



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IRIS LAMBERTI ZIOBER

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS:
ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA α RyR**

Londrina
2009



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IRIS LAMBERTI ZIOBER

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS:
ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA α RyR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Massami Shimokomaki, PhD

Co-Orientador: Dr. Alexandre Lima
Nepomuceno

Londrina
2009

IRIS LAMBERTI ZIOBER

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) DE FRANGOS: ANÁLISE
DOS TRANSCRITOS DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA α RyR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho
USP – São Paulo – SP

Prof. Dr. Alexandre Oba
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de agosto de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela beleza do que são, pela harmonia em casa e pelas irmãs maravilhosas que me deram.

AGRADECIMENTOS

Nunca encontraria palavras suficientes para agradecer a todos...

A Deus, pelo mistério das coisas, que me desperta todos os dias milhões de questionamentos que são a oportunidade de aprender sempre. Por me deixar perceber que é através do amor que a vida se move.

A minha família, meu porto seguro, meu “mundo encantado”, meus amores, minha paz. Pai, Mãe, Talise e Dainah: Obrigada!

Ao Prof. Massami Shimokomaki, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por me estimular sempre na busca do conhecimento e por ser essa pessoa dinâmica, humilde, determinada e me mostrar o que é excelência científica.

A Dr^a Fernanda G. Paião, pela imensa ajuda na conclusão deste trabalho e publicações.

Aos Professores Alexandre Oba, Elza I. Ida, Adriana L. Soares por compartilharem seus conhecimentos e pela ajuda sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Luiz L. Coutinho, e toda sua equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP, por terem me recebido tão bem e me auxiliado na realização de uma etapa deste trabalho.

A EMBRAPA – Soja pela estrutura disponibilizada para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Dr. Alexandre L. Nepomuceno pelas sugestões, colaboração e parceria na realização deste trabalho.

Ao Dr. Eliseu Binneck pelas sugestões, colaboração, parceria e ajuda sempre que precisei.

A Dr^a. Sandra Helena Oda, pelas sugestões e pela pronta disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA-Soja. Silvana pela competência e ajuda inestimável. Verinha, César, Vieira, Márcia, pela ajuda nos momentos de apuro. A todos do laboratório, pelo companheirismo e ajuda sempre que necessitei. Em especial aos ex-estagiários Adelina, Gustavo, André, pelas risadas impagáveis e companhia. E principalmente ao Antonio Augusto, o Guto, pela ajuda com as células eletrocompetentes, onde pude perceber que dali nascia mais que uma amizade. Obrigada pela paciência, carinho e parceria!

Aos companheiros do Grupo de Carnes: Denis, pelos incontáveis planejamentos de experimentos, Allan, Cassiana, Luiz Gustavo, Cristina, Marta, Adriana D., por toda ajuda dispensada no desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Big Frango, pela parceria na realização do trabalho e amostras cedidas.

Aos estagiários do Grupo de Carnes: Gleice, Bruno, Alberto, Thaísa, Elisa, Lucas, Felipe, Janaina e Pedro e também ao Apoio Técnico Valdecir, pela imensa ajuda durante os experimentos realizados.

Aos alunos do curso de Zootecnia: Rimena, Gustavo, Vitor e Maurício, pelo auxílio e pela pronta disponibilidade em ajudar nos experimentos.

Aos Profs. Drs.: Marco Antônio Trindade e José Bento Ferraz e a Tércio Michelan Filho, que nos receberam na Universidade de São Paulo – campus de Pirassununga (FZEA) para a realização de uma etapa deste trabalho.

À Profa. Dra. Alice Murakami da Universidade Estadual de Maringá e ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernández Blazquez da Universidade de São Paulo pela colaboração na obtenção de reagentes.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pela concessão da bolsa e auxílio financeiro deste trabalho.

À Fundação Araucária pelo auxílio financeiro destinado a esta pesquisa.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, professores e funcionários, por oferecerem condições para a realização de pesquisas e formação de alunos.

Ao Prof. Dr. Julio César de Freitas, que primeiramente me recebeu em seu laboratório e me descortinou as oportunidades. Muito obrigada!

A Patrícia F. N. da Silva, que abriu sua casa e me acolheu. Obrigada pelas risadas, pelas conversas, pelo aprendizado, pela amizade.

A Larissa Giroto, que também me acolheu em sua casa. Obrigada pela amizade e pronta disponibilidade em ajudar.

Aos tios queridos, Carlos e Lou, pela acolhida sempre que precisei.

Aos amigos de outrora: Cássia, Muriel, Madjana, Monique, André Luiz, Rodrigo “fala-rápido”, por não permitirem que essa amizade acabasse mesmo com a distância e as atribuições desse “mundo moderno”. Adoro vocês!

Pela sincronicidade que existe, agradeço a tudo e a todos que passaram por minha vida, pois graças a essa imensidão, estou aqui, hoje.

"Com efeito, mesmo que a realidade não fosse inesgotável, bastaria a necessidade que tem cada geração e mesmo cada um de nós de resolver, por si só, cada problema, em nossa própria linguagem, para tornar o conhecimento aquilo que ele é por natureza a tentativa, incessantemente renovada, de explicar o homem e o mundo. Talvez seja mais exato dizer, aliás, que o importante é tornar a linguagem comum em carne, e sangue, e ossos, para cada pessoa em particular; e esta é a tarefa que cada pensamento particular, cada geração, cada pessoa, têm de realizar, ao serem chamados a repensar o mundo."

Iniciação a estética -Ariano Suassuna

ZIOBER, I. L. **Carnes PSE (pale, soft, exudative) de Frangos: análise dos** transcritos do gene codificador da proteína α RyR. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Carnes PSE (pálida, flácida e exsudativa) ocorrem por fatores múltiplos, e o estresse e causas genéticas tem papéis cruciais. Em suínos, uma mutação no gene RYR1 (receptor de rianodina tipo 1) leva à PSS (Síndrome do Estresse Suíno) e às carnes PSE. A RyR1 é uma proteína formadora do canal de liberação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático de células musculares. Em suínos com a mutação neste gene o estresse desencadeia um acúmulo intracelular de Ca^{2+} , e conseqüentemente à uma contração muscular permanente, fazendo com que a célula dispenda mais glicogênio tentando relaxar o músculo, produzindo assim mais ácido láctico, provocando uma rápida queda do pH enquanto a carcaça ainda está quente, o que leva às carnes PSE. Em frangos, a região N-terminal do α RYR – a região *hotspot* para mutações que levam à carnes PSE em suínos – ainda não foi sequenciada. O objetivo deste trabalho foi selecionar animais pelo teste do halotano, além de submeter aves ao estresse térmico (ET) e exposição ao halotano pré abate para avaliar alterações nos transcritos do α RYR e correlacioná-los com a ocorrência de carnes PSE. Para isso foram realizados quatro experimentos (A, B, C e D) e após o abate, foi coletado um fragmento do músculo *Pectoralis major* de onde se extraiu RNA total, o qual foi utilizado para obtenção de cDNA; amplificou-se a região a ser estudada, e estes fragmentos foram clonados e sequenciados. Para classificação de carnes PSE utilizou-se o valor de L^* em 24h. Em 75 amostras analisadas, foram identificadas 62 variações ao longo das sequências obtidas. A sequência mais conservada apresentou 97% de similaridade com α RYR de perus. No experimento A, das 10 amostras que apresentaram proteínas alteradas, sete originaram carnes PSE, e apenas quatro eram de amostras HAL+. Mas amostras HAL- que também tinham alterações nos transcritos também originaram carnes PSE. No experimento B 88,2% das amostras, desenvolveram carnes normais (provavelmente devido ao tempo de jejum pré-abate superior a 24h) e nenhuma das alterações dos transcritos encontradas ocorreram em amostras que produziram carnes PSE. O halotano não foi um bom identificador de amostras com alterações. No Experimento C, quando as aves foram submetidas ao halotano no pré abate e também ao ET, proteínas truncadas (TR) foram prevalentes nas aves expostas ao halotano, mas apenas as que também foram expostas ao ET, originaram carnes PSE. No Experimento D, não houve jejum pré abate nem *chiller* e 94,5% das amostras foram PSE, enquanto que o teste do halotano, em conjunto com o ET detectou amostras que teriam proteínas TR. Conclui-se então que o teste do halotano não foi eficaz para triar amostras que teriam alterações no mRNA nesta região do α RYR. O ET em conjunto com a exposição ao halotano parecem denunciar o aparecimento de códons sem sentido do α RYR (proteínas TR) e de carnes PSE. Não houve uma mutação em comum entre os grupos testados que pudesse ser correlacionada com carnes PSE e a resposta ao halotano. O ET pode ter modulado a expressão gênica, o que explicaria o grande número de transcritos alterados encontrados, principalmente quando esta variável foi aplicada. Esses resultados indicam diferenças nos mecanismos de formação de carnes PSE e resposta ao halotano entre aves e mamíferos.

Palavras-chave: RyR. Mutação. Teste do halotano.

ZIOBER, I. L. **Chicken PSE (pale, soft, exudative) meat: molecular analysis of the gene that codifies the α RyR protein.** 2009. 118 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, 2009.

ABSTRACT

Broiler PSE meat is the consequence of multiple factors being the physiological stress the cause most evaluated and recently genetic origin has gained its scientific attention. In pigs, a mutation in the RYR1 gene, receptor for rianodine type 1, leads to the PSS (Pork Stress Syndrome,) and subsequently to PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. RyR1 is a protein forming the Ca^{2+} release channel within muscle cells sarcoplasmic reticulum. In pigs with this mutation, the physiological stress triggers an accumulation of intracellular calcium, and consequently to a continuous muscle contraction, thus accelerating the glycolysis producing more lactic acid subsequently leading to the PSE meat formation. The objective of this work was to sequence broiler chicken N-terminal region of α RYR since it is the region most prone to mutations that conducted to the PSS and subsequently to PSE meat. In order to select the genetically sensitive animals, four experiments were conducted in birds that had prior selection by the halothane test (HAL+ and HAL-) and treatments of thermal stress (TS) and halothane exposure before slaughtering. A fragment of *Pectoralis major m.* was collected from samples previously classified as PSE and non PSE meat by measuring their characteristic colors. The extraction of total RNA was performed, which was used to obtain cDNA and the specific region was amplified and thus these fragments were cloned and sequenced. Among 75 samples analyzed, 62 samples were found to have variations within the sequence of 468 obtained base pairs, which presented 97% of similarity with turkey α RyR. The following results were obtained from these four experiments: In Experiment A, from the 10 samples that showed alterations in the protein, seven originated PSE meat and just four of them were HAL+. However samples HAL- that had alterations within the transcripts also originated PSE meat. In Experiment B, the halothane test was not a good genetic identifier of samples with transcript alterations. Non-PSE meat was produced by 88,2% of the animals, presumably because of a long fasting pre slaughtering treatment that the birds were submitted and none of the the found altered transcripts were correlated to PSE meat development. In Experiment C, the truncated proteins were prevalent in birds exposed to halothane test, but only those that were associated to TS were capable to originated PSE meat. Finally, in Experiment D, in birds submitted to non pre slaughter fasting and the meat did not go through the chiller, 94.5% of breast samples presented PSE meat and furthermore truncated proteins were detected in chicken HAL+ associated to TS treatment. Lastly, our results pointed out that the halothane test was not fully efficient to detect samples that presented alterations at that strategic regions of α RYR gene. However only the association of the thermal stress, and halothane exposure presented evidence for this role suggesting a modulation of gene expression by the environmental factors. Unfortunately, a common gene mutation was not found and the large number of altered transcripts found was possibly the result of environmental factors particularly heat stress which could somehow modulate the α RYR gene expression. Also our results indicated that the avian physiological role related to halothane susceptibility and PSE is different in relation to the mammals.

