumento de sua concentração mioplasmática (LOPEZ et al., 1988; PRIORI e NAPOLITANO, 2005; ROSSI e SORRENTINO, 2004). O emprego de dantrolene sódico, 1-[[[5-(4-nitrofenil)-2-furanyl]-metileno]amino]-2-4-imidazolidinodiona, um derivado hidantoínico lipossolúvel, tem garantido a redução dos óbitos por episódios de HM (PIRES, 2005).

O teste de contratura *in vitro* (IVCT) é o exame diagnóstico padrão para a HM. Entretanto, uma correlação total entre os pacientes portadores de mutações no *ryr1* e os resultados positivos obtidos nos testes de contratura nem sempre ocorre, visto que em um quarto dos indivíduos positivos no IVCT, apenas metade deles apresentará mutações no gene da RyR1. O grande tamanho do gene e a heterogeneidade genética que ocorre na HM são os principais fatores que dificultam seu estudo molecular (KOSSUGUE et al., 2005).

As mutações relacionadas à HM são descritas no domínio citoplasmático da RyR1, onde o sítio de ligação do cálcio foi mapeado e também na região C-terminal (WINGERTZAHN e OCHS, 1998). Em particular, 3 *hot spots* de mutações foram identificados na região N-terminal (aminoácidos 35-614), na região central (aminoácidos 2117-2787) e na região C-terminal (aminoácidos 4136-4973). As mutações parecem ser altamente conservadas entre as isoformas das RyR e

entre espécies (YANG et al., 2003; ROSSI e SORRENTINO, 2004).

LARA (2003) confirmou a existência de mutações de ponto isoladas em dois fragmentos da proteína receptora de rianodina 3, que não resultaram em alteração geral na estrutura da proteína. No fragmento denominado 2ryr3, em duas amostras distintas que deram origem à carne normal, foram observadas duas alterações nas posições 6150 e 4559, onde uma adenina no lugar de uma guanina e também uma guanina ocupou o lugar de uma timina, respectivamente. Já no fragmento 3ryr3, apesar de não ser possível detectar diferenças na seqüência de DNA de PSE e Normais foi possível encontrar uma diferença em 1 par de bases, na posição 27 do fragmento e 3295 na seqüência do NCBI, onde uma adenina deu lugar a uma timina em todas as amostras estudadas. A relevância está no fato de que a variabilidade genética existente neste gene, em frangos, sugere a possibilidade da existência de outras alterações na proteína RyR3 que resulte nas características de PSE na carne.

São reconhecidos muitos avanços nos últimos anos quanto ao entendimento das mutações nos RyR1 e o desenvolvimento da HM, entretanto, a compreensão efetiva destas doenças envolve não somente a caracterização funcional dos canais de cálcio, mas também a interação com outras proteínas, como por exemplo, a DHP ou FKBP12.

2.12 Melhoramento Genético

Através da genética é possível identificar, isolar, multiplicar e incorporar genes relacionados ao desenvolvimento de massa corporal, morfologia muscular e diversos atributos envolvidos com a qualidade de carne de animais, a

exemplo do que acontece nos programas envolvendo o mapeamento completo do genoma de algumas espécies, como ovelhas, suínos, bovinos e aves (LAWRIE, 1991). A seleção diretamente pelo genótipo resultará em uma seleção mais acurada, precoce e de menor custo, dependendo da característica em questão (DEKKERS e HOSPITAL, 2002).

Segundo LEDUR, “atualmente (22/04/2004), o mapa genético da galinha possui 2522 *loci*, incluindo 757 genes identificados. Vários QTLs (*loci* que influenciam características quantitativas) foram identificados para características de desempenho, carcaça e resistência a doenças”. A descoberta de novos marcadores e a busca por genes ou mutações nas regiões já associadas a QTLs que possam explicar a variação fenotípica determinada por estes QTLs serão os passos a seguir. Com o entendimento de como estes genes influenciam as características de interesse econômico, será possível buscar novos direcionamentos para melhorar o desempenho das aves e a qualidade do produto final (LEDUR et al., 2005).

Considerando a estrutura normal do gene, modificações de três tipos podem ser encontradas: a) deleção, por perda de apenas uma a centenas de pares de bases (pb); b) inserção, pela adição de uma a centenas de pb e c) substituição de uma base por outra diferente, sem alteração do número total de bases da seqüência. Dependendo da posição dentro do gene, tais alterações poderão afetar os mecanismos de transcrição do DNA, o *splicing* e tradução do RNA e, também, a estrutura e a quantidade final da proteína. As conseqüências a nível fenotípico acontecerão em diferentes níveis (TIXIER-BOICHARD, 2002). São utilizadas as seguintes técnicas para o estudo da relação entre os genes e os fenótipos correspondentes: hibridização *in situ*, RT-PCR, PCR em tempo-real, *Northern Blot*, macroarranjos, microarranjos de DNA, análise serial de expressão gênica (SAGE),

entre outros (YANG e JIANG, 2005).

2.13 Conseqüências da Seleção Genética em Frangos Comerciais

Nos últimos 20 anos observou-se o crescimento das indústrias de frango concomitante ao crescimento das redes de *fast foods* e do consumo de pratos prontos, vários deles processados com carnes de peito (WICKI et al., 2003). O alto valor agregado deste corte aumentou a pressão sobre os geneticistas para o desenvolvimento de genótipos com rápido crescimento além de elevado rendimento de carne de peito, ainda que tenha resultado em alterações morfológicas (por exemplo, hipertrofia nas fibras musculares e alta proporção de fibras musculares glicolíticas em relação as oxidativas) e contribuído para o aumento na incidência de problemas de qualidade de carne após o abate. O tempo requerido para produzir um animal de 2 kg passou de 12 semanas para 56 semanas nos últimos 25 anos (DRANSFIELD e SOSNICKI, 1999; GUERNEC et al., 2003; LE BIHAN-DUVAL, 2003; MILLS et al., 1999; MITCHELL e SANDERCOCK, 2004; WERNER, 2005).

Outros problemas decorrentes do melhoramento genético são o aumento de doenças metabólicas, carnes de baixa qualidade (PSE), redução da fertilidade, queda na resposta vacinal e redução na resistência a doenças infecciosas em aves de corte, além do aumento da incidência de osteoporose e problemas de qualidade da casca do ovo em poedeiras (BURT, 2002).

Estimativas de parâmetros genéticos sugerem a existência de um papel predominante da genética sobre o controle de características de qualidade, como o pH e a cor (BERRI et al., 2001; LE BIHAN-DUVAL et al., 1999; QIAO et al., 2002). A carne PSE não é palatável e apresenta problemas de características

funcionais, o que torna impróprio seu uso na fabricação de produtos processados e representa perdas econômicas para a indústria, segundo WICKI et al. (2003).

2.14 Processo e Regulação da Expressão Gênica

O processo de transcrição é responsável pela síntese de todos os ácidos ribonucléicos (RNAs) da célula, onde o RNA mensageiro (mRNA) é a forma utilizada na transferência da informação genética do DNA para a síntese de proteínas e, os demais RNAs, apresentam funções estruturais, catalíticas e de regulação de expressão gênica (ZAHA, 2000).

A transcrição do gene tem início com o desdobramento da cromatina da região cromossômica em que ela se encontra, reconhecimento da região promotora pela enzima RNA polimerase e incorporação de nucleotídeos (nt) complementares aos nt de uma das fitas do DNA, na direção 5' 3' (ZAHA, 2000).

A primeira molécula de RNA, chamada de RNA nuclear heterogêneo - *hnRNA*, é processada ainda no núcleo para produzir um mRNA contendo apenas *exons*, em um processo denominado *splicing*. Algumas características têm sua expressão regulada por um outro processo denominado *splicing* alternativo e tem como resultado final uma variante da molécula original de mRNA e, conseqüentemente, uma proteína diferente (RAMALHO, 1995).

A síntese de proteínas que compõe os canais iônicos ocorre sempre em ribossomas livres no citosol, mas somente quando o peptídeo sinal emerge da proteína em construção, ocorre a ligação do ribossoma ao retículo endoplasmático (RE) (DE SOUZA e FERREIRA, 2006). Pressupõe-se que existam proteínas receptoras especiais na membrana que formam o túnel pelo qual o polipeptídeo se

movimenta. Uma vez no interior da luz do retículo endoplasmático, a cadeia de proteína é completada e o ribossoma é desacoplado da membrana (DE ROBERTIS e DE ROBERTIS, Jr., 1993), podendo de acordo com sua natureza, permanecer na membrana do RER, ou passar, através do sistema de vesículas para o Complexo de Golgi ou à membrana plasmática. Os estudos sobre os mecanismos de transporte até a membrana celular, remoção e posterior degradação ainda estão no início (RODEN e KUPERSHMIDT, 1999), mas qualquer alteração nestes processos/ mecanismos que envolvem este transporte podem alterar a característica em questão.

Alterações no meio, como a alteração de pH ou a fosforilação do canal, podem resultar em mudanças em seu funcionamento. Por exemplo, a ligação de guanosina trifosfato (GTP) a adenilato ciclase, uma proteína transmembrana, eleva os níveis de cAMP (uma molécula sinalizadora intracelular) e nestas condições, alguns genes cujas regiões reguladoras possuem elementos de resposta do cAMP (CREs, *cAMP response elements*) são transcritos. A ativação desta rota de sinalização leva a um aumento na corrente iônica através de uma série de canais, entre eles o canal de cálcio, que passa a apresentar abertura mais longa e lenta do que em relação ao estado não-estimulado (GARTNER e HIATT, 2003).

O conhecimento sobre os fatores que induzem e regulam a expressão dos genes que codificam os receptores de rianodina ainda é muito escasso, no entanto é sabido que os sinais que alteram a função destas proteínas expressas também são capazes de regular o processo de transcrição gênica (RODEN e KUPERSHMIDT, 1999).

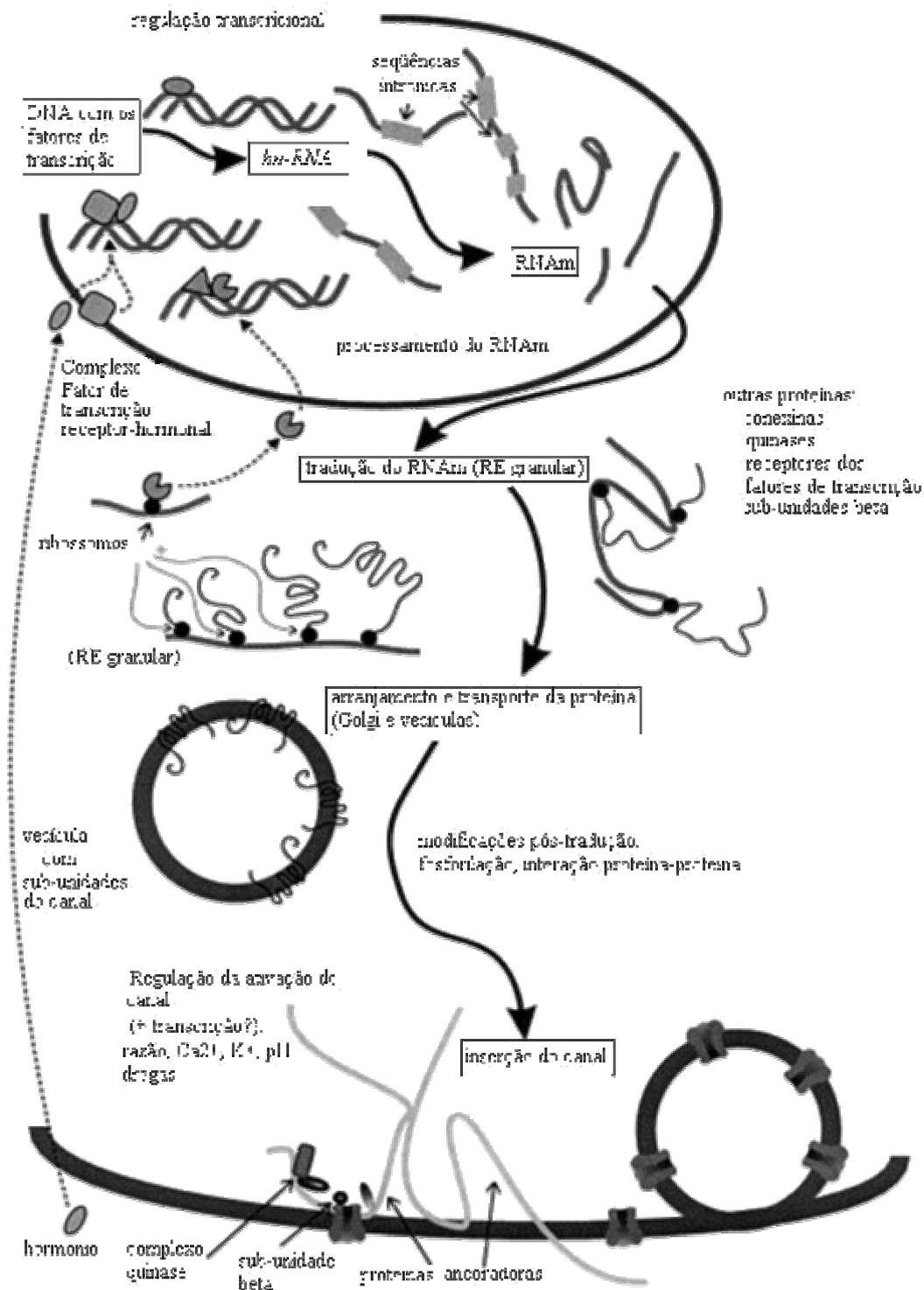


Figura 5 - Etapas envolvidas na expressão dos canais iônicos. A transcrição do DNA a RNAm ocorre no núcleo e a tradução do RNAm ocorre no retículo endoplasmático. Estes são então transportados à superfície celular por vesículas secretadas pelo Complexo de Golgi. Na superfície celular, os canais podem se complexar a outras proteínas.
Fonte: RODEN e KUPERSHMIDT (1999)

2.15 PCR

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu a automatização dos métodos de amplificação de DNA (SAIKI et al., 1985) e consiste na replicação do DNA *in vitro* catalisada por uma DNA polimerase. As fitas recém-sintetizadas servem de molde em um novo ciclo. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos e de dois oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar.

2.16 PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi desenvolvida por HIGUCHI et al. (1992) e permite a detecção direta dos produtos de PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo. A técnica pode ser utilizada para a detecção de patógenos, análise de expressão gênica, detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e, mais recentemente, para detecção de proteínas por imuno-PCR em tempo real (KUBISTA et al., 2006).

Antes das medidas da expressão gênica ser realizada por PCR em tempo real, o mRNA da amostra deve ser transcrito em cDNA (DNA codificante) por transcrição reversa (RT) através da enzima transcriptase reversa. Os *primers* Oligo (dT) hibridizam com a cauda poli-A presente na maioria dos mRNA e a transcrição reversa se inicia a partir da terminação (3') (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Com o objetivo de detectar o sinal de fluorescência durante as reações, foram desenvolvidas várias químicas. Por exemplo, as sondas *TaqMan*,

baseadas no princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), *molecular beacons*, *scorpions* e sondas para hibridização (ALVES, 2004). Uma outra forma de detecção utiliza o *dye SYBR Green*, que se liga ao DNA dupla fita emitindo fluorescência (figura 6). É um sistema mais barato em relação à construção de sondas marcadas. Com a utilização deste corante, os *primers* devem ser desenhados cuidadosamente a fim de evitar a amplificação de produtos inespecíficos, assim como a formação de dímeros de *primers*, uma vez que qualquer fita dupla de DNA terá um aumento na fluorescência detectado. Os dímeros de *primers* interferem na formação de produtos específicos por causa da competição por reagentes e podem levar a leituras errôneas.

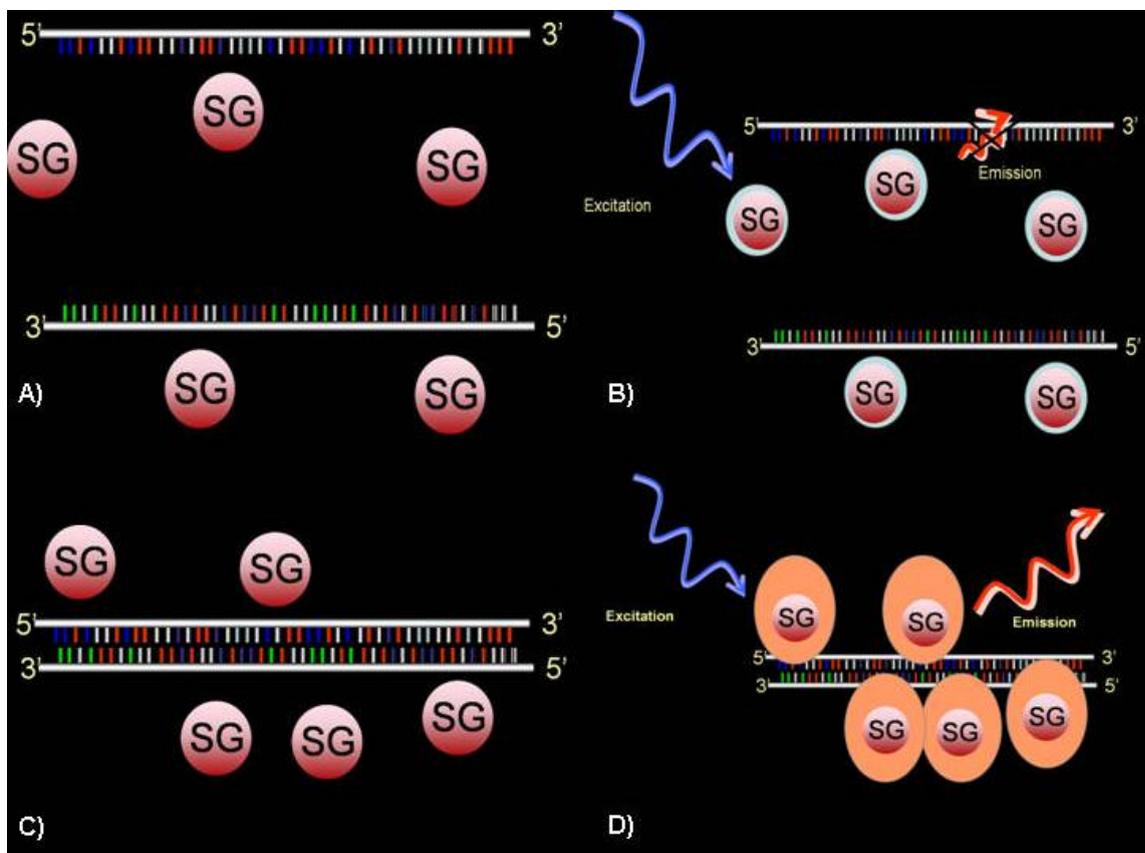


Figura 6 - Sistema SYBR Green.
Fonte: BEXTINE (2005)

O aumento na emissão de fluorescência pode ser lido por um detector em tempo real durante a reação de PCR, e é uma consequência direta da amplificação da seqüência de DNA de interesse. A magnitude do sinal de fluorescência produzido por cada reação é indicado pelo valor de ΔR_n , que é calculado usando a seguinte equação: $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$, onde: R_n^+ representa a emissão de fluorescência em cada ponto e R_n^- , a emissão de fluorescência na linha de base. O *threshold* é a linha cuja de intersecção com a curva de amplificação define C_t e é calculado do ciclo de número 3 ao 15.

O nível de expressão (RQ) é calculado pela subtração do C_t da amostra com o C_t do controle endógeno, gerando o ΔC_t . Este valor de ΔC_t dos tratamentos é subtraído do valor de ΔC_t da amostra controle (calibrador), resultando num valor de $\Delta\Delta C_t$. O valor RQ finalmente é calculado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo (100 % = 1) e do controle endógeno (100 % = 1) (PFAFFL, 2001).

Os *plots* de amplificação são construídos usando estes dados de fluorescência e os ΔR_n são plotados vezes o número de ciclos de amplificação (figura 7). Um ciclo limiar (C_t) arbitrário é escolhido baseado na variação da linha de base. Os valores de C_t são então calculados por determinação do ponto no qual a fluorescência excede esse limiar escolhido. Desta forma, pode-se definir o C_t como o número de ciclos neste ponto e afirmar que este valor irá refletir a atividade transcricional do gene em cada amostra, em particular.

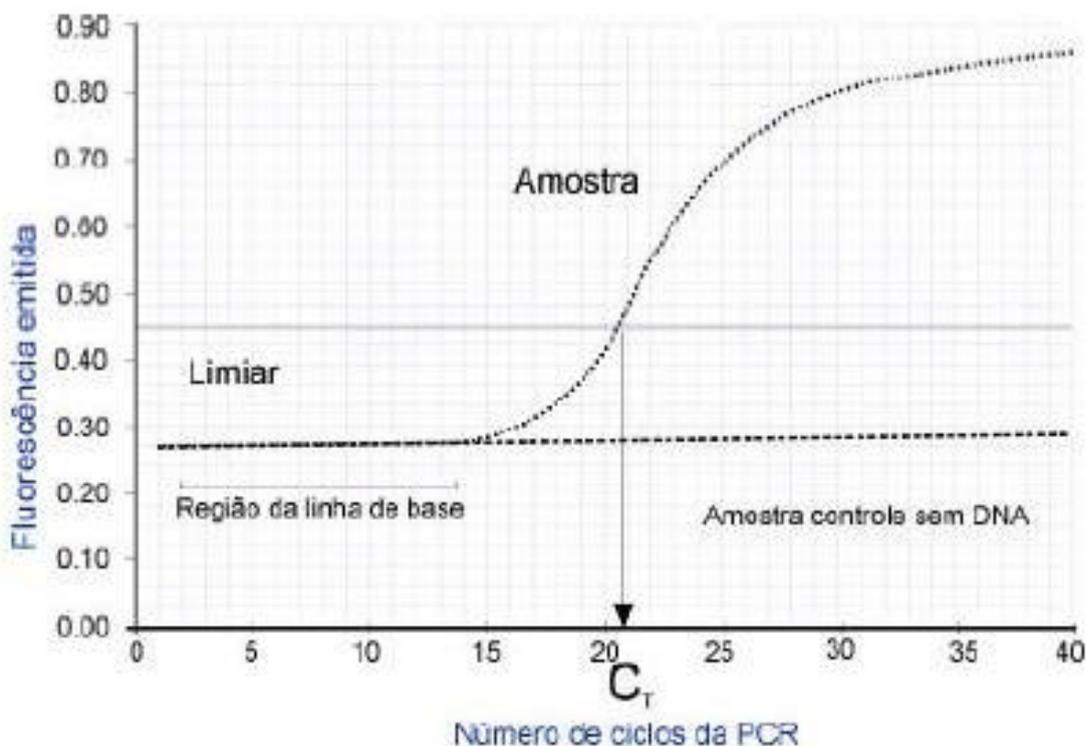


Figura 7 - Curva de amplificação da PCR em tempo real. Ct: *Cycle threshold*. A amplificação mostra 3 fases distintas: (1) linha basal: não houve produtos de PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) a fase platô: não há mais aumento no número de produto.

Fonte: NOVAIS e PIRES-ALVES (2004)

A seguir, os produtos de PCR são identificados pela execução de uma Curva de Dissociação ou *Melting Curve*, que consiste na medição contínua da fluorescência enquanto a temperatura é vagarosamente elevada. Uma curva com um pico é produzida toda vez que as temperaturas de desnaturação são atingidas tanto para produtos de PCR específicos, como não específicos. Como os dímeros de *primers* são menores e apresentam a *melting temperature* inferior, sua presença é facilmente detectada. A corrida em gel de agarose (1,0 %) serve para confirmar a não formação de dímeros de primers e/ou produtos inespecíficos, e também para verificar se os fragmentos apresentam o tamanho desejado (LIU et al. 2005).

Os métodos para analisar os dados de experimentos de PCR em tempo real são: o método de quantificação absoluta e o método de quantificação relativa. No primeiro, o número de cópias é determinado relacionando-se o sinal de PCR com uma curva-padrão, onde se utilizam diluições seriais de uma amostra de concentração conhecida. O método de quantificação relativa é feito entre a relação do sinal da PCR de um gene de interesse entre um grupo tratado com uma amostra controle. Nos dois métodos são utilizados genes constitutivos para a normalização das amostras. Tais genes devem ter expressão constante em todos os tecidos e todas as fases de desenvolvimento, bem como não serem afetados pelos tratamentos experimentais. O gene mais utilizado com esta finalidade é o gene da β -actina (ALVES, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar variações na seqüência genômica e nos níveis de expressão dos genes da proteína receptora de rianodina possivelmente relacionadas com a ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) de frangos e, também, avaliar possíveis diferenças de atributos sensoriais de filés de peito (*P. major*) de frango.

3.2 Objetivos Específicos

a) Seqüenciar um domínio específico (*pFam 00520*) do gene da \hat{a} -RyR, homóloga à proteína receptora da rianodina 3 (RyR3), de aves F₃ normais e PSE provenientes de cruzamento divergente entre linhagens de frango de corte e galinhas poedeiras.

b) Avaliar diferenças nos níveis de expressão dos genes *á-ryr* e *â-ryr* em diferentes linhagens de frangos (*Gallus gallus*) com e sem a anomalia PSE.

c) Avaliar se os provadores seriam capazes de selecionar, em função da preferência por determinados atributos de textura, filés de peito (*P. major*) de frango que apresentavam ou não o fenômeno PSE e diferenciar a intensidade de coloração entre os filés *in natura*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapa 1: Seqüenciamento do Produto de PCR do Domínio pFam 00520

4.1.1 Matéria-prima

Foram abatidos 1.497 frangos da geração F_3 da população referência para mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) da EMBRAPA Suínos e Aves (LEDUR et al., 2002). Os animais foram divididos em 2 grupos distintos, onde um deles foi submetido ao estresse térmico (exposição à temperatura de 40 °C por 60 minutos, conforme sugerido por OLIVO (1999)) e o outro, não. A partir das amostras de sangue total destes indivíduos, foram selecionadas e extraídas 20 amostras de DNA (LARA, 2003; DROVAL, 2004), procedentes de 10 indivíduos que originaram carnes PSE ($L^* > 53$ (PSE)) e 10 indivíduos que resultaram em carnes de características Normais ($44 \leq L^* \leq 53$ (Normal)) (BARBUT, 1997a).

Esta linhagem referência foi desenvolvida através de cruzamentos de animais de linhagens experimentais divergentes, de corte (TT) e postura (CC). A primeira geração destas aves (F_1) consta de 6 famílias de irmãos completos, cada uma contendo 3 machos e 6 fêmeas escolhidas ao acaso. As aves foram criadas como matrizes de frango de corte e alojadas em gaiolas individuais. Para a formação da segunda geração (F_2), foram selecionados 1 macho e 3 fêmeas ao acaso de cada família F_1 . Através de inseminação artificial, cada macho acasalou 3 fêmeas, não parentes próximos. A população F_2 foi identificada com controle de pedigree individual, e avaliada para as características de desempenho e carcaça. Na

população F₃, foi estudado o seqüenciamento de regiões codificantes para o gene da α -RyR (\hat{a} -ryr), pelos colegas Dr. Jorge A. F. Lara e Ms. Adriana A. Droval.

4.1.2 Determinação de carne PSE

A caracterização de carnes PSE pode ser obtida pela combinação de dois parâmetros de qualidade, o valor de pH final e o valor de L^*_{24h} . OLIVO (1999) e OLIVO e SHIMOKOMAKI (2001) caracterizaram inicialmente o PSE como $L^* > 52$. Pesquisas e trabalhos subseqüentes do grupo do Prof. Dr. Massami Shimokomaki, aliados aos subsídios de literatura, permitiram caracterizar a qualidade de filés de frango através da análise do valor de L^*_{24h} , nas seguintes faixas: $L^*_{24h} > 53$ (PSE); $L^*_{24h} < 44$ (análogo ao DFD) e $44 \leq L^*_{24h} \leq 53$ (normal) (SOARES et al., 2002). Segundo BENDALL e SWATLAND (1988), em suínos, os valores de L^*_{24h} foram os mais adequados para a estimativa de incidência de carnes PSE.

4.1.3 Medida do pH *post mortem*

Para as análises de pH utilizamos um potenciômetro digital portátil Sentron 1001 (Sentron), dotado de eletrodo para carnes, com resolução de 0,01 unidade de pH. O aparelho foi calibrado em solução tampão de pH 4,0 e pH 7,0. Foram obtidas três leituras por amostra e considerado como resultado final o valor médio desses resultados.

4.1.4 Análise de cor (L^* , a^* , b^*)

A cor das amostras foi avaliada pelo sistema CIE $L^*a^*b^*$, em que L^* representa o índice de luminosidade; a^* o teor de vermelho e b^* o teor de amarelo. Foram tomadas medidas em três pontos distintos do peito, cuja média foi considerada como leitura válida para cada amostra. O valor L^* foi utilizado para determinar a cor classificatória de peitos de frango normais ou PSE (McCURDY, 1996). A medida de cor foi realizada com a utilização de um colorímetro (Minolta Chroma Meter, M CR-10). Foram consideradas carnes PSE aquelas que apresentaram valores de $L^*_{24h} > 53,0$ e pH_{24h} inferior a 5,8 (BARBUT, 1997a).

4.1.5 Extração de DNA

No processo de extração de DNA foi utilizado o reagente DNAzol® (Gibco, Co), composto de uma solução de lise celular com detergente tiocianato de guanidina. O protocolo de extração foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, disponível no anexo II.

4.1.6 Seleção das regiões gênicas para estudo e desenho dos primers

Genes candidatos para diferentes mutações em frangos já foram identificados ou sugeridos por estudos genéticos ou de fisiologia. Neste trabalho, consideramos o gene (\hat{a} -*ryr*) da proteína receptora de rianodina \hat{a} como o gene candidato para a procura de mutações no estudo do fenômeno PSE, por ele ser efetivamente expresso e estar relacionado com o processo de contração muscular em aves.