Keywords: Mutation. The halothane test. Environment factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia de zonas normais (a) e zonas de PSE (b) em músculo <i>semimembranosus</i> de suínos	23
Figura 2 – Mecanismo de contração do músculo esquelético	28
Figura 3 – RyR1 e DHPR, modulados pela ligação da calmodulina (CaM), para liberação de íons cálcio pelo RyR1	29
Figura 4 – Diagrama esquemático do mecanismo de excitação-contração em músculo esquelético de aves	31
Figura 5 – Diagrama esquemático das regiões <i>hotspot</i> com diferentes mutações para RyR.....	38
Figura 6 – Modelo molecular do receptor de rianodina	39
Figura 7 – Alinhamento das sequências de mRNA aRYR de frangos disponíveis no <i>GenBank</i>	40
Figura 8 – Aparato utilizado para o teste do halotano	43
Figura 9 – Aves submetidas ao teste do halotano e as respostas observadas.....	43
Figura 10 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 44 dias de idade coletadas no experimento A.....	55
Figura 11 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 42 dias de idade coletadas no experimento B.....	56
Figura 12 – Correlação da exposição ao halotano, ao estresse térmico e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 44 dias de idade coletadas no experimento C.....	57
Figura 13 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-), ao estresse térmico (ET) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 45 dias de idade coletadas no experimento D.....	58
Figura 14 – RNA Total após eletroforese em gel de agarose 1%. As setas indicam as bandas estruturais de RNA	59
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1%	59

- Figura 16** – Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à reação de digestão do produto da extração plasmidial60
- Figura 17** – Alinhamento entre as sequências de aRYR de frangos disponíveis no *GenBank* (XM_424193, XM_428139, XM_427376, X95266) e a nova sequência (GQ337080), com base na sequência completa do gene de perus (EU177005.1).....61
- Figura 18** – Alinhamento global das proteínas RyR1 na região N-terminal, incluindo a nova sequência identificada: GQ33708062
- Figura 19** – Alinhamento global das sequências de aRYR de perus e das sequências parciais de perus e frangos63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR.....	52
Tabela 2 – Amostragem de 22 frangos machos, de linhagem comercial, com 44 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, e a produção de carnes PSE	54
Tabela 3 – Amostragem de 17 frangos machos, bisavózeiros, com 42 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, e a produção de carnes PSE. Experimento B.....	55
Tabela 4 – Amostragem de 18 frangos machos, de linhagem comercial com 44 dias de idade, expostos e não expostos ao halotano e ao estresse térmico, e a produção de carnes PSE dentro destes grupos. Experimento C.....	56
Tabela 5 – Amostragem de 18 frangos com 45 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, expostos ao estresse térmico, e a produção de carnes PSE dentro destes grupos. Experimento D.	57
Tabela 6 – Identificação das amostras referentes ao experimento A que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações	64
Tabela 7 – Transcrito alterado com inserção de nucleotídeos detectado no experimento A. Amostra AN10	65
Tabela 8 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento A que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações	66
Tabela 9 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento A, resposta ao halotano e qualidade de carne	67
Tabela 10 – Identificação das amostras referentes ao experimento B que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações	68
Tabela 11 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento B que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações ...	68.

Tabela 12 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento B, resposta ao halotano e qualidade de carne	69
Tabela 13 – Identificação das amostras referentes ao experimento C que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações	70
Tabela 14 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento C que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações	71
Tabela 15 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento C, exposição ao halotano, estresse térmico e qualidade de carne	72
Tabela 16 – Identificação das amostras referentes ao experimento D que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações	73
Tabela 17 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento D que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações	73
Tabela 18 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento D, resposta ao halotano, estresse térmico e qualidade de carne	74

LISTA DE ABREVIações

AF	Proteína com função alterada
ATP	Adenosina Trifosfato
CaM	Calmodulina
cDNA	DNA complementar
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DHPR	Receptor de dihidropiridina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
ET	Estresse Térmico
HAL+	Halotano positivo
HAL-	Halotano negativo
HM	Hipertermia Maligna
IP3R	Receptor de Inositol 1,4,5 Trifosfato
L*	Valor de luminosidade
mRNA	RNA mensageiro
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> (via de decaimento de RNA mensageiros sem sentido)
PB	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da Polimerase em Cadeia)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSE	<i>Pale, Soft, Exudative</i> (Pálida, Flácida, Exsudativa)
PSS	<i>Porcine Stress Syndrome</i> (Síndrome do Estresse em Suínos)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
RS	Retículo Sarcoplasmático
rRNA	RNA ribossômico
RyR	Proteína receptora de rianodina
RYR	Gene codificador da proteína receptora de rianodina
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de um único nucleotídeo)
TR	Proteína truncada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 CARNES PSE	22
3.2 CARNES PSE, SÍNDROME DO ESTRESSE SUÍNO E HIPERTERMIA MALIGNA.....	25
3.3 O RECEPTOR RIANODINA.....	27
3.4 ESTRESSE EM AVES E CARNES PSE	31
3.4.1 Efeito da Seleção Genética nas Características de Qualidade da Carcça	34
3.5 TESTE DO HALOTANO	35
3.6 ESCOLHA DA REGIÃO DE ESTUDO.....	37
3.7 MUTAÇÕES DETECTÁVEIS.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 EXPERIMENTO A	42
4.1.1 Animais.....	42
4.1.2 Teste do Halotano	42
4.1.3 Abate	44
4.1.4 Coleta de Amostra para as Análises Moleculares	44
4.2 EXPERIMENTO B	44
4.2.1 Animais.....	45
4.2.2 Teste do Halotano	45
4.2.3 Abate	45
4.3 EXPERIMENTO C	46
4.3.1 Animais.....	46
4.3.2 Teste do Halotano	46
4.3.3 Estresse Térmico	46

4.3.4 Abate	47
4.4 EXPERIMENTO D	47
4.4.1 Animais.....	48
4.4.2 Teste do Halotano	48
4.4.3 Estresse Térmico	48
4.4.4 Abate	48
4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
4.6 ANÁLISES DE QUALIDADE DE CARNE.....	49
4.6.1 Análises de Cor do Músculo <i>Pectoralis major</i>	49
4.7 ANÁLISES MOLECULARES	50
4.7.1 Extração de RNA Total.....	50
4.7.2 cDNA	50
4.7.3 PCR a partir do cDNA	51
4.7.4 Clonagem	52
4.7.5 Preparação de Plasmídeos em Microplacas	52
4.7.6 Digestão Plasmidial.....	52
4.7.7 Sequenciamento	53
4.7.8 Análise das Sequências	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 TESTE DO HALOTANO E CARNES PSE	54
5.1.1 Experimento A.....	54
5.1.2 Experimento B.....	55
5.1.3 Experimento C.....	56
5.1.4 Experimento D.....	57
5.2 ANÁLISES MOLECULARES	58
5.2.1 Análise da Integridade do RNA Total	58
5.2.2 Amplificação da Região <i>Hot Spot</i>	59
5.2.3 Digestão Plasmidial	60
5.3 ANÁLISE DOS SEQUENCIAMENTOS	61
5.3.1 Experimento A.....	63
5.3.2 Experimento B.....	67
5.3.3 Experimento C.....	69
5.3.4 Experimento D.....	72

6 DISCUSSÃO	75
6.1 DETECÇÃO DE TRANSCRITOS VARIANTES.....	76
6.2 MUTAÇÕES X CARNES PSE	81
6.3 MUTAÇÕES X TESTE DO HALOTANO.....	83
7 CONCLUSÕES	88
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	99
ANEXO A	100
ANEXO B	103
ANEXO C	104
ANEXO D	105
ANEXO E	106
ANEXO F.....	107
ANEXO G.....	116

1 INTRODUÇÃO

A pós-graduação no Brasil, visando o desenvolvimento da Ciência e o crescimento de uma comunidade cientificamente competente, vem ganhando forças e incentivos recentemente. Estudos cujos objetivos são solucionar problemas que causam grande prejuízo econômico às indústrias e conseqüentemente ao país são cada vez mais comuns, na tentativa de se criar uma ponte entre a academia e a indústria. O setor de produção de carnes é um grande exemplo desta nova postura de pesquisa.

O Brasil vem cada vez mais se firmando como exportador de carnes para o mundo. O produto brasileiro “carne de frango” vem se consolidando e é um dos responsáveis pela grande movimentação financeira que ocorre no setor agropecuário. Para o primeiro trimestre de 2009, mesmo com a crise financeira internacional, o setor brasileiro de produção de carne de frango prevê um crescimento de 2,2%. A retração fica por conta das exportações que demonstram ser 4,1% menores em relação ao mesmo período do ano passado (Avicultura Industrial, 2009). Em contrapartida, de acordo com a estimativa disponível no Sumário Executivo do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o complexo Carnes, o nível de crescimento se mantém tanto na produção, quanto no consumo e na exportação de carne de frango (MAPA, 2009).

Só em 2008, todo o setor de carne de frango movimentou aproximadamente US\$ 7 bilhões, o que representa um crescimento de 39% em relação a 2007 (UBA, 2009). Essa ampliação de mercado e lucratividade da cadeia produtiva da carne de frango só foi possível graças aos avanços alcançados nas áreas do melhoramento animal, nutrição e sanidade, gerando assim um produto altamente melhorado geneticamente que pode atingir mais de 2 kg de peso em 42 dias; o que causa espanto na população em geral, e o surgimento de mitos, como a aplicação de hormônio em frangos de corte. Conforme Bellaver (2006), os hormônios sendo substâncias protéicas, caso fossem utilizados nas dietas das aves não apresentariam efeito farmacológico pois seriam destruídos pelas proteases do sistema digestivos destes animais. Ainda, a injeção de hormônios representaria uma mão de obra considerável e inviável já que deve ser feita individual e diariamente para surtir algum efeito. Os 40 anos de pesquisas e seleção genética, determinação

das exigências nutricionais e balanceamento de cada nutriente e energia das dietas, ambiência adequada, monitoria e controle de doenças, e o adequado manejo, transporte e abate culminam com a alta performance da avicultura brasileira.

A seleção genética visando o aumento da performance de crescimento (ganho de peso e conversão alimentar), melhoramento da composição corporal (mais carne de peito e menos gordura abdominal) (BERRI *et al.*, 2001; MITCHELL; SANDERCOCK, 2004), representam características de alta herdabilidade. Entretanto pouco se sabe sobre o impacto dessa seleção nas características de qualidade e propriedades funcionais da carne (LE BIHAN DUVAL, 2003; BARBUT, 1998).

Supostas consequências dessa seleção são as carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*), que apresentam como características de superfície uma palidez, flacidez e perda de exsudato. Essas características iniciais são decorrentes das propriedades funcionais alteradas como: baixa Capacidade de Retenção de Água (CRA), proteína de baixa funcionalidade, alterações na textura e cor, sendo que esses problemas causam mais prejuízos na indústria de processados (LARA *et al.*, 2003; STRASBURG; CHIANG, 2003). Cálculos considerando a produção de 2003 demonstraram que indústria avícola nacional perde em torno de US\$ 9 milhões anuais com carnes PSE (ODA *et al.*, 2003).

Em suínos já foi comprovada a relação entre carnes PSE e a Síndrome do Estresse em Suínos (PSS -*Porcine Stress Syndrome*), relacionada com excessiva liberação de íons Ca^{+2} . As bases moleculares dessa síndrome foram identificadas em suínos: uma mutação de ponto no gene que codifica a proteína receptora de rianodina do tipo 1 (RyR1), responsável pela liberação de íons Ca^{+2} durante a contração muscular o que faz com que esta proteína perca sua atividade reguladora, permitindo uma excessiva liberação desses íons durante o processo de contração muscular, ocasionando uma aceleração no metabolismo anaeróbico e da glicólise *post mortem*, levando a uma queda drástica do pH muscular. Essa brusca queda do pH associada à elevada temperatura da carcaça (aproximadamente 35 °C) provoca a desnaturação das proteínas, levando à perda da capacidade de retenção de água seguida da perda de exsudato, comprometendo as propriedades funcionais da carne e gerando as carnes PSE (PIETRZAK *et al.*, 1997). Acredita-se que em frangos mutações genéticas também possam levar à ocorrência de carnes PSE, mas

apesar dos trabalhos de Lara (2003), Droval (2004) e Oda (2006), ainda não existe fundamentação genética para explicar como ocorrem carnes PSE em frangos.

Considerando a posição do Brasil no mercado mundial de frangos e a manutenção dessa posição, é indispensável e urge que se estude as bases genético-moleculares desse problema, visando futuramente o desenvolvimento de um teste diagnóstico prévio para matrizes, já que não existe um “fenótipo PSE”, ou seja, características que permitam uma seleção visual dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações na seqüência de nucleotídeos do mRNA (RNA mensageiro) que codificam a proteína α RyR que possam estar relacionadas com a resposta ao halotano e com a ocorrência de carnes PSE em frangos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expor as aves ao halotano e classificá-las em positivas e negativas e também verificar se há ação deste anestésico na expressão gênica da α RyR;
- Avaliar o efeito do estresse térmico em aves classificadas através do teste do halotano;
- Classificar as carnes provenientes do abate dessas aves como PSE ou não, através da análise de cor;
- Amplificar, clonar e sequenciar fragmentos do cDNA (DNA complementar) de α RYR de frangos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARNES PSE

O termo PSE provém da designação inglesa *pale, soft and exudative*, devido às características organolépticas destas carnes, que apresentam descoloração, flacidez e exsudação. Isso ocorre em virtude da desnaturação protéica pela associação dos seguintes eventos: rápida glicólise *post mortem*, com queda do pH enquanto a carcaça ainda se encontra quente (35 °C) (BARBUT, 1998).

Os fatores que levam as carnes PSE são inúmeros, a velocidade com que ocorre o abaixamento da temperatura da carcaça é um deles. A temperatura interna do peito é o ponto onde a queda da temperatura ocorre mais lentamente na carcaça

O que favorece o desenvolvimento de PSE (JAMES *et al.*, 2006). Em perus, esse fenômeno foi estudado avaliando-se a perda de água em carcaças em diferentes períodos de tempo e verificou-se que o rápido resfriamento auxiliaria no controle desse problema. Tem sido recomendado então que a temperatura interna do peito de perus deve ser reduzida para abaixo de 25 °C dentro dos 60 minutos *post mortem* a fim de minimizar a ocorrência de carnes PSE (LESIK *et al.*, 1997).