Um domínio da transmembrana do gene *â-ryr* relacionado ao controle do fluxo de cálcio (figura 8) e, possivelmente, à ocorrência do PSE em aves foi selecionado. Pela definição, um domínio extracelular é parte de um receptor projetado para fora da membrana, caso a cadeia polipeptídica cruze a bicamada lipídica várias vezes. O domínio *pFam 00520* é encontrado nos canais de sódio, potássio e cálcio e permite a passagem de íons através das membranas celulares, sendo considerado essencial para processos fisiológicos como a contração muscular (SIGWORTH, 2003).

Este domínio é formado por subunidades α -hélices (que contêm o poro do canal e o sensor de voltagem) que atravessam a membrana lipídica, com partes que se projetam para fora e para dentro da célula. A chamada P-region (P, de poro) é altamente conservada em todos os canais dependente de voltagem e pequenas alterações na seqüência de aminoácidos dentro delas poderiam levar à perda da seletividade iônica do canal (SIGWORTH, 2003).



**Figura 8 - Domínios específicos do gene *â-ryr*, de *Gallus gallus* (GI:46048743). Em verde, está indicado o domínio *pFam 00520*.
Fonte: www.ca.expasy.org**

A partir da seqüência de mRNA do gene do receptor de rianodina α de *Gallus gallus* (GI:46048743) disponível no GenBank (NCBI – National Center of Biological Information), fez-se o alinhamento desta com o genoma do frango, através

do programa BLAST Genomes, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/GgaBlast.html>, onde obtivemos uma série de seqüências contíguas (contigs) com 100% de similaridade com a proteína α -RyR (figura 10).

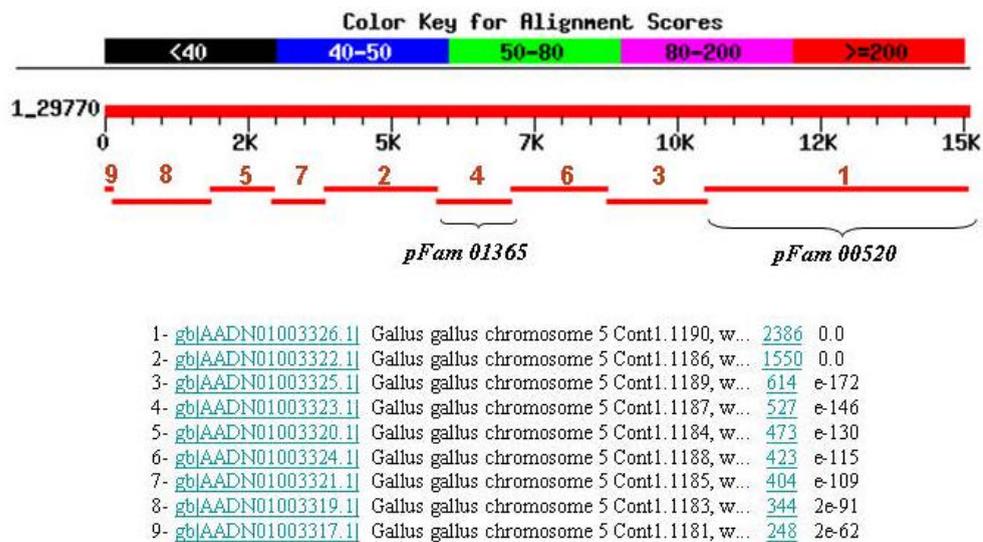


Figura 10 - Seqüências contíguas do gene α -ryr de *Gallus gallus*.

Verificou-se então que o domínio *pFam 00520* é encontrado no *contig* [gb\[AADN01003326.1\]](#). Com estas informações e utilizando também a seqüência de nucleotídeos deste domínio específico (tabela 3), disponível no ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q90985>), utilizou-se o programa de alinhamento local BLAST 2 sequences (ALTSCHUL et al.,1990) para delimitar exons e introns.

Tabela 3 - Seqüência de nucleotídeos que compõe o domínio pFam 00520.

Domínio	Seqüência
<i>pFam 00520</i> (13.902-14.381)	ATTTGGAAGCTCGGTGTTGTTTTCACTG7ATAATTCATTTTT GTATTTAGCTTGGTACACAACACTATGTCTATCCTTGGGCACT ATAACAACCTTCTTTTTTGTCTGCTCATCTGCTGGACATTGCTA TGGGTTTCAAGACATTGCGAACCATTTTGTCCCTCTGTCCT CACAATGGCAAACAGCTTGTGCTGACTGTAGGACTCCTGG CTGTAGTAGTGTATCTTTACACTGTTGTGGCGTTCAACTTCT TCCGCAAATTCTACAATAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCA GATATGAAATGTGATGACATGATGATGTGTTACCTATTCCA CATGTACGTGGGTGTAAGAGCTGGTGGTGGCATTGGGGAT GAAATTGAGGATCCTGCTGGAGACCCTTATGAAATGTATCG AATTGTCTTCGACATCACATTTTTCTTCTTTGTCATTGTCATC CTA CTGGCCATTATTCAAGGTCTGATT

Tabela 4 - Primers desenhados para os exons hipotéticos do domínio pFam 00520 contidos no contig gb[AADN01003326.1].

Fragmento	Seqüência dos primers		Amplicon (pb)
	Direto	Reverso	
Exon 1	5'-GCATACGAAGTGCATAACAG-3'	5'-CAAGTAGTGGAGACATGC-3'	222
Exon 2	5'-CCTTAAATGTACAGTGGAGTTG-3'	5'-TGGAGGAGTCTGTTCTTTAATC-3'	398
Exon 3	5'-CACACCCTATGATATCTTTTCC-3'	5'-ATTTGAAGCGTGCTGGT-3'	274
Exon 4	5'-TGAAACCGCACTAGTTAAGA-3'	5'-ACATTTTCATAAGGGTCTCCA-3'	247

4.1.7 PCR

As amostras de DNA foram amplificadas por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (SAIKI et al., 1988) em termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System-9600). As concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação estão descritos na tabela 5. As temperaturas de amplificação utilizadas na PCR foram as seguintes: 5 minutos a 94 °C para desnaturação da fita de DNA, seguida de 38 ciclos de 94 °C por 30 segundos

(desnaturação), temperatura de anelamento (55 °C) por 1 minuto e 72 °C por 30 segundos (polimerização). O programa terminou com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Depois de amplificadas, as amostras foram mantidas em -20 °C até sua utilização.

TABELA 5 – Concentrações e volume dos reagentes empregados na PCR.

Reagente	Concentração inicial (estoque)	Concentração final (por μL)	Volume (μL)
Água Autoclavada	-	-	12,1
Tampão TE	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,6
DNTPs	2,5 mM	0,2 mM	1,6
<i>Primer Forward</i>	50 μM	2,5 μM	1,0
<i>Primer Reverse</i>	50 μM	2,5 μM	1,0
Amostra de DNA	30 ng/ μL	2,2 ng	1,5
<i>Taq DNA Polimerase.</i>	5 U	1 U*	0,2

* Concentração final por reação (20 μL)

Com o apoio do programa ExonPrimer (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>), desenharam-se conjuntos de primers, descritos na tabela 4, que cobriram a totalidade exons hipotéticos do domínio estudado (anexo V). Os mesmos foram testados através do programa OMIGA® 2.0.

4.1.8 Separação e purificação das bandas

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de

agarose (1%) imerso em solução TBE 1X, a 5 V/cm. A purificação de bandas foi realizada através do kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System® (Promega, Madison, WI) (anexo IV). Na preparação do gel, foram pesados 2,5 g de agarose, diluídos em 250 mL de tampão TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1X, onde acrescentou-se depois 2,5 µL de brometo de etídeo. Em cada poço do gel, foram pipetados 40 µL de cada produto de PCR adicionados de 4 µL de tampão de corrida. A eletroforese foi realizada a 120 V por aproximadamente 2 horas e 40 minutos. Após a corrida o gel foi exposto a luz UV para visualização das bandas e os resultados foram registrados e digitalizados pelo sistema KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Eastman Kodak Company, New Haven). As bandas foram escisadas do gel com auxílio de um bisturi e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL. O tamanho das bandas foi estimado com o emprego de um padrão de peso molecular (Molecular Weight Standard ou ladder) de 100 pares de base (Gibco, Co.).

4.1.9 Seqüenciamento

4.2.9.1 PCR

As bandas purificadas foram submetidas a uma reação de PCR com o intuito de amplificar a região alvo do gene da α -RyR. A reação foi realizada utilizando o kit Cycle Sequencing, sistema ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit®, versão 2 (Applied Biosystems).

Cada reação foi montada da seguinte forma: 3,7 µL de água destilada; 2,0 µL de solução save money (Tris-HCl 0,2M pH 9 e MgCl₂ 5mM) ; 2,0 µL

de mix terminator; 0,8 μL de primer M13 (2 pmol/ μL) e 1,5 μL de DNA. As temperaturas do ciclo de PCR foram: 96 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

O mix terminator é composto por uma polimerase na presença dos quatro nucleotídeos que compõem o DNA (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), em menor quantidade que os 4 nucleotídeos participam da reação os dideoxynucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) marcados com diferentes corantes (diclororhodaminas) que possibilitam a identificação do oligonucleotídeo que os contém, MgCl_2 e Tris-HCl pH 9,0.

4.2.9.2 Precipitação alcoólica do DNA

Após a reação de PCR, as amostras amplificadas foram submetidas a precipitação alcoólica em placa. Foram adicionados 80 μL de isopropanol 75% a cada amostra, e em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm (1.310 g)/ 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente. Em seguida 100 μL de etanol 70 % foi aplicado e o sistema centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante novamente foi descartado e o *pellet* deixado secar a temperatura ambiente e protegido da luz.

4.2.9.3 Separação dos fragmentos amplificados

Após a precipitação do DNA, foram adicionados em cada amostra 10 μL de formamida e as placas foram, então, levadas ao termociclador a 95 °C e imediatamente colocadas no gelo com o objetivo de promover nova desnaturação do

DNA, expondo as fitas da hélice e melhorando a eficiência na leitura do seqüenciador.

A separação dos fragmentos de PCR marcados foi realizado em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências foram nomeadas conforme o nome da placa e posição do clone na mesma. Os cromatogramas foram submetidos ao tratamento pelo software Phred (EWING et al., 1998) atribuindo o valor de qualidade às bases. De cada seqüência, foi considerada útil a porção que apresentou pontuação Phred igual ou superior a 20.

4.2.9.4. Análise dos resultados

Os resultados das seqüências codificantes obtidos na análise de seqüenciamento foram comparados entre si, discriminando os indivíduos classificados como PSE ou normais. Depois as seqüências foram submetidas à análise de similaridade com a seqüência de mRNA do *â-ryr* de *Gallus gallus* (número de acesso NM_206874), utilizando o programa BLAST 2 sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/b12.html>) e BioEdit v7.0.5.

4.2 Etapa 3: Análise da Expressão dos Genes *á-ryr* e *â-ryr* em Duas Linhagens de Frangos

4.2.1 Matéria-prima

Com o objetivo de realizarmos a análise da expressão dos genes (*á-ryr* e *â-ryr*) por PCR em tempo-real, foi conduzido um abate, de 204 frangos da população para mapeamento de QTL–Embrapa (102 animais de linhagem de postura (CC) e 102 de linhagem de corte (TT)), criados em galpão experimental. As aves foram abatidas aos 45 dias de idade e peso médio de 450,29 g (CC) e 2.298,2 g (TT).

4.2.2 Abate

O abate foi conduzido seguindo as seguintes etapas: a) identificação da ave; b) pesagem; c) degola; d) sangria; e) escaldagem; f) depenagem e g) evisceração. Em seguida, eram realizadas: a) registro da primeira medida de pH (15 min); b) desossa; c) pesagem dos cortes e d) separação dos peitos para análise posterior (24 h) de pH e cor (sistema CIE L*a*b*). Após a sangria das aves, foram retiradas pequenas amostras (1,0 x 0,5 x 2,0 cm³) de músculo *Pectoralis major* acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, mergulhados em seguida em nitrogênio líquido e mantidos posteriormente em Ultra-freezer (-70 °C).

4.2.3 Análise de pH

Para as análises de pH utilizamos um potenciômetro digital portátil (PH-720, Instrutherm) equipado com eletrodo de inserção (EPC-50), com resolução de 0,01 unidades de pH. O aparelho foi calibrado em solução tampão de pH 4,0 e pH 7,0. Foram obtidas duas leituras por amostra e considerado como resultado final o valor médio desses resultados.

4.2.4 Análise de cor (L^* , a^* , b^*)

A cor das amostras foi avaliada pelo sistema CIE $L^*a^*b^*$, em que L^* representa o índice de luminosidade; a^* o teor de vermelho; e b^* o teor de amarelo. Foram tomadas medidas em três pontos distintos do peito, cuja média foi considerada como leitura válida para cada amostra. A medida de cor foi realizada com a utilização de um colorímetro (Minolta Chroma Meter, M CR-10). Foram consideradas carnes PSE aquelas que apresentaram valores de $L^*_{24h} > 53,0$ e pH_{24h} inferior a 5,8 (Barbut, 1997a).

4.2.5 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita usando reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme metodologia descrita por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987), disponível no anexo VI. O precipitado de RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 20 μ L de H_2O DEPC para posterior determinação da concentração por espectrofotometria. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA total avaliada pela presença das bandas estruturais de RNA ribossômico (28 S, 18 S e 5,8 S) (figura 11) (ALVES, 2004).

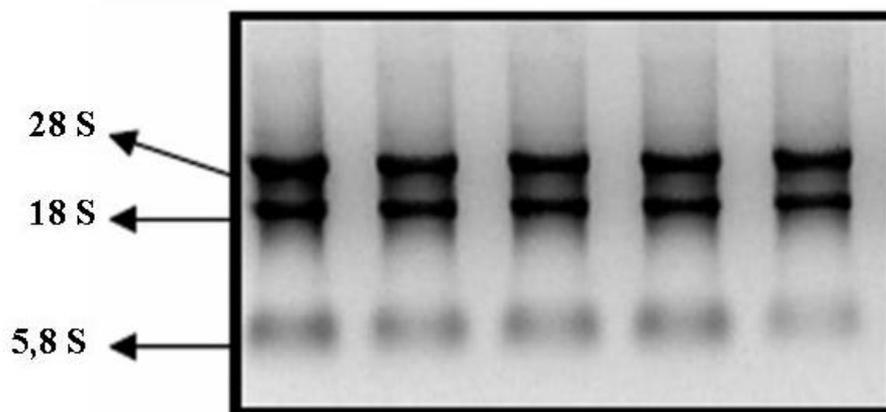


Figura 11 – Gel de agarose 1% para verificação de qualidade do RNA total da musculatura peitoral.

Fonte: ALVES (2004)

4.2.6 Isolamento do RNA mensageiro

As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV) (Invitrogen), para obtenção do DNA complementar (DNAC). Inicialmente, 2 μ L de primer oligo (dT) foram adicionados a 5 μ L de RNA total (2,5 μ g) sendo a mistura aquecida a 80 $^{\circ}$ C por 3 minutos e, logo após, resfriada em gelo. A seguir, foram adicionados 18 μ L de um outro mix composto de 6 μ L de 5 X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]; 4 μ L de 2,5 mM dNTP mix; 2 μ L de M-MLV (200 U/ μ L); 4 μ L de água livre de nucleases e 2 μ L de DTT. Procedeu -se então a incubação a 37 $^{\circ}$ C por 60 minutos, seguida de aquecimento a 65 $^{\circ}$ C por 10 minutos.

4.2.7 Primers

Para amplificar a região de interesse, foram desenhados primers

pelo *Programa Primer Express (Applied Biosystems)* próximo à região 3' dos genes *â-ryr* (GI:46048743) e *â-actina* (GI:45382926), descritos na tabela 6. Os *primers* utilizados na análise da expressão gênica do *á-ryr* foram os mesmos descritos por MAAK et al. (2005), em perus. As regiões amplificadas podem ser conferidas no anexo VII.

Tabela 6 - Primers selecionados para os genes *á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina*.

Gene	Seqüências dos <i>primers</i>		Amplicon (pb)
	<i>Direto</i>	<i>Reverso</i>	
á-RyR	5'-GGCGGGGCTCTACGGGAGCTT-3'	5'-ACG TTCAGCCGGTCGATGCAGTT-3'	210
â-RyR	5'-CTGGCCAGGAGTCATTTGTGT-3'	5'-TGGGAAGAAAATCCCAGCATCT-3'	59
â-Actina	5'-TTCTTTTGCGCTTGACTCA-3'	5'-GCGTTCGCTCCAACATGTT-3'	88

4.2.8 PCR em tempo real

Para as análises de RT-PCR em tempo real, foram selecionados 4 indivíduos PSE e 4 Normais, de cada uma das linhagens avaliadas. Foram preparados dois bulks de cDNAs dos indivíduos sem anomalia, para serem utilizados como calibradores na análise de expressão gênica de suas respectivas linhagens. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador 7300 Real Time System (Applied Biosystems), utilizando-se o kit Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen). Primeiramente, realizou-se uma curva de eficiência de amplificação, que era determinada utilizando-se uma série de diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e, em seguida, procedeu-se a amplificação, propriamente dita, das amostras. A programação de ciclagem foi: 95 °C por 10 min e, então, 45 ciclos de: 95 °C por 2

min; 55 °C por 30 s; 72 °C por 30 s, com os dados sendo coletados na fase de extensão (último passo).

O preparo e distribuição do Master Mix para cada amostra, em placa de PCR de 96 poços (figura 12), foi realizado da seguinte forma: adicionaram-se no primeiro poço 12 μL de DNAC; 75 μL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG; 3 μL de ROX Reference Dye e 8 μL de água Milli Q. Em seguida, o mix foi dividido em dois volumes iguais de 69 μL , para que, então, 3 μL de cada um dos *primers* para os genes alvo e controle endógeno (5 pmoles/ μL), direto e reverso, fossem adicionados em seus respectivos poços. A seguir, o mix foi novamente dividido em volumes finais de 25 μL / poço (triplicata).

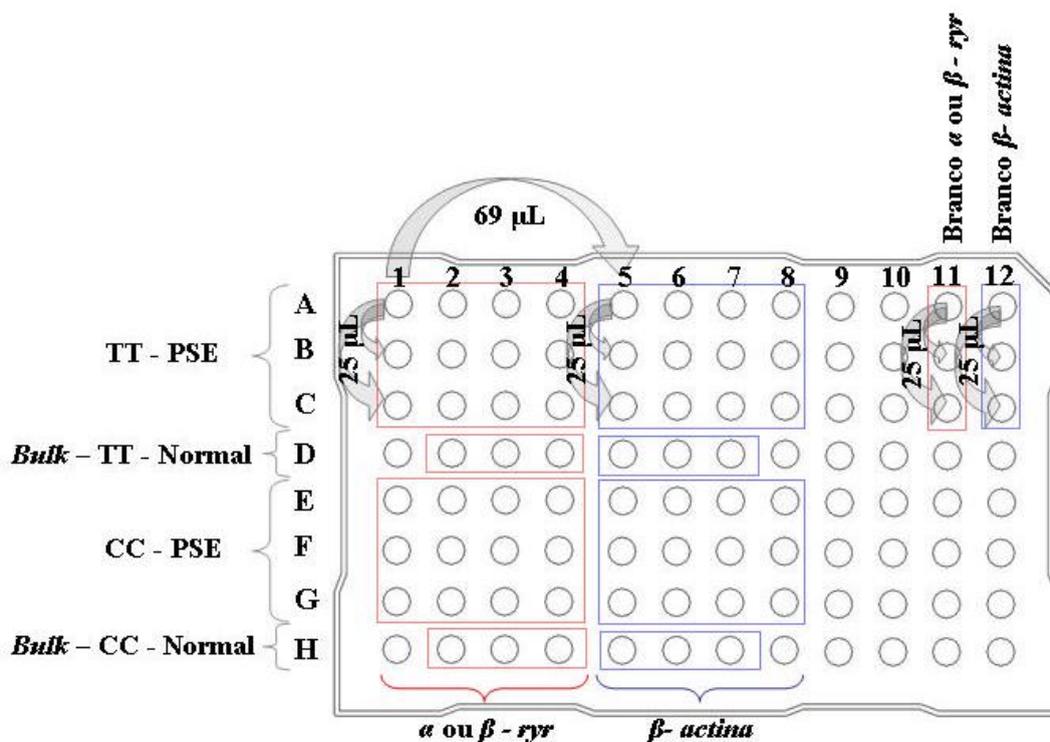


Figura 12 - Distribuição das amostras e reagentes do Master Mix na placa de 96 poços para análise por PCR em tempo real.

Logo após a amplificação das amostras em tempo real, o equipamento realizava uma curva de dissociação (*Melting Curve*) para cada amostra. Esse dado permite verificar a temperatura de desnaturação dos produtos da reação de PCR, podendo-se diferenciar entre os produtos amplificados e os dímeros de primers e produtos inespecíficos. A programação de ciclagem desta etapa foi: 95 °C por 15 s; 60 °C por 30 s e 95 °C por 15 s. Os produtos desta corrida de *melting* eram ainda analisados em um gel de agarose (1%) para checar a especificidade de amplificação (LIU et al., 2005).

O método escolhido para a quantificação dos resultados foi o método de quantificação relativa, já que não é necessário saber o número absoluto de cópias de cada gene e sim a diferença de expressão entre as aves das linhagens estudadas que apresentaram a anomalia PSE. Este método envolve a quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle, um gene constitutivo, que neste trabalho foi o gene *â-actina* (GIULIETTI et al., 2001). Os resultados foram analisados pelo Programa Sequence Detection (Perkin Elmer).

4.2.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 1995). O teste de T foi utilizado para determinar o nível de significância entre os filés de peito de frango PSE e normais com relação aos índices de cor, pH às 24h.

Para as análises de expressão gênica (RQ), foi utilizado o

delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), tendo as repetições como bloco. O modelo experimental foi: $Y_{ij} = \mu + C_i + A_j + \hat{\epsilon}_{ij}$, onde Y_{ij} = valores de RQ da anomalia i , na repetição j ; μ = constante associada a todas as observações; C_i = efeito do tratamento (PSE/TT, Normal/TT, PSE/CC e Normal/CC), sendo $i = 1, 2, 3$ e 4 ; A_j = efeito do bloco (repetições), sendo $j = 1, 2, 3$ e 4 ; e $\hat{\epsilon}_{ij}$ = erro experimental. Os resultados foram analisados através do programa estatístico SAS. Todas as condições requeridas para a análise de variância foram verificadas: a normalidade do erro foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk; a homogeneidade de variância, pelo teste de Burr-Foster; a não aditividade do modelo, pelo método de Tukey e, foram também examinados os coeficientes de assimetria e curtose. Quando as análises de variância determinaram diferenças, os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3 Etapa 4: Análise Sensorial de Filés de Peito de Frango PSE e Normais

4.3.1 Condições ambientais e experimentais

O desenvolvimento experimental foi realizado na região oeste do estado de Santa Catarina (Brasil), durante o verão, e no Departamento de Tecnologia e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina/PR. Os frangos foram transportados das granjas ao abatedouro, por distâncias que variaram de 35 a 80 km. A temperatura ambiental no período do estudo foi de 20 °C a 30 °C, e a umidade relativa variou de 39 a 90 %.

Na chegada ao frigorífico, os animais foram banhados com água a temperatura ambiente, por 10 minutos, através de sistema dotado de aspersores,

seguido de ventilação. As consecutivas etapas de abate seguiram a linha de processamento comercial, e foram as seguintes: insensibilização elétrica, escalda, depenagem, evisceração e resfriamento em pré-chiller (6 a 10 °C/ 25 minutos) e chiller (2 a 5 °C/ 55 minutos) por imersão em água, conforme norma estabelecida por BRASIL (1998). A seguir, as carcaças foram desossadas e os músculos Pectoralis major retirados para análises de pH e cor. Após estas análises, os filés foram armazenados sob resfriamento a 2 °C (± 2 °C), protegidos em embalagens plásticas de polietileno por 24 h e analisados novamente quanto ao pH e cor.

4.3.2 Cora

O valor L^* (luminosidade ou porcentagem de reflectância) foi utilizado para determinar a cor classificatória de peitos de frango normais ou PSE, conforme metodologia descrita por BARBUT (1997b). Foram adotados os valores de L^*_{24h} acima de 53,0 e pH abaixo de 5,8 como indicativos de carne PSE. As leituras foram realizadas na face ventral do filé no momento da coleta e 24 h *post mortem*, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra, sendo a média considerada como leitura válida para cada amostra. Foi utilizado o colorímetro 45/0 Gardner®, calibrado com padrão fornecido pelo fabricante, que além do valor L^* indica também os valores a^* (intensidade de cor vermelha) e b^* (intensidade de cor amarela).

4.3.3 pH

As medidas de pH foram realizadas em duplicata também à coleta e 24 h *post mortem*. O pH glicolítico foi analisado diretamente no músculo *Pectoralis major* pela inserção de eletrodo conectado ao potenciômetro Sentron 1001. O ponto

de incisão do eletrodo foi na parte cranial-ventral do filé (BOULIANNE e KING, 1995).

4.3.4 Perda de peso por cozimento (PPC)

Os filés de peito (PSE e normais) servidos aos provadores foram pesados, ainda íntegros, antes e após a cocção, com a finalidade de se conhecer a perda de peso durante o cozimento (*cooking loss*) (OWENS et al., 2000a). Os resultados, expressos em percentagem, se basearam na diferença entre as pesagens.

Primeiramente, os filés foram cozidos (grelhados) em chapa elétrica, previamente aquecida a 180 °C, até atingirem a temperatura interna de 72 °C (± 2 °C), cerca de 10 minutos depois (5 minutos/ lado). A seguir, foram resfriados a 40 °C (± 2 °C) para serem novamente pesados em balança semi-analítica. A temperatura foi monitorada com auxílio de um termômetro digital.

4.3.5 Análise sensorial

Foram aplicados Testes de Comparação Pareada utilizando 40 provadores treinados com o objetivo de determinar diferença na intensidade de cor entre amostras de filés de peito de frango PSE e Normais e, também, avaliar se os provadores seriam capazes de selecionar, em função da preferência por determinados atributos de textura, filés que apresentavam ou não o fenômeno PSE (MEILGAARD et al., 1999; CARVALHO et al., 2005).

Os filés de peito utilizados na avaliação, na sua forma integral e in natura (sem adição de qualquer tipo de tempero), foram previamente pesados e

cozidos (grelhados) em chapa elétrica até atingirem a temperatura interna de 72 °C (± 2 °C). A seguir, foram resfriados a 40 °C (± 2 °C), pesados em balança semi-analítica para determinação da PPC e preparados para serem servidos. Os provadores, separados em cabines individuais (em grupos de 5 por vez), receberam uma ficha de avaliação (anexo IX), na qual responderam as questões sobre diferença e preferência entre as duas amostras. Adicionalmente, foram solicitados a exporem de forma espontânea, comentários e as razões de sua preferência.

4.3.6 Perda de umidade no descongelamento (*Drip Loss*)

Os filés utilizados na análise de textura instrumental tiveram os pesos iniciais (antes do congelamento) anotados. Assim, o *Drip Loss* de cada amostra foi calculado pela diferença de peso após o seu descongelamento em refrigerador (4 °C/ 48 h) e expresso em percentagem.

4.3.7 Textura instrumental

Na determinação da força de cisalhamento (maciez) das amostras cozidas, utilizou-se um texturômetro Texture Analyser TA-TX2i, equipado com lâmina Warner-Bratzler e regulado para a velocidade de 5 mm/ s (BRATZLER, 1949). Os resultados foram expressos em Newton da força máxima necessária para o corte das amostras.

Foi utilizado um total de 17 filés íntegros (7 PSE e 10 Normais), transportados congelados até o laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/ UEL. No momento das análises, as amostras foram descongeladas em refrigerador (4 °C/ 48 h) e seu peso anotado. Os filés foram,

então, cozidos em chapa elétrica e avaliados também quanto à perda de peso por cozimento (PPC). A seguir, amostras na forma de paralelepípedos com $1 \times 1 \times 2 \text{ cm}^3$ (altura, largura, comprimento), foram retiradas e colocadas com as fibras no sentido perpendicular às lâminas do aparelho (FRONING et al., 1978).

4.3.8 Índice de fragmentação miofibrilar (MFI)

O índice de fragmentação miofibrilar da carne foi determinado de acordo com CULLER et al. (1978). Foram utilizados 4 g de amostra de carne, ainda congelada, livre de gordura e de tecido conjuntivo, homogeneizados em homogeneizador do tipo Ultra Turrax com 20 mL de tampão MFI contendo KCl 100 mM, fosfato de potássio 20 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 1mM e azida sódica 1 mM, por 30 s. Em seguida, a solução homogeneizada foi centrifugada, por 15 minutos, a $4.000 \times g$, a 2°C . O sobrenadante foi filtrado em papel filtro comum e reservado, mantendo-se a temperatura de 2°C . O decantado foi ressuspensão novamente em 20 mL de tampão MFI (2°C) usando um bastão de vidro e, então, centrifugado novamente nas condições anteriores. Novamente filtrou-se o sobrenadante juntando-se com o anterior.

Em tubos de ensaio colocou-se 1 mL de cada suspensão com 4 mL do reagente biureto. Estes tubos foram postos em uma sala escura por 30 min para a reação. Simultaneamente fez-se curva padrão com Albumina Sérica Bovina, nas seguintes concentrações: zero (branco), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mg/ml. Em seguida, foram feitas as leituras das amostras em espectrofotômetro (540 nm) e determinou-se então a concentração de proteína para cada suspensão.

Para obtenção do índice de fragmentação miofibrilar, adicionou-se

quantidades apropriadas do tampão MFI para fazer 8 mL de uma solução 0,5 mg de proteína/mL. Fez-se novamente a determinação de biureto e a leitura espectrofotométrica a 540 nm foi multiplicada por 200.