Rathgeber *et al.* (1999) reportaram a importância da temperatura na perda da funcionalidade protéica em músculo *Pectoralis major* de perus. Estes autores verificaram que a extractabilidade das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares foram reduzidas após a exposição das carnes de peito de peru (*post rigor*) à temperatura de 40 °C, por um período de 30 minutos. Essa taxa reduziu-se mais ainda quando o tempo aumentou para 120 minutos; acentuando-se assim a importância da temperatura da carcaça na perda da funcionalidade protéica.

Em um estudo sobre o efeito do *rigor mortis* acelerado sobre a funcionalidade protéica em peito de peru, verificou-se que a fosforilase, uma enzima solúvel, se torna associada firmemente com as miofibrilas do músculo do grupo PSE, portanto, menos miosina se solubiliza, em comparação com as carnes normais. Mais especificamente, a fosforilase se acumula somente nas linhas Z e na parte central

das bandas A do sarcômero. Então, a desnaturação da miosina, muito mais que das proteínas sarcoplasmáticas, é a responsável pela baixa extractabilidade das proteínas miofibrilares. O comprimento dos sarcômeros no grupo PSE é tipicamente maior, e as linhas Z se tornam muito mais visíveis. Os mesmos autores calcularam a taxa de declínio de pH nos 20 minutos *post mortem* que foi de 0.03 unidades/minuto no grupo normal, enquanto no grupo PSE, essa taxa se elevou para 0.06 unidades/minuto. A combinação de uma rápida queda do pH nos primeiros 20 minutos *post mortem*, e que se mantém como pH final na carne, promove uma desnaturação adicional da miosina (PIETRZAK *et al.*, 1997).

De acordo com Li e Wick (2001), a actomiosina é a proteína funcional predominante no tecido muscular, responsável pelas propriedades de ligação da água no músculo e carnes processadas. As diferenças de solubilidade em sal da miosina é uma propriedade crucial para a formação de gel em produtos cárneos processados de alta qualidade. Alvarado e Sams (2004) também afirmam que a miosina é importante para as propriedades ligantes e CRA da carne, sendo que a sua desnaturação pode diminuir a CRA e formar géis fracos após a gelatinização térmica. Entretanto, o mecanismo que torna a miosina insolúvel ainda não foi bem elucidado.

A exsudação observada nas carnes PSE foi demonstrada por Laville *et al.* (2005). Os autores, procurando caracterizar zonas de PSE no músculo *semimembranosus* de suínos, verificaram uma desorganização do alinhamento das fibras que estavam enrugadas e rompidas (Figura 1). Houve também um aumento de 26,2% do espaço entre as fibras com acúmulo de material amorfo extracelular. A solubilidade da proteína também foi menor (55,4 mg/g nos músculos caracterizados como PSE e 91,5 mg/g nos normais).

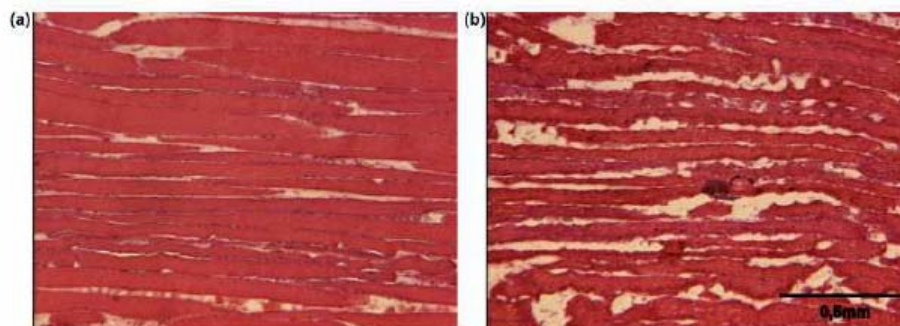


Figura 1 – Microscopia de zonas normais (a) e zonas de PSE (b) em músculo *semimembranosus* de suínos.

Fonte: Laville *et al.* (2005).

A palidez observada nas carnes PSE tem sua origem através de mecanismos pouco conhecidos. Em experimento realizado por Swatland (2008), foi confirmado a dependência do pH na dispersão da luz em carne de frango, da mesma maneira que nas carnes suína e bovina. Dúvidas ainda existem com relação à integridade das fibras musculares. Quando não são observados danos na microestrutura, ou seja, as fibras estão intactas e separadas por fluidos, uma queda no pH diminui a repulsão eletrostática negativa entre os miofilamentos, fazendo com que eles se unam lateralmente. Dessa forma, haverá um aumento da reflectância na superfície miofibrilar, bem como um aumento da dispersão dos raios refletidos através das miofibrilas. Além disso, a reflexão pode ocorrer entre as miofibrilas e o sarcoplasma, entre as superfícies das fibras musculares e fluidos intercelulares e entre a fáscia muscular e exsudatos intercelulares. Porém, quando a microestrutura muscular está rompida no *post mortem* como quando há precipitação das proteínas sarcoplasmáticas, ou quando há uma desestruturação das fibras, essas situações levarão ao aumento da dispersão sem contudo alterar o índice de refração.

A desestruturação da microestrutura muscular de carne de frangos foi estudada por Wilhelm *et al.* (2009) onde verificaram que o aumento da concentração de Ca^{2+} que ocorre nas carnes PSE promove adicionalmente o aumento da atividade de proteases que alteram a estrutura das fibras musculares. Além disso, a ocorrência de PSE também está relacionada com manejo pré abate estressante, rápido desenvolvimento muscular, temperatura ambiental elevada (LARA *et al.*, 2003; SOLOMON; VAN LAACK; EASTRIDGE, 1998), alterações na atividade da fosfolipase A2, que também provocam uma liberação excessiva de Ca^{2+} sarcoplasmático tanto em suínos (CHEAH, 1981, CHEAH; CHEAH, 1981) quanto em aves (SOARES *et al.*, 2003), sugerindo assim uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais e mostrando dessa forma mais uma parte do complexo mecanismo que culmina com o problema das carnes PSE.

3.2 CARNES PSE, SÍNDROME DO ESTRESSE SUÍNO E HIPERTERMIA MALIGNA,

Os primeiros estudos sobre a ocorrência de carnes PSE e a associação deste defeito com uma síndrome se deu em suínos. Isso porque estes animais são usados como modelo para estudos em humanos. Observou-se uma associação entre carnes PSE, Síndrome do Estresse em Suínos (*Porcine Stress Syndrome* -PSS) e Hipertermia Maligna (HM), uma doença existente em humanos.

Em seres humanos, verificou-se a sensibilidade de determinadas pessoas à anestesia inalatória com halotano, cujos sintomas eram aumento da temperatura corporal, hipermetabolismo e contração muscular intensa (OHNISHI; OHNISHI, 1994). A incidência desta doença é de 1 caso em cada 50 000 – 100 000 adultos exposto ao anestésico (MACLENNAN, 2000)

A intensa contração muscular durante a exposição ao halotano também foi verificada em suínos (HARRISON, *in* OHNISHI; OHNISHI, 1994), cães (O'BRIEN, *in* OHNISHI; OHNISHI, 1994), perus (OWENS *et al.*, 2000a; OWENS *et al.*, 2000b) e frangos (SANTOS *et al.*, 2006).

A HM e a PSS têm reconhecidamente causas genéticas, (OHNISHI; OHNISHI, 1994), e em suínos a PSS leva ao desenvolvimento de carnes PSE. (FUJII *et al.*, 1991). A primeira ligação entre HM e uma mutação específica no RYR1 (gene que codifica a proteína receptora de rianodina 1) foi encontrada em suínos por Fujii *et al.* (1991), que relataram uma alteração numa proteína localizada no retículo sarcoplasmático (RS), formadora de um canal que controla da liberação de íons Ca^{2+} , denominado receptor de rianodina (RyR). O gene responsável por codificar a RyR1 foi identificado no cromossomo 19q13-1 de humanos, bem como as mutações nesse gene que causam a HM (FUJII *et al.*, 1991). A origem genética do PSE em suínos é descrita bioquimicamente como sendo uma estimulação continuada da abertura da RyR1, sendo que a abertura do canal é facilitada enquanto o fechamento é inibido (FUJII *et al.*, 1991). Em suínos, o gene RYR1 foi localizado no cromossomo 6p11-q21, uma região relacionada com a região 19q13-1 do cromossomo humano, o que sugere fortemente uma ligação da HM suína e o RYR1. A mutação de ponto encontrada em suínos localiza-se no nucleotídeo 1843, onde uma citosina é encontrada em animais normais e uma timina foi encontrada em

animais mutantes. Essa troca de nucleotídeos alterou a sequência de aminoácidos na posição 615, onde inicialmente havia uma arginina, e nos mutantes é encontrada uma cisteína, provocando assim a hipersensibilidade do RyR1 em animais caracterizados como suscetíveis a apresentarem carnes PSE (FUJII *et al.*, 1991).

Posteriormente, sequenciamentos em larga escala de múltiplos clones do cDNA de RYR1, além do *screening* de segmentos curtos amplificados por PCR a partir do cDNA de músculo esquelético foram feitos com o objetivo de se identificar polimorfismos na espécie humana e atualmente várias mutações na RyR1 estão relacionadas com HM (BRINI, 2004).

Em aves, ainda não existe a caracterização de uma síndrome como a existente para humanos e suínos (LARA *et al.*, 2003), demonstrando assim a necessidade do estudo das bases moleculares. Síndromes do estresse são comuns e podem causar graves consequências, por exemplo, as miopatias induzidas por estresse em aves e que apresentam forte associação com as carnes PSE (MITCHELL; SANDERCOCK, 2004). Os autores sugerem que a identificação dos genes envolvidos são importantes caminhos para a prevenção de síndromes de estresse através da seleção de indivíduos que irão ou não desenvolver carnes com qualidade comprometida.

É necessário então entender os mecanismos de controle da permeabilidade do RyR durante a contração muscular e a resposta dos RyRs a essa ativação, através da interação com os receptores de dihidropiridina (DHPR). Os DHPR são canais de Ca^{2+} do tipo L voltagem-dependentes, presentes no exterior das membranas de células musculares e que controlam a abertura dos RyRs (PROTASI *et al.*, 2002). O entendimento da própria configuração do RyR, uma proteína de aproximadamente 2.200 kDa (FRANZINI – ARMSTRONG, 1994), bem como de outras proteínas envolvidas na contração muscular se faz necessário para que se possa desenvolver uma compreensão mais ampla deste evento celular.

3.3 O RECEPTOR RIANODINA

A sinalização de cálcio no meio intracelular e as várias etapas envolvidas na contração muscular compreendem eventos bastante complexos. O mecanismo básico envolve proteínas especializadas em liberar, se ligar, seqüestrar e re-armazenar o cálcio dentro das células. Para isso, proteínas como RyR, os DHPR, a calmodulina (CaM), entre outros, localizados na membrana do RS, incluem múltiplas isoformas e variantes de *splicing*, envolvendo a co-expressão de diferentes membros de famílias protéicas em uma mesma célula, de acordo com a funcionalidade de cada um (SUTKO; AIREY, 1996).

As estruturas envolvidas nesse mecanismo compreendem dois sistemas de membranas: plasmalema e o RS, que se comunicam eficientemente entre si em estruturas específicas denominadas Unidades Liberadoras de Cálcio, ou junções. Essas estruturas contém proteínas que foram identificadas como peças chaves neste processo: os RyRs, grandes canais intracelulares (~2260 kDa) que permitem a saída de Ca^{2+} do RS em resposta a despolarização da membrana plasmática; e os DHPRs, canais de Ca^{2+} do tipo L voltagem-dependentes, que estão presentes no exterior das membranas de células musculares e que controlam a abertura dos RyRs (PROTASI *et al.*, 2002). (Figura 2).

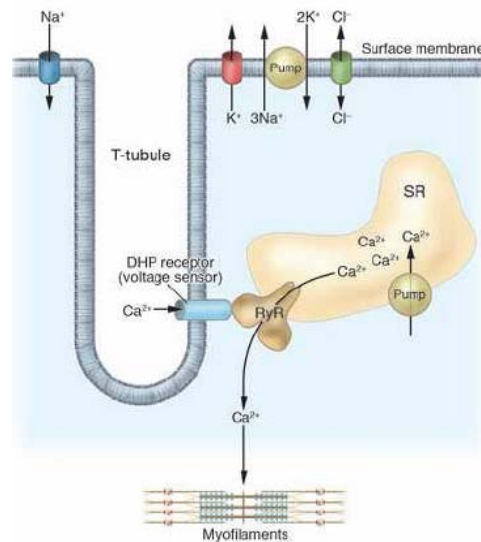


Figura 2 – Mecanismo de contração do músculo esquelético. A fibra muscular é excitada através do nervo (placa motora) e gera o potencial de ação que se espalha ao longo da superfície da membrana e pelo sistema de túbulo transverso, nas partes mais profundas da fibra muscular. O DHPR detecta a despolarização da membrana e altera sua conformação, ativando o RyR que libera Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} se liga a troponina e ativa a contração muscular.