4.3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 1995). O teste de T foi utilizado para determinar o nível de significância entre os peitos PSE e normais com relação aos teores de luminosidade, pH às 24h; PPC e força de cisalhamento (FC).

Os dados da análise sensorial foram analisados através da comparação do número mínimo de respostas coincidentes (N.R.C.) para o número total de testes aplicados, a 5% de significância, em tabelas específicas para cada teste (MEILGAARD et al., 1999).

4.4 Etapa 5: Ensaio para Separação das Isoformas á-Ryr e â-Ryr por Imunoprecipitação

Estes ensaios foram parte do treinamento no Laboratório de Carnes, da Michigan State University - MSU, sob co-orientação do Prof. Dr. Gale M. Strasburg e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Processo BEX 2223/04-0). O objetivo inicial seria a realização na MSU do seqüenciamento de fragmentos de DNA que cobriam a totalidade dos domínios *pFam 01365* e *pFam 00520*, dadas as facilidades para tal, oferecidas pela Universidade. Porém, um outro trabalho foi proposto pelo co-orientador Dr. Gale M. Strasburg e sua Equipe. Esta nova proposta foi aceita pelo orientador, Prof. Dr.

Massami Shimokomaki, e consistiu da execução de um estudo para desenvolvimento a metodologia de separação das duas isoformas da RYR (á e â) de músculo esquelético de peito de perus por imunoprecipitação, e conhecimento de técnicas como extração do Heavy Sarcoplasmic Reticulum (HSR) e do Crude Sarcoplasmic Reticulum (CSR); quantificação de proteínas; corrida de proteínas em géis verticais de agarose e poliacrilamida; *Western Blotting* e imunoprecipitação (IP). Estas metodologias, quando otimizadas, possibilitarão novos estudos como os de caracterização das propriedades e mecanismos de ativação e controle de cada isoforma dos canais de cálcio, como detalhado por MURAYAMA e OGAWA (2004), além de representar uma ferramenta para a detecção de indivíduos potencialmente predipostos a originar carnes com qualidade anômala, conforme sugerido na patente U.S. Pat. N°. 2005/0272362.

4.4.1 Extração de proteínas do retículo sarcoplasmático (RS)

A extração de proteínas seguiu o protocolo previamente descrito por MURAYAMA et al (1999), com pequenas modificações. Inicialmente, a amostra de tecido (P. major) de perus foi descongelada em câmara fria, homogeneizada com um Blender homogeneizador em tampão de homogeneização I (1 L de NaCl 0,1 M; Tris-maleato 5 mM; pH 7; 2-mercaptoethanol 30 mM e inibidores de protease (PMSF a 0,2mM; Aprotinina; Benzamidina; Pepstatina; Leupeptina, a 1 ì g/ mL), a 4 °C. O homogenato foi centrifugado (30 min/ 4.500 rpm) e o pelete descartado. O sobrenadante inicial coletado, foi filtrado e novamente centrifugado (30 min/ 10.000 rpm). O pelete, então, foi ressuscendido em tampão II (100mL de KCl 0,6M; Tris-maleato 5mM; pH 7; 2-mercaptoethanol 30mM) e centrifugado (40 min/ 42.000 rpm) utilizando rotor Ti-70. Desta vez, o pelete formado era ressuscendido em um

pequeno volume de Sucrose 10% e novamente centrifugado (40 min/ 42.000 rpm) utilizando rotor Ti-70. O pelete resultante era ressuspendido em 8 mL de tampão III (50mL de sucrose 10%; KCl 0,4M; Tris-maleato 5mM; pH 7) e o volume final ajustado para 10 mL. Aproximadamente 2,5 mL de amostra eram colocadas em cada um dos gradientes de Sucrose (Sucrose 22 % + KCl 0,4 M + Tris-maleato 5 mM; pH 7; Sucrose 36 % + KCl 0,4M + Tris-maleato 5 mM; pH 7 e Sucrose 45 % + KCl 0,4M + Tris-maleato 5 mM; pH 7) e centrifugados (5 h/ 25.000 rpm) utilizando o rotor Dupont AH629. As frações eram diluídas (1:1) em Sucrose 10% e depositadas em tubos apropriados ao rotor Ti-70, que eram centrifugados (40 min/ 42.000 rpm). O pelete final era ressuspendido em solução de Sucrose 10% e aproximadamente 25 µL eram separados para corrida em gel e para a quantificação. Ao restante, era adicionado DTT em uma proporção de 1:1.000, e as amostras eram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C.

4.4.2 Solubilização das proteínas do RS

A solubilização das proteínas extraídas do RS foi realizada segundo a metodologia adaptada de SHOMER et al., 1993. As concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações e volume dos reagentes empregados na solubilização de proteínas do RS.

Soluções Estoque	Concentração final das soluções de solubilização
MOPS PM = 209,3 (pH 7,2)	50 mM
NaCl (PM = 58,5)	0,3 M
CHAPS	1,6 %
DTT	5 mM

Benzamidina (PM = 156,6)	0,8 mM
Leupeptina	1 ì g/ mL
Aprotinina	1 ì g/ mL
PMSF	0,1 mM
Pepstatina	0,6 ì g/ mL
Membrana RS	1,3 mg/ mL

Inicialmente, a solução de solubilização foi preparada e estocada a 4 °C. A amostra de RS mais a solução, foram deixados por 2 horas à temperatura ambiente, em um agitador magnético com um magneto para agitar a solução. Foi retirada uma alíquota de (aproximadamente 100 ìL), transferida para tubos apropriados ao rotor Ti-70. Foi realizado, então, um spin (20 min/ 35.000 rpm/ 4 oC) e separada alíquota para corrida em gel. As proteínas foram quantificadas pelo método de LOWRY (1951), comparando as medidas obtidas para as amostras à curva padrão de albumina bovina lida a 750 nm

4.4.3 Géis de agarose e de poliacrilamida

Os géis de agarose, foram realizados segundo a descrição de WARREN et al. (2003) e os mini géis de SDS-PAGE, segundo o Manual Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (BIO-RAD). Para 40 mL de gel de agarose eram utilizados: 1% de agarose Sea Kem Gold (Biowhittaker Cell Biology Products, Walkersville, MD), 30% de glicerol, Tris-base 50 mM, glicina 0,384 M e 0,1% de SDS, sem ajuste do pH. Para um volume de 2,5 mL do gel de empilhamento, usavam-se: 12,8% de T-acrilamida; 2,34% de DATD (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); 10% de glicerol; Tris-Cl 0,5 M, pH 9,3; 0,028% de APS e 0,152% de TEMED.

Para o de gel de acrilamida, eram utilizados: 8,4 mL de água, 1,5 mL

de acrilamida/ bisacrilamida a 50%, 3,6 mL de separating buffer pH 8,8, 0,1 mL SDS a 10 %, 1,4 mL de glicerol, 50 μ L de APS a 10 % e 5 μ L de TEMED. Para o gel de empilhamento usavam-se 6,1 mL de água, 0,8 mL de acrilamida/ bisacrilamida a 49,5%, 2,5 mL de stacking buffer pH 6,8, 100 μ L de APS a 10% e 20 μ L de TEMED.

4.4.4 Western blotting

As análises por western blot foram realizadas utilizando aproximadamente 50 μ g de proteína desnaturada em tampão de amostra, por poço. As amostras eram separadas em mini-géis SDS-PAGE 5%, em tampão de corrida (Tris 0,25 M; Glicina 1,92 M, SDS 5 %, 2-mercaptoethanol 30mM), utilizando-se 100 V e um tempo de corrida que variava de 120-180 minutos. Foi montado o sanduíche banhado em tampão de transferência, a 4 °C, (Tris 25mM; 192 mM de Glicina, 0,1% de SDS, pH 7,5) e fixado à cuba eletroforética para executar a transferência para a membrana de nitrocelulose (0,22 μ m) segundo TOWBIN et al. (1979), com amperagem fixa em 300 mA e por 180 minutos. Após esta etapa, a membrana era deixada overnight em solução de metanol 15 % e o gel, separado em recipiente contendo solução corante (Commasie Blue; Metanol 50 % + Ácido acético 10 % + água 40 %) para realização de corrida em gel de poli(acrilamida). Em seguida, a membrana era enxaguada em água, cortada em tiras e, então, era realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução BSA-TBST por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio era removida lavando-se a membrana TBST. Os anticorpos de interesse (anti-á, anti-â ou anti-ââ) eram diluídos em solução de bloqueio, mantidos à temperatura ambiente sob agitação por 120 minutos. Seguiam-se duas lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBS sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado

a peroxidase (alkaline phosphatase anti-mouse IgG (Promega, Madison, WI)), diluído em solução de bloqueio (1:7.500) era então aplicado por 120 minutos e depois lavado em TBS (2 ciclos de 10 minutos cada). Após as lavagens, as amostras foram incubadas e monitoradas com o substrato enzimático NBT/ BCIP (4-nitro-azul de tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Roche) até a revelação das bandas nas tiras (cerca de 15 minutos), e depois a reação era interrompida lavando-se a membrana várias vezes em água destilada.

4.4.5 Ensaio de imunoprecipitação

Inicialmente, foi determinada a concentração de proteínas nos lisados celulares, que eram então diluídos (1 µg/ µL) em solução de tampão de imunoprecipitação (8 g NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ e 0,24 g de KH₂PO₄, pH 7,4, em 1000 mL de água destilada). Os ensaios foram realizados testando uma relação anticorpo/ proteína de 1:100 e de 1:20. O anticorpo (anti-â) foi incubado durante 4-24 h sob agitação leve, a 4 °C, nos lisados celulares. O lisado celular contendo o imunocomplexo foi incubado pela segunda vez de 4-24h, a 4 °C, com adição de 50 µL de proteína A (protein A sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences, Sweden). Esta mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi reservado, e a proteína A e o imunocomplexo foram capturados. O pelete foi lavado por 3 vezes com 800 µL de solução de tampão fosfato de sódio gelado e ressuspenso em 60 µL em tampão de amostra (Uréia 8 M, tiouréia 2 M, SDS 3%, DTT 75 mM, Tris base 0,05 M pH 6,8 e 0,03 % de bromophenol blue). O pelete foi fervido por 5 minutos para dissociar o imunocomplexo da proteína A. A proteína A era coletada por centrifugação, a 14.000 rpm por 10 minutos, e a solução eluída, contendo o anticorpo e quaisquer outras moléculas que porventura

estivessem ligadas a ele, eram utilizadas na corrida em gel SDS-PAGE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1

5.1.1 Análise da eletroforese em gel de agarose 1%

As amostras de DNA foram extraídas a partir de amostras de sangue dos 13 indivíduos que originaram as aves F3 estudadas por LARA (2003) e, de forma semelhante, armazenadas na Embrapa Suínos e Aves. Após a verificação da integridade do material extraído, por corrida em gel de eletroforese 1,0 %, realizou-se a amplificação por PCR do fragmento 3_{yr3}.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % para verificação, sob luz ultravioleta, da presença de bandas únicas para este fragmento. Constatou-se, entretanto, a presença de várias bandas de pesos moleculares diferenciados em todas as amostras avaliadas (figura 13), de forma diversa ao ocorrido com LARA (2003). Assim, optou-se pelo sequenciamento das bandas (numeradas de 1-45), seu agrupamento e identificação das seqüências consenso.

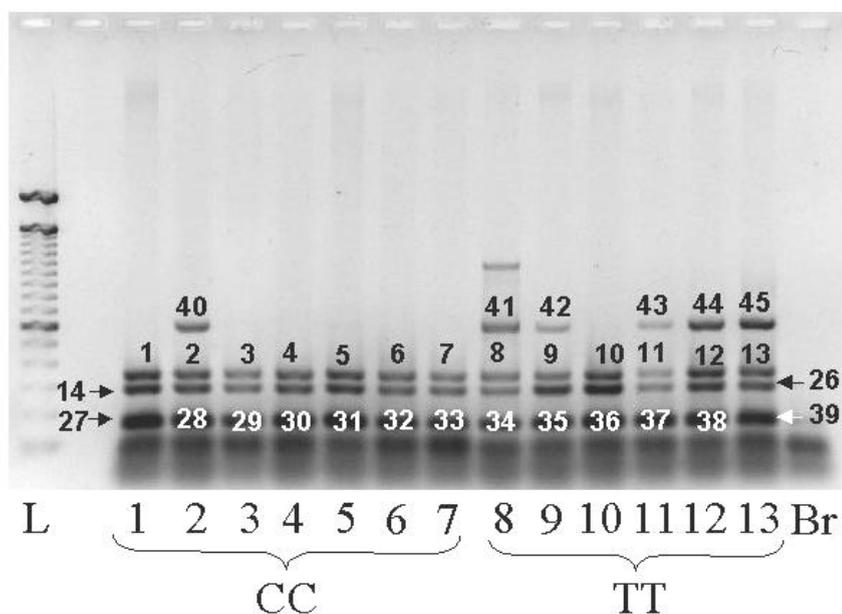


Figura 13 – Produtos de PCR para o fragmento 3yr3. Nota-se a presença bandas com pesos moleculares diferenciados em todas as amostras avaliadas.

5.1.2 Análise de seqüenciamento e da estrutura primária do fragmento 3yr3

Os fragmentos visualizados no gel de agarose foram clonados utilizando o vetor PGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI), sendo escolhidos 2 clones do mesmo fragmento para o seqüenciamento. Os cromatogramas obtidos foram agrupados em 4 contigs conforme o peso molecular (tabela 8), utilizando-se o programa SeqMan. Realizou-se o alinhamento destas seqüências através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor, obtendo-se por fim, uma seqüência consenso para cada contig. Foi realizada a avaliação comparativa destas seqüências com os dados disponíveis no NCBI através do programa BLASTN nucleotídeo-nucleotídeo (ALTSCHUL et al., 1990).

Tabela 8 – Seqüências consensos dos contigs obtidos no fragmento 3ryr3.

Contig	Seqüência consenso
1	GGCGGCCGCGGGAAATTCGATTAGTCAGCATTGACAAGATACGTCGTATTGCAAGAGTAA CAAAAAGTGCCTAACAGAGAGCAGCAACGCTAGATGTTGTACAGTCAACAGATTTGAATTA CAGGTCTCTGAGAGTTTTAGAAAATCTGCTTGAGTCATTCTCTGAGCCATTAATGTTGAGT TTTAGTAAGTCATAGCATATTGAGGAAGTTCCAGACGACTGCAAGAAATCTAATGTTGTGC CAGTAACAACGTAATGGGACGACCCAGGTAATTACAGGTCTGTGACCTGACATTGAACT GGAATCGAATTCGCGGCCGCA
2	GCGGTTACAGGATTCCAGTTCAATGTCAGGTCGACTTAGCACAGGTTAGTTTGGGGCTTG AGTTTTCCACGTACTGTCACATGCTTTAATATCTCTGCAACCCACTGCATGATCAGAATGTTG AGCAGTGCCACTGTTTTACAGTTATTCTATTGCTCTTCTTTACAGTAACTAATTAACAAGT AAAGGCCAGGTGTGGTGTCTGCAGTGGTGAAGACAATGCTCTCATTGTAACCTAACATTT AACTGTACCCATTTACTCTGGCACAGGGCTGCCACAATACTGGCCCGAAGAAGGAATA CTGCGGTATGGTCCCATTCAAGTGGAATGCGTATCTTGCAATGCTGACTAATCTATTCCC GCGGCCGCCGAGGCGGCCGG
3	TCCAGTTCAATGTCAGGTCGACAGCCTGGCCTGGCCCAGCCAACACGCATATCTCCACCT GTTACAGCTTCAAATTCAAAGTACCCTTTCCGGACTTCACTGCATAAGACTGTTCTACTCT GAAAAACGTATCTTGTC AATGCTGACTAATCGAATTCGCGGCCGCC
4	TAGCAAATACTCCAGTTCAATGTCAGGTCGACCTGTTTATTACAAATCTTAAGCAGGGAGAT GGGGAAGGGGAGACGAGCAATGGAAAAGGTGGGAAATAAAAGCAAGGAGTCTTTGTAGG AAGCAAGAGGGAGATAGTCACCACCATAAGTCCAATGTGGTTCATAGTTCACTCCTTGATC TTCAACAGTGGAAGTTGTTGAGCATTGTTGATCCATTGACGATGATGACTGTGACTG ACTTTCCAATGGCAGTACAACTTATTTATAAGTCCAAAGTGGTGCAGTCAACTCTCTTTGT AGTGGCAGCTTCTGCCTTTTGGATCTCAGCAGGAACCTCTTTTGTCCCATCTTCCAGGCC TTGACAGCAGATAAGAGGGAGCATAGAGCCGCTAACTTGATCTTGCCTTACATTTGAAA ATTTGCAGGTCATATGTATTTATAACTGAAAATTGTCTTGCAAAGGTAAATCAATGACTTT TTTAGGCAGTCTTGAACCCCAAGCTGCAGGGTGCAGTTGACAGAAGGGACGAGATGCCA CCCAAAGAGATCTAGACAGACATGAACAGTATCTTCTCTGTTTAGAGCCCCGTATCTTGT AATCTGACTAATCGAATTCGCGGCCGCC

Apenas a seqüência do contig de número 3 apresentou homologia de 99 % ao gene da $\hat{\alpha}$ -RyR (NM_206874.1). O contig de número 1, com seqüência consenso de 328 pares de bases (pb), e referente à seqüência das bandas de número 14-26 não apresentou homologia a nenhuma seqüência de interesse. Por sua vez, a seqüência consenso do contig de número 2, com um total de 387 pb e relativa às seqüências das bandas de número 1-13, alinhou-se a apenas 77 e 59 nucleotídeos do gene da proteína tirosina fosfatase de *Gallus gallus* (XM_419748.1, com 6.077 pb) e *Mus musculus* (NM_008983.1, com 5.896 pb), respectivamente. Estas proteínas exercem efeitos na regulação de vias de sinalização e no controle fisiológico de alguns tecidos (AOYAMA et al., 2003). Com relação ao gene da $\hat{\alpha}$ -RyR (NM_206874.1), as seqüências consenso dos contigs 1 e 2 alinharam-se somente a

23 e 21 pares de bases do gene, respectivamente (do número 3395-3417 e do 3289-3269). Com 641 pb, a seqüência do contig de número 4 alinhou-se aos nucleotídeos de número 79.496-79.321, da seqüência do clone BAC CH261-9P3 (AC_147447.3), e não apresentou qualquer relação ao gene *â-ryr*.

A mesma mutação descrita por LARA (2003), uma diferença em 1 nucleotídeo na posição de número 27 do fragmento e 3.295 na seqüência do NCBI, onde uma adenina deu lugar a uma timina, foi encontrada em todas as amostras estudadas. Os fragmentos que apresentaram outras alterações na seqüência podem ser visualizados na tabela 9, a seguir.

Tabela 9 - Seqüência de DNA do fragmento 3ryr3 comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743).

Frag. 29_cl. 2	(1)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(60)
Frag. 30_cl. 2	(1)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(60)
Frag. 33_cl. 1	(1)	AGT-CATCATTGTACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(61)
Frag. 37_cl. 1	(1)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(60)
Frag. 38_cl. 1	(1)	AGT-CAGTAGTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(61)
Frag. 39_cl. 2	(1)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(60)
Frag. 3ryr3	(1)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(60)
NM_206874.1	(3.269)	AGT-CAGCATTG-ACAAG-ATACGTTTTTTCAGAGTAGAACAGTCTTATGCAGTGAAGTCCGG	(3.328)
Frag. 29_cl. 2	(61)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCCAG	(120)
Frag. 30_cl. 2	(61)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCC-G	(118)
Frag. 33_cl. 1	(62)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCCA-G	(121)
Frag. 37_cl. 1	(61)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCC-G	(118)
Frag. 38_cl. 1	(62)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCCA-G	(121)
Frag. 39_cl. 2	(61)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCC-G	(118)
Frag. 3ryr3	(61)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCCA-G	(120)
NM_206874.1	(3.329)	AAAGTGGTACTTTGAATTTGAAGCTGTAACAGGTGGAGATATGCGTGTGGCTGGGCCA-G	(3.389)
Frag. 29_cl. 2	(121)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(149)
Frag. 30_cl. 2	(119)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(147)
Frag. 33_cl. 1	(122)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(150)
Frag. 37_cl. 1	(122)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(149)
Frag. 38_cl. 1	(122)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(150)
Frag. 39_cl. 2	(119)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(147)
Frag. 3ryr3	(121)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(149)
NM_206874.1	(3.390)	GCC-AGG-CTGTCGACCTGAC-ATTGAACTGG	(3.417)

Algumas posições nucleotídicas no fragmento 3ryr3, de 149 pb, variaram entre os indivíduos das duas linhagens. Houve uma inserção de uma timina no fragmento de número 33 (indivíduo de número 7 da linhagem CC), na posição de número 3.280 no gene da α -RyR (indicada em azul).

Foram localizadas substituições, indicadas em vermelho, no fragmento de número 33, de uma guanina por uma timina na posição 3.274 da seqüência da α -RyR (NM_206874.1) disponível no NCBI. Além destas, no fragmento 38 (indivíduo 12, TT) ocorreram outras alterações, como a mudança de uma cistossina por uma timina (na posição equivalente ao nt 3.275) e de uma timina por uma guanina (posição 3.277 do gene). Ainda foi observada mudança na seqüência do fragmento 39 (indivíduo 13, TT) com a substituição de uma citosina por uma timina (posição 3.382). No fragmento 29, do indivíduo 3 da linhagem CC, posição 3.388 do gene, houve a substituição de uma adenina por uma citosina e ainda a inserção de uma adenina na posição vizinha.

Na análise de alinhamento de seqüências de aminoácidos pelo programa Blastx, constatou-se que essas alterações na seqüência nucleotídica resultaram em algumas mudanças na estrutura primária (tabela 10), como a alteração do aminoácido 1.073, com a substituição de uma tirosina por uma fenilalanina em todas as amostras e, também, a troca dos aminoácidos (Ile-1.066-Leu) e (Asp-1.067-Tyr) no indivíduo 37.

Tabela 10 – Tradução em aminoácidos – Blastx para o fragmento 3ryr3 das amostras que apresentaram alterações nas seqüências de nucleotídeos.

Frag. 29_cl. 2	(121)	VSIDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(149)
Frag. 30_cl. 2	(119)	VSIDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(147)
Frag. 33_cl. 1	(122)	- S LYKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(150)
Frag. 37_cl. 1	(122)	VSIDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWA-PGCRPDIEL	(149)
Frag. 38_cl. 1	(122)	VSSDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWA RPGCRPDIEL	(150)
Frag. 39_cl. 2	(119)	VSIDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(147)
Frag. 3ryr3	(121)	VSIDKIRF F RVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(149)
NP_996757	(1065)	VSIDKIRFYRVEQSYAVKSGKWYFEFEAVTGGDMRVGWARPGCRPDIEL	(1113)

5.2 Etapa 2

5.2.1 . Extração do DNA

As amostras de DNA selecionadas para esta etapa do trabalho foram extraídas de amostras de sangue de um total de 1.497 frangos da linhagem desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves. Os animais foram separados em dois grupos distintos, um grupo onde as aves foram expostas ao estresse térmico e outro, não. As amostras de carne foram avaliadas segundo critérios de pH final e cor (valor de L*) e puderam ser classificadas como sendo PSE (Pale, Soft, Exudative) ou normais (BARBUT, 1998).

Diversos fatores como o manejo pré-abate, condições de transporte, descanso e temperatura ambiente, entre outros, têm conhecida influência na qualidade final da carne (BARBUT, 1998; OLIVO, 1999; GUARNIERI et al, 2002,

2004).

Segundo LARA (2003), a incidência de carnes PSE, semelhantes entre os grupos controle e o submetido ao estresse térmico, com valores de 35,30 % e 37,08 %, respectivamente, sugerem que o transporte e a temperatura ambiente não foram significativos para a determinação de condições estressantes para as aves. Considerou-se então, que a incidência de PSE nos dois grupos de aves talvez pudesse estar relacionada com técnicas de manejo; captura dos frangos; excessiva emissão de ruídos na plataforma de desembarque dos animais e ausência de insensibilização e de descanso (LARA et al., 2002).

Foi possível alcançar uma amostragem significativa para a realização das análises, com a seleção de 20 amostras de DNA das aves abatidas (F_3) para a amplificação, purificação e seqüenciamento, provenientes de 10 indivíduos classificados como normais para a qualidade de carne e 10 indivíduos que manifestaram características PSE, conforme os parâmetros de pH_{24h} e L^*_{24h} (tabela 11). A amostra de DNA de número 16 provavelmente terminou, portanto foram avaliadas 19 amostras neste estudo, sendo de 1-10 classificadas como normais e de 11-20, PSE.

TABELA 11 - Classificação das amostras de carne de frango normais e PSE da população F3 utilizadas na análise de seqüenciamento neste estudo e nos de LARA (2003) e DROVAL (2004).

NORMAIS			PSE		
Amostra	pH _{24h}	L* _{24h}	Amostra	pH _{24h}	L* _{24h}
1	5,84	45,8	11	5,62	54,3
2	5,92	43,2	12	5,46	55,0
3	5,82	47,4	13	5,55	56,5
4	5,87	47,7	14	5,50	60,6
5	5,87	48,1	15	5,64	58,1
6	5,92	47,6	16	5,46	59,1
7	5,77	47,8	17	5,55	59,2
8	5,56	53,0	18	5,45	56,0
9	5,80	48,9	19	5,71	55,3
10	5,76	44,7	20	5,42	59,4

Fonte: Lara (2003).

5.2.2 Análise da eletroforese em gel de agarose 1%

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (figuras 14, 15, 16 e 17). Todas as amostras apresentaram banda única para os quatro fragmentos, exons 1, 2, 3 e 4, quando se observaram os géis em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos estavam de acordo com o esperado, de acordo com a seqüência do gene β -ryr disponível no site do NCBI e do desenho dos primers.

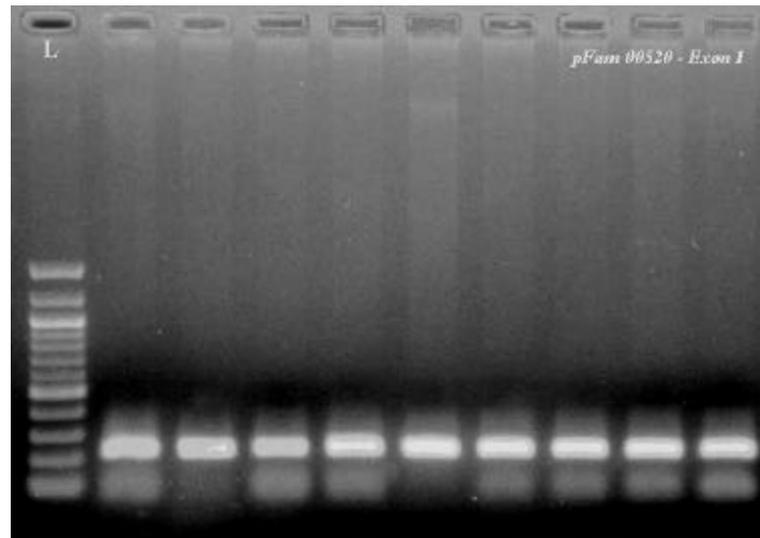


Figura 14 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 1 - *pFam 00520* em gel agarose 1% (amostras PSE) (*Amplicon*: 222 pb e *Ladder*: 100 pb).

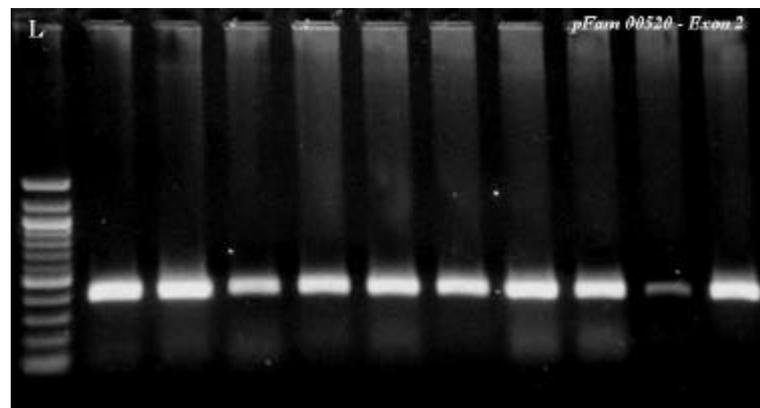


Figura 15 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 2 - *pFam 00520* em gel agarose 1% (amostras Normais) (*Amplicon*: 398 pb e *Ladder*: 100 pb).

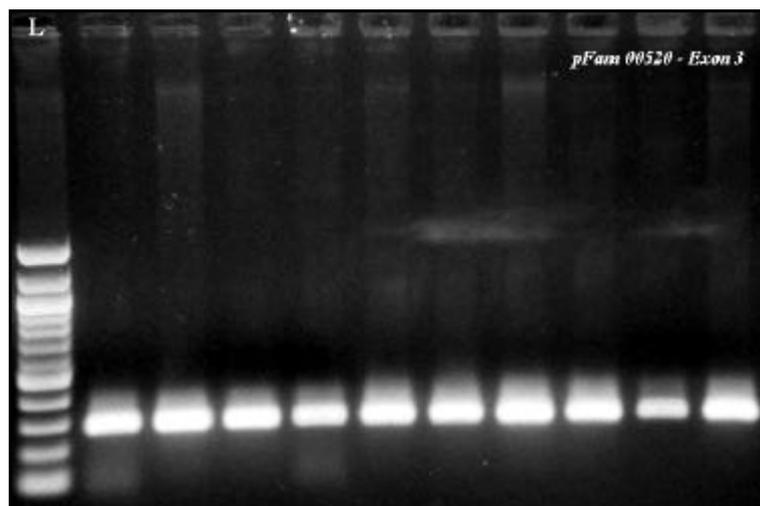


Figura 16 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 3 - *pFam 00520* em gel agarose 1% (amostras Normais) (Amplicon: 274 pb e Ladder: 100 pb).