Fonte: Jurkat-Rott; Lehmann-Horn (2005).

Além dessas duas principais proteínas (DHPR e RyR), estudos recentes revelam a participação da CaM. A CaM é uma proteína ligante do Ca^{2+} , expressa ubiquitariamente, que se liga na maioria das vezes com proteínas de modo Ca^{2+} dependente. Parece que a CaM se liga ao RyR e ao DHPR de uma maneira que modula o fenômeno de excitação-contração muscular no músculo esquelético. Em concentrações nanomolares de Ca^{2+} a CaM se liga ao RyR e ativa este canal. Já em concentrações micromolares de Ca^{2+} , ocorre uma inibição da atividade do RyR (HAMILTON, SERYSHEVA, STRASBURG, 2000) (Figura 3).

Hamilton (2005) também afirma que baixas concentrações (baixa amplitude em μM) ativam o RyR, mas concentrações maiores (maiores valores em μM até mM) inibem a atividade do canal.

Os receptores de rianodina, assim denominados pela afinidade de ligação com o alcalóide rianodina, possuem uma massa molecular de aproximadamente 2,3 milhões de Daltons que formam uma proteína homotetramérica, com subunidades polipeptídicas de massas entre 500 e 600 kDa,

e formam uma estrutura protéica com uma grande região N-terminal citosólica, um domínio modulatório central e um domínio C-terminal. Em vertebrados existem três isoformas desse receptor, codificadas por três genes diferentes: RYR1, RYR2 e RYR3 (SUTKO; AIREY, 1996; ROSSI; SORRENTINO, 2004). Em mamíferos, o RYR1 é expresso em altos níveis nas fibras musculares esqueléticas, sendo que o RYR2 ocorre principalmente em miócitos cardíacos e no cérebro; além de ambos terem sido detectados no sistema nervoso central e outros tecidos periféricos, participando de mecanismos de transdução de sinal. O RYR3 parece ser expresso em vários tecidos de mamíferos, inclusive o músculo esquelético, entretanto em níveis que são de 20 a 50 vezes menores em comparação com RyR1, e apenas no diafragma (OTTINI *et al.*, 1996; ROSSI; SORRENTINO, 2004).

Já em músculo esquelético de aves, anfíbios e peixes, duas isoformas do receptor de rianodina, denominadas α e β – correspondendo as isoformas RyR1 e RyR3 de mamíferos, respectivamente (OTTINI *et al.*, 1996) – são co-expressas, enquanto em mamíferos verifica-se apenas o RyR1. Uma terceira isoforma que é reconhecida pelos anticorpos anti-RyR2 de mamíferos, foi encontrada em coração de galinhas, e parece ser homóloga a RyR2 de mamíferos (PERCIVAL *et al.*, 1994; ROSSI; SORRENTINO, 2004).

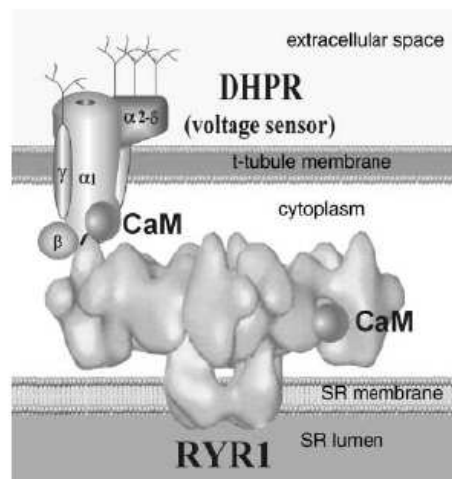


Figura 3 – RyR1 e DHPR, modulados pela ligação da calmodulina (CaM), para liberação de íons cálcio pelo RyR1

Fonte: Hamilton, Serysheva, e Strasburg, (2000).

Os RyR1 e RyR2 estão dispostos em localizações precisas nos músculos esqueléticos e cardíacos, em estruturas denominadas tríades e díades,

respectivamente, e tem mecanismos de ativação diferenciados. Essas estruturas são complexos juncionais entre o RS e o sistema de túbulos T, o que garante uma interação direta entre os DHPR e RyR, contato este que é essencial para a ativação do mecanismo de excitação-contração muscular. Portanto, o RyR1 está fisicamente acoplado com os DHPR e abertos em relação a mudanças conformacionais dos DHPRs induzidas pelas mudanças na despolarização da membrana que provocam a contração muscular. Já nas fibras cardíacas, em contraste, os RyR2 não estão associados fisicamente com os DHPRs, sendo então ativados pelo mecanismo Ca^{2+} -induzido - Ca^{2+} liberado (ROSSI; SORRENTINO, 2004). Já o RyR3 (β RyR) -nas espécies que possuem esse canal de Ca^{2+} no músculo esquelético na mesma proporção que o RyR1 (α RyR) - está localizado em uma região parajuncional, imediatamente adjacente à região juncional do RS, portanto, sua ativação deve ser indireta e derivativa, durante o evento de excitação-contração (FELDER; FRANZINI-ARMSTONG, 2002).

Basicamente, dois mecanismos têm sido propostos para explicar a liberação de cálcio: interação dos RyRs com os sensores de voltagem ou DHPR, e o mecanismo Ca^{2+} -induzido - Ca^{2+} liberado. O primeiro é o mais aceito, enquanto o segundo ainda apresenta controvérsias, mas acredita-se que processos bem distintos estão envolvidos na ativação da liberação de Ca^{2+} pelo RS pelas diferentes

isoformas. A partir disso, pode-se supor que no caso dos vertebrados não mamíferos, onde duas isoformas de RyR estão presentes em quantidades semelhantes, que uma isoforma (RyR1 ou α RyR) responde ao mecanismo de ativação a partir do DHPR, enquanto a outra (RyR3 ou β RyR) responde a ativação pelos íons Ca^{2+} (PERCIVAL *et al.*, 1994). A comprovação de que a ativação do RyR3 ou isoforma β é indireta, também foi verificado por Protasi *et al.* (2000) em células musculares que continham o RyR3 mas não o RyR1, o que causava uma falha no mecanismo de contração.

Segundo Percival *et al.* (1994), essa diferença entre os mecanismos de contração-excitação em músculo de vertebrados mamíferos e não-mamíferos se mostra verdadeira. As isoformas α e β parecem ser reguladas diferentemente tanto em tecidos maduros quanto embrionários, mas ambas dão corpo aos canais de íon, com propriedades de condutância e seletividade semelhantes, diferindo no comportamento de disparo e resposta aos modificantes do canal, fornecendo evidências de que esses canais potencialmente têm funções distintas no mecanismo de contração-excitação em músculo esquelético de frangos. Observar na figura 4, o esquema proposto por

Strasburg e Chiang (2003), que ilustra o funcionamento da isoformas de RyR alfa e beta.

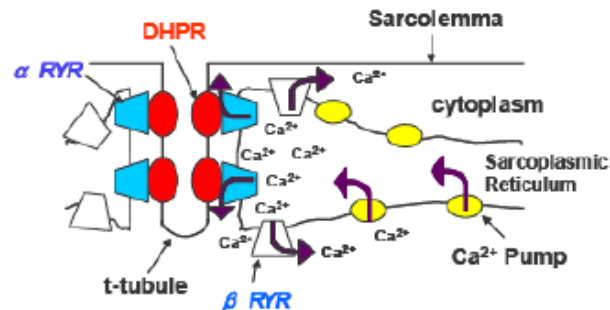


Figura 4 – Diagrama esquemático do mecanismo de excitação-contração em músculo esquelético de aves. A despolarização dos túbulos T provoca a liberação de Ca^{2+} pelo αRyR , que está fisicamente acoplado ao DHPR. O aumento local da concentração de Ca^{2+} provoca a abertura do βRyR , localizados periféricamente aos túbulos T/junção do RS. Os íons cálcio são recapturados durante o relaxamento muscular pela bomba de cálcio.

Fonte: Strasburg e Chiang (2003).

O comportamento dos canais α e β RyR quando abertos, diferem dependendo se são ativados por íons Ca^{2+} ou por ATP. No caso dos βRyR , o Ca^{2+} parece desestabilizar o estado fechado, enquanto o ATP estabiliza o estado aberto. As diferenças entre as duas isoformas se acentuam na ausência de ATP, onde os αRyR s exibem um grande número de aberturas por um período de tempo extremamente curto. A significância fisiológica desse evento necessita ser determinada, mas se especula que esses canais são mais eficientes em fornecer Ca^{2+} para a ativação de canais adjacentes do que para aumentar a concentração de Ca^{2+} nas proximidades das miofibrilas (PERCIVAL *et al.*, 1994).

3.4 ESTRESSE EM AVES E CARNES PSE

A influência dos fatores ambientais que culmina com o desenvolvimento de carnes PSE é amplamente estudado (OWENS *et al.*, 2000a; OWENS *et al.*, 2000b; DEBUT *et al.*, 2003). Entretanto, ainda não existe um fator

exclusivamente determinante na formação das carnes PSE (transporte, estresse térmico, succinilcolina) (OWENS *et al.*, 2000b, CAVITT *et al.*, 2004), e pode-se afirmar, de maneira consistente, que se trata de um problema de origem multifatorial.

No período *ante mortem* ocorrem alterações no metabolismo da célula muscular e conseqüentes alterações no sarcolema e outras estruturas teciduais que levam ao desenvolvimento de miopatias com profundas implicações na qualidade da carne e incidência de PSE (MITCHELL; SANDERCOCK, 2004). Essas alterações são decorrentes das situações de estresse a que as aves são submetidas: estresse térmico, apanha e transporte, jejum, etc. A importância do manejo pré-abate e sua influência na qualidade da carne têm sido consistentemente estudados e maneiras de se minimizar o estresse foram propostas com sucesso por Guarnieri *et al.* (2004) através da aplicação de um jato de água antes do abate e por Olivo *et al.* (2001), pela adição de vitamina E na ração, inibindo o desenvolvimento de carnes PSE.

Segundo Barbut (1998), diferentes graus de estresse levam a diferentes taxas de glicólise *post mortem*. A resolução do *rigor mortis* em aves por si só já é mais rápida (cerca de 1 hora para frangos, 24 horas para bovinos e várias horas em suínos, de acordo com Dransfield e Sosnicki, 1999) em comparação com outras espécies e nos casos de PSE em aves, o pH final é atingido em 35 minutos.

Quando as aves são submetidas ao estresse, vários mecanismos são ativados na tentativa de se manter a homeostase. O aparente aumento da susceptibilidade ao estresse é atribuído à exploração do potencial genético para o crescimento, sem que tenha havido o desenvolvimento conjunto de mecanismos compensatórios em correspondência aos mecanismos regulatórios e de homeostase (MITCHELL; SANDERCOCK, 2004). Isso é comprovado em vários estudos que levam em conta o estresse térmico sofrido pelas aves. Aves comerciais, geneticamente selecionadas, têm menos capacidade de se adaptar as variações de temperatura que ocorrem rotineiramente, em comparação com aves não melhoradas geneticamente (N'DRI *et al.*, 2007; CHIANG, BOOREN; STRASBURG, 2008;). Com isso a taxa de mortalidade em aves comerciais pode chegar até 35,5% em condições de temperatura flutuante (N'DRI *et al.*, 2007).

O estresse térmico, agudo ou crônico, pode causar uma infinidade de alterações fisiológicas e metabólicas nas aves. Essas mudanças vão desde um aumento da temperatura corporal, até as aves ficarem ofegantes e naturalmente

acontece a alcalose respiratória. Metabolicamente, a alteração é trazida à tona pela queda nos níveis plasmáticos de triiodotironina (LIN, DECUYPERE, BUYSE, 2006).

Chiang, Booren e Strasburg (2008) verificaram a resposta dos hormônios tireoidianos e a influência nos parâmetros de qualidade de carne quando as aves eram submetidas ao estresse térmico, em duas linhagens de perus geneticamente diferentes. De acordo com os autores, as mudanças nos níveis de hormônio da tireóide em resposta a mudanças de temperatura, poderiam alterar a regulação de cálcio no músculo esquelético, afetando assim a qualidade da carne produzida por esses animais. Os resultados indicam que a seleção genética para musculatura do peito e taxa de crescimento acelerada em perus, originaram aves mais suscetíveis ao estresse térmico. As características de perda por cozimento e absorção do marinado foram as mais evidenciadas pelo estresse térmico. Perus com alta concentração plasmática de T3 antes do abate, produziram carne de inferior qualidade nesses dois parâmetros.

O estresse, portanto, provoca uma reação em cascata. As reservas de glicogênio são consumidas rapidamente, e essa rápida glicólise *post mortem* leva a queda do pH enquanto ainda não houve o abaixamento da temperatura da carcaça. Essa situação leva a desnaturação das proteínas miofibrilares, influenciando assim a funcionalidade protéica (incapacidade de formar emulsão), a CRA (exudativa) e a cor da carne (pálida), características claramente encontradas nas carnes PSE (BARBUT, 1998; OWENS *et al.*, 2000a; BERRI, 2001; STRASBURG, CHIANG, 2003).