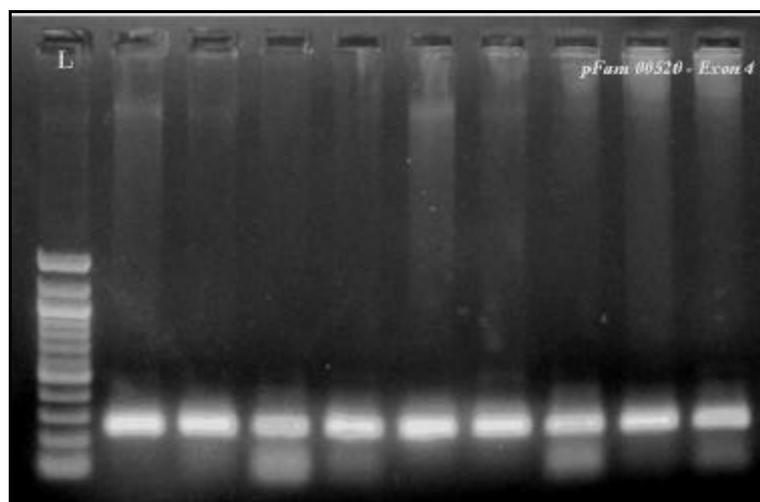


Figura 17 - Eletroforese de fragmentos de DNA do exon 2 - *pFam 00520* em gel agarose 1% (amostras PSE) (Amplicon: 247 pb e Ladder: 100 pb).

5.2.3 Análise de seqüenciamento e da estrutura primária dos fragmentos estudados no gene da α -RyR.

Apesar das amplificações via PCR com os pares de primers desenhados para o exon 4 apresentarem-se no tamanho esperado, os resultados do seqüenciamento direto não foram bons, isto é, ocorreram diversas séries de fragmentos de nucleotídeos de tamanhos muito pequenos, e ainda várias seqüências não correspondentes às regiões de interesse (codificantes), o que inviabilizou a análise de seqüenciamento e assim os resultados para esse fragmento não será apresentado. Para finalizar a análise de sequenciamento deste fragmento sugerimos desenhar novos primers para esta região. Nos demais fragmentos, não foram observadas diferenças de tamanho detectáveis pela eletroforese em gel de agarose 1% para amostras PSE e normais.

Exon 1

Três fragmentos (exon 1, exon 2 e exon 3) foram seqüenciados e analisados. Em relação ao fragmento do exon 1 (tabela 12), os resultados encontrados não foram diferentes entre as amostras que deram origem a carne PSE e normal, bem como encontraram 100% de homologia quando alinhadas com a seqüência do gene α -ryr de *Gallus gallus* (GI:46048743) disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 12 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 1, do â-ryr, comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743).

Exon 1	(1)	ATTATCAGTGAAAACAACACCGAGCTTCCAAAT	(33)
NM_206874.1	(13.934)	ATTATCAGTGAAAACAACACCGAGCTTCCAAAT	(13.902)
Primers	Direto	5' GCATACGAAGTGCATAACAG	3'
	Reverso	5' CAAGTAGTGGAAGACATGC	3'

Na tabela 13, é apresentado o alinhamento de seqüência de aminoácidos pelo programa Blastx, das seqüências obtidas no sequenciamento e a disponível no site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

TABELA 13 – Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 1.

		I W K L G V V F T D N	
Exon 1	(1)	ATTTGGAAGCTCGGTGTTGTTTTCACTGATAAT	(60)
		I W K L G V V F T D N	
NP_996757	(4.609)	ATTTGGAAGCTCGGTGTTGTTTTCACTGATAAT	(4.619)

Exon 2

Algumas posições nucleotídicas nos fragmentos dos exons 2 e 3 variaram entre os indivíduos PSE e normais avaliados. No fragmento do exon 2, foi encontrada uma mutação de ponto isolada na amostra de DNA do indivíduo número 4 (seqüência obtida a partir do primer direto), classificado como carne de características normais. Nesta amostra uma citosina ocupou o lugar de uma adenina, na posição 26.477 do *contig* 1.190 (AADN01003326), disponível no NCBI (alteração indicada na cor vermelha, na tabela 14). Foi verificado também que esta seqüência apresentou 99 % de identidade com o gene da â-RyR de frangos

(GI:46048743), utilizando os programas BLASTN (Nucleotide-nucleotide blastn) disponível no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 14 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 2 que apresentou uma alteração na posição de uma base, do â -ryr, comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743).

Exon 2	(1)	TCATTTTGTATTTAGCTTGGTACACAACACTATGTCTATCCTTGGGCACTATAACAACCTTC	(60)
NM_206874.1	(13.935)	TCATTTTGTATTTAGCTTGGTACACAACACTATGTCTATCCTTGGGCACTATAACAACCTTC	(13.994)
Exon 2	(61)	TTTTTGGCTGCTCATCTGCTGGACATTGCTATGGGTTTCAAGACATTGCGAACCATTTTG	(120)
NM_206874.1	(13.995)	TTTTTGGCTGCTCATCTGCTGGACATTGCTATGGGTTTCAAGACATTGCGAACCATTTTG	(14.054)
(C)			
Exon 2	(121)	TCCTCTGTCACACTCACAATGGCAAACAG	(147)
NM_206874.1	(14.055)	TCCTCTGTCACACTCACAATGGCAAACAG	(14.081)
<hr/>			
<i>Primers</i>	Direto	' CCTTAAATGTACAGTGGAGTTG 3'	
	Reverso	' TGGAGGAGTCTGTTCTTTAATC 3'	

Foi constatado também, através da análise de alinhamento de seqüências de aminoácidos pelo programa Blastx, que essa alteração na seqüência nucleotídica não acarretou em mudanças na estrutura primária (tabela 15).

Tabela 15 – Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 2 da amostra que apresentou alteração na seqüência de nucleotídeos

S F L Y L A W Y T T M S I L G H Y N N F			
Exon 2	(1)	TCATTTTGTATTTAGCTTGGTACACAACACTATGTCTATCCTTGGGCACTATAACAACCTTC	(60)
NP_996757	(4.619)	S F L Y L A W Y T T M S I L G H Y N N F	(4.539)
NM_206874.1	(13.935)	TCATTTTGTATTTAGCTTGGTACACAACACTATGTCTATCCTTGGGCACTATAACAACCTTC	(13.994)
<hr/>			
F F A A H L L D I A M G F K T L R T I L			
Exon 2	(61)	TTTTTGGCTGCTCATCTGCTGGACATTGCTATGGGTTTCAAGACATTGCGAACCATTTTG	(120)
NP_996757	(4.540)	F F A A H L L D I A M G F K T L R T I L	(4.559)
NM_206874.1	(13.995)	TTTTTGGCTGCTCATCTGCTGGACATTGCTATGGGTTTCAAGACATTGCGAACCATTTTG	(14.054)
<hr/>			
S S V T H N G K Q			
Exon 2	(121)	TCCTCTGTCACACTCACAATGGCAAACAG	(147)
NP_996757	(4.660)	S S V T H N G K Q	(4.668)
NM_206874.1	(14.055)	TCCTCTGTCACACTCACAATGGCAAACAG	(14.081)

Exon 3

Além disso, foram encontradas na análise do fragmento do exon 3, três alterações nucleotídicas (tabela 16): a) a amostra de número 20 (PSE, seqüência obtida a partir do primer reverso) possuía uma timina no lugar de uma adenina, presente na posição nucleotídica de número 27.596 do contig 1.190 (AADN01003326), disponível no NCBI (posição indicada na cor vermelha) e b) as amostras de número 7 (normal) e 18 (PSE) (ambas seqüências obtidas a partir do primer direto) apresentaram uma inserção de uma timina entre o nt de número 27.550 e 27.551 do mesmo contig (alteração indicada em azul).

Tabela 16 - Seqüência de DNA do fragmento correspondente ao exon 3, do â-ryr, comparada à seqüência disponível no GenBank (GI:46048743).

(T)			
Exon 3	(1)	AAACAGCTTGTGCTGACTGTAG-GACTCCTGGCTGTAGTAGTGTATCTTTACACTGTTGTGGC	(63)
NM_206874.1	(14.076)	AAACAGCTTGTGCTGACTGTAG-GACTCCTGGCTGTAGTAGTGTATCTTTACACTGTTGTGGC	(14.137)
(T)			
Exon 3	(64)	GTTCAACTTCTTCCGCAAATTCTACAATAAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCAGATATGAA	(124)
NM_206874.1	(14.138)	GTTCAACTTCTTCCGCAAATTCTACAATAAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCAGATATGAA	(14.197)
Exon 3	(125)	ATGTGATGACATGATGA	(141)
NM_206874.1	(14.198)	ATGTGATGACATGATGA	(14.214)
<i>Primers</i>	Direto	5' CACACCCTATGATATCTTTTCC	3'
	Reverso	5' ATTTGAAGCGTCTGGT	3'

Foi constatado também, através da análise de alinhamento de seqüências de aminoácidos pelo programa Blastx, que essas alterações na seqüência nucleotídica acarretou em mudanças na estrutura primária. A adição de uma timina na posição nucleotídica de número 14.143 (NM206874.1) resultou na

alteração do aminoácido 4.674 (tabela 17), quando comparamos com a proteína disponível na base de dados do NCBI. Para a substituição que ocorreu no nucleotídeo localizado na posição de número 14.142, verificou-se a substituição de uma treonina por uma isoleucina (Thr-4.674-Ile).

Tabela 17 – Tradução em aminoácidos – Blastx para o exon 3 das amostras que apresentaram alterações na seqüência de nucleotídeos.

Exon 3		N S L C - L - - L L A V V V Y L Y T V V A	
(+ timina)	(1)	AACAGCTTGTGCTGACTGTAGT G ACTCCTGGCTGTAGTAGTATCTTTACTGTTGTGGCG	(63)
Exon 3		K Q L V L T V G L L A V V V Y L Y T V V A	
(- adenina)	(1)	AAACAGCTTGTGCTGACTGTAGGACTCCTGGCTGTAGTAGTATCTTTACTGTTGTGGCG	(62)
NP_996757	(4.667)	K Q L V L T V G L L A V V V Y L Y T V V A	(4.687)
NM_206874.1	(14.078)	AAACAGCTTGTGCTGACTGTAGGACTCCTGGCTGTAGTAGTATCTTTACTGTTGTGGCG	(14.137)
Exon 3		F N F F R K F Y N K S E D E D E P D M K	
(+ timina)	(64)	TTCAACTTCTTCCGCAAATTCTACAATAAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCAGATATGAAA	(124)
Exon 3		F I F F R K F Y N K S E D E D E P D M K	
(- adenina)	(63)	TTCA T CTTCTTCCGCAAATTCTACAATAAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCAGATATGAAA	(123)
NP_996757	(4.688)	F N F F R K F Y N K S E D E D E P D M K	(4.707)
NM_206874.1	(14.138)	TTCAACTTCTTCCGCAAATTCTACAATAAAAAGTGAAGATGAAGATGAACCAGATATGAAA	(14.197)
Exon 3		C D D M M	
(+ timina)	(125)	TGTGATGACATGATGA	(141)
Exon 3		C D D M M	
(- adenina)	(124)	TGTGATGACATGATGA	(137)
NP_996757	(4.708)	C D D M M	(4.802)
NM_206874.1	(14.198)	TGTGATGACATGATGA	(14.214)

As amostras utilizadas neste estudo foram às mesmas avaliadas por Lara (2003) e Droval (2004). Ambos os trabalhos estudaram fragmentos do gene da isoforma â da proteína receptora da rianodina. A escolha deste gene-candidato aconteceu por vários motivos, especialmente o fato de ele ser efetivamente expresso e também de estar relacionado com o processo de contração muscular em aves. Contribui ainda, o fato do teste do halotano se mostrar ineficiente para a detecção de perus e frangos PSE (OWENS et al., 2000b; WHEELER et al., 1999)

OTTINI et al. (1996) e SUTKO e AIREY (1996) determinaram a homologia das isoformas α e β da RyR de aves às RyR1 e RyR3 de mamíferos, respectivamente (Airey et al. 1993) e FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI (1997), revelaram a proporção das proteínas α -RyR e β -RyR nas células musculares como sendo igual a 1.

Na figura 18 estão representadas as regiões já estudadas no gene da β -RyR pela equipe do Prof. Dr. Massami Shimokomaki, incluindo o do presente estudo.

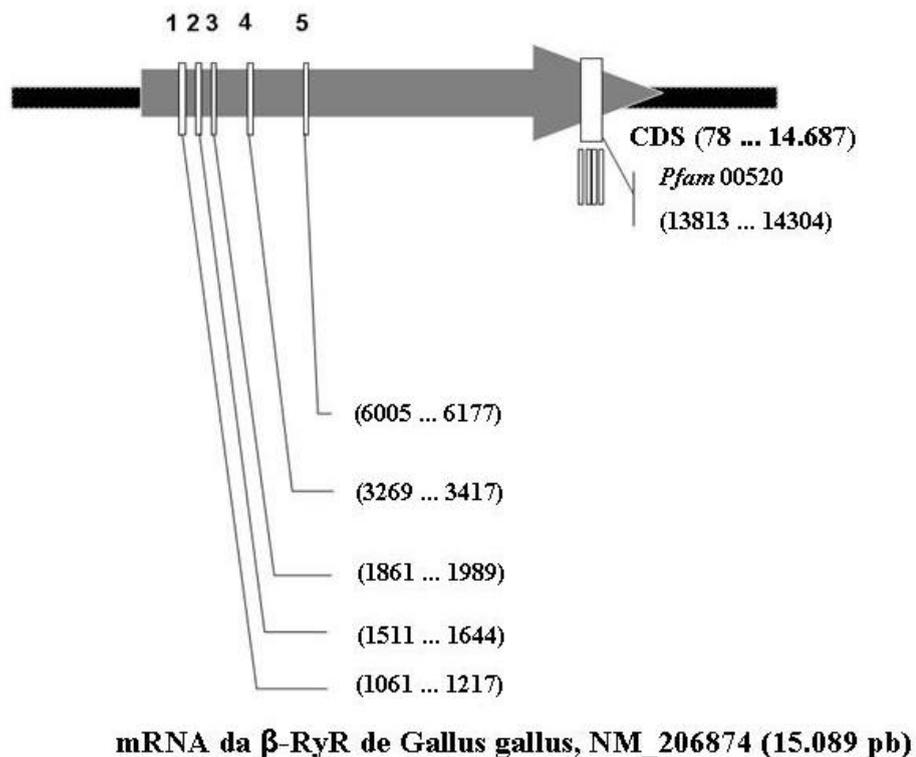


Figura 18 - Diagrama dos fragmentos estudados do gene da proteína receptora de rianodina (β -RyR).

Em seu estudo, Lara (2003) encontrou mutações de ponto em dois fragmentos avaliados no gene *ryr3*, onde apesar das mesmas não terem resultado em alterações na estrutura da proteína RyR3, comprovou a variabilidade genética presente neste gene em frangos, e também sugeriu a possibilidade de que mutações em outros genes possam estar relacionadas à ocorrência da síndrome. A única mutação encontrada em todas as 20 amostras analisadas levou a alteração na estrutura primária, com a substituição do aminoácido 9 do polipeptídeo estudado (Tyr-1073-Phe), embora sem alteração na estrutura secundária.

Assim, ainda que tenha sido comprovada a existência desta diferença na seqüência de nt dos frangos utilizados em seu estudo, LARA (2002) não pôde relacioná-la a ocorrência da anomalia PSE. No presente trabalho, observou-se variabilidade nas seqüências obtidas de um mesmo indivíduo, possivelmente resultado da população F_3 de frangos do experimento, que provavelmente apresenta heterozigose para este alelo, o que explicaria os polimorfismos encontrados dentro de indivíduos ou ainda pode-se supor que algumas mutações consideradas possam ter ocorrido devido à inserção errônea nt pela enzima *Taq polimerase* durante a amplificação dos fragmentos na reação de PCR. Como DROVAL (2004) que avaliou outros 2 fragmentos de um domínio do gene *ryr3*, as mutações encontradas nos exons analisados neste trabalho não foram conclusivos para explicar o fenômeno em carne de aves, uma vez que não houve diferenciação entre os indivíduos PSE e não-PSE.

Embora a base genética como fator causal do PSE em aves ainda não esteja totalmente definido, é reconhecido que os avanços no entendimento da atividade e da variação dos receptores de rianodina possam estar relacionados à mutações nos repectores de rianodina do músculo esquelético de aves susceptíveis

ao desenvolvimento de carne PSE (STRASBURG e CHIANG, 2003). Existem poucas referências a respeito dos genes da proteína receptora de rianodina em aves, tanto á como â, porém a existência da relação deste gene com a qualidade da carne em suínos foi comprovada (FUJII et al., 1991) e bastante explorada.

Atualmente, a proteômica vem sendo sugerida como uma nova alternativa na busca por respostas a respeito da estrutura e funcionamento das proteínas envolvidas em diversos mecanismos relacionados à qualidade de carne. Segundo REMIGNON et al. (2006), este tipo de análise permite o conhecimento dos grupos de proteínas expressas a nível celular em um dado momento e condições e poderia ser aplicada no estudo do desenvolvimento ou ocorrência da síndrome PSE em animais susceptíveis.

5.3 Etapa 3

5.3.1 Determinação de carne PSE: Análises do valor L^*_{24h} e de pH_{24h}

Para obtenção do material genético necessário para as etapas posteriores deste estudo, foram abatidos 204 frangos de duas linhagens diferentes, (102 aves de linhagem de postura – CC, e 102 aves de linhagem de corte – TT), e as propriedades pH e cor (valor L^*) foram mensuradas 24 horas *post mortem*. Foram consideradas carnes PSE, aquelas que apresentaram valores de $L^*_{24h} > 53,0$ e $pH_{24h} < 5,8$ (Barbut, 1997a).

Ocorreram 10 amostras de carnes PSE (9,8 %) na linhagem de corte (TT), provenientes de 6 machos e 4 fêmeas, e um total de 4 amostras de carnes PSE (3,9 %), provenientes de 1 macho e 3 fêmeas da linhagem de postura (CC). O

número superior de casos de carnes de qualidade anômala na linhagem de corte corrobora a observação de ANADÓN (2002), de que a seleção genética visando ganhos em velocidade de crescimento e deposição de massa muscular animal estaria relacionada ao aumento na incidência de carnes PSE suínas. Outros estudos também confirmam esta tendência em carnes de aves (BERRI et al., 2001; LE-BIHAN-DUVAL et al., 1999, 2001; SANTE et al., 1991).

Foram selecionadas para a extração de RNA total, 4 amostras PSE e 4 amostras normais de cada linhagem. As médias de L^*_{24h} observadas nas amostras PSE das linhagens de corte e de postura, 56,57 ($\pm 0,78$) e 55,4 ($\pm 0,79$), respectivamente, foram superiores ($P < 0,05$) às médias das amostras Normais destas duas linhagens, com índices de 50,45 ($\pm 0,55$), 49,95 ($\pm 0,78$), respectivamente. Já as médias de pH_{24h} obtidas nas amostras PSE das linhagens de corte e postura, com índices de 5,65 ($\pm 0,06$) e 5,73 ($\pm 0,02$), respectivamente, foram inferiores ($P < 0,05$) às médias das amostras Normais das duas linhagens, com valores de 5,99 ($\pm 0,03$) e 6,14 ($\pm 0,05$), respectivamente.

Os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} das amostras de carnes PSE e normais, oriundas das linhagens TT e CC, selecionadas para a análise de expressão gênica apresentaram correlações negativas significativas ($p \leq 0,001$) (figura 20). Diversos pesquisadores também verificaram que valores menores de pH correspondiam a filés com valores de L^* mais elevados (mais pálidos) (BARBUT, 1997b; SOLOMON et al., 1998; SOARES et al., 2003).

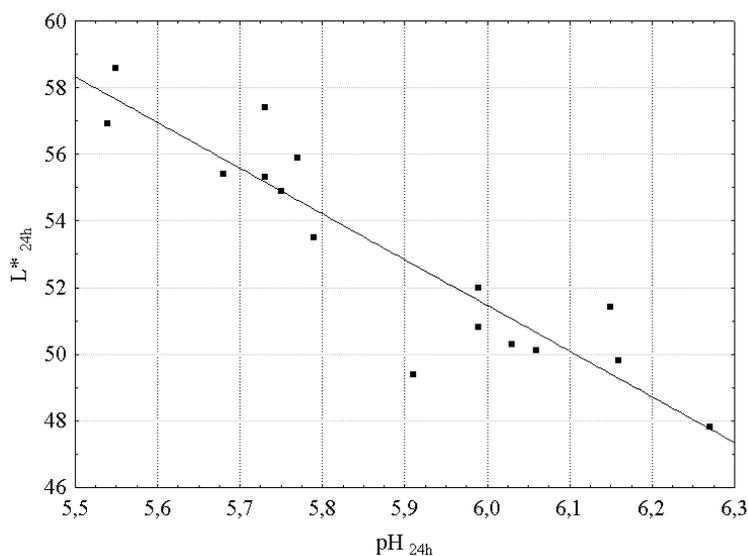


Figura 19 - Correlação entre os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} das amostras de carnes de frango PSE e Normais ($P < 0,001$, $r = - 0,9172$).

5.3.2 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total foram utilizadas amostras de tecido (P. major) de 8 animais de cada linhagem (TT- corte e CC- postura), 4 classificadas como PSE e 4 como não-PSE. A eletroforese em gel de agarose permitiu identificar a integridade das amostras de RNA total, Após a verificação da qualidade do RNA total e quantificação em espectrofotômetro, procedeu-se a síntese de cDNA empregado nas análises de expressão gênica.

5.3.3 PCR em tempo real

O cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras de tecido peitoral foi empregado nas reações de PCR em tempo real com o objetivo de estabelecer as condições de amplificação para cada um dos genes estudados.

Desta forma foi realizada uma curva de eficiência para cada um dos genes estudados (*á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina*), tendo no eixo Y, o ciclo em que a fluorescência foi detectada (Ct) e, no eixo X, o log das concentrações de cDNA utilizadas. Com valores de concentração de cDNA menores, observa-se um aumento do número de ciclos necessários para a detecção de fluorescência (Ct). O resultado das curvas de eficiência permitiu verificar para os genes *á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina*, valores de coeficiente de regressão linear e slope da ordem de: 0,9691 e -2,4603; 0,9921 e -3,6482; 0,9980 e -2,8053, respectivamente (anexo VIII).

Para todos os genes utilizados na análise de expressão gênica, também foram feitos testes para se obter uma condição otimizada de amplificação. Como resultado, a temperatura de anelamento ficou em 55 °C (condição otimizada em termociclador convencional). Foram ajustados os parâmetros de amplificação em tempo real (tempo de desnaturação, anelamento, extensão, bem como ajuste da curva de *melting*). Nas figuras 20, 21 e 22 podem ser visualizadas as corridas com as condições de amplificação para a PCR em tempo real já otimizadas.

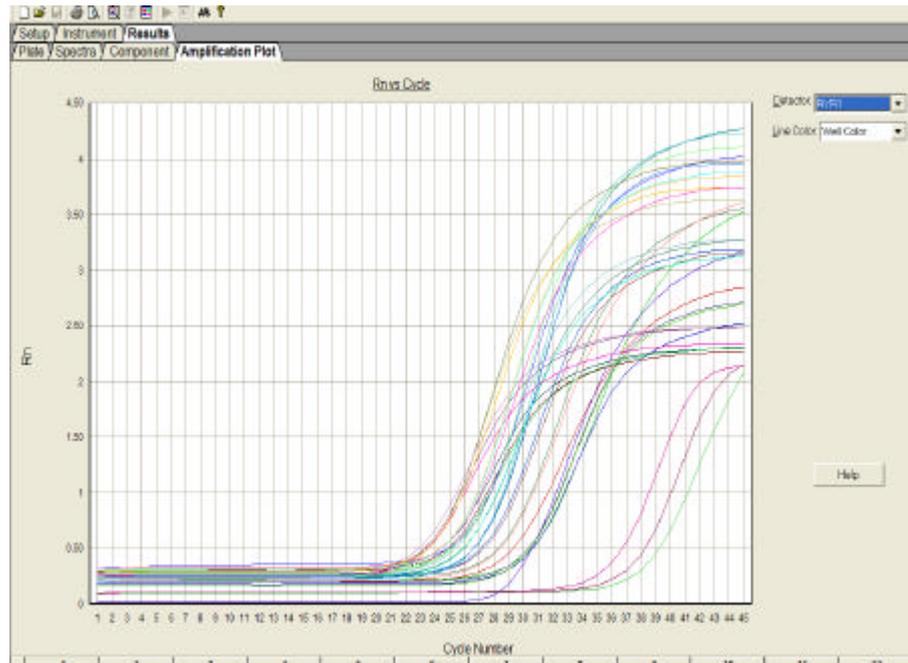


Figura 20 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real do gene á-ryr.

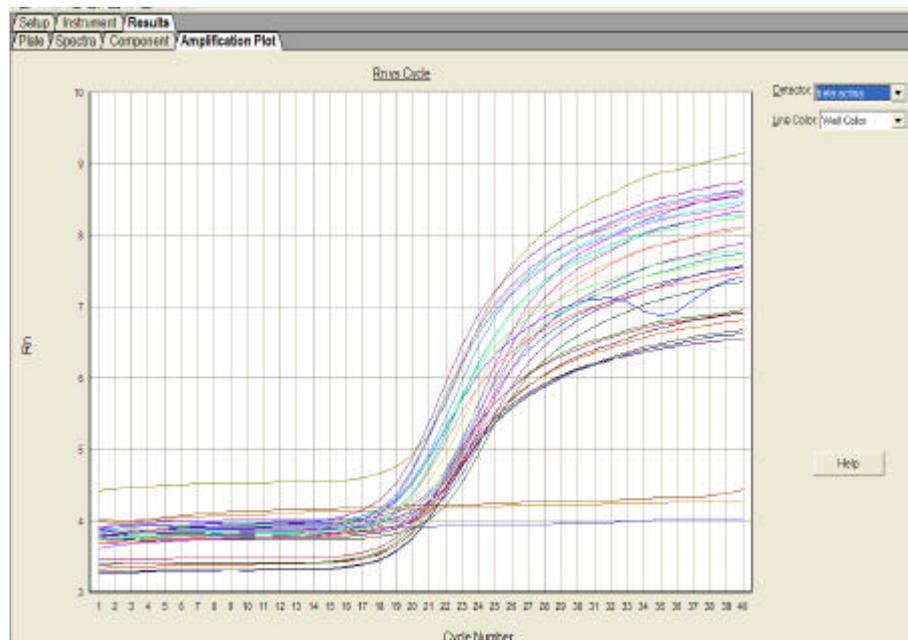


Figura 21 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real do gene â-ryr.

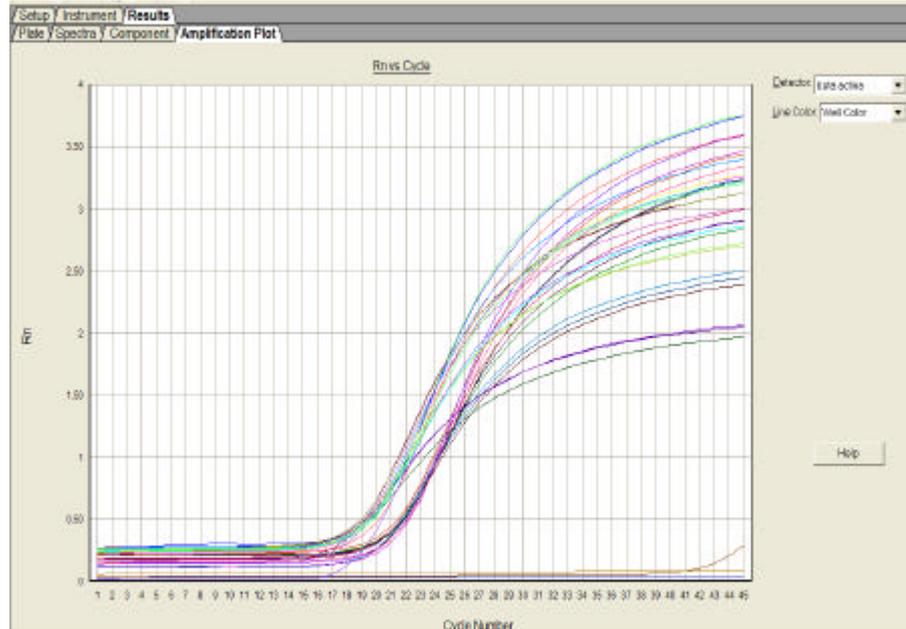


Figura 22 - Resultado da amplificação por PCR em tempo real do gene β -actina.

Nas figuras 23, 24 e 25 são apresentadas as curvas de *melting* para cada um dos genes estudados

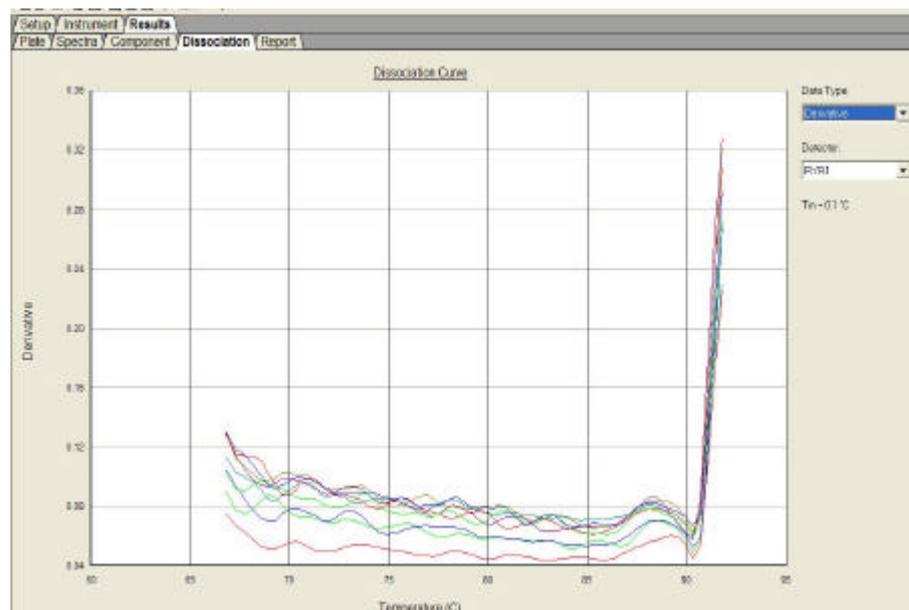


Figura 23 – Curva de melting do produto amplificado para o gene β -ryr.

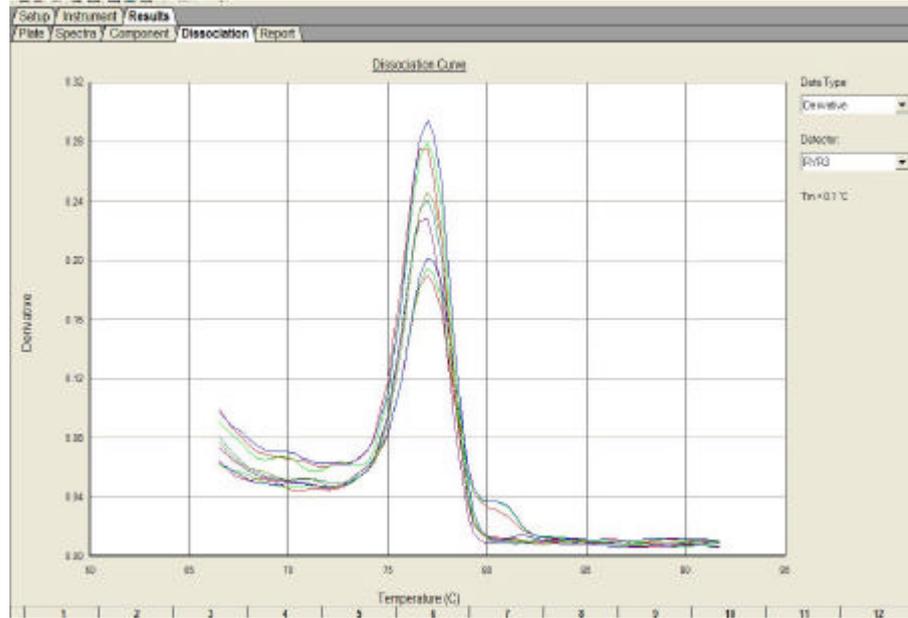


Figura 24 – Curva de melting do produto amplificado para o gene α -ryr.

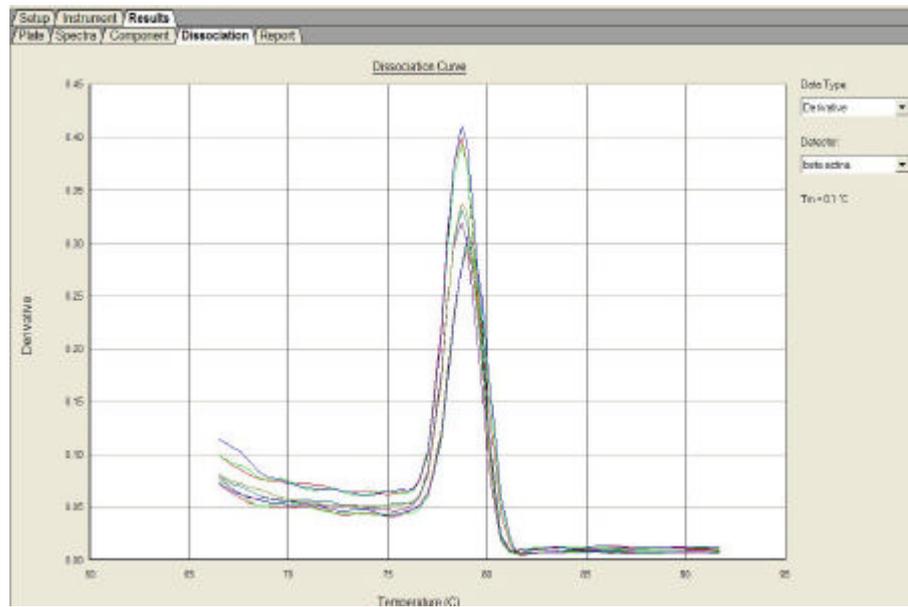


Figura 25 – Curva de melting do produto amplificado para o gene α -actina.

5.3.4 Análise de expressão dos genes *á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina*

Em seu trabalho, LARA (2003) sugeriu várias possibilidades de análises em busca do entendimento dos mecanismos envolvidos na ocorrência do fenômeno PSE, da escolha de novos genes candidatos (como o gene que codifica a enzima fosfolipase A_2 , também relacionada com PSE, conforme verificado por Soares (2003)) aos estudos de expressão gênica para qualidade da carne de frango. O trabalho de MAAK et al. (2005) foi o único encontrado, onde se buscava uma relação entre a expressão de um grupo de seis genes, entre eles o *á-ryr* e outros que codificavam para componentes estruturais do músculo esquelético de aves, e a qualidade de carnes de perus.

Neste trabalho, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada com o intuito de investigar a expressão dos genes que codificam os canais de cálcio em tecido muscular esquelético de frangos, *á-RyR* e *â-RyR*. Além destes, também foi analisada a expressão do gene *â-actina*, um gene constitutivo utilizado como controle.

Nas figuras 20, 21 e 22, pode ser observado que os produtos amplificados para os genes *á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina* começaram a ser detectados em torno do ciclo 22. Além disso, pela análise das curvas de melting (figuras 23, 24 e 25), verifica-se que não foram constatadas amplificações inespecíficas e nem dímeros de *primers*. Também se pode verificar que os produtos amplificados desnaturaram na mesma temperatura (78 °C). Na figura 26, é possível verificar a especificidade de amplificação dos primers, em gel de agarose (1%), confirmando estes resultados (LIU et al., 2005).

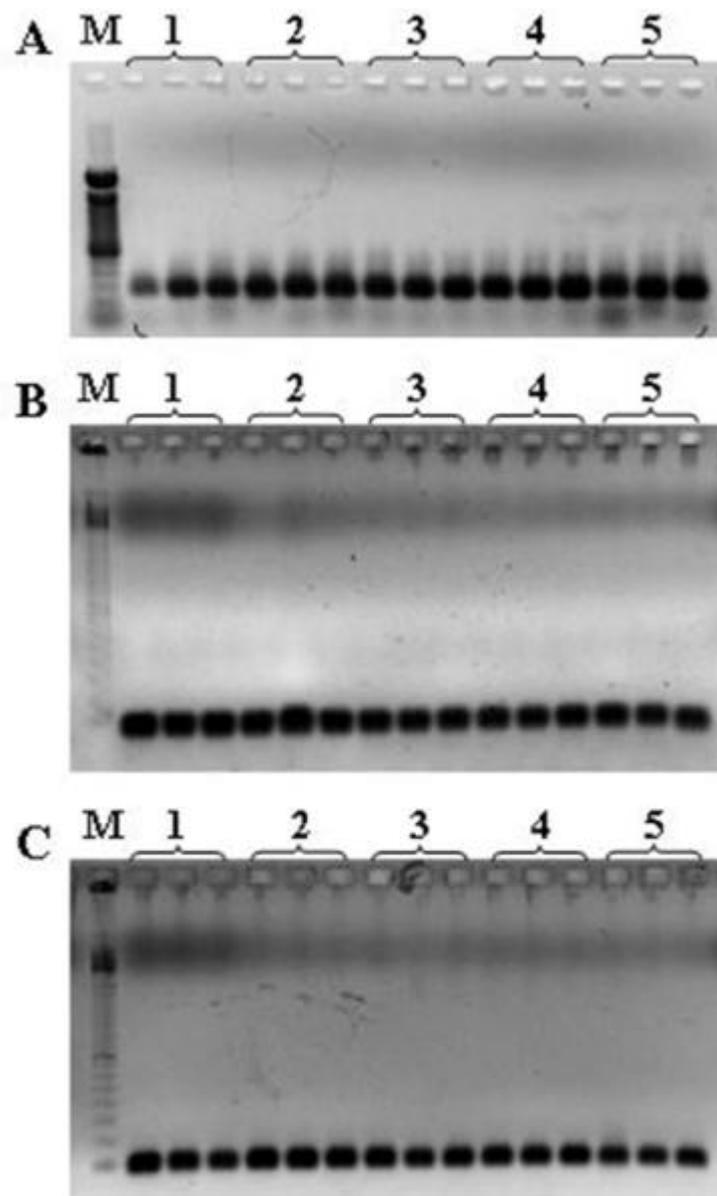


Figura 26 – Gel de agarose 1% para verificar a especificidade de amplificação dos *primers* para a) $\acute{\alpha}$ -ryr; b) $\hat{\alpha}$ -ryr; e c) $\hat{\alpha}$ -actina. A canaleta M: corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pares de base; canaletas de 1 a 4: amostras PSE; e canaleta 5: amostra controle (bulk de DNAc) de aves normais.

Os valores de expressão gênica (RQ) das amostras são apresentados na tabela 18.

Tabela 18 – Médias e erros-padrão da expressão dos genes α -ryr e β -ryr em músculo Pectoralis major de frangos de duas linhagens (TT e CC).

Gene	TT		CC	
	PSE	Normal	PSE	Normal
α -RyR	1,3374 ^a \pm 0,1526	1,0 ^a \pm 0,0	0,9400 ^a \pm 0,1608	1,0 ^a \pm 0,0
β -RyR	0,8385 ^b \pm 0,056	1,0 ^a \pm 0,0	0,7936 ^b \pm 0,0680	1,0 ^a \pm 0,0

a,b Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

TT: linhagem de corte; CC: linhagem de postura.

O gene β -ryr foi diferencialmente expresso (P<0,05) nos animais PSE, com valores significativamente inferiores nas duas linhagens estudadas. Por sua vez, a análise dos níveis de expressão gênica para o gene α -ryr não revelou diferenças significativas (P>0,05) entre os indivíduos das duas linhagens avaliadas. De forma semelhante, em um estudo com perus, MAAK et al. (2005) não encontraram diferenças (P>0,05) na expressão do gene α -ryr das aves de duas linhagens diferentes, com problemas de qualidade de carne. Os autores, entretanto, revelaram uma tendência de aumento na expressão da MyHC e diminuição da expressão de Glypican, independentemente da linhagem ou da idade ao abate nos animais que apresentaram qualidade de carne inferior.

O número inferior de RNAm do gene que codifica a β -RyR no tecido muscular PSE das aves das duas linhagens (TT e CC) é um indicativo de que um número inferior da β -RyR esteja disponível na periferia do retículo sarcoplasmático (RS), elevando de forma desbalanceada a conhecida proporção igual a 1 das duas

isoformas dos receptores de rianodina, α e β , em aves e anfíbios (FRANZINI-ARMSTRONG E PROTASI, 1997; SUTKO & AIREY, 1996).

Recordamos que os mecanismos de excitação-contração dos músculos esqueléticos de aves e mamíferos são diferentes (STRASBURG e CHIANG, 2003). Em aves, ele tem início com chegada de impulsos elétricos nos túbulos transversos, alteração conformacional na proteína receptora de dihidropiridina (DHP) e com a ativação da α -RyR. O aumento local na concentração de cálcio resultaria na ativação das β -RyR disponíveis e, em animais com a síndrome PSE, provavelmente na presença mais elevada de íons no meio extracelular, em relação aos animais classificados como Normais.

Devem-se ainda considerar os fatos de que os dois canais iônicos são proteínas distintas, com funções e formas de regulação diferentes em tecidos embrionários e maduros (AIREY et al., 1993; PERCIVAL et al., 1994). E, especialmente, que as β -RyR são mais reativas à presença cálcio, não são desativadas em concentrações milimolares do íon e apresentam, em geral, um tempo e uma frequência de aberturas superiores aos da α -RyR (PERCIVAL et al., 1994; SHIROKOVA et al., 1996).

Recentemente, MURAYAMA e OGAWA (2001) desenvolveram a metodologia para avaliação da atividade dos canais de cálcio, via CICR (Calcium Induced Calcium Release), nas isoformas α -RyR e β -RyR em seu estado original. Neste trabalho, os resultados revelaram que embora a sensibilidade ao cálcio seja semelhante entre as isoformas nativas, a afinidade de ligação na α -RyR pela [3H]-rianodina foi reduzida, contrastando com estudos anteriores (MURAYAMA et al., 2000; MURAYAMA e OGAWA, 1996). TAKESHIMA et al. (1995) estudando músculo esquelético dispédicos de ratos, que expressavam somente a RyR3 e do tipo *wild*

type (expressando RyR1 e RyR3, sendo esta última em um nível muito inferior), encontraram magnitudes de CICR semelhantes para os dois grupos, demonstrando que a contribuição da isoforma RyR3 na atividade CICR foi muito maior em relação a outra isoforma.

Estes resultados também proporcionaram elementos para a discussão da provável etiologia da Hipertemia Maligna (HM), e em 2004, MURAYAMA e OGAWA, baseados nas idéias de YAMAMOTO et al. (2000), propuseram que a ocorrência da HM seria conseqüência da estabilidade prejudicada da RyR1, devido a presença de mutações em seus três hot spots, que poderiam alterar a sensibilidade do canal de cálcio a vários agentes de liberação do íon, culminando com o aumento da atividade no mecanismo CICR. Por sua vez, ao analisarem dois grupos de perus, separados quanto a características de qualidade de carne, YOON e STRASBURG (2005) relataram que as aves PSE apresentaram atividade do canal de cálcio $\hat{\alpha}$ -RyR significativamente superior às aves de qualidade de carne normal.

Os resultados encontrados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene da $\hat{\alpha}$ -RyR para as linhagens de corte (TT) e de postura (CC), enquanto a menor expressão do gene da $\hat{\alpha}$ -RyR nas aves que originaram carnes PSE é sugerida como um dos fatores provavelmente envolvidos no desenvolvimento da síndrome. Assim, considerando-se as características particulares das duas isoformas, $\hat{\alpha}$ e $\hat{\alpha}$ -RyR, expostas anteriormente, é proposto que a alteração na relação $\hat{\alpha}$ -RyR/ $\hat{\alpha}$ -RyR (1:1) em aves poderia resultar em um aumento na disponibilidade de íons Ca^{2+} no citosol para se associarem a troponina C, resultando na contração muscular e desenvolvimento de carnes de características PSE.

5.4 Etapa 4

5.4.1 Cor (L*, a* e b*) e pH_{24h} *post mortem*

As médias dos valores dos componentes de cor (L*, a* e b*) e do pH medidos 24 horas *post mortem* no músculo *Pectoralis major* de frangos estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 19 - Médias e erros-padrão dos valores de L*, a* e b* 24h e de pH 24h encontrados em peitos de frangos.

	PSE	NORMAL
L* _{24h}	55,781 ^a ± 0,190	49,130 ^b ± 0,199
a* _{24h}	-0,276 ^a ± 0,087	-0,063 ^a ± 0,098
b* _{24h}	9,191 ^a ± 0,284	7,948 ^b ± 0,138
pH _{24h}	5,554 ^b ± 0,013	5,793 ^a ± 0,016

a,b Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de T ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

A cor é uma importante propriedade funcional da carne e está intimamente relacionada a outras, tais como: o pH, a capacidade de retenção de água, a capacidade emulsificante e a textura. Além disso, a cor é apontada como o índice de frescor e qualidade mais óbvio para o consumidor e, por isso, tem influência direta na decisão de compra da carne (OLIVO et al., 2001; SAINZ, 1996; SARANTOPOULOS e PIZZINATO, 1990).

A cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da luz pela mioglobina e por outros componentes importantes presentes, como as fibras musculares e suas proteínas. A quantidade de líquido livre e a forma

do corte estão também entre os fatores que influenciam na cor do produto final (OLIVO et al., 2001).

No presente estudo, as médias dos valores de L^*_{24h} foram maiores ($p < 0,05$) nos filés PSE em relação aos filés Normais, como preconizado por várias equipes de pesquisadores (BARBUT, 1998; OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2001; SOSNICKI et al., 1998). A palidez da carne é diretamente relacionada com a desnaturação protéica causada pelo baixo pH. Neste trabalho, foi encontrado um coeficiente de correlação entre o pH_{24h} e o L^*_{24h} de $-0,7066$ (figura 27), semelhante ao observado por GUARNIERI (2003) que confirma a existência da relação inversa entre estes dois importantes parâmetros de qualidade.

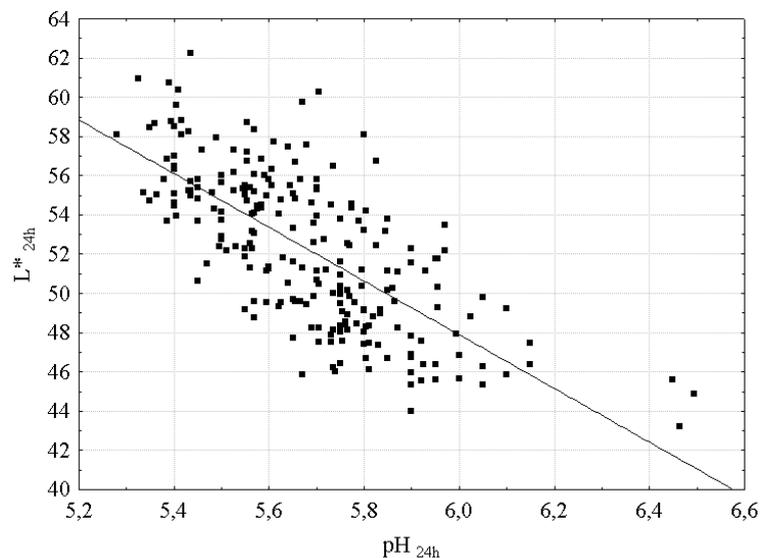


Figura 27 - Correlação entre os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} das amostras de carnes de frango PSE e Normais ($P < 0,001$, $r = -0,7066$).

Não foram detectadas diferenças ($P > 0,05$) para os teores de a^* entre os filés de peito PSE e Normais. Os valores muito baixos de a^* (teor de vermelho) podem ser atribuídos, em parte, às concentrações reduzidas de pigmentos e de ferro

encontradas em carne de aves de linhagens de corte, segundo BERRI et al. (2001) e BOULIANNE e KING (1995). A Mb em carnes de aves é encontrada em uma concentração significativamente menor em relação a outras espécies resultando na variação da tonalidade deste tipo de carne do cinza a um vermelho pálido (DE SOUZA, 2005). Além disso, a carne de peito de frango apresenta uma baixa capacidade de formar oximioglobina (*bloom*) quando exposta ao ar (MILLAR et al., 1994) e quando comparada às carnes bovina e suína, a carne de frango apresenta uma alta taxa de consumo de oxigênio que tende a aumentar a formação de metamioglobina na superfície da carne.

As diferenças encontradas nos valores de pH às 24 h *post mortem* influenciaram significativamente a cor dos filés de peito. Os teores de amarelo (índice b*) encontrados neste estudo foram superiores nos filés PSE em relação aos filés Normais, resultado que confirma estudos prévios reportando a relação inversa também encontrada entre os valores maiores de pH final e os teores reduzidos de b* (ALLEN et al., 1998; WILKINS et al., 2000).

5.4.2 Medida do exsudato e da Perda de Peso por Cozimento (PPC)

A medida da perda de umidade por exsudação e por cozimento (PPC) são formas diretas de determinação da Capacidade de Retenção de Água (CRA), assim como o teste de Perda de Umidade durante o descongelamento (Drip Loss). FORREST et al. (1979) descreveram que a PPC em animais de açougue pode variar entre valores de 20% a 40%. Entre os fatores que podem interferir nos resultados da PPC de amostras de uma mesma espécie, estão: as diferentes metodologias de cocção (banho-maria ou chapa) e preparo da amostra (retirada de

tecidos conjuntivos e depósitos de gorduras) e as categorias de pesos ao abate, em que os animais apresentam diferentes percentuais de gordura na carcaça (SCHÖNFELDT et al., 1993). As médias do exsudato e da PPC do músculo P. major de frango estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20 - Médias e erros-padrão dos valores do exsudato e Perda de Peso por Cozimento (PPC) encontrados em filés de peito de frango.

	PSE	NORMAL
Exsudato (%)	2,990 ^a ± 0,180	1,810 ^b ± 0,104
PPC (%)	22,098 ^a ± 0,992	19,695 ^a ± 1,256

a,b Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de T ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

O resultado de perdas por exsudação foi superior (P<0,05) nas amostras PSE em relação às amostras Normais. No entanto, um aspecto interessante do presente estudo é que a PPC não diferiu entre os filés PSE e normais. Isto é surpreendente, visto que a maior perda de umidade por exsudação é indicativa de que a CRA deveria ser inferior entre os filés PSE. A umidade perdida antes da cocção provavelmente foi grande o suficiente para que a água livre no interior do filé (*P. major*) perdida durante o processamento não diferisse entre as amostras (LEACH et al., 1996).

5.4.3 Análise sensorial

Dos provadores, 38 indivíduos (97,44%) responderam que os filés de peitos de frango Normais apresentavam uma intensidade de cor maior em relação aos peitos PSE. Como o número mínimo de respostas coincidentes para o

nível de significância de 5% é 26, concluímos que os filés de peito de frango Normais apresentam intensidade de cor maior ($P < 0,05$) em relação aos peitos PSE.

Para verificar a preferência dos provadores com relação à textura, aplicou-se um teste de comparação pareada-preferência. O número total de respostas obtidas foi 40, e o número de respostas indicando a preferência pelos atributos de mastigabilidade, maciez e suculência foram para amostras PSE e Normais foram de 26 e 14; 26 e 14; 24 e 16, respectivamente. Como os números mínimos de julgamentos necessários para estabelecer preferência de uma amostra sobre a outra, extraídos de tabela apropriada (MEILGAARD et al., 1999) em diferentes níveis de significância são: 5 % = 27; 1 % = 29 e 0,1 % = 31, pode-se afirmar que não houve preferência significativa ($P > 0,05$) para as estas características entre as amostras testadas.

Em um estudo avaliando a qualidade de carnes de suínos portadores do gene hal (Nn) e Normais (NN), LEACH et al. (1996) igualmente não encontraram diferenças na CRA e entre os atributos de maciez e suculência da carne. Porém, autores como BOLES et al., (1992); NPPC (1994) e MURRAY e JONES (1992), reportaram que carnes suínas de indivíduos PSE e Normais apresentam qualidade sensorial inferior, embora esta diferença, em geral, seja muito pequena.

5.4.4 Perda de umidade no descongelamento (Drip Loss), PPC, Força de Cisalhamento (FC) e Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

O teste de Perda de umidade durante o descongelamento, como a PPC, é uma prova para a avaliação da CRA da carne, sendo empregado para a

determinação da carne PSE (OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2001; OWENS et al., 2000). As médias das análises de Drip Loss, PPC, FC e MFI são apresentadas na tabela 21.

Tabela 21 - Médias e erros-padrão dos valores de Drip Loss, PPC, FC e MFI em filés de peito de frango.

	PSE	NORMAL
<i>Drip Loss (%)</i>	12,267 ^a ± 1,142	4,571 ^b ± 0,739
PPC (%)	41,821 ^a ± 1,332	35,766 ^b ± 1,101
FC (N)	64,400 ^a ± 7,581	45,009 ^b ± 2,379
MFI	68,341 ^a ± 0,529	65,086 ^a ± 2,498

^{a,b} Médias seguidas da mesma letra são estatisticamente iguais entre si pelo teste de T ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

As Perdas por Descongelamento, PPC e FC foram superiores (P<0,05) nas amostras de filés PSE em relação aos Normais. Todos estes parâmetros estão diretamente relacionados ao pH final da carne (NORTHCUTT et al., 1994). Segundo PARDI et al. (1993), a velocidade de instalação do rigor mortis influencia na qualidade da carne, de tal forma que quanto maior o pH final, maior a dureza na matéria-prima. Ainda relacionado a este tópico, encontra-se o modelo de amaciamento da carne baseado na ativação das calpaínas, proposto por DRANSFIELD (1993), onde o aumento na concentração de cálcio livre, a partir do início do rigor mortis – o declínio do pH de 6,5 a 5,7 aumentaria a atividade da calpaína I de 15 % a 97 % da atividade máxima. Em concordância com o presente trabalho, outros estudos demonstraram que cortes suínos e peitos de perus que apresentaram maior perda de água durante o cozimento tornaram-se mais rígidos

(WAL et al., 1988; McCKEE e SAMS, 1998).

Apesar dos índices de MFI em filés de peito PSE serem maiores em relação aos filés Normais, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as médias das duas amostras. De acordo com KOOHMARAIE et al. (1987), mudanças no grau de fragmentação têm correlação significativa com o aumento da maciez da carne cozida após a estocagem, e está associado com alterações físico-químicas durante a maturação da carne (DAVEY e GILBERT, 1969). O aumento nos índices de MFI durante o processo de maturação pode possuir efeito direto na maciez da carne (MOLLER et al., 1973).

5.5 ETAPA 5

Para a extração das proteínas do RS utilizou-se como matéria-prima, amostras de peito (*Pectoralis major*) de perus (*Meleagris gallopavo*) de linhagens comerciais, conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. A técnica executada na extração de proteínas do RS (MURAYAMA et al., 1999), permitia sua separação em duas frações, baseada nas diferenças em densidade e utilizando a centrifugação em gradiente de sacarose. O *Heavy SR* (HSR) é rico em componentes da membrana juncional (incluindo os canais de cálcio e calsequestrina), tríades, cisternas terminais. A fração *Light SR* (LSR) é principalmente rica em componentes dos túbulos longitudinais de membrana, especialmente em proteínas da bomba de Ca^{2+} (FRANZINI-ARMSTRONG, 1980).

Na tabela 22 estão demonstrados alguns dados sobre os rendimentos obtidos desde o início das extrações, o tipo de material extraído e observações.

TABELA 22 – Dados sobre as extrações de proteínas do RS

Número	Rendimento ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	OBSERVAÇÕES	
1	6,59	HSR	Ressuspender 150 μL .
2	4,2	HSR	Idem.
3	2,26	HSR	Idem.
4	3,17	HSR	Idem.
5	2,66	HSR	Idem.
6	7,22	HSR	Idem./ Afição da lâmina do blender.
7	5,71	HSR	Idem.
8	12,27	LSR	Idem.
9	10,06	LSR	Idem.
12	8,05	CSR	Utilização de bisturi e martelo para quebrar amostras no início do protocolo/ Ressuspender em 10mL.
13	9,05	CSR	Idem.
14	3,44	CSR	Idem.
15	4,9	CSR	Idem.
16	3,69	CSR	Idem.
17	1,72	CSR	Idem.
18	15,48	CSR	Idem./ Ressuspender em 5 mL.
19	13,82	CSR	Idem.
20	11,74	CSR	Idem.
21	13,25	CSR	Idem.
22	12,46	CSR	Idem./ Metodologia para diminuir o conteúdo de miosina
23	14,42	CSR	Idem.
24	10,28	CSR	Idem./ Utilizar 5 mM EGTA
25	8,07	CSR	Idem.

As extrações iniciais apresentaram rendimentos de HSR muito reduzidos e muitos géis não foram executados com qualidade suficiente para que fosse garantida a transferência das amostras, de maneira eficiente, para membrana (Western blotting). Assim, optou-se por trabalhar com o CSR ao invés do HSR, garantindo rendimentos maiores das amostras e assegurando a presença das isoformas α e β da proteína receptora de rianodina, verificado na quantificação e em corrida em gel de poliacrilamida 5 % (figura.28). A figura mostra a mesma amostra extraída após execução de protocolo visando redução no conteúdo de miosina, que consistia em ressuspê-la em 15 mL de solução (KCl 1M; pirofosfato de sódio 20 mM, Hepes 20 mM; pH 7,5 e 2-mercaptoetanol 30 mM), centrifugar (40 min/ 42.000

rpm) e novamente ressusper em 15 mL de solução de Sacarose 10 % e centrifugar (40 min/ 42.000 rpm) para a coleta do pelete final.

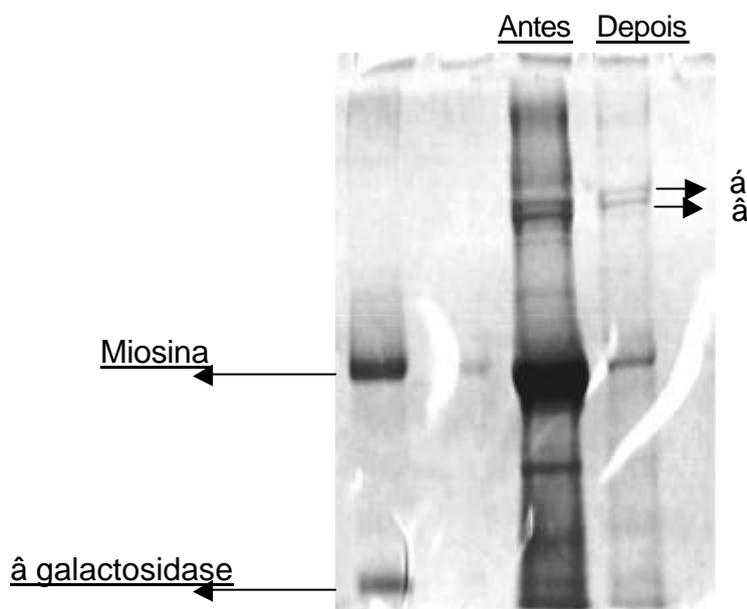


Figura 28 - Gel de SDS-PAGE com amostras de CSR extraído de *P. major* de perus, antes e depois da execução metodologia para redução do conteúdo de miosina.