Lara *et al.* (2002) afirmam que o estresse térmico parece ser o principal fator ambiental desencadeante da condição PSE. Após quatro semanas de estresse térmico, perus de uma linhagem comercial nos Estados Unidos produziram carnes PSE. Houve uma aceleração do consumo de ATP e conseqüentemente uma taxa de queda de pH mais rápida também no grupo estressado. O estresse térmico, portanto, parece ser um fator estressante o suficiente para provocar a condição de PSE nas carnes produzidas por estes animais (MCKEE; SAMS, 1997).

Entretanto, ainda há controvérsias, visto que para Debut *et al.* (2003), os fatores ambientais têm um efeito de menor magnitude em comparação com o efeito do genótipo de frangos selecionados para crescimento rápido e lento, que sofreram estresse ambiental (transporte e calor). Características de carnes PSE neste estudo foram observadas apenas na musculatura das coxas, sugerindo que a

carne dessa região é mais sensível aos fatores ambientais que a carne do peito. Já a carne do peito, sofreu maior influência da movimentação que os frangos faziam quando eram pendurados na nória, até a sua morte.

3.4.1 Efeito da Seleção Genética nas Características de Qualidade da Carcaça

Berri *et al.* (2001), comparando características de carcaça entre linhagens de frangos comerciais e experimentais (cada uma subdividida em controle e selecionada para ganho de peso e rendimento de peito e baixa porcentagem de gordura abdominal), verificaram que a carne proveniente da linhagem comercial selecionada apresentava um maior conteúdo protéico e uma baixa umidade, em comparação com a linhagem controle. As aves selecionadas, tanto da linhagem comercial quanto da experimental, apresentavam um menor conteúdo de ferro (representativo do total de pigmentos heme), que suas respectivas linhagens controle. O pH do músculo *Pectoralis major* diminuiu em uma taxa média de 0,3 unidades de pH/h, com uma variação de 0,05 a 0,8 unidades de pH/h. O pH final médio foi de 5,9, e a taxa de declínio de pH foi mais longa nos animais não selecionados, em comparação com os animais selecionados. Ainda avaliando-se as características de qualidade, a carne do peito de animais selecionados apresentou-se mais clara (maior valor de L^*) e menos vermelha (baixo valor de a^*), em comparação com os controles. A conclusão obtida a partir desses dados é que a seleção para ganho de peso e desenvolvimento do músculo peitoral não teve um impacto negativo nas características de qualidade de carne, apesar da grande influência no metabolismo *post mortem* do músculo do peito de frangos. Quando se consideram as características de carcaça, Yost *et al.* (2002) afirmam que a seleção para aumento da massa corporal levou a um aumento da capacidade anaeróbica muscular.

As características de qualidade de carne também apresentam herdabilidade (valor fenotípico que irá representar o real valor genético de um indivíduo e varia de 0 a 1). De acordo com Le Bihan-Duval *et al.* (2001), os parâmetros de cor são os que apresentam maiores valores de herdabilidade (0,50 a

0,57). Já a extensão e taxa de declínio de pH parecem ser controlados por diferentes genes, pois apresentam uma baixa correlação genética ($0,02 \pm 0,04$). O pH final apresenta uma forte correlação genética com a característica de luminosidade e capacidade de retenção de água, o que sugere que a seleção considerando o pH final pode ser realizada para prevenir a incidência de carnes PSE (LE BIHAN-DUVAL *et al.*, 2001). Barbut *et al.* (2008) também afirma que o pH final tem se mostrado como genética e fenotipicamente correlacionado com importantes critérios de qualidade como CRA, coloração, maciez e qualidades sensoriais; e essa característica tem sido rapidamente incorporada nos programas de melhoramento genético mais recentes.

Considerando características peso corporal e rendimento de carne de peito, as correlações genéticas foram baixas com as características de qualidade como valor de pH 15 minutos *post mortem* e 24h. Uma correlação genética negativa significativa entre gordura abdominal e pH final foi encontrada neste mesmo estudo. Com base nos resultados, os autores afirmam que a seleção para crescimento e desenvolvimento muscular não alterariam o pH da carne, mas provocariam uma ligeira modificação na cor, diminuindo os valores de a^* e b^* (LE BIHAN-DUVAL *et al.*, 2001).

A seleção genética, portanto, tem uma influência potencial nas características de qualidade da carcaça, entretanto, estas também podem ser influenciadas pelo ambiente, conforme já explanado anteriormente.

3.5 TESTE DO HALOTANO

A reação ao halotano, um anestésico volátil utilizado em cirurgias humanas, foi inicialmente detectada em suínos que faziam parte do programa de transplante de fígados em humanos, e participavam como animais experimentais. Contrariamente ao relaxamento que a anestesia deveria provocar, os animais sensíveis ao anestésico apresentavam-se ofegantes, com cianose, pernas enrijecidas, taquicardia, acidose metabólica e temperatura de $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ (HARRISON, *in* OHNISHI; OHNISHI, 1994). Sintomatologia semelhante é observada em humanos com hipertermia maligna (HM), entretanto, o quadro pode ser revertido pela

administração do medicamento Dantrolene, que provoca o relaxamento dos músculos esqueléticos (OHNISHI; OHNISHI, 1994). Para diagnosticar essa enfermidade em humanos, um exame muito utilizado é o teste de contratura muscular *in vitro*, onde pequenas tiras musculares, obtidas através de biópsia, são expostas ao halotano e também à cafeína, e então se verifica a sensibilidade, frente a estes agentes estressores (BRINI, 2004).

Em cães, essa sintomatologia também foi observada (O'BRIEN, apud OHNISHI; OHNISHI, 1994), bem como em perus (OWENS, MATTHEWS, SAMS, 2000b) e frangos (SANTOS *et al.*, 2006). Outras doenças musculares têm sido associadas com a HM, pela sintomatologia semelhante, como é o caso da miopatia de captura, síndrome desencadeada pelo estresse provocado pela captura de animais selvagens (ungulados e pássaros). Além disso, outros anestésicos voláteis também podem desencadear o quadro em suínos como o isoflurano e sevoflurano e o anestésico local lidocaína; além de outras substâncias como a succinilcolina (relaxante muscular despolarizante de membranas) (HARRISON, apud OHNISHI; OHNISHI, 1994).

A succinilcolina foi usada por Cavitt *et al.* (2004) em frangos para verificar a sua influência no desenvolvimento de carnes PSE em aves consideradas halotano positivas. Entretanto, este procedimento não funcionou como um teste previsivo do desenvolvimento de carnes PSE.

Dessa maneira, outros estudos envolvendo halotano foram desenvolvidos para verificar a possibilidade deste anestésico ser usado como um possível teste seletivo para identificar animais propensos a síndromes de estresse e ao desenvolvimento de carnes PSE. Owens *et al.* (2000a) avaliaram a habilidade do teste do halotano em identificar perus sensíveis ao estresse. Aproximadamente 10% dos animais testados apresentaram rigidez muscular, e o halotano se mostrou um bom identificador dos animais mais suscetíveis ao estresse (no caso, as aves sofreram estresse térmico) e que apresentam um desenvolvimento de rigor mais acelerado. Carnes com características PSE foram encontradas em 47% dos perus considerados halotano positivos, o que sugere que cerca de metade das carnes pálidas encontradas no estudo são provenientes de perus que apresentam algum defeito na proteína que forma o canal de cálcio (RyR).

Soares *et al.* (2007) também verificaram que 13,6% dos frangos de linhagem comercial demonstravam reação ao halotano, sendo que 42,1% desses animais reativos produziram carnes PSE.

Verificado que as aves também apresentam reação ao halotano, e sabendo-se de que em suínos, essa sensibilidade ao halotano era indicativa de uma mutação no RYR1 em 95% dos animais que apresentavam a sintomatologia de HM quando expostos ao anestésico (FUJII *et al.*, 1991; MACLENNAN; PHILLIPS, 1992), aventou-se então, a possibilidade de usar o teste do halotano nesta pesquisa como uma possível ferramenta para selecionar amostras que teriam mais chances de apresentarem alguma alteração que levasse a dados mais concretos neste aspecto, em frangos.

3.6 ESCOLHA DA REGIÃO DE ESTUDO

O receptor de rianodina é uma molécula extremamente grande (~2,200 kDa), e o DNA que origina esta proteína em humanos tem cerca de 159 000 pares de base (pb), dividido em 106 exóns (~15 000 pb), sendo que dois deles, através de mecanismos de *splicing* alternativos do mRNA originam diferentes isoformas da proteína (MACLENNAN, 2000). Assim, o sequenciamento do gene ou transcrito inteiro se torna extremamente inapropriado neste momento para identificação de mutações que possam levar ao desenvolvimento de carnes PSE.

A RyR em sua porção citoplasmática é formada por quatro subunidades (de 565 kDa cada uma) que apresentam uma forma de quadrado, o que permite a sua identificação como “pés”, que são estruturas localizadas na junção entre o retículo sarcoplasmático e os túbulos T. Nessa região há uma associação muito próxima com regiões exteriores à membrana, onde se localiza uma outra molécula responsável pela contração muscular, que é o DHPR (FRANZINI-ARMSTRONG, 1994; PROTASI *et al.*, 2000; BRINI, 2004). A região do RyR que interage com o DHPR é a região N-terminal, cuja porção é formada por cerca de 4000 aminoácidos, enquanto a região C-terminal contém 1000 aminoácidos e forma os quatro domínios transmembrana (M1, M2, M3 e M4) dessa proteína (SUTKO; AIREY, 1996; BRINI, 2004). Um modelo esquemático dessa grande região N-

terminal pode ser observado nas Figuras 5 e 6. Já os quatro domínios transmembrana estão esquematizados na Figura 5.

Um modelo molecular do RyR foi proposto por MacLennan (1990) (Figura 6). Como se pode observar, a região de junção dos túbulos T com o retículo sarcoplasmático é ocupada pela porção N-terminal do RyR, e é a região que interage com o DHPR. É na região N-terminal que se concentra as numerosas mutações do RYR1 em humanos com HM. Este fato também ocorre em suínos, o que torna essa região apta para pesquisa de mutações em outros animais (CHIANG *et al.*, 2004).

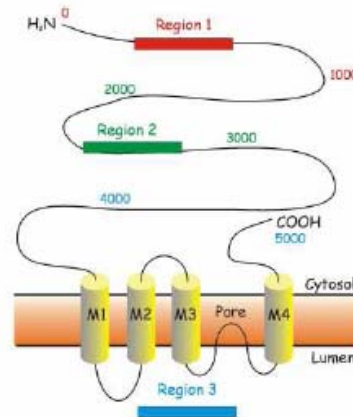


Figura 5 – Diagrama esquemático das regiões *hotspot* com diferentes mutações para RyR. Região 1: aminoácidos 0-1000; Região 2: aminoácidos 2000-3000; Região 3: aminoácidos 4000-5000. M1, M2, M3 e M4: domínios transmembrana.

Adaptado de: Brini (2004)

Essa região *hotspot* N-terminal está entre os aminoácidos 1 e 614 (região 1), mas além dessa, existem outras duas regiões que estão localizadas entre os aminoácidos 2162 e 2458 (região 2) e a região C-terminal, entre os aminoácidos 4800 e 4900 (região 3) (BRINI, 2004) (Figura 5). Estudos indicam que essas regiões são importantes domínios regulatórios, que controlam a sensibilidade do canal protéico às substâncias regulatórias e modulam a liberação de Ca²⁺ (STRASBURG; CHIANG, 2009).

Molecular Model of Ryanodine Receptor

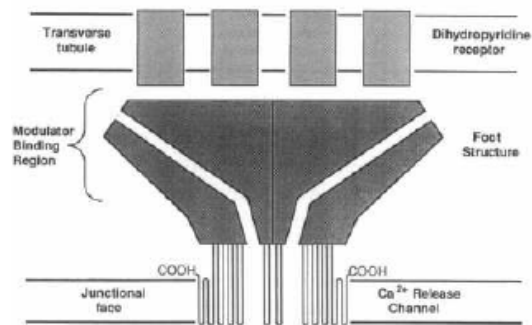


Figura 6 – Modelo molecular do receptor de rianodina.

Fonte: MacLennan (1990).

Chiang *et al.* (2004), trabalhando com perus, iniciaram a pesquisa fazendo um *screening* no cDNA de perus, no gene da α RYP, na região correspondente aos resíduos de aminoácido 36-615, região de mutação *hotspot* para o RYP1 humano, e identificaram três transcritos diferentes (localizados na região correspondente aos nucleotídeos #1231 – 1947, da sequência do cDNA do RYP1 humano). São eles: um com 717 pb, similar ao RYP1 de músculo esquelético de mamíferos; AS-81 com uma deleção de 81 bases no início do exon 13; e um terceiro, chamado de AS-193 que apresentou uma deleção de 193 bases, o que corresponde ao éxon 13 inteiro. Segundo os autores, a deleção ocorrida no α RYP parece afetar a interação entre o canal de cálcio e o DHPR, o que conseqüentemente afetaria a regulação da liberação de cálcio.

Ao se comparar o alinhamento das sequências do α RYP de frangos existentes no *GenBank*, (n^os de acesso: X95266, XM_424193, XM_428139, XM_427376) com a sequência completa do α RYP de perus (n^o de acesso: EU177005.1), verifica-se que a parte seqüenciada em frangos é referente ao final do mRNA. Sendo assim, é necessário que o início do gene seja seqüenciado, para verificar-se a existência de alterações na região que é *hotspot* para as outras espécies conforme pode ser observado na Figura 7.

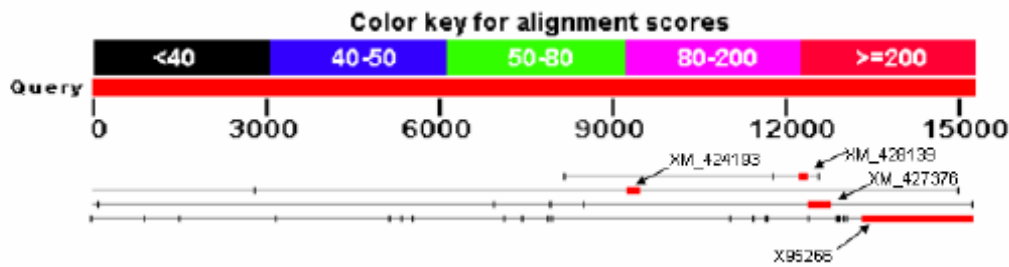


Figura 7 – Alinhamento das seqüências de mRNA α RYP de frangos disponíveis no *GenBank* (X95266, XM_424193, XM_428139, XM_427376) com o mRNA da α RYP de perus *lquery* (EU177005.1) ilustrando a ausência de seqüências referentes ao início do gene.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

3.7 MUTAÇÕES DETECTÁVEIS

Considerando que a região estudada é passível de mutações, e que essas causam um grande impacto fisiologicamente, faz-se necessário verificarmos quais as alterações de nucleotídeos seriam possíveis de detectarmos:

- Mutação de ponto ou substituição: é quando ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro.
- Inserção: é a adição de um ou mais nucleotídeos na seqüência.
- Deleção: caracteriza-se pela remoção de um ou mais nucleotídeos (BROWN, 1999).

Essas alterações podem ou não levar à alteração dos aminoácidos, e essa possibilidade é de verificação mais simples quando se trabalha com mRNA, pois esta molécula só contém os éxons que irão codificar a proteína, graças a retirada dos íntrons pelo processamento através do *splicing*. Se a mutação for uma substituição do nucleotídeo na terceira posição do códon, haverá alteração do códon, mas não necessariamente do aminoácido devido à redundância do código genético; essa é a chamada mutação silenciosa. Trocando-se os nucleotídeos das primeiras e segundas posições, na maioria das vezes haverá a troca do aminoácido. Isso também acontece em alguns casos quando a troca ocorre na terceira posição.

Entretanto, a ocorrência de um fenótipo mutante irá depender da função exata deste aminoácido na estrutura da cadeia polipeptídica (BROWN, 1999).

Um outro caso é o das mutações sem sentido. A mutação de ponto ocorrida leva a um códon especificador de um aminoácido para um códon finalizador da tradução. Com isso, temos um gene truncado que perderia um segmento no terminal carboxila (BROWN, 1999).

Quando se tem uma inserção ou deleção, a alteração existente é a mudança no quadro de leitura, já que a adição ou remoção de qualquer número de pares de bases que não seja um múltiplo de três faz com que o ribossomo leia um conjunto de códons totalmente novo adiante da mutação (BROWN, 1999). Esse tipo de mutação é denominado *nonsense*, já que a molécula de mRNA gerada não tem sentido, devido ao códon de terminação prematura gerado e/ou da alteração do quadro de leitura. As proteínas resultantes são denominadas truncadas e na maioria das vezes não chegam a ser funcionais quando traduzidas. Para prevenir estes defeitos essas moléculas de mRNA alteradas não necessariamente chegarão à tradução devido a mecanismos existentes na célula (FRISCHMEYER; DIETZ, 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de obter-se o maior número possível de amostras positivas no teste do halotano, bem como amostras que desenvolveram PSE, o desenvolvimento deste trabalho envolveu a realização de quatro experimentos que serão detalhados a seguir.

4.1 EXPERIMENTO A

Realizado no mês de junho de 2007, o experimento ocorreu na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Teve como objetivo detectar a sensibilidade ao halotano e sua relação com o desenvolvimento de carnes PSE, além da coleta de amostras para as análises genéticas.

4.1.1 ANIMAIS

Frangos machos de linhagem comercial (N=352) foram criados de acordo com os métodos tradicionais até a idade de 44 dias, quando foram então submetidos ao teste do halotano.

4.1.2 Teste do Halotano

Os frangos, em número de três animais por vez, foram colocados em uma estrutura construída exclusivamente para isso, onde se encaixa a cabeça das aves em um recipiente fechado e o halotano circula graças ao auxílio de um aparelho de anestesia que vaporiza o anestésico numa mistura com oxigênio (Figura 8)

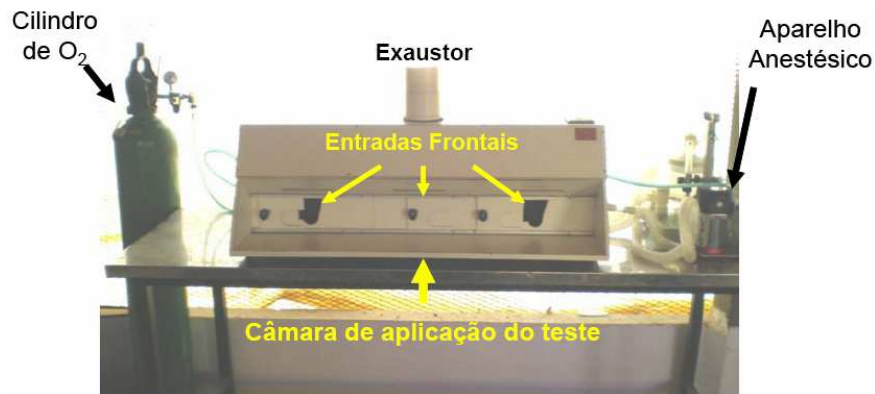


Figura 8 – Aparato utilizado para o teste do halotano

Fonte: Marchi (2008)

Os frangos eram expostos a uma atmosfera de 3% de halotano (GUIMARÃES; MORAES, 2000) com um fluxo de 6L/minuto, durante 5 minutos e ao final do tempo eram avaliados quanto à rigidez muscular nos membros pélvicos por 3 julgadores aleatórios e um julgador fixo (Figura 9). Animais com as pernas enrijecidas eram considerados reativos ao halotano e classificados com HAL+, já os que não exibiam essa rigidez e os membros mantinham-se flácidos eram considerados não reativos e classificados como HAL-.



Figura 9 – Aves submetidas ao teste do halotano e as respostas observadas: A) e B) Aves com enrijecimento muscular provocado pelo halotano; C) Ave sem reação ao halotano.

4.1.3 Abate

Após quarenta e oito horas da realização do teste do halotano, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de aproximadamente 10 horas e abatidos para a coleta das amostras. Neste experimento não foi aplicado nenhum tipo de estresse pré-abate.

Separou-se aleatoriamente 22 animais, sendo 12 considerados Positivos ao teste do halotano e 10 animais Negativos para que fosse realizado o abate e a posterior coleta de material para as análises moleculares.

Após a coleta das amostras, os frangos seguiam um fluxo de abate tradicional e ao final, o peito era coletado e mantido sob refrigeração (4 °C) por 24 horas, para as análises classificatórias de PSE, segundo Soares *et al.* (2002).

4.1.4 Coleta de amostra para as análises moleculares

Realizou-se a coleta de amostras de peito (*Pectoralis major*) do lado direito, dentro de cinco minutos após o abate. As amostras eram armazenadas em microtubos (com um furo na tampa para evitar o estouro) devidamente identificados, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas congeladas a – 80 °C para as extrações de RNA total.

4.2 EXPERIMENTO B

Realizado no mês de agosto de 2007, este experimento envolveu uma parceria com a Universidade de São Paulo, campus Pirassununga (FEZEA/USP, Pirassununga, SP).

4.2.1 Animais

Foram utilizados bisavôs machos (N=298), da linhagem fêmea, os quais foram criados até os 42 dias de idade por uma empresa situada no estado de Minas Gerais, até a realização do teste do halotano, realizado na unidade experimental da Universidade de São Paulo (USP), campus Pirassununga, SP (FEZEA).

Este experimento teve como objetivo coletar amostras de aves que demonstraram sensibilidade ao halotano (enrijecimento dos membros inferiores) além das amostras de aves que se comportaram normalmente frente ao halotano (relaxamento) e verificar sua relação com o desenvolvimento de carnes PSE.

4.2.2 Teste do Halotano

Os animais foram submetidos ao teste da mesma maneira descrita no item 4.1.2, bem como a sua classificação.

4.2.3 Abate

No mesmo dia em que se realizou o teste do halotano, também ocorreu o abate dos frangos (N=17), sendo 7 deles positivos no teste e 10 animais negativos. Neste experimento não foi aplicado nenhum tipo de estresse pré-abate.

O abate seguiu os procedimentos normais de uma planta comercial, exceto pelo fato das aves terem sofrido um jejum alimentar de aproximadamente 24 h. devido a problemas logísticos ocorridos no transporte.

O ponto de coleta para as análises genéticas era exatamente após a passagem das aves pelo túnel de sangria e procedeu-se conforme o descrito no item 4.1.4.

4.3 EXPERIMENTO C

Realizado no mês de dezembro de 2007, o experimento ocorreu na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina.

O objetivo aqui era apenas verificar se o halotano funcionaria como um agente estressor, e comparar sua ação ou sinergia com o estresse térmico que também foi provocado, no desenvolvimento de carnes PSE

4.3.1 Animais

Frangos, machos de linhagem comercial, (N=18) foram criados de acordo com os métodos tradicionais até a idade de 44 dias, quando foram então submetidos ao teste do halotano.

4.3.2 Exposição do Halotano

O halotano foi aplicado da mesma maneira descrito no item 4.1.2, e nos outros experimentos, entretanto as aves não foram avaliadas quanto à sensibilidade. Das aves expostas ao anestésico (n=10), quatro delas foram abatidas imediatamente após o teste, e as seis restantes foram levadas imediatamente para a câmara de estresse térmico.

4.3.3 Estresse Térmico

O estresse térmico foi produzido da seguinte maneira: até seis aves eram colocadas em um compartimento fechado com temperatura regulada para

35°C, e assim foram mantidas por 1 hora, e ao término deste período foram imediatamente abatidas.

Para verificar a ocorrência de sinergia entre halotano e estresse térmico, seis aves que foram submetidas ao halotano, foram adicionalmente submetidas ao estresse.

Com o objetivo de verificar apenas o efeito do estresse térmico, cinco aves que não foram expostas ao halotano, foram submetidas ao estresse térmico.

4.3.4 Abate

O abate foi realizado na Fazenda Escola da UEL.

As aves que passaram pelo estresse halotano (n=4) foram abatidas logo em seguida a exposição ao agente.

As aves que passaram pelo estresse térmico ou halotano+estresse térmico também foram abatidas logo em seguida a suspensão do agente estressor final.

As aves não estressadas termicamente e não expostas ao halotano foram abatidas aleatoriamente e a coleta de material ocorreu da mesma maneira descrita no item 4.1.4.

4.4 EXPERIMENTO D

O seguinte experimento foi realizado em fevereiro de 2008, em uma granja da empresa Big Frango, no município de Rolândia -PR.

Teve como objetivo detectar a sensibilidade ao halotano e sua relação com o desenvolvimento de carnes PSE e a aplicação de estresse térmico, além da coleta de amostras para as análises genéticas.

4.4.1 Animais

As aves (N=201) eram de linhagem comercial e estavam com 43 dias de idade no momento em que foram submetidas ao teste, e 45 dias de idade no momento do abate.

4.4.2 Teste do Halotano

Os animais foram submetidos ao teste da mesma maneira descrita no item 4.1.2, bem como a sua classificação.

4.4.3 Estresse Térmico

O estresse térmico foi promovido da mesma maneira descrita no item 4.3.3, sendo que no máximo seis animais eram colocados na câmara, sob temperatura de 35 °C e ali mantidos por 1 hora e logo em seguida abatidos

Dentro do grupo halotano positivo (N=15), 8 aves foram submetidas ao estresse térmico. No grupo negativo (N=3), apenas 2 aves foram submetidas ao estresse térmico.

4.4.4 Abate

O abate foi realizado manualmente, 48 horas após o teste do halotano, na própria granja e não houve restrição alimentar nem o resfriamento da carcaça logo após o abate (*chiller*).