Ao utilizarmos EGTA 5 mM nas extrações ocorreu um fato inusitado: a presença de uma terceira banda de peso molecular superior ao das duas isoformas (figura 29). Foram realizadas diversas tentativas, através da técnica de Western Blotting, para verificar se a mesma reagia contra os anticorpos específicos para uma das isoformas (anti- α e anti- β) ou para ambas (anti- α/β). Os resultados foram inconsistentes, pois a reações contra os anticorpos para estas amostras não demonstraram um padrão. Além disso, persistia a dúvida na Dra. Wen Chiang sobre o fato das bandas das RyR extraídas até então pelos grupo e observadas em gel SDS-PAGE, não corresponderem extamente aos pesos moleculares esperados, de

aproximadamente 560 kDa, para a molécula RyR (baseada em cálculos dos pesos moleculares pela taxa de migração no gel).

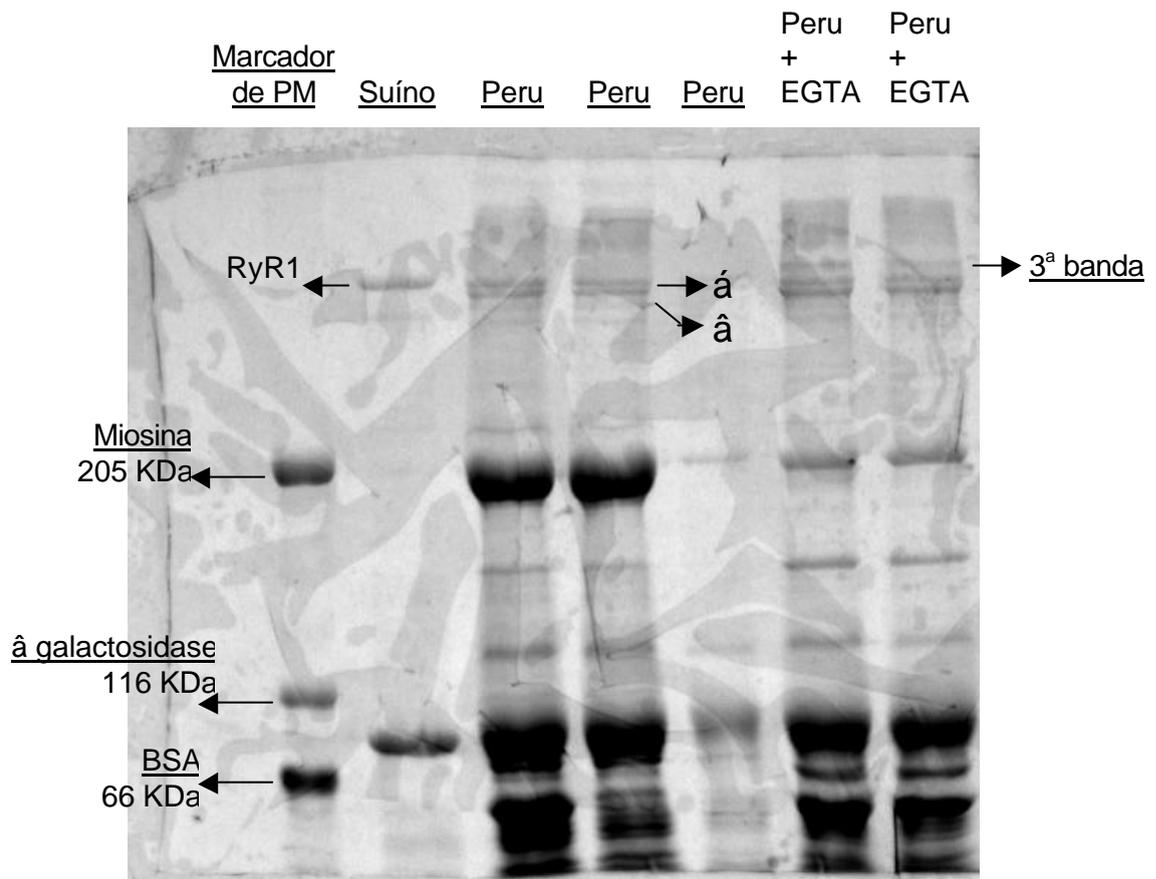


Figura 29 - Gel de SDS-PAGE com amostras de CSR, obtidas de suínos, perus e com alteração no protocolo.

Assim, tentamos também resolver esta questão, se as duas bandas obtidas nas extrações anteriores realmente se referiam as isoformas α e β . O resultado foi confirmado com a otimização da extração de uma proteína denominada Kettin (VAN STRAATEN et al., 1999), de músculo esquelético de crayfish. Esta proteína peso molecular conhecido de (500 kDa), semelhante ao PM da proteína RyR, serviu também como um novo padrão de marcador de peso molecular, uma

vez que no padrão comercial, a proteína de maior peso molecular é a miosina. O desenvolvimento de uma corrida com essa nova amostra pode ser verificado na figura 30.

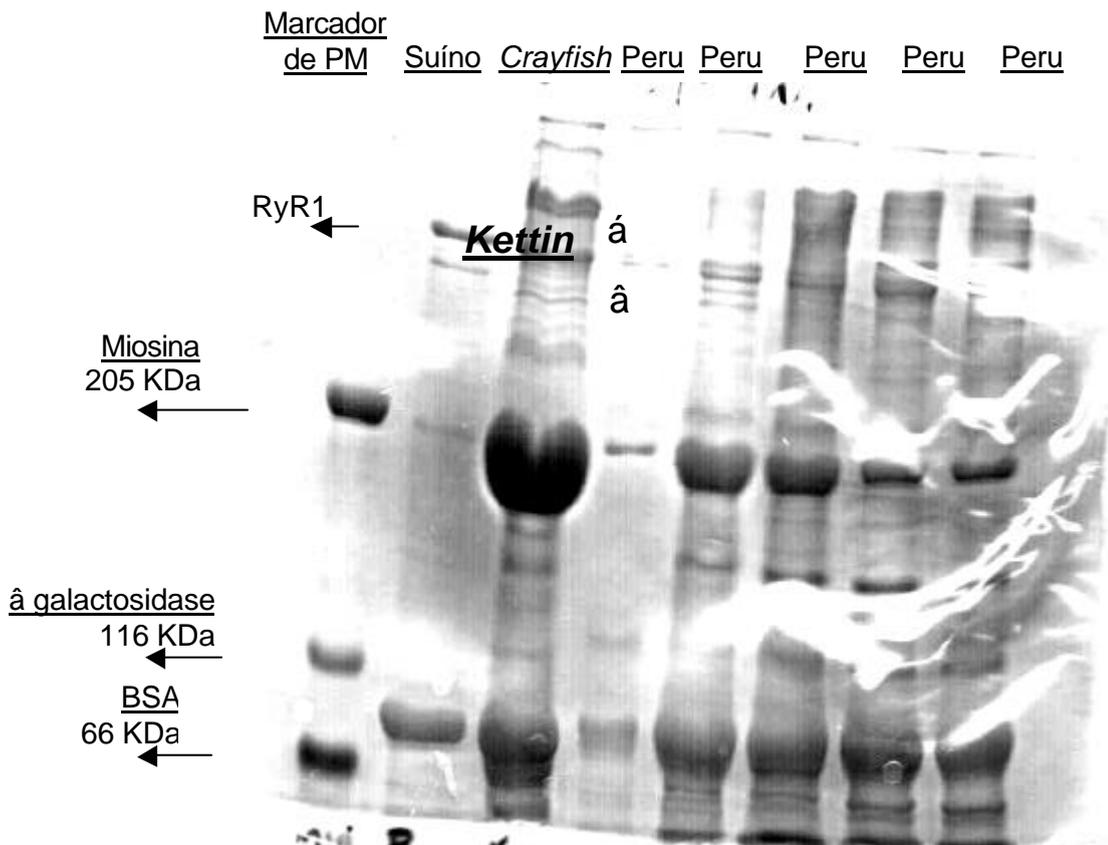


Figura 30 –Gel de SDS-PAGE 1 % com amostras de kettin de Crayfish, CSR de suínos e perus.

Antes de iniciar a análise das proteínas componentes de membranas deve-se assegurar que durante o seu processo de isolamento, ocorra um mínimo de perdas dos componentes e também mínima adsorção de contaminantes (frações não pertencentes à membrana). A solubilização pode ser definida como a conversão de uma membrana intacta, um sistema complexo, em um estado relativamente

simplificado, tornando-a receptiva a ser submetida a análises que não podem ser aplicadas à membrana inteira. Assim, se o objetivo principal do estudo for a análise constitucional da membrana, torna-se imperativo assegurar que os componentes de membrana na “solução” estejam completamente dissociados uns dos outros, de outra forma, alguns complexos supramoleculares podem ser identificados erroneamente como espécimes moleculares distintos. Por outro lado, se o objetivo principal for o estudo da atividade biológica da membrana, então o estado conformacional das proteínas isoladas será de significativa importância e a manutenção de algumas forças intermoleculares pode ser essencial, i.e. se a atividade biológica for dependente da integridade do complexo lipoprotéico. Quando um detergente é escolhido para o isolamento de uma proteína de membrana particular, o cientista deve primeiramente selecionar o detergente e determinar a concentração ótima requerida para obter o final desejado. A seleção permanece predominantemente como uma forma de tentativa e erro com um princípio de que os detergentes com baixo c.m.c. (critical micellar concentration) tenderá a causar menor rompimento que aqueles com alto c.m.c.. Neste trabalho utilizamos o CHAPS como detergente. Como os resultados na transferência no Western Blotting não aconteciam de maneira uniforme, pensamos que talvez pudesse estar acontecendo algum problema na etapa de solubilização das amostras. Procuramos observar o que estava acontecendo em diferentes tempos de “incubação” com o magneto misturando a solução (30 minutos, 1 hora, 2 horas). Entretanto, observamos que bandas correspondentes às isoformas á e â estavam efetivamente presentes no tempo de 2h, mas com baixa intensidade (figura 31).



Figura 31 - Gel de poliacrilamida com amostras de proteínas extraídas do RS e submetidas à solubilização.

As reações de Western Blotting seguintes, para que pudéssemos escolher os melhores anticorpos para a etapa de imunoprecipitação, foram um obstáculo à medida que as transferências e as reações com os anticorpos não se desenvolveram segundo um padrão. Mesmo com resultados inconsistentes, foram realizados dois testes de imunoprecipitação, com o anticorpo (anti-â) apenas para garantir a aprendizagem da técnica e para que dentro da realidade de nossas condições, pudesse ser repetida e gerar resultados significativos. Não foram fornecidas as seqüências dos anticorpos testados.

6 CONCLUSÕES

a) No seqüenciamento do domínio (*pFam 00520*) do gene da α -RyR, foi verificada a variabilidade nas seqüências obtidas de um mesmo indivíduo, possivelmente resultado da população F₃ de frangos do experimento. As mutações encontradas nos exons analisados neste trabalho não foram conclusivos para explicar o fenômeno em carne de aves, uma vez que não houve diferenciação entre os indivíduos PSE e não-PSE.

b) Os resultados encontrados na análise de expressão gênica demonstraram que a expressão do gene da α -RyR nas aves que originaram carnes PSE foi inferior em relação às aves Normais, sendo sugerida como um dos prováveis fatores envolvidos no desenvolvimento da síndrome PSE.

c) A coloração dos filés PSE é diferenciada da coloração dos filés Normais e, embora após a cocção, os filés PSE tenham apresentado maciez inferior ($P < 0,05$) em relação aos Normais, não foram encontradas entre si, preferências significativas para os atributos de textura avaliados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. Acessado em 18 de abril de 2006. Disponível na internet em <http://www.abef.com.br>.

ADDIS, P.B. Poultry muscle as food. 371-404p. In: Muscle as food. P.J. BETCHEL, ed. Academic Press, New York, NY.1986.

AIREY, J.A.; DEERINCK, T.J.; ELLISMAN, M.H.; HOUENOU, L.J.; IVANENKO, A.; KENYON, K.L.; MCKEMY, D.D.; SUTKO, J.L. Crooked neck dwarf (cn) mutant chicken skeletal muscle cells in low density primary cultures fail to express normal alpha ryanodine receptor and exhibit a partial mutant phenotype. *Dev. Dyn.*, v. 197: 189-202p. 1993.

ALLEN, C.D.; FLETCHER, J.K.; NORTHCUTT, J.K.; RUSSEL, S.M. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf life. *Poult. Sci.*, v.77, 361-366p. 1998.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search toll. *J. Mol. Biol*, n.215, p.403-410, 1990.

ALVARADO, C.Z.; SAMS, A.R. Rigor mortis development in turkey breast muscle and the effect of electrical stimulation. *Poultry Sci.*, v.78, 210- p. 1999.

ALVARADO, C.Z.; SAMS, A.R. The role of carcass chilling rate in the development of pale, exudative turkey pectoralis. *Poultry Sci.*, v.81, 1365-1370p. 2002.

ALVES, H.J. Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte. 103p. 2004. (Tese de Doutorado- ESALQ/USP).

ANADÓN, H.L.S. Biological, Nutritional, and Processing Factors affecting breast meat quality of broilers. 171p.2002. (Tese de Doutorado- Faculty of Virginia/ Polytechnic Institute and State University).

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, D.; SMITH, J. A.; STRUL, K. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons., 809 p., 1995.

AVEWORLD. UBA: Destinação da Produção da Carne de Frango (Estatística Mensal). Acessado em 13 de abril de 2006. Disponível na internet em <http://www.aveworld.com.br/aveworld/publicacoes.asp?pais=brasil&codigo=42929>

AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. Quim. Nova, v.26, n.6, 896-900p. 2003

BARBUT, S. Estimates of the magnitude of the PSE problem in poultry - A review. J. Muscle Food, v.9, n.1, p.35-49. 1998.

BARBUT, S. Occurrence of Pale Soft Exudative Meat In Mature Turkey Hens. Br. Poult. Sci., Edinburgh, v. 38, n. 1, p.74-77, 1997a.

BARBUT, S. Problem of pale, soft, exudative meat in broiler chickens. Br. Poultry Sci., v.38, 355-358p. 1997b.

BECHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. Physiological Reviews, v.80, n.3, 1215-1265p. 2000.

BENDALL, J.R. Post mortem changes in muscle. Page 243 in Structure and Function of Muscle. G.H. Bourne, ed. Academic Press, New York, NY. 1973.

BENDALL, J.R.; SWATLAND, H.J. A review of the relationship of pH with physical aspects of pork quality. **Meat Sci.**, Oxford, v.24, 85-126p. 1988.

BERAQUET, N. Influência de fatores ante e post mortem na qualidade da carne de aves. Revista Brasileira de Ciência Avícolas, n.1, p.155-166, 1999.

BERRI, C. Variability of sensory and processing qualities of poultry meat. *World's Poultry Science Journal*, v.6, n.3, 209-224p. 2000.

BERRI, C.; WACRENIER, N.; MILLET, N. et al. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poultry Science*, n.80, p.833-838, 2001.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v.415: 198-205p. 2002.

BEXTINE , B. Quantitative Real Time PCR. Acessado em 05 de dezembro de 2005. Disponível na internet em http://www.faculty.ucr.edu/~chmeliar/miller_home/people/postdoctoral/blake_bextine/bextineQRTPCR.htm.

BILGILI, S.F.; EGBERT, W.R.; HUFFMAN, D.L. Effect of postmortem aging temperature on sarcomere length and tenderness of broiler Pectoralis major. *Poultry Sci.*, v.68, 1588-1591p. 1989.

BLATZLER, L. J. Característica organoléptica de la carne. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. (Ed.). *Ciencia de la carne y de los produtos carnicos*. Zaragoza: Acribia, 1976.

BOLES, J. A., PARRISH, Jr.;F.C.; SKAGGS, C.L.; CHRISTIAN, L.L. Sensory, physical, and chemical properties of pork loin chops from somatotropin-treated pigs of three stress classifications. *J. Anim. Sc.i*, 70:3066. 1992.

BOULIANNE, M.; KING, A.J. Biochemical and color characteristics of skinless boneless pale chicken breast. *Poultry Sci.*, v.74, 1693-1698p. 1995.

BOUTON, P. E.; HARRIS, P. V.; SHORTHOSE, W. R. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 36, n. 5, p. 435-439, May 1971.

BRASIL. Portaria n.210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. Divisão de Inspeção de

Produtos de Origem Animal (DIPOA), Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Brasília, 1998.

BRATZLER, L.J. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. Proceedings of the Second Annual Reciprocal Meat Conference. National Livestock and Meat Board, Chicago, IL. AMSA, Savoy, IL. p.117, 1949.

BRESSAN, M.C. Efeitos dos fatores pré-abate sobre a qualidade do peito de frango. 1998. 179p. (Tese de Doutorado- Unicamp)

BURT, D.W. Applications of biotechnology in the poultry industry. World's Poultry Science Journal, 58 (1): 5-13p. 2002.

CARVALHO, A.M.; JUNQUEIRA, A.M.R.; VIEIRA, J.V.; BOTELHO, R. Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional. Horticultura Brasileira, Brasília, v.23, n.3, p.805-809, jul-set 2005.

CASTILLO, C.J.C. Qualidade de carcaça e carne de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2001, São Pedro. Anais... São Pedro: ITAL, 2001, p.79-99.

CHEN, M.T.; LIN, S.S.; LIN, L.C. Effect of stresses before slaughter on changes to the physiological, biochemical and physical characteristics of duck muscle. Br. Poult. Sci. v.32, 997-1004p. 1991.

CHIANG, W.; ALLISON, C.P.; LINZ, J.E.; STRASBURG, G.M. Identification of two alpha RyR alleles and characterization of alpha RyR transcript variants in turkey skeletal muscle. Gene, 330, 177-184p. 2004.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, v.162, p.156-159, 1987.

CONTRERAS, C.C.; BERAQUET, N.J. Electrical stunning, hot boning, and quality of chicken breast meat. Poultry Science, v. 80, 501-507p. 2001.

CORÓ, F. A. G.; YOUSSEF, E. Y.; SHIMOKOMAKI, M. Carne do zebu: o que está por trás da sua textura? Revista Nacional da Carne, São Paulo, v. 23, n. 27, p. 28-33, set. 1999.

CORÓ, F.A.G., YOUSSEF, E. Y. e SHIMOKOMAKI, M. Age Related Changes in Poultry Breast Meat Collagen Pyridinoline and Texture. J. Food Biochem., (Trumbull), v.26, n.6, p533-541, 2002.

CROSS, H.R. Effects of electrical stimulation on meat tissue and muscle properties: a review. J. Food Sci., v.44, 509-512, 514, 523p. 1979.

CULAU, P. O. V. Efeito da distância criação-abatedouro e temperatura de descanso pré-abate sobre a qualidade da carne suína. 132 p. 1991. (Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

CULAU, P.O.V.; LÓPEZ, J.; RUBENSAM, J.M.; LOPES, R.F.F.; NICOLAIEWSKY, S. Influência do gene halotano sobre a qualidade da carne suína. R. Bras. Zootec., v.31, n.2, 954-961p. 2002.

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

DABÉS, A. C. Propriedades da carne fresca. Revista Nacional da Carne, São Paulo, v. 25, n. 288, p. 36-40, fev. 2001.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. Changes in the fine structure of meat during aging. J. Food Sci. v.34, 69-74p. 1969.

DAWSON, P.L.; JANKY, D.M.; DUKES, M.G.; THOMPSON, L.D.; WOODWARS, S.A. Effect of post-mortem boning time during simulated commercial processing on the tenderness of broiler breast meat. Poultry Sci., v.66, 1331-1333p. 1987.

DE SOUZA, H.B.A. Parâmetros físicos e sensoriais utilizados para avaliação de qualidade da carne de frango. 2005. Acessado em 18 de junho de 2006. Disponível na Internet em:

http://www.cnpqa.embrapa.br/sqc/sqc_publicacoes/publicacao_v0b53l1x.pdf.

DE SOUZA, V.R.; FERREIRA, Q.T.M. Síntese e secreção de macromoléculas. 2006. Acessado em 11 de julho de 2006. Disponível na Internet em:

http://www.icb.ufmg.br/~biocelch/sintese/texto_sintese.html

DE PENNA, E.W. Metodos sensoriales y sus aplicaciones. Avances en análisis sensorial. Em: ALMEIDA, T.C.A.; HOUGH, G.; DAMÁSIO, M.H.; da SILVA. M.A.A.P. (Orgs). CYTED. São Paulo. p.13-22. 1999.

DEBUT, M., BERRI, C., BAEZA, E., SELIER, N., ARNOULD, C., GUEMENE, D, JEHL, N., BOUTTEN, B., JEGO, Y., BEAUMONT, C., BIHAN-DUVAL, E.L. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. Poultry Science, v.82:1829-1838. 2003.

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. Nature Reviews Genetics, 3:22-32p. 2002.

DESOUZART, O. Brasil – A indústria avícola em 2005. Aveworld, ano 3, n.14, 32-36p. 2005.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization - IV- Role of calpain and calpastatin in conditioning. Meat Sci. v.34, 217-234p. 1993.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A.A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. Poult. Sci., v.78, p.743-746. 1999.

DROVAL, A.A. Carne PSE (Pale, Soft, Exudative): mutações no gene receptor da rianodina tipo 3 e alterações no perfil de ácidos graxos. 118f. 2004. (Dissertação de Mestrado – UEL).

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.

EKU. Eastern Kentucky University. Acessado em 22 de abril de 2006. Disponível na internet em <http://www.people.eku.edu/ritchisong/301notes3.htm>.

EWING, B.; HILLIER, L.; WEDL, M.C.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v.8, p.175-185, 1998.

FARRAN, M.T.; KHALIL, R.F.; UWAYJAN, M.G. et al. Performance and carcass quality of commercial broiler strain. *Journal of Applied Poultry Research*, v.9, n.2, p.252-257, 2000.

FELDER, E.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 1695-1700p. 2002.

FELICIO, P. E. Qualidade da carne bovina: características físicas e organolépticas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36. , 1999. Anais... Porto Alegre: SBZ, 1999. p. 89-97.

FERNANDES, L.M.; VIEIRA, S.L.; KINDLEIN, G. et al. Avaliação do crescimento e rendimento de carcaça de linhagens comerciais e dois tipos de bebedouros. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001. Suplemento da Revista Brasileira de Ciência Avícolas, n.3, p.1.

FERREIRA, A.T. Fisiologia da contração muscular. *Revista Neurociências*, v.13, n.3 (supl-versão eletrônica), 61-63p. 2005.

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. Fundamentos de ciencia de la carne. Ed. Acribia. 363 p. 1979.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. Functional implications of RyR-DHPR relationships in skeletal and cardiac muscles. . *Biol. Res.* [online]. 2004, vol.37, no.4 [citado 17

Fevereiro 2006], p.507-512. Disponível na internet em:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602004000400003&lng=pt&nrm=iso. ISSN 0716-9760.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Review*, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 699-729, 1997.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. Studies of the triad: I structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.*, v. 47, 488-499p. 1970.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* v.39, 2403-2409p. 1980.

FRONING, G.W. Color of poultry meat. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 6(1): 83-93. 1995.

FRONING, G.W.; BABJI, A.S.; MATHER, F.B. The effect of preslaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. *Poultry Science*, v.57, n.3, p.630-633, 1978.

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

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; COSTA, M.J.R.P. Bem-estar das aves e suas implicações sobre o desenvolvimento e produção. In: FORUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: animal world, 2005, p.60-68.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1600, 38-44p. 2002.

GANONG, W. F. **Review of Medical Physiology**, 19 ed. Appleton and Lange, A Simon and Cluster, U. S. A. 472p. 1999.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. 2003. Tratado de Histologia. Ed. Guanabara Koogan, 2a. Ed., Rio de Janeiro, 456p.

GIANNINI, G.; CONTI, A.; MAMMARELLA, SCROBOGNA, M.; SORRENTINO, V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 128, n. 5, p. 893-904, 1995.

GISPERT, M.; FAUCITANO, L.; OLIVER, M. A.; GUARDIÀ, M. D.; COLL, C.; SIGGENS, K.; HARVEY, K.; DIESTRE, A. A survey of pre-slaughter conditions, halotane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science*, Barking, v. 55, n. 1, p. 97-106, 2000.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, v.25, p. 386-401, 2001.

GREASER, M.L. Conversion of muscle to meat. 37102p. In: *Muscle as Food*. P.J., BECHTEL, ed. Academic Press, New York, NY. 1986.

GUARNIERI, P. D., SOARES, A.L., OLIVO, R., SCHNEIDER, J. P., MACEDO, R. M., IDA, E. I. e SHIMOKOMAKI, M. Preslaughter handling with water shower spray inhibits PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler breast meat in a commercial plant. Biochemical and Ultrastructural observations. *Journal Food Biochemistry*, Trumbull, v. 28 n.3, p.269-277, 2004.

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

GUERNEC, A.; BERN, C.; CHEVALIER, B.; WACRENIER-CERE, N.; LE BIHANDUVAL, E.; DUCLOS, M.J. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. *Growth Hormone and IGF Research*, v.13: 8-18p. 2003.

HEDRICK, H. B.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; JUDGE, M.; MERKEL, R. A. Principles of meat science. 3. ed. Kendall: Hunt publishing company, 1994. 364 p.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology*, 10(4), 413-417. 1992.

HONIKEL, K. O ; FISCHER, C. A. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscles. *Journal Food Science*. Chicago, v.42, n.6, p.1663-76. 1977.

HUALLANCO, M.B.A. Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito pós abate da qualidade de cortes de frango criados no sistema alternativo. 82p. 2004. (Dissetação de Mestrado- Esalq).

HUANG, C.F.; TONG, J., SCHMIDT, J. Protein kinase C couples membrane excitation to acetylcholine receptor gene inactivation in chick skeletal muscle. *Neuron*., v.9, 671-678p., 1992.

IFT sensory evaluation guide for testing food and beverage products. *Food Technology*, v.35, n.11, 1981.

ING, I. Meat quality: defining the term by modern standards. *Fleisch*., 69: 1268. 1989.

ISLAM, M.N., NARAYANAN, B.; OCHS, R.S. A mechanism for both capacitative Ca^{2+} entry and excitation-contraction coupled Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle cells. *Experimental Biology and Medicine*, v.227, 425-431p. 2002.

JONES, J.M.; GREY, T.C. Influence of processing on product quality and yield. *Processing of Poultry*, p.127-130, 1989.

JURKAT-ROTT, K.; MCCARTHY, T.; LEHMANN-HORN F. Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*, V.23: 4-27P. 2000.

KIJOWISKI, J.A.; NIEWIAROWICZ, A.; KUJAWAKA-BIERNAT. Biochemical and technological characteristics of hot chicken meat. *Journal of Food Technology*, Dorking, v.17, p.553-560, 1982.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, Oxford, v. 36, n. 1/2, p. 93-104, 1994.

KOOHMARAIE, M., SEIDEMAN, S.C., SCHOLLMAYER, J.E., DUTSON, T.R., CROUSE, J.D. Effect of post-mortem storage on Ca^{++} -dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Sci.*, v.19, 187-196p. 1987.

KOSSUGUE, P.M.; MUNIZ, V.P.; VAINZOF, M. Estudos genéticos na Hipertermia Maligna e Miopatia de Central Core. *Revista Neurociências*, v.13, n.3. 66-68p. 2005.

KRIESE, P.R. Influência da maturação na maciez de peito de frango realizada em condições de processamento industrial. 58p. 2005. (Dissertação de Mestrado- UEL).

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, XXX (2006) XXX-XXX (In press)

KUREBAYASHI, N.; OGAWA, Y. Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, v.533.1, 185-199p. 2001.

LANGSLOW, D.R.; LEWIS, R.J. Alterations with age in composition and lipolytic activity of adipose tissue from male and female chickens. *British Poultry Science*, n.15, p.267-273, 1974.

LARA, J. A. F. ; M. C. LEDUR ; A. L. NEPOMUCENO ; SHIMOKOMAKI, M. . Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Aves. In: Conferência APINCO 2002, 2002, Campinas. Anais. Campinas : Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2002. v. 04. p. 15-15.

LARA, J. A. F., NEPOMUCENO, A. L., LEDUR, M. C., BINNECK, E., IDA, E. I. AND SHIMOKOMAKI, M. Chicken PSE Meat. Molecular Cloning and Sequencing of Three Regions of Type 3 Ryanodine (RyR3) Receptor Gene. submetido, agosto de 2004.

LARA, J.A.F. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos. Ocorrência de mutações no gene receptor da rianodina. 101p. 2003. (Tese de Doutorado- UEL)

LARA, J.A.F., NEPOMUCENO, A.L., LEDUR, M.C., IDA, E.I. e SHIMOKOMAKI, M. Carne PSE em Frangos. Ocorrência de Mutações no Gene Receptor da Rianodina. In: Prêmio Lamas Organizado pela APINCO, 2003, Campinas. Revista Brasileira de Ciência Avícola. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003. v. Supl.5. p. 112-112.

LAWRIE, R.A. Meat Science. 5th ed. Pergamon Press, New York, NY. 293p. 1991.

LEACH, L.M.; ELLIS, M.; SUTTON, D.S.; MCKEITH, F.K.; WILSON, E.R. The Growth Performance, Carcass Characteristics, and Meat Quality of Halothane Carrier and Negative Pigs. J. Anim. Sci., 1996. 74:934–943.

LE BIHAN-DUVAL, E. Genetic variability of poultry meat quality. Poultry Digest Online, v.3, n.11. 2003.

LE BIHAN-DUVAL, E., BERRI, C.; BAEZA, E.; MILLET, N.; BEAUMONT, C. Estimation of the genetic parameters of meat characteristics and of their genetic correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. Poult. Sci., 80: 839-843. 2001.

LE BIHAN-DUVAL, E.; MILLET, N.; REMIGNON, H. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. Poult. Sci., v.78, p.822-826. 1999.