A coleta de amostras para as análises genéticas foi realizada de acordo com o descrito no item 4.1.4.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram identificadas da seguinte maneira:

- 1ª letra: Refere-se ao experimento em questão (A, B, C, ou D).
- 2ª letra: Refere-se a resposta ou a exposição ao halotano (P= Hal positivo, N= Hal negativo; H= exposto ao halotano, N= não exposto ao halotano – conforme o experimento em questão)
- 3ª e 4ª letras: Referem-se a aplicação de estresse térmico quando houver (ET)
- Número: Identificador da amostra

Exemplo: Amostra DPET2 = amostra número 2 referente ao experimento D, positiva ao halotano e submetida a estresse térmico.

4.6 ANÁLISES DE QUALIDADE DE CARNE

Todas as amostras coletadas dos Experimentos A, B, C, e D foram submetidas à análise de cor, com o objetivo de se determinar sua classificação como carnes PSE ou normal, conforme já padronizado por SOARES *et al.* (2002).

4.6.1 Análises de cor do músculo *Pectoralis major*

Esta análise foi realizada 24 horas após o abate e os filés de peito de frango eram mantidos sob refrigeração a 4 °C durante esse período.

As medidas de cor foram realizadas na face ventral do filé de peito, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra e o resultado final como a média desses três valores. A medida de cor foi feita utilizando o colorímetro Minolta[®]

CR400 iluminante D65 e ângulo de visão de 10°. Os valores de luminosidade L^* , foram expressos no sistema de cor CIELAB.

Como o critério de classificação de carnes PSE escolhido foi o valor de L^* , filés com valores de $L^* > 53$ foram classificados como PSE; valores de $L^* < 44$ como análogo ao DFD e com valores intermediários $44 \leq L^* \leq 53$, como normal (SOARES *et al.*, 2002).

4.7 ANÁLISES MOLECULARES

Todas as amostras que foram coletadas conforme descrito no item 4.1.4 foram submetidas às seguintes análises:

4.7.1 Extração de RNA total

A presente análise foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP, na cidade de Piracicaba-SP. Inicialmente foi realizada a extração do RNA total, usando o reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). O precipitado de RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 20 μ L de H₂O DEPC para posterior determinação da concentração por espectrofotometria, bem como determinação de integridade em eletroforese (gel de agarose 1 %).

4.7.2 cDNA

A presente análise foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP, na cidade

de Piracicaba-SP. O cDNA foi obtido através da transcrição reversa com *SuperScript III RNase H⁻Reverse Transcriptase* (Invitrogen; Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

Nesta etapa padronizou-se a produção do cDNA utilizando-se 2µg de RNA total na reação, de forma que os cDNA produzidos teriam a mesma concentração.

As análises seguintes foram realizadas nas dependências da EMBRAPA-Soja, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, na cidade de Londrina – PR.

4.7.3 PCR a partir do cDNA

Os *primers* utilizados na reação foram os mesmo utilizados por Chiang *et al.* (2004) em perus (*Meleagris gallopavo*), com as seguintes sequências: 5'-CTG CAC CAG GAG GGC CAC ATG GAC GA-3' (direto) e 5'-CGG TCC AGT TTG CTG ACC AGC CAG TCC AGG-3' (reverso).

A amplificação por PCR foi conduzida utilizando a enzima Platinum®*Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e a primeira fita de cDNA como molde. A amplificação consistiu de uma desnaturação a 95 °C por 2 min., seguido por 35 ciclos a: 95 °C por 30 s e 64,5 °C por 30 s, e 72 °C por 1 min, além de uma extensão final a 72 °C por 8 min. As concentrações dos reagentes podem ser observadas na tabela 1.

A confirmação da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose (TBE 1X – Tris, Ácido Bórico, EDTA) 1%. Os fragmentos amplificados foram cortados do gel e purificados utilizando-se o kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e os produtos de PCR purificados armazenados em *freezer* -20°C.

Tabela 1 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR.

<i>Reagente</i>	<i>Concentração</i>	<i>Volume</i>
MgCl ₂	50 mM	1,0 µL
dNTPs	10 mM	0,5 µL
<i>Primer forward</i>	10 µM	1,0 µL
<i>Primer reverse</i>	10 µM	1,0 µL
Tampão	10X	2,5 µL
Taq Polimerase	5 U/µL	0,2 µL
Água ultra-pura		15,8 µL
cDNA		3 µL
Vol. Final =		25 µL

4.7.4 Clonagem

Todos os produtos de PCR foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning® (Invitrogen) conforme especificações do fabricante e transformados usando células eletrocompetentes DH5α e DH10β. Após a eletroporação, realizada de acordo com protocolo descrito por Miller e Nickoloff (1995), os clones recombinantes foram isolados, e procedeu-se a extração plasmidial.

4.7.5 Preparação de plasmídeos em microplacas – Miniprep ABI3100-1

Os plasmídeos foram preparados de acordo com protocolo descrito no Anexo A deste trabalho.

4.7.6 Digestão plasmidial

Com o objetivo de verificar a inserção do fragmento, a digestão do plasmídeo foi conduzida utilizando-se a enzima *Eco* RI. Para a confirmação da

reação e visualização, o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%.

4.7.7 Sequenciamento

Os clones que confirmaram a presença de fragmento visualizado no gel de digestão plasmidial foram submetidos a PCR com os *primers* universais M13 e kit BigDye® Terminator v3.1. (*Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3100 (*Applied Biosystems*).

4.7.8 Análise das Sequências

Os cromatogramas foram analisados visualmente, base por base, e os contigs montados através do *ContigExpress* do programa Vector NTI Suite 8 (InforMax). Juntamente com os programas Vector Screen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), para remoção do vetor, e do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) para alinhamento global das amostras e obtenção das sequências consenso. As sequências de nucleotídeos obtidas foram convertidas em sequências preditas de aminoácidos através do programa Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>).

As amostras que apresentaram alterações foram submetidas a um resequenciamento para confirmação.

Após a confirmação das alterações, utilizou-se o programa SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant* -<http://sift.jcvi.org/>) para estimar os efeitos que as mutações teriam na estrutura da proteína, classificadas em: Toleráveis e Alteração da Função.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DO HALOTANO E CARNES PSE

Os dados de valor L^* e a classificação de PSE para todas as amostras coletadas nos experimentos estão disponíveis no Anexo B deste trabalho.

5.1.1 Experimento A

A relação das amostras coletadas e sequenciadas neste experimento e suas classificações podem ser observadas no Quadro 1 e na Figura 10.

Dados completos sobre a incidência de amostras positivas e negativas ao halotano bem como de carnes PSE neste experimento estão disponíveis no Anexo C deste trabalho (Adaptado de Marchi, 2008).

Tabela 2: Amostragem de 22 frangos machos, de linhagem comercial, com 44 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, e a produção de carnes PSE.

Tratamento	Nº de amostras coletadas	Hal+	Incidência PSE Hal +	Hal-	Incidência PSE Hal -
Teste do Halotano	22	12	83%	10	50%

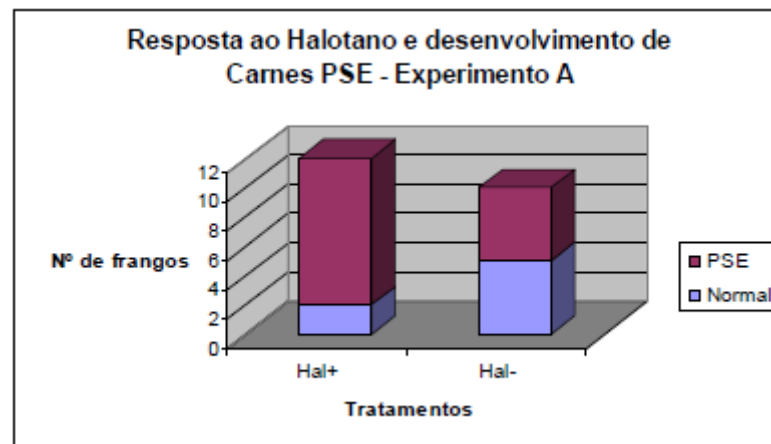


Figura 10 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 44 dias de idade coletadas no experimento A.

5.1.2 Experimento B

Neste experimento, a relação das amostras coletadas e suas classificações podem ser observadas a partir do Quadro 2 e da Figura 11.

Dados completos sobre incidência de amostras positivas e negativas ao halotano bem como de carnes PSE neste experimento estão disponíveis no Anexo C deste trabalho (Adaptado de Marchi, 2008).

Tabela 3 – Amostragem de 17 frangos machos, bisavózeiros, com 42 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL-) ao halotano, e a produção de carnes PSE. Experimento B

Tratamento	Nº de amostras coletadas	Hal+	Incidência PSE Hal +	Hal-	Incidência PSE Hal -
Teste do Halotano	17	7	0%	10	20%

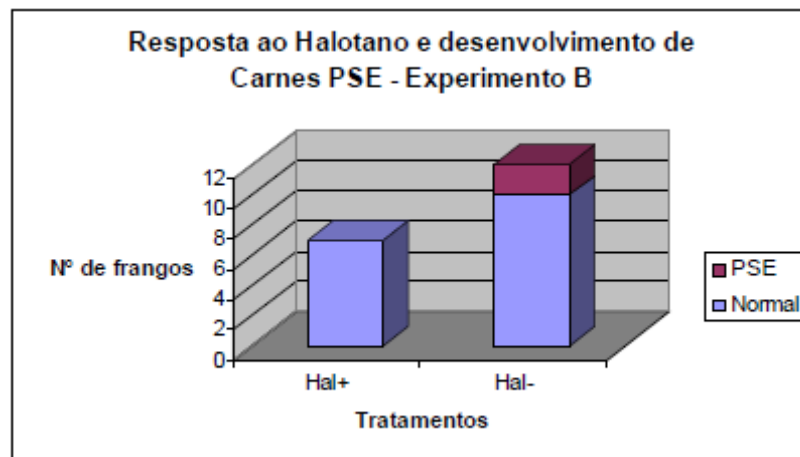


Figura 11 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 42 dias de idade coletadas no experimento B.

5.1.3 Experimento C

Conforme já relatado no item 4.3, neste experimento não foi realizado o teste do halotano. O objetivo aqui era apenas verificar se o halotano funcionaria como um agente estressor, bem como o estresse térmico aplicado. O halotano foi aplicado da mesma maneira que no teste, entretanto as aves não foram avaliadas quanto à sensibilidade. Assim, as aves que passaram pelo halotano foram abatidas logo em seguida bem como as aves submetidas ao estresse térmico.

A relação das amostras coletadas e suas classificações podem ser observadas no Quadro 3 e na Figura 12.

Tabela 4 – Amostragem de 18 frangos machos, de linhagem comercial com 44 dias de idade, expostos e não expostos ao halotano e ao estresse térmico, e a produção de carnes PSE dentro destes grupos. Experimento C.

Tratamentos	Nº de amostras coletadas	Expostas ao Hal.	Incidência PSE Exp. Hal	Não-expostas ao Hal	Incidência PSE Não Exp. Hal
Expostas ao Halotano	18	10 (H)	50%	8 (N)	33,3%
Estresse térmico	11	6 (HET)	66,6%	5 (NET)	60%

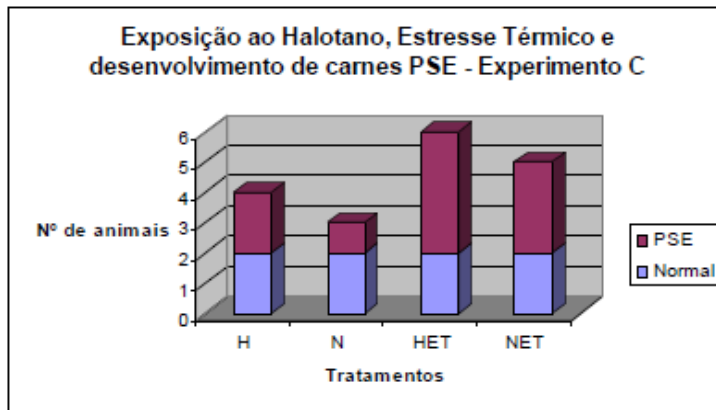


Figura 12 – Correlação da exposição ao halotano, ao estresse térmico e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 44 dias de idade coletadas no experimento C. (H= exposto ao halotano, N= não exposto, HET= exposto ao halotano + estresse térmico, NET= Não exposto ao halotano + estresse térmico).

5.1.4 Experimento D

Neste experimento, a relação das amostras coletadas e suas classificações podem ser observadas no Quadro 4 e na Figura 13.

Dados sobre incidência de amostras positivas e negativas ao halotano bem como do efeito do estresse térmico e o desenvolvimento de carnes PSE neste experimento estão disponíveis no Anexo C deste trabalho.

Tabela 5 – Amostragem de 18 frangos com 45 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL-) ao halotano, expostos ao estresse térmico, e a produção de carnes PSE dentro destes grupos. Experimento D.