LEDUR M. C.;LARA, J.A.; NINOV, K.; BONASSI, C. A.; SHIMOKOMAKI, M.; ZANELLA, E.; BERTANI, G. R.; NEPOMUCENO, A. L. QTL population to investigate the genetics of the pale, soft and exudative (PSE) meat in chickens. Proceedings of the XXVIII International Conference on Animal Genetics – ISAG, Gottingen, Germany, abstract E030, p. 171-172, 2002.

LEDUR, M.C.; NONES, K.; ALVES, H.J.; BERTANI, G.R. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. Acessado em 19 de novembro de 2005. Disponível na internet em: lb.cnpsa.embrapa.br/genomafrango/publica/palestra.pdf.

LISBOA, J.S.; SILVA, D.J.; SILVA, M.A. et al. Rendimento de carcaça de três grupos genéticos de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes teores de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, n.3, p.548-554. 1999.

LIU, C.; McFARLAND, D.C.; VELLEMAN, S.G. Effect of Genetic Selection on MyoD and Myogenin Expression in turkeys with different growth rates. *Poult. Sci.*, 84, 376-384. 2005.

LOCKER, R. H.; HAGYARD, C. J. A. Cold Shortening effect in beef muscle. *Journal of the Science Food Agriculture*, London, v. 14, n. 11, p. 787-793, Nov. 1963.

LONERGAN, S.M.; DEEB, N.; FEDLER, C.A.; LAMONT, S.J. Breast meat quality and composition in unique chicken populations. *Poult. Sci.* v.82, p.1990-1994. 2003.

LOPEZ, J.R., ALLEN, P.D., ALAMO, L., JONES, D., SRETER, F.A. Myoplasmic free [Ca²⁺] during a malignant hyperthermia episode in swine. *Muscle nerve*, v.11, n.1, p.82-88. 1988.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. . *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275. 1951.

LYON, B.G., SMITH, D.P., LYON, C.E., SAVAGE, E.M. The Effects of Diet and Feed Withdrawal on the Sensory Descriptive and Instrumental Profiles of Broiler Breast Fillets. *Poultry Science*, v.83, n.2, p.275-281, 2004.

LYON, C.E.; HAMM, D.E.; THOMSON, J.E. pH and tenderness of broiler breast meat deboned various times after chilling. *Poultry Science*, v.64, n.2, p.307-310, 1985.

MA, R.T-I; ADDIS, P.B. The association of struggle during exsanguination to glycolysis, protein solubility and shear in turkey pectoralis muscle. *J. food Sci.*, v.38, p.995-997, 1973.

MAAK, S.; WICKE, M.; SWALVE, H. H. Analysis of gene expression in specific muscles of swine and turkey. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, v.48, Special Issue, 135-140p. 2005.

MALLIA, J.G.; BARBUT, S.; VAILLANCOURT, J-P.; MARTIN, S.W.; McEWEN, S.A. A dark, firm dry-like condition in turkeys condemned for cyanosis. *Poult. Sci.*, Champaign, v.79, n.2, p.281-285, 2000a.

MALLIA, J.G.; BARBUT, S.; VAILLANCOURT, J-P.; MARTIN, S.W.; McEWEN, S.A. Roaster breast meat condemned for cyanosis: a dark, firm dry-like condition? *Poult. Sci.*, Champaign, v.79, n.6, p.908-912, 2000b.

MARKS, A.R. Expression and regulation of ryanodine receptor / calcium release channels. *TCM*, v.6, n.4, 130-135p. 1996.

McCURDY, R.D., BARBUT, S., QUINTON, M. Seasonal effects on pale, soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. *Food Res. Int.*, Essex,, v.29, p.363-366, 1996.

McKEE, S.R. Muscle fiber types and meat quality. 2002. Acessado em 18 de junho de 2006. Disponível na Internet em:
<http://www.wattnet.com/library/Download/PD10meatq.pdf>.

McKEE, S.R., SAMS, A.R. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poultry Sci.*, v.76, 1616-1620p. 1997.

McKEE, S.R.; SAMS, A.R. Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale exudative turkey meat characteristics. *Poult. Sci.*, Savoy, v.77, 169-174p. 1998.

McLENNAN, D. H.; PHILLIPS, M. S. Malignant hyperthermia. *Science*, Washington, v. 256, p. 789-794, 1992.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory evaluation techniques*. Vol. II. CRC Press. Boca Raton, 387p. 1999.

MELLOR, D.B.; SRINGER, P.A.; MOUNTNEY, G.J. The influence of glicogen on tenderness of broiler meat. *Poultry Science*, v.37, n.3, p.1028-1029, 1958.

MENDES, A.A. Jejum pré-abate em frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.3, n.3, 199-209p. 2001.

MENDES, A.A.; GARCIA, E.A.; GONZALES, E. et al. Efeito da linhagem e idade de abate sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.22, n.3, p.466-472, 1993.

MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ regulation defects. *Physiological Review*, Baltimore, v. 76, n. 2, p. 537-592, 1996.

MILLAR, S.; WILSON, R.; MOSS, B.W.; LEDWARD, D.A. Oxymyoglobin formation in meat and poultry. *Meat Sci.*, v.34, 397-406p. 1994.

MILLS, L.; MITCHELL, M.A.; MAHON, M. Susceptibility to heat stress in fast and slow growing turkey lines. *Poultry Science*, 78 (Suppl 1): 56. 1999.

MITCHELL, M.A.; SANDERCOCK, D.A. Spontaneous and stress induced myopathies in modern meat birds: a cause for quality and welfare concerns. 2004. Acessado em 19 de novembro de 2005. Disponível na internet em <http://www.vetsci.usyd.edu.au/apss/Documents/++++Mitchell%20&%20Sandercoc -Spontaneous%20&%20Stress.doc>.

MOLLER, A. J., VESTERGAARD, T., WISMER-PEDERSEN, J. Miofibril fragmentation in bovine longissimus dorsi as an index of tenderness. *Journal of Food Science*, Chicago, v.38, n.5, p.824-825, 1973.

MONIN, G.; SELIER, P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the intermediate post mortem period: The case of Hampshire breed. *Meat Sci.* v.13, p.49-63. 1985.

MOREIRA, J.; MENDES, A.A.; GARCIA, E.A.; OLIVEIRA, R.P.; GARCIA, R.G.; ALMEIDA, I.C.L. Avaliação de desempenho, rendimento de carcaça e qualidade de carne de peito em frangos de linhagens de conformação versus convencionais. *R. Bras. Zootec.*, v.32, n.6, p.1663-1673, 2003.

MULDER, N.D. Rabobank: a indústria avícola global. *Aveworld*. Paulínia, São Paulo: ano 3, n.14, p.10-15, 2005.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. *J. Biochemistry*, Tokyo, v.131, p.285-292, 2002.

MURAYAMA, T.; OBA, T.; KATAYAMA, E.; OYAMADA, H.; OGUCHI, K.; KOBAYASHI, M.; OTSUKA, K.; OGAWA, Y. Further characterization of the typer 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.24, 17297-17308p. 1999.

MURAYAMA, T.; KUREBAYASHI, N.; OGAWA, Y. Role of Mg^{2+} in Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release through ryanodine receptors of frog skeletal muscle: modulations by adenine nucleotides and caffeine. ***Biophysical Journal***, v.78, 1810-1824p. 2000.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. Selectively suppressed Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release activity of α -ryanodine receptor (α -RyR) in frog skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.4, 2953–2960p. 2001.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. RyR1 exhibits lower gain of CICR activity than RyR3 in the SR: evidence for selective stabilization of RyR1 channel. *Am J Physiol.*, v.287, C36-C45. 2004.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. Properties of RyR3 ryanodine receptor isoform in mammalian brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.9, 5079-5084p. 1996.

MURGIA M, SERRANO AL, CALABRIA E, PALLAFACCHINA G, LOMO T, SCHIAFFINO S. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. [Nature cell biology](#), v.2, n.3, 142-147p. 2000.

MURRAY, A. C.; JONES, S.D.M. The effect of mixing, fasting and genotype on carcass shrinkage and pork quality. *Int. Congr. Meat Sci. Tech.* 38:205. 1992.

NATURE. <http://nature.com.br/nature/focus/ionchannel>. Capturado em 10/10/2004.

NCBI. National Center of Biological Information. Acessado entre abril de 2003 e novembro de 2005. Disponível na internet em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

NORTHCUTT, J.K. Factors affecting poultry meat quality. *Cooperative Extension Service Bulletin*, 1157p. The University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences. 1997.

NORTHCUTT, J.K.; FOEGEDING, E.A.; EDENS, F.W. Water-holding properties of thermally preconditioned chicken breast and leg meat. **Poult. Sci.**, Champaign, v.73, 308-316p. 1994.

NPPC. 1991. *Procedures to evaluate market hogs (3rd Ed.)*. National Pork Producers Council, Des Moines, IA.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo-real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed n.33, 10-13p. 2004.

ODA, S. H. I., SCHNEIDER, J., SOARES, A. L., BARBOSA, D. M. L., IDA, E. I., OLIVO, R. e SHIMOKOMAKI, M. Detecção de cor em filés de peito de frango. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v.28, n. 321, p.30-34, 2003.

OFFER, G. Modeling of the formation of pale, soft and exsudative meat: effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Sci.*, 30: 157-184. 1991.

OGAWA Y; KUREBAYASHI N; MURAYAMA T. Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Advances in Biophysics*, v. 36, 27-64p. 1999.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; FUKUSHIMA, S. Carne PSE em frangos. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v. 27, n. 252, p. 32-34, 1998.

OLIVO, R. Carne PSE em frangos. 97p. , 1999. (Tese de doutorado- USP).

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes: no caminho da pesquisa. *Cocal do Sul: IMPRINT*, 155p. 2001.

OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary Vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat function properties. *Journal of Food Biochemistry*, Trumbull, v.25, n.4, p.271-283, 2001.

OTTINI, L.; MARZIALI, G.; CONTI, A.; CHARLESWORTH, A. et al. α and β isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian Ryr1 and Ryr3 *Biochemical Journal*, London, v. 315, p. 207-216, 1996.

OWENS, C.M.; HIRSCHLER, E.M.; McKEE, S.R.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A.R. The characterization and incidence of pale, soft, exudative turkey meat in a commercial plant. *Poult. Sci.*, v.79, n.4, p.553-558, 2000.

OWENS, C.M.; MATTHEWS, N.S.; SAMS, A.R. The use of halothane gas to identify turkeys prone to developing pale, exudative meat when transported before slaughter. *Poult. Sci.*, v.79, 789-795p. 2000a.

OWENS, C.M.; SAMS, A.R. The influence of transportation on turkey meat quality. *Poult. Sci.*, v.79, 1204-1207p. 2000b.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da sua obtenção e transformação. Goiânia: Universidade de Goiás, 1993. v. 1, 586 p.

PEARSON, A. M. La función muscular y los cambios postmortem. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. Ciencia de la carne y de los productos carnicos. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 139-174.

PERCIVAL, A. L., WILLIAMS, A. J., KENYON, J. L., GRINSELL, M. M. and SUTKO, J. L. 1994. Chicken skeletal muscle ryanodine receptor isoforms: ion channel properties. *Biophysical Journal*, 67, 1834-1850.

PESSAH, I.N.; SCHIEDT, M.J. Early over-expression of low-affinity [³H]ryanodine receptor sites in heavy sarcoplasmic reticulum fraction from dystrophic chicken pectoralis major. [Biochim Biophys Acta](#).v.1023, n.1, 98-106p. 1990.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Research*, v.29, n.9, 2000-2007p. 2001.

PIRES, O. Aspectos farmacológicos do Dantrolene Sódico. *Revista Neurociências*, v.13, n.3 (supl-versão eletrônica), 80-88p. 2005.

PRICE, J. F. SCHWEIGERT, B. S. Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos. Editora Acribia, S.A. 2º edição, Zaragoza/ España, 581p., 1994.

PRIORI, S.G., NAPOLITANO, C. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.8. 2033-2038p. 2005.

QIAO, M.; FLETCHER, D.L.; NORTHCUTT, J.K.; SMITH, D.P. The relationship between raw broiler breast meat color and composition. *Poult. Sci.* v.81, p.422-427. 2002.

QIAO, M.D.; FLETCHER, D.P.; SMITH, D.P.; NORTH CUTT, J.K. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. *Poultry Sci.*, v.80, 676-680p. 2001.

RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B. **Genética na agropecuária**. 4. ed. – São Paulo : Editora Globo, 359p. 1995.

RASMUSSEN, A.J., ANDERSON, M. New method for determination of drip loss in pork muscles. *Proceedings of the 42nd International Congress on Meat Science and Technology*, Lillehammer, Norway, 286-287. 1996.

REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 215p. 2001.

REMIGNON, H.; DESROSIER, V.; MARCHE, G. Influence of increasing breast meat yield on muscle histology and meat quality in the chicken. *Reproduction, nutrition, development*, v.36: 523-530p. 1996.

REMIGNON, H.; MOLETTE, C.; BABILE, R.; FERNANDEZ, X. Currents advances in proteomic analysis and its use for the resolution of poultry meat quality problems. *World's Poultry Science Association*, v.62, 123-129p. 2006.

RODEN, D. M. and KUPERSHMIDT, S. 1999. From genes to channels: normal mechanisms. *Cardiovascular Research*. 42, 318-326.

ROSSI, D.; SORRENTINO, V. The ryanodine receptors gene family: expression and functional meaning. *Basic Appl Myol.*, v.14, n.5, 323-343p. 2004.

SABBADINI, R.A., DANIELI-BETTO, D.; BETTO, R. The role of sphingolipids in the control of skeletal muscle function: a review. *Neurological Sciences*, v.20, n.6, 423-430p. 1999.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D.; STOFFEL, D. H.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA

with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Washington, v. 239, p. 487-491, 1985.

SAINZ, R. D. Qualidade das carcaças e da carne bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS: reprodução e genética aplicada aos zebuínos, 2., 1996, Uberaba, MG. Anais... Uberaba: ABCZ, 1996.

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

SAMS, A.R. Meat quality in the processing plant. In: FORUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: animal world, 2005, p.245-249.

SAMS, A.R.; MILLS, K.A. The effect of feed withdrawal duration on the responsiveness of broiler pectoralis to rigor mortis acceleration. *Poultry Science*, v.72, n.9, p.1789-1796, 1993.

SAMS, A.R. 2002. PSE/DFD. In: Turkey Breast Enhancement through the Utilization of Poultry Collagen, Soy Protein, and Carrageenan in a Chunked and Formed Deli Roll. Acessado em 18 de junho de 2006. Disponível na internet em: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-09162005-180700/unrestricted/Chapter5.pdf>.

SANTÉ, V.; BIELICKI, G.; RENERRE, M.; LACOURT, A. Post mortem evolution in the Pectoralis superficialis muscle from two turkey breeds: Relationship between pH and colour changes. Page 465-468 in: 37th International Congress of Meat and Technology, v.1, Kulmbach, Germany. Federal Center for Meat research, Kulmbach, Germany. 1991.

SANTOS, H.C.; BRANDELLI, A.; AYUB, M.A.Z. Influence of post-mortem aging in tenderness of chicken breast fillets. *Ciência Rural*, v.34, n.3, p.905-910. 2004.

SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; PIZZINATO, A. Fatores que afetam a cor das carnes. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, v. 15, n. 169, p. 50-57, mar. 1991.

SCHREURS, F.J.G.; VAN DER HEIDE, D.; LEENSTRA, F.R.; DE WIT, W.
Endogenous proteolytic enzymes in chicken muscles. Differences among strains with different growth rates and protein efficiencies. *Poult. Sci.* v.74, p.523-537. 1995.

SCHÖNFELDT, H. C.; NAUDÉ, R. T.; BOK, W.; VAN HEERDEN, S. M.;
SOWDEN, L. E BOSHOF, Cooking and juiciness-related quality characteristics of goat and sheep meat. *Meat Science*, Oxford, v. 34, n. 3, p. 381-394, 1993.

SHAND, P. J.; BOLES, J. A.; PATIENCE, J. F.; McCURDY, A. R.; SCHAEFER, A. L.
Acid/base status of stress susceptible pigs affects cured ham quality. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 60, n. 5, p. 996-1000, 1995.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; FRANCO, F. O. Qualidade da carne de frango suplementada com dieta contendo vitamina E. *Anais do I Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas, p. 179, 1997.

SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I.; KRIESE, P.R.; SOARES, P.R.; SOARES, A.L.
Calpaínas e calpastatinas. Pág.185 em *Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes*. SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M.. São Paulo: Livraria Varela. 2006.

SHIROKOVA, N., GARCÍA, J., PIZARRO, G. and RÍOS, E. 1996. Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 107, 1-18.

SHOMER, N.H.; LOUIS, C.F.; FILL, M.; LITTERER L.A.; MICKELSON, J.R.
Reconstitution of abnormalities in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor. *Am. J. Physiol.*, 264 (Cell Physiol. 33) C125-C135. 1993.

SIGWORTH, F.J. Structural biology: Life's transistors. **Nature**, v.423, 21-22p. 2003.

SIMPSON, M.D.; GOODWIN, T.L. Comparison between shear values and test panel scores for predicting tenderness of broilers. *Poultry Science*, v.53, n.6, p.2042-2046, 1974.

SOARES, A., L.; IDA, E. I.; MIYAMOTO, S.; BLAZQUEZ, F. J. H.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, Pale, Soft, Exudative, Journal of Food Biochemistry, v. 27, n. 4, p. 309-319, 2003.

SOARES, A.L.; LARA, J.A.F.; IDA, E.I.; GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: Proceedings 48th International Congress of Meat Science and Technology. Rome: 48th ICoMST, 2002. v.48. p.540-541.

SOLOMON, M. B.; VAN LAACK, R. L. J. M.; EASTRIDGE, J. S. Biophysical basis of pale, soft, exsudative (PSE) pork and poultry muscle: a review. Journal Muscle Food, Trumbull, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.

SORRENTINO, V.; REGGIANI, C. Expression of the Ryanodine Receptor Type 3 in Skeletal Muscle. A New Partner in Excitation-Contraction Coupling? TCM, v.9, n.1/2, 54-61p. 1999.

SOSNICKI, A.A.; WILSON, B.W. Pathology of turkey skeletal muscle. Implications for the poultry industry. Food Structure. v.10, p.317-326. 1991.

SOSNICKI, A. A.; GREASER, M. L.; PIETRZAK, M.; POSPIECH, E.; SANTE, V. PSE-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys; a review. Journal Muscle Food, Trumbull, v. 9, n. 1, p. 13-23, 1998.

SOUZA, P.A.; KODAWARA, L.M.; PELICANO, E.R.L.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; LEONEL, F.R.; NORKUS, E.A.; LIMA, T.M.A. Effects of deboning time on the quality of broiler breast meat (Pectoralis major). Brazilian Journal of Poultry Science., v.7, n.2, 123-128p. 2005.

SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; CAMPOS, F.P. et al. Desempenho e características de carcaça de diferentes linhagens comerciais de frangos de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, v.23, n.5, p.783-791, 1994.

STATISTICA for Windows 5.0. Computer program manual. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 1995.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W. Genetic Basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. Proceedings of the 56th American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference. 15-18 de junho. Colúmbia, Missouri. 2003. Disponível em: <www.meatscience.org>. Acesso em: janeiro de 2004.

SUTKO, J. L.; AIREY, J. A. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: does diversity in form equal diversity in function. *Physiological Review*, Baltimore, v. 76, n. 4, p. 1027-1071, 1996.

TAKESHIMA, H.; YAMAZAWA, T.; IKEMOTO, T.; TAKEKURA, H.; NISHI, M.; NODA, T.; IINO, M. Calcium-induced calcium release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. **EMBO J.**, v.14, 2999-3006p. 1995.

TE PAES, M.F.W.; VERBURG, F.J.; GERRITSEN, C.L.M.; DE GREEF, K.H. Messenger ribonucleic acid expression of the MyoD gene family in muscle tissue at slaughter in relation to selection for porcine growth rate. *Journal of Animal Science*, v.78, 69-77. 2000.

TIXIER-BOICHARD, M. From phenotype to genotype: major genes in chickens. *World's Poultry Science Journal*, v.58, 65-45p. 2002.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy Science USA*, v.76, n.9, 4360-4354p. 1979.

USDA. United States Department of Agriculture. Acessado em 19 de novembro de 2005. Disponível na internet em www.usda.gov.

VAINZOF, M.; YAMAMOTO, L.U.; KOSSUGUE, P.M. et al. Animal models of neuromuscular disorders. *Revista Neurociências*, v.13, n.3 (supl-versão eletrônica), 19-21p. 2005.

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

WAL, P.G.;VAN DER, B.; BOLINK, A.H.; MERKUS, G.S.M. Differences in quality characteristics of normal, PSE, and DFD pork. *Meat Sci.*, Oxford, v.24, 79-84p. 1988.

WANG, L. J.; BYREM, T. M.; ZAROSLEY, J.; BOOREN, A. M.; STRASBURG, G. M. Skeletal muscle calcium channel ryanodine binding activity in genetically unimproved and commercial turkey populations. *Poult. Sci.*, v. 78, n. 6, p. 792-797, 1999.

WARREN, C.M.; KRZESINSKI, P.R.; GREASER, M.L. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis*, volume 24, issue 11, 2003. 1695-1702p.

WERNER, C.; OPALKA, J.R.; GELLERICH, F.N. The influence of mitochondrial function on meat quality in turkey and swine. *Arch. Tierz.Dummenstorf*, 48, Special Issue, 106-114p. 2005.

WHEELER, B. R.; MCKEE, S. R.; MATTHEWS, N. S.; MILLER, R. K.; SAMS, A. R. A halothane test to detect turkeys prone to developing pale, soft and exsudative meat. *Poultry Science*, Champaign, v. 78, n. 11, p. 1634-1638, 1999.

WICKI, [M.](#); [Reddish, J.M.](#); [Pierre, N. R. St.](#); [Lilburn, M. S.](#) Biochemical Analyses of Muscles from Poultry Bred for Rapid Growth. *Poult. Sci.*, 82: 1980-1984. 2003.

WILKINS, L.J.; BROWN, S.N.; PHILLIPS, A.J.; WARRIS, P.D. Variation in the colour of broiler breast fillets in the UK. **Br. Poult. Sci.**, Basingstoke, v.41, 308-312p., 2000.

WILLINS, I.J.; BROWN, S.N.; PHILLIPS, A.J.; WARRIS, P.D. Variation in the colour and characterization of pale, soft, and exudative chicken meat in a commercial plant. *Poultry Sci.*, v.77 (Suppl. 1): 62. (Abstr.).

WIMMERS, K.; MURANI, E.; SCHELLANDER, K.; PONSUKSILI, S. Combining QTL- and expression analysis: identification of functional position candidate genes for meat quality and carcass traits. *Arch. Tierz.Dummenstorf*, 48, Special Issue, 23-31p. 2005.

WINGERTZAHN, M.A.; OCHS, R.S Control of calcium in skeletal muscle excitation-contraction coupling: implications for malignant hyperthermia. *Molecular genetics and metabolism*, v.65, 113-120p. 1998.

WISMER-PERDENSEN, J. Chemistry of animal tissues: Water. In: *The science of meat and meat products*. PRICE, J.F.; SCHWEIGERT. Food & Nutrition Press, Inc. Westport, CN. 1986.

WOEFEL, R.L.; OWENS, C.M.; HIRSCHLER, E.M.; SAMS, A.R. The incidence and characterization of pale, soft and exsudative chicken meat in a commercial plant. *Poult. Sci.*, 77 (Suppl. 1): 62. (Abstr.). 1998.

WOELFEL, R.L.; OWENS, C.M.; HIRSCHLER, E.M.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A.R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. *Poult. Sci.*, v.73, n.2, p.579-584, 2002.

WOOD, D. F.; RICHARDS, J.F. Isometric tension studies on chicken Pectoralis major muscle. *J. Food Sci.*, v.39, 525–529p.1974.

YAMAMOTO, T.; EL-HAYEK, R.; IKEMOTO, N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca²⁺ channel regulation. **J Biol Chem.**, v.275, 11618-11625p. 2000.

YANG, N., JIANG, R.-S. Recent advances in breeding for quality chickens. *World's Poultry Science Association*, v.61, n.3, 373-381p. 2005.

YANG, T.Y.; TA, T.A.; PESSAH, I.N.; ALLEN, P. Functional defects in six ryanodine receptor isoform-1 (RyR1) mutations associated with malignant hyperthermia and their impact on skeletal excitation-contraction coupling. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.28, p.25722-25730. 2003.

YOON, H.-J.; STRASBURG, G.M. Identification of genetic components of $\hat{\alpha}$ -RyR associated with PSE characteristics in turkeys. In: *International Congress of Meat Science and Technology*, 51, 2005. Anais... Baltimore. Anais... Baltimore, 2005, 119p.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000. 336p.

ZHANG, H.; BYREM, T. M.; OWENS, C. M.; SAMS, A. R.; STRASBURG, G. M. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel differences in turkey skeletal muscle from genetically unimproved and commercial populations. In: Annual Meeting of IFT, Proceedings, 2000.

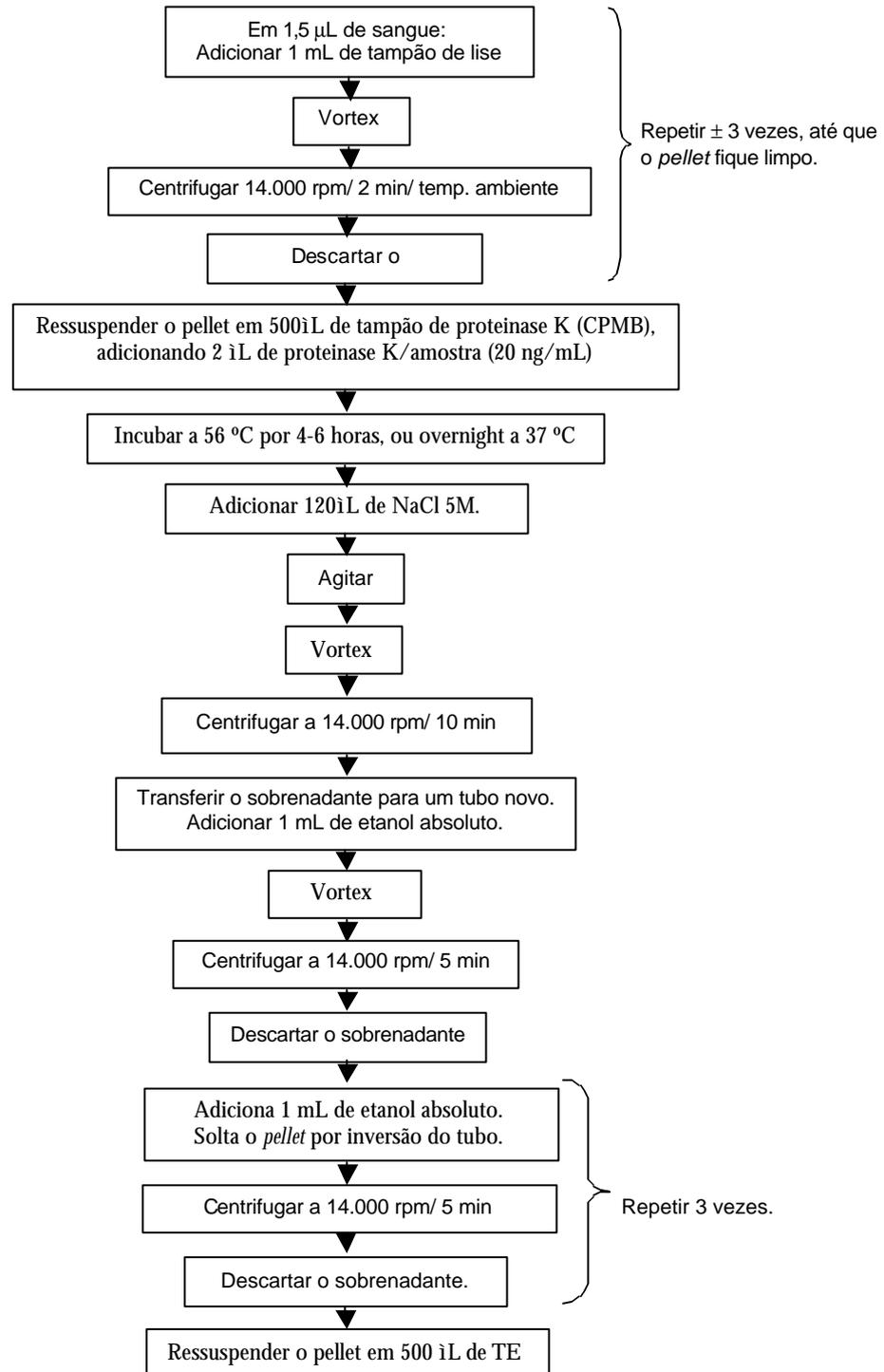
ANEXO I

- **Primers selecionados para os exons hipotéticos que compreendem os dois domínios estudados, *pFam* 01365 (de1-6) e *pFam* 00520 (de7-10).**

Nº	Posição no contig	Seqüência dos primers		Tam pb
		Direto	Reverso	
1	8211-8407	5'TAGTGCTGCCTCTGTGAAG3'	5'TCATCCAGGATCTAAAGTGG3'	197
2	10133-10285	5'AGTATTTCTTAAAGATGTTGCC3'	5'GATTTATCTCCTCCAAGCAC3'	153
3	13082-13294	5'CTTGTTAAGGATGTGGGAAG3'	5'CAACACTGCTGTTTTCCAG3'	213
4	14228-14391	5'CGATTACTGCAAACCTGAATG3'	5'TCAAGATCTGGTTCTTCCAG3'	164
5	16132-16307	5'TCTGCATGGATGAGTAAATG3'	5'CTTAGGAATGACAGGTAACG3'	154
6	16547-16750	5'CAGAAGAAAGCATGTATAGTGC3'	5'AGATCCGTATGGCTTCTTG3'	177
7	25278-25430	5'CTTAATGCATTTCAAATCTGG3'	5'GAAGACATGCATTCACATTTAG3'	153
8	26269-26498	5'TTGCACAAGTGTATTAGAGATA3'	5'GACAGAGGACAAAATGGTTC3'	212
9	27495-27667	5'GAAATTGAAACCTACATTCTTG3'	5'CTGGTTCATCTTCATCTTCAC3'	166
10	29509-29668	5'CACATGTACGTGGGTGTAAG3'	5'GAATAATGGCCAGTAGGATG3'	142

ANEXO II

▪ Extração de purificação de DNA (Extração com sal).



▪ **Preparo de reagentes e soluções**

1- Tampão de Lise	Para 100mL
Sucrose	10,95g
Tris-HCl pH 7,5 (1M)	1 mL
MgCl ₂ (1M)	0,5mL
Triton X	1 mL
H ₂ O milli Q q.s.p.	100mL
2- Tampão para Digestão com proteinase K (CPMB)	p/ 50 mL
NaCl (5M)	1 mL
Tris-HCl pH 8,0 (1M)	0,5 mL
EDTA pH 8,0 (0,5M)	2,5 mL
SDS (20%)	1,25 mL
H ₂ O milli Q q.s.p	50mL
3- NaCl 5M	400 mL
NaCl	116,9 g
H ₂ O milli Q q.s.p	400mL
4- TE	100 mL
Tris-HCl pH 8,0 (1M)	1,0 mL
EDTA pH 8,0 (0,5M)	200μl
5- EDTA	250mL
EDTA	46,53g
H ₂ O milli Q q.s.p	250mL
6- Tris-HCl	100mL
Tris	30,285
H ₂ O milli Q q.s.p	100mL
7- SDS 20%	200mL
SDS	40g
H ₂ O milli Q q.s.p	200mL
8- MgCl₂	100mL
MgCl ₂ . 6H ₂ O	20,3g
H ₂ O milli Q q.s.p	100mL

ANEXO III

- **Localização do par de *primers* para a região *3ryr3* amplificada por PCR na proteína receptora de rianodina â.**

LOCUS NM_206874 15089 bp mRNA linear VRT 08-JUL-2005

DEFINITION Gallus gallus ryanodine receptor 3 (RYR3), mRNA.

VERSION NM_206874.1 GI:46048743

ORIGIN

```

1 aagaggagct gtactgagcg cagagagctg ccggtggagg cgatcagagt cctagcagag
61 ctgactcctc aagagccatg gctgaagggg gtgaaggagg ggaagatgaa atacagttcc
121 tacgaactga tgacgaagta gtacttcagt gtgtttccag tatacacaaa gaacaaagga
181 agttttgctt ggcagctgag ggacttggaa atcgcctgtg ctttttggaa ccaacatcag
241 aagctaaata tgttcctcca gacctttgca tctgtaattt tgtccttgaa cagtctc.....

3181 .....tccgtga agctgttagg acatttgcag gctatgggta taatgttgag ccacctgacc
3241 aagaaatagc tgaccaaaca gtggaaaaag tcagcattga caagatacgt ttttacagag
3301 tagaacagtc ttatgcagtg aagtccggaa agtggactt tgaatttgaa gctgtaacag
3361 gtggagatat gcggtttggc tgggcccaggc caggctatcg acctgacatt gaactgggag
3421 ctgatgacca agcatttgtt tttgaaggaa gcaaaggcca gcgttggcat caaggcagtg
3481 ggttccttgg acgaagtgg caaccaggag atgtgggttg ttgcatgata aacttgg.....

14941 .....catttaa cctaagtgtt ggtaagagcg aaagggctaa aagatgtcct aaccgtacaa
15001 cgtttgacat ttaagaactt gaacatcaga ggccatgcct cagaaaaagt actttaagtg
15061 ctgtcccatt tttgccccac aatatttgc

```

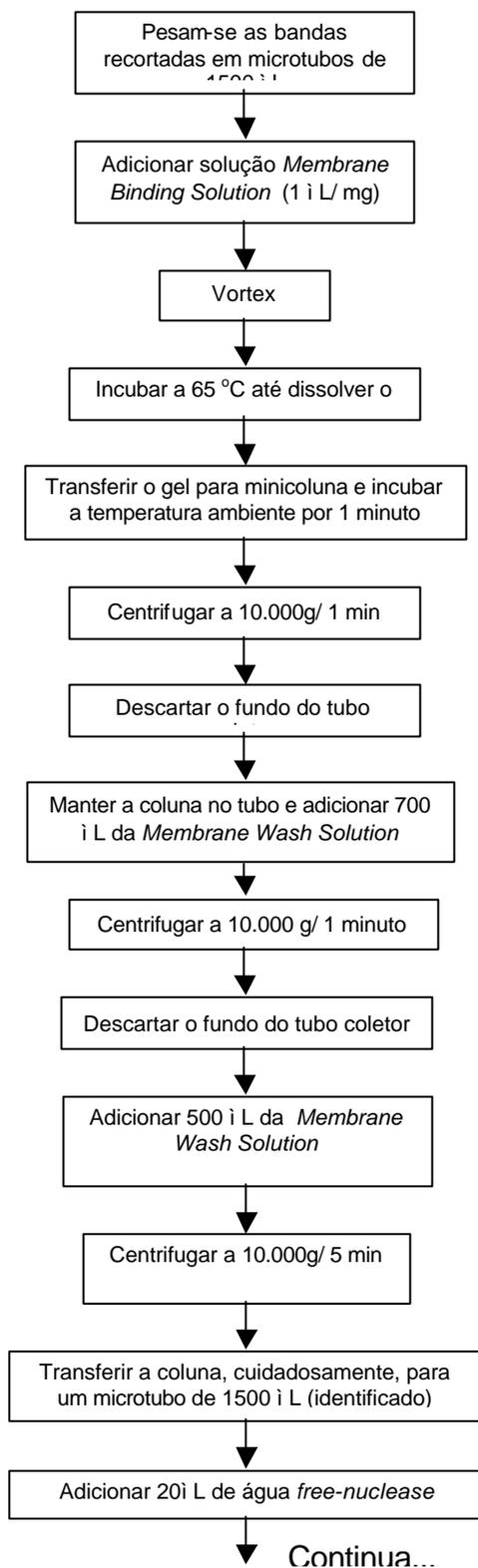
 *Primer forward*

 *Primer reverse*

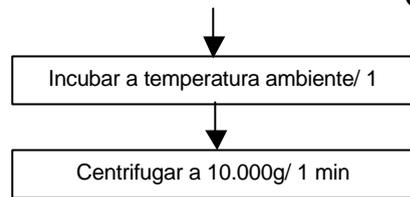
 Região do gene amplificada

ANEXO IV

- **Purificação de bandas com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, WI).**



Continuação...



ANEXO V

- **Localização dos pares de primers para o domínio *pFam 00520* na proteína receptora de rianodina â amplificadas por PCR.**

LOCUS AADN01003326 75060 bp DNA linear VRT 29-FEB-2004
 DEFINITION Gallus gallus chromosome 5 Cont1.1190, whole genome shotgun sequence.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 75060)

```

1 agttttttcc ctacgaaaag agggccactg agatcaaagt tacctgattg gcgcaaactt
61 ctgtcaaac aacgcaaac agctgtgtt gcttgttta gaatggcacc gttatacaac
121 ctaccagggt aagcggctga aagatTTTT tttccataac ttttgttac atttcttggg
181 ggaaatacta ctcgtgtgta taactacaag tttgctagtt gtttagttta tgtgata.....

25021 .....cttttaa cacacacca tcttaatttt tgtaagtctg gagcaggcca gcataccttc
25081 tagtgaatc attccacca tttcggatgt tagaaactgt gtgggtgcta cgacttaaac
25141 aattcactct gaaaatgaa gcatctaaa agcccagata ataacagca aatacacatc
25201 accaccttca acaacatgca tacgaagtgc ataacagttg gcttgttact tggaggattt
25261 agtacttcat tttgacactt aatgcatttc aaatctggta tttcctaggt taagttccat
25321 tgatacaaac taccacattt ggaagctcgg tgttgtttc actgataatg taagtatgta
25381 aacctagcgg aatattcttt gatttactct aaatgtgaat gcatgtcttc cactacttgc
25441 ttttatatta aacaaatata tgctacgcaa gtactattga attacagagc cattttttaa
25501 atagtTTTT tgttttgact tgaagcaaat ggctttgtgt tagaatttc tttttgattc
25561 caaaggaaa taaatactta tttaccatta acatgatgct agcatttggg aagttaa.....

26161 .....atgctga aaactgtatt taaatatgta atctatagag gtctcattag cataactgag
26221 caataaacac actttaaag tacagtggag ttgataagaa acagtatttt tgcacaagtg
26281 tattagagat actacattga aatcagatca ttgacttat tacttcattt caaatttcac
26341 tctctctgca gtcatttttg tatttagctt ggtacacaac tatgtctatc cttgggcact
26401 ataacaactt cttttttgct gctcatctgc tggacattgc tatgggtttc aagacattgc
26461 gaaccatttt gtctctgtc actcacaatg gcaaacaggt tagtattaca tatagagctc
26521 tgaattaat gcattttgta acaatattag aaaaagtctt ggggtactta ggaaatatta
26581 caatacaatc gattttgacc atgaatgat taaagaacag actcctccaa gtctctgca
26641 gcacatttag tacaagctaa ttctataaa atataacaa tctatactca aagagtg.....

27361 .....tccaagc aatggggata tttcaaagct gtcattactg ctctatttag ttcccttctt
27421 gggaaacaca ccctatgata tcttttccat acttaagaca ataaattgag ctagtccatc
27481 agttataaca gaatgaaatt gaaacctaca ttcttgctat gtctccatat acagcttgtg
27541 ctgactgtag gactcctggc tgtagtagtg tatctttaca ctgttggtgc gttcaacttc
27601 ttccgcaaat tctacaataa aagtgaagat gaagatgaac cagatatgaa atgtgatgac
27661 atgatgacgg taagtaaaac aacaccagca cgcttcaaat ctattctga attcttata
27721 agatacttaa gatgaaatcc caaaacatca ggaattggaa aaggatctca aaagatc.....

29281 .....gatttag ggaatgatga gaggataata cacttgattc tgactcccac ctctttgcaa
29341 gtttactcaa agatgaaacc gcactagtta agatgcttaa cagatttttg gtttactgta
29401 tgatacatga ggaacgatat tacatcttct atttttctaa cttttgaaa agaattagta
29461 gggcaaaaata atccacaata aataaaatc cccacttttt ttttttagt gttacctatt
29521 ccacatgtac gtgggtgtaa gagctggtgg tggcattggg gatgaaatg aggatcctgc
29581 tggagaccct tatgaaatgt atcgaattgt cttcgacatc acatttttct tctttgtcat
29641 tgtatccta ctggccatta ttcaaggtac tttcattat gttagtagaa actgtca.....

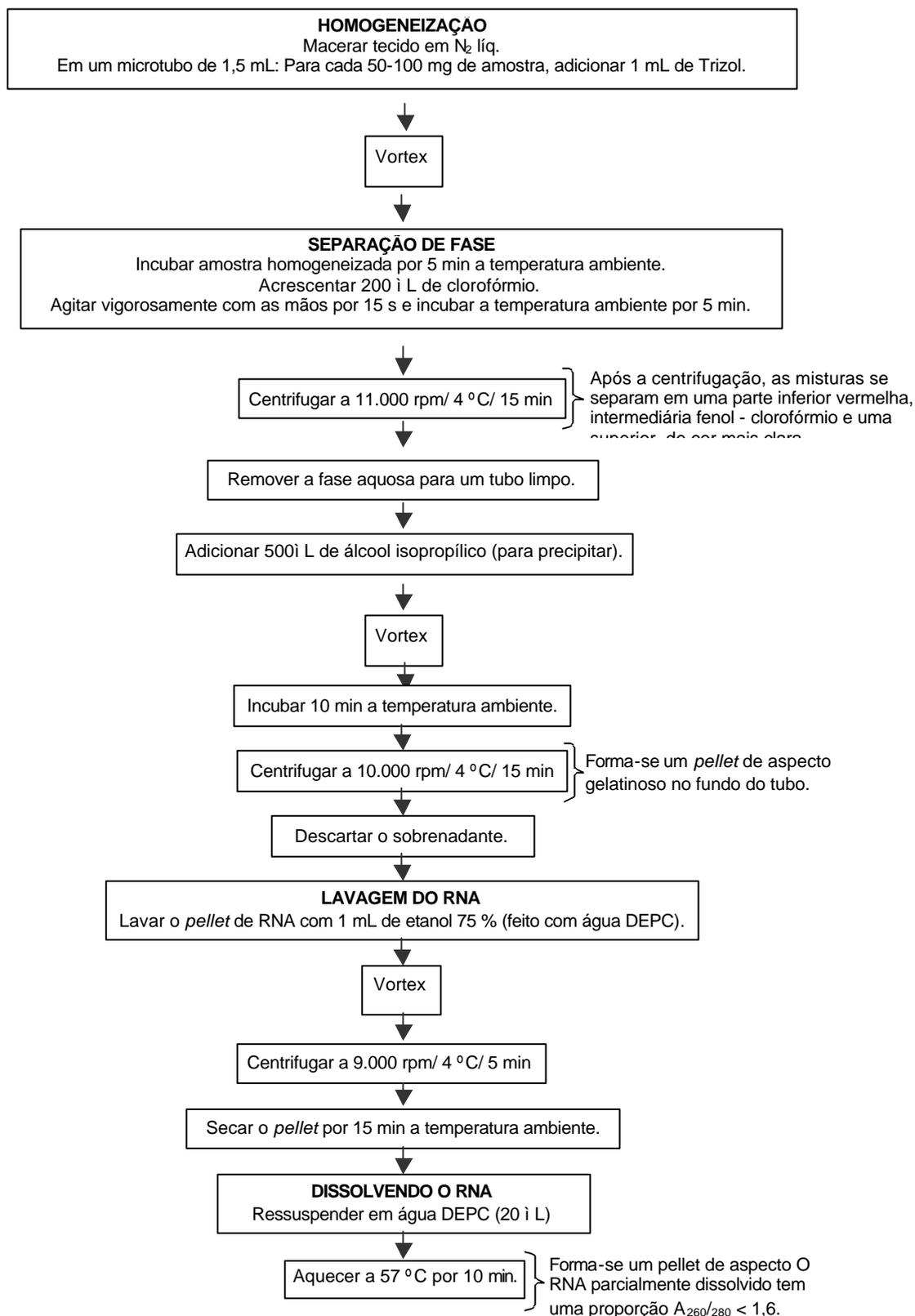
74881 .....ttaaac ctatcacctt tgatgctata aaattacaaa gtccttgag gttgcatga
74941 aatttcagca agctttcaca cacatttaa actgagaaca ttttttttaa atattacttc
75001 tttgctcaat tctatgcaac acctataag caatactctc aaaacaaata ttattcattt

```

- Primer forward
- Primer reverse
- Região de exons
- Região de introns

ANEXO VI

▪ Extração de RNA total com Trizol (US Patent n° 5.346.994).



ANEXO VII

- **Localização dos pares de *primers* nos genes das proteínas receptoras de rianodina, á e â, e também da â-actina, nas análises de PCR em tempo real.**

á-ryr

Gallus gallus similar to Ryanodine receptor 1 (Skeletal muscle-type ryanodine receptor) (RyR1) (RYR-1) (Skeletal muscle calcium release channel) (LOC429820), partial mRNA
GI: 50778092 ref: XM_427376.1

```
gccatggacagccagaagcagtagcagccgtccgaggtgcagttcctcctgtcctgctcggaggcggacg
agaacgagatgatcgacgtggagggcgttcgcccggcgctccaggagccggcgcgacatcggcttcaa
cgtggcgggtgctgctgaccaacctggccgagcacgtccccacgaccagcggctgcgcaccttctggag
caggctgccagcatcctcgagtacttccgccccttctggccgcattgagatcatgggggaggcgcgac
gcatcgagcggctctacttggagatcagcgccgccaacaaggcgagtgaggagatgccgcaggtgaagga
gtcgaagcggcagttcatcttcgacgtggtcaacgagggggggaggcggagaagatggagct
```

â-ryr

LOCUS NM_206874 15089 bp mRNA linear VRT 08-JUL-2005
DEFINITION Gallus gallus ryanodine receptor 3 (RYR3), mRNA.

ORIGIN

```
1 aagaggagct gtactgagcg cagagagctg ccggtggagg cgatcagagt ctagcagag
61 ctgactcctc aagagccatg gctgaagggg gtgaaggagg ggaagatgaa atacagttcc
121 tacgaactga tgacgaagta gtacttcagt gtgtttccag tatacacaaa gaacaaagga
181 agttttgctt ggcagctgag ggacttggaa atcgctgtg ctttttggaa ccaacatcag
241 aagctaaata tgttctcca gacctttgca tctgtaattt tgtccttgaa cagtctc.....

14401 .....gagacca gcaagaacaa gtgagagaag atatggagac caagtgcttt atttgtggaa
14461 ttggcaacga ctattttgac acaatccctc atggctttga aacacatact ctgcaggaac
14521 acaacttggc aaactaccta ttcttcttaa tgtacctcat aaacaaggac gagactgagc
14581 ata tggcca ggagtcattt gtgtggaaga tgtaccaaga aagatgctgg gatttcttcc
14641 agcaggaga ctgcttccgg aaacagtatg aggatcaact cggctaatat aacaaaagat
14701 atatatccag tatataaact tctttccttc tcatgatgta aattctgggc ctgtatttgc
14761 tttaaatgtc ttcaaacttg aagacatacg taaaatttgg aacaactgca taggcttttt
14821 gtacgtacca cgtacaaaac tggcttctcy tcggaattgt aattgaaaag aaaaactctg
14881 caatatcaat caagccttcc actttcaaca cgttctgata ttataacaac tttttaagta
14941 caccatttaa cctaattggt ggtaagagcg aaagggttaa aagatgtctt aaccgtacaa
15001 cgtttgacat ttaagaactt gaacatcaga ggccatgctc cagaaaaagt actttaagtg
15061 ctgtccatt tttgccccac aatatttgc
```

â-actina

LOCUS NM_205518 1736 bp mRNA linear VRT 03-AUG-2005

DEFINITION Gallus gallus beta-actin (LOC396526), mRNA.

ORIGIN

```

1 ggaacaacnn ggccgcctcg cgccgcccgcc cccggctctg actgaccgcg ttactcccac
61 agccagccat ggatgatgat attgctgcgc tcggtgttga caatggctcc ggtatgtgca
121 aggccggttt cgccggggac gatgcccccc gtgctgtggt cccatctatc gtggg.....

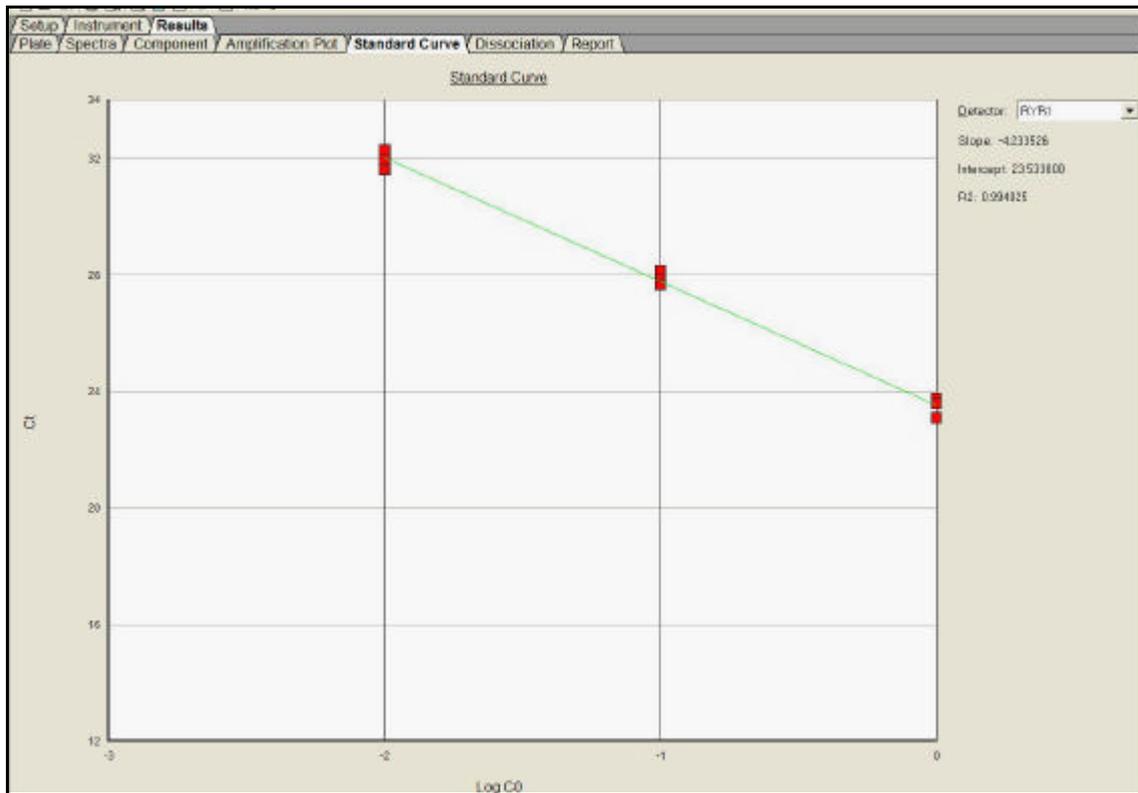
1141 .....agcagga gtacgatgaa tccggaccct ccattgtcca ccgcaaatgc ttctaaaccg
1201 gactgttacc aacacccaca cccctgtgat gaaacaaaac ccataaatgc gcataaaaca
1261 agacgagatt ggcatggctt tatttgtttt ttcttttggc gcttgactca ggattaaaaa
1321 actggaatgg tgaagggtgc agcagcagtc ttaaaatgaa acatgttggg gcgaacgccc
1381 ccaaagtctt acaatgcatc tgaggacttt gattgtacat ttgtttcttt tttaatagtc
1441 attccaaata ttgttataat gcattgttac aggaagttac tcgcctctgt gaaggcaaca
1501 gccagctgg gaggagccgg taccaattac tgggtttaga tgataattgc ttgtctgtaa
1561 attatgtaac ccaacaagtg tctttttgta tcttccgct taaaaacaaa acacacttga
1621 tcctttttgg tttgtcaagc aagcgggctg tgttcccag tgatagatgt gaatgaaggc
1681 tttacagtcc cccacagtct aggagtaaag tgccagtatg tgggggaggg aggggg

```

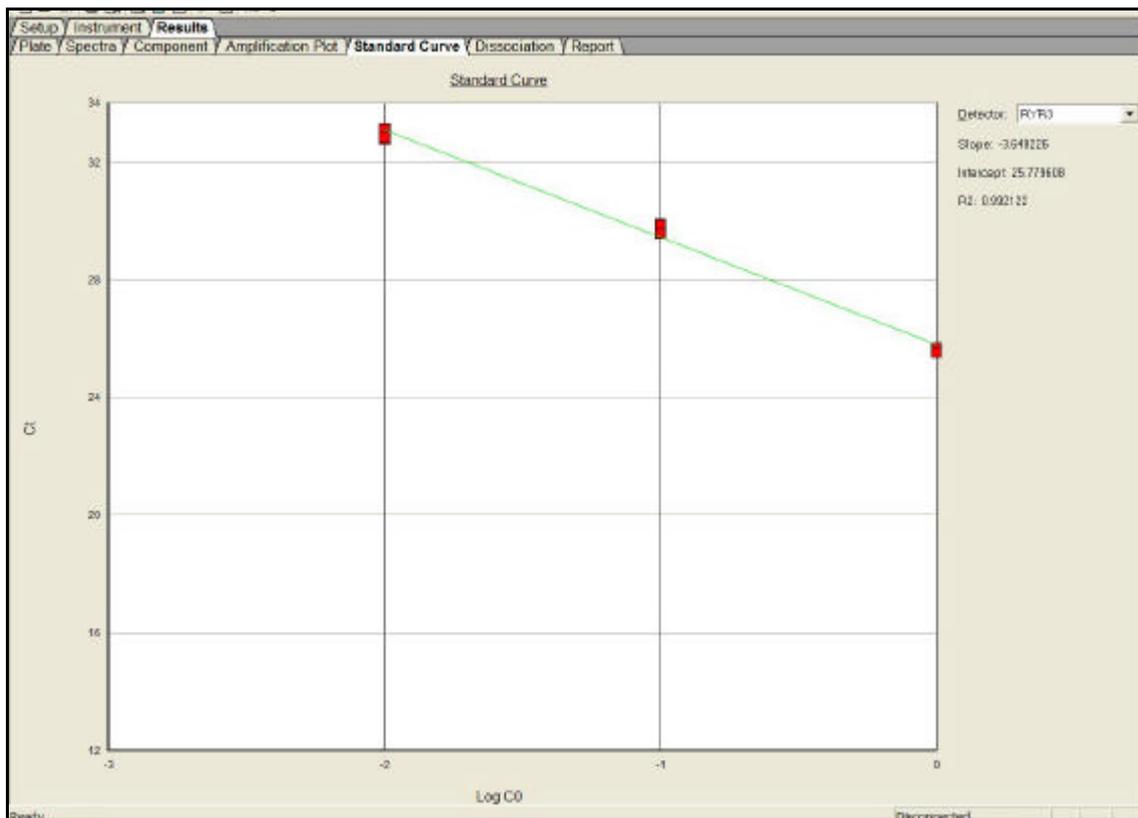
- *Primer forward*
- *Primer reverse*
- Região do gene amplificada

ANEXO VIII

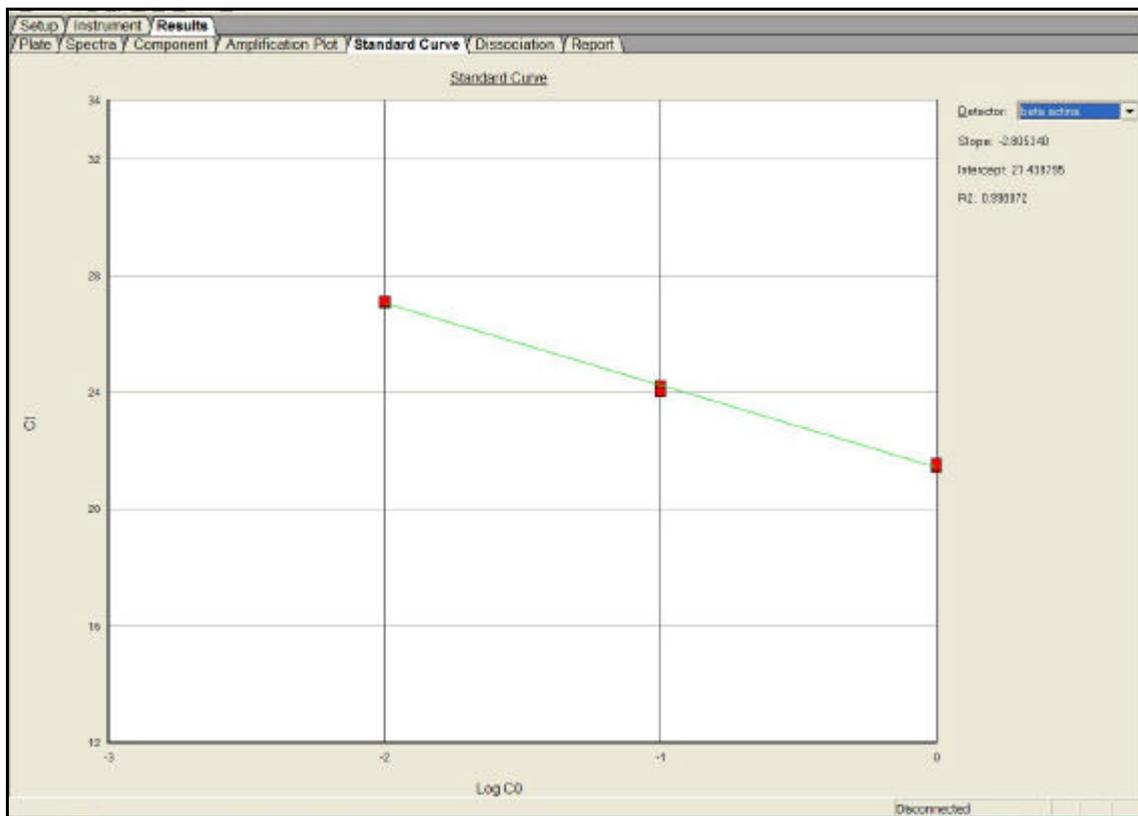
- Curvas de eficiência dos genes *á-ryr*, *â-ryr* e *â-actina*.



Curva de eficiência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *á-ryr* (slope = -4,233526; $r^2 = 0,994025$).



Curva de eficiência dos *primers* utilizados na amplificação do gene $\hat{\alpha}$ -*ryr* (slope = -3,648226; $r^2 = 0,992122$)



Curva de eficiência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *̂-actina* (slope = -2,805340; $r^2 = 0,998072$)

ANEXO IX

- **Ficha utilizada na análise sensorial**

ANÁLISE SENSORIAL DE FILÉ DE PEITO DE FRANGO

Nome: _____ Data: ___/___/___

Instruções

1) Cor

Você está recebendo duas amostras de filé de peito de frango. Avalie as amostras codificadas da esquerda para a direita e circule abaixo, o código da amostra com maior intensidade de cor.

759 584

Comentários: _____

2) Textura

Prove as amostras codificadas assinalando um X indicando a sua preferência em cada um dos parâmetros abaixo. Em cada item, se possível, descreva o que você gostou ou não gostou na amostra com relação à textura.

	943	872
Mastigabilidade		
Maciez		
Suculência		

Comentários: _____

Muito obrigada pela sua participação!

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)