Tratamentos	Nº de amostras coletadas	Hal+	Incidência PSE Hal +	Hal-	Incidência PSE Hal -
Teste do Halotano	18	15 (Hal+)	85,7%	3 (Hal-)	100%
Estresse térmico (ET)	10	8 (Hal+ET)	100%	2 (Hal-ET)	100%

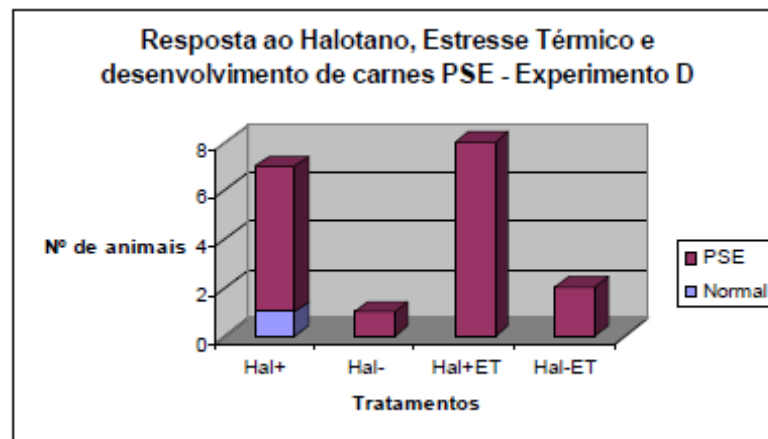


Figura 13 – Correlação da resposta ao halotano (Hal+/-), ao estresse térmico (ET) e o desenvolvimento de carnes PSE referente às amostras de peito de frango com 45 dias de idade coletadas no experimento D.

5.2 ANÁLISES MOLECULARES

5.2.1 Análise da Integridade do RNA Total

Para iniciarem-se as análises moleculares, procedeu-se à extração do RNA a partir do músculo do peito coletado durante os experimentos. Para avaliar a qualidade da extração foi feita a quantificação das amostras bem como a confirmação da integridade do RNA total. Uma amostra de RNA íntegra deve apresentar duas bandas bem definidas que equivalem aos RNAs ribossômicos 28S e 18S. Amostras de boa qualidade devem apresentar a banda correspondente ao rRNA 28S com o dobro de tamanho em comparação com a banda do rRNA 18S. Pode-se ainda observar uma terceira banda, que não necessariamente será tão definida quanto as outras, mas é correspondente aos rRNAs 5S e 5,8S. A falta de uma das bandas de rRNA significa que a amostra sofreu degradação e não serve para a continuidade das análises (REGITANO; COUTINHO, 2001). A integridade do RNA extraído e também a presença das bandas estruturais de RNA (28 S, 18 S, 5,0 e 5,8 S) podem ser observados na Figura 14.

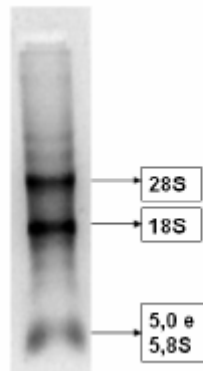


Figura 14 – RNA Total após eletroforese em gel de agarose 1%. As setas indicam as bandas estruturais de RNA ribossômico.

5.2.2 Amplificação da Região *Hotspot*

Após a extração do RNA total e a obtenção do cDNA, realizou-se a amplificação do fragmento *hotspot* para mutações do gene em estudo.

Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados através de luz ultravioleta, conforme pode ser observado na Figura 15. Todas as amostras apresentaram o mesmo tamanho de fragmentos amplificados (~600 pb).

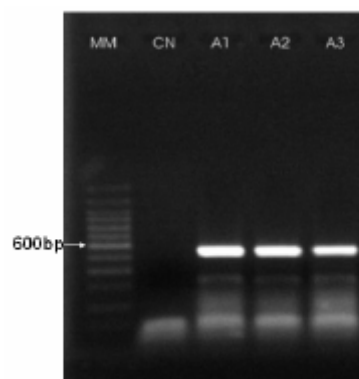


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1%. MM: Marcador de peso molecular 100pb, CN: Controle Negativo, A1, A2: amostras positivas ao halotano, A3: amostra negativa ao halotano

5.2.3 Digestão Plasmidial

Com o intuito de confirmar a presença de insertos nos clones, foi realizado a digestão plasmidial. Como exemplo, será usada a amostra AN10, onde estão evidenciados quatro clones em que se procedeu a extração plasmidial e observou-se que apenas dois deles realmente continham o fragmento (Figura 16). Entretanto, nas amostras que continham o fragmento há uma ligeira diferença de tamanho entre as bandas (A1 e B1), situação esta que nos levou a sequenciar ambos os clones para verificar se haveria uma possível diferença na sequência.

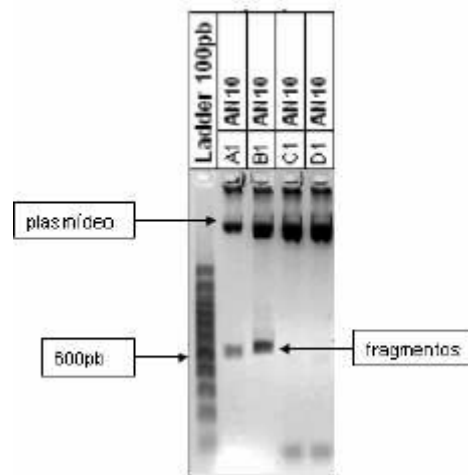


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à reação de digestão do produto da extração plasmidial.

Outras amostras apresentaram essa diferença de tamanho entre os produtos de digestão de diferentes clones provenientes de um mesmo indivíduo.

Outro fato interessante observado nesta etapa foi que uma mesma amostra apresentou clones com insertos de mesmo tamanho, contudo com sequências de nucleotídeos diferentes (AP12, BN10).

5.3 ANÁLISE DOS SEQUENCIAMENTOS

A sequência obtida neste estudo, quando comparada as outras seqüências de α RyR de frangos disponíveis no *GenBank*, através do alinhamento utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), tomando como base a sequência completa deste gene em peru (Nº de acesso: EU177005.1) mostra que realmente detectou-se a região inicial do gene, (N-terminal) conforme esperava-se (Figura 17).

Esta sequência foi comparada com demais seqüências disponíveis no *GenBank* através da ferramenta BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Conforme esperado, o grau de identidade entre a proteína predita do fragmento de frango encontrado e da α RyR de peru foi de 97%, demonstrando que a sequência encontrada realmente codifica esta proteína. Com as espécies de mamíferos o grau de identidade verificado foi menor: 75% com RyR1 de camundongo, rato, cão e 74% com o RyR1 de coelho, cavalo, boi, suíno e humano (Figura 18).

O alinhamento global de todas as seqüências obtidas neste trabalho podem ser visualizados nos Anexos F (nucleotídeos) e G (proteínas).

A sequência de frangos obtida foi depositada no *GenBank* e recebeu o número: GQ337080; sendo definida como controle por não apresentar variações nos nucleotídeos quando se comparou com todas as seqüências conseguidas neste trabalho e por se mostrar mais frequente entre os indivíduos (41,3%).

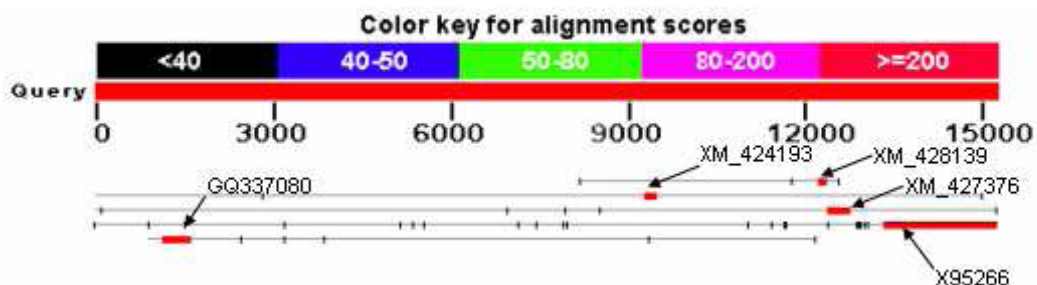


Figura 17 – Alinhamento entre as seqüências de α RyR de frangos disponíveis no *GenBank* (XM_424193, XM_428139, XM_427376, X95266) e a nova seqüência (GQ337080), com base na seqüência completa do gene de peru (EU177005.1).

P11716_coe1ho	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAILHQEGHMDDALFLTRCQEEES	398
NP_000531_humano	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAMLHQEGHMDDALSLTRCQEEES	397
AAA31119_suino	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAILHQEGHMDDALSLTRCQEEES	398
ABC46714_equino	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAMLHQEGHMDDALSLTRCQEEES	394
NP_033135_rato	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAMLHQEGHMDDALSLTRCQEEES	399
AAL09307_cao	QHVASGLWLTYAAPDPKALRLGVLKKKAMLHQEGHMDDALSLTRCQEEES	334
ABY50125_peru	QHAASGLWLTYAADTKALRLGLMKRRPILHQEGHMDDALSLSRSQEEES	397
GQ337080_frango	-----ALSLSRSQEEES	12
P11716_coe1ho	QAARMIHSTAGLYNQFIKGLDSFSGKPRGSGPPAGPALPIEAVILSLQDL	448
NP_000531_humano	QAARMIHSTAGLYNQFIKGLDSFSGKPRGSGPPAGTALPIEGVILSLQDL	447
AAA31119_suino	QAARMYSTAGLYNHFIKGLDSFSGKPRGSGAPAGTALPIEGVILSLQDL	448
ABC46714_equino	QAARMYSTAGLYNQFIKGLDSFSGKPRGSGPPAGTALPIEGVILSLQDL	444
NP_033135_rato	QAARMYSTAGLYNQFIKGLDSFSGKPRGSGPPAGSALPIEGVILSLQDL	449
AAL09307_cao	QAARMYSTAGLYNQFIKGLDSFSGKPRGSGPPAGTALPIEGVILSLQDL	384
ABY50125_peru	QAARMYSTAGLYGFSFIRSLDALSSRGRGGG-AGNAALPIAAVILSLRDL	446
GQ337080_frango	QAARMYSTAGLYGFSFIRSLDALSSRGRGGG-AGNAALPIAAVILSLRDL	61
P11716_coe1ho	IGYFEPPEELQHEEKQSKLRSLRNRQSLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYT	498
NP_000531_humano	IIYFEPPEEDLQHEEKQSKLRSLRNRQSLFQEEGMLSMVLNCIDRLNVYT	497
AAA31119_suino	IGYFEPPEELQHEEKQSKLRSLRNRQSLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYT	498
ABC46714_equino	IGYMEPPSEELQHEEKQSKLRSLRNRQSLFQEEGMLALVLNCIDRLNVYT	494
NP_033135_rato	IGYFEPPEELQHEEKQTKLRSLRNRQSLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYT	499
AAL09307_cao	IGYFEPPEELQHEEKQSKLRSLRNRQSLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYT	434
ABY50125_peru	IAYFRAPHTELQHEQRQNRSLRSLRRRQDLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYS	496
GQ337080_frango	I GYFRAPHTELQHEQRQSRSLRSLRRRQDLFQEEGMLSLVLNCIDRLNVYS	111
P11716_coe1ho	TAAHFAEYAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRNCALFSTNLDWV	548
NP_000531_humano	TAAHFAEFAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRSNCALFSTNLDWL	547
AAA31119_suino	TAAHFAEFAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRNCALFSTNLDWL	548
ABC46714_equino	TAAHFAEFAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFSTNLDWL	544
NP_033135_rato	TAAHFAEFAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFSTNLDWL	549
AAL09307_cao	TAAHFAEFAGEEAAESWKEIVNLLYELLASLIRGNRSNCALFSTNLDWL	484
ABY50125_peru	TAAHFAEFAGEEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFSTNLDWL	546
GQ337080_frango	TAAHFAEFAGEEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST-----	155

Figura 18 – Alinhamento global das proteínas RyR1 na região N-terminal, incluindo a nova sequência identificada: GQ337080. **Em vermelho**: alteração de aminoácido apresentada pela sequência de frango GQ337080 em relação à de peru ABY50125.

Em perus, os transcritos encontrados por Chiang *et al.* (2004) tinham 717 pb. Utilizando os mesmos *primers*, obtivemos fragmentos de 468 pb. Entretanto, fazendo um alinhamento entre as sequências de nucleotídeos da α RyR completa de peru (Nº de acesso: EU177005.1), do fragmento encontrado por Chiang *et al.* (2004) (Nº de acesso: AY372817.1), e do fragmento encontrado neste trabalho (Nº de acesso: GQ337080) observou-se que os *primers* estão exatamente no intervalo da sequência da α RyR de frangos. Embora não tenha sido possível detectar os *primers* em todas as amostras, todas as sequências consenso referentes ao α RyR de frangos estão neste intervalo (Figura 19).

R_YR_peru_parcial	-----ATTCTGCACCAGGAG	15
R_YR_peru	GCTGACACCAAAGCGCTGCGCCTGGGGCTGATGAAACGGAGGCCCATCTGCACCAGGAG	1140
R_YR_frango	-----	
R_YR_peru_parcial	GGCCACATGGACGACGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGCG	75
R_YR_peru	GGCCACATGGACGACGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGCG	1200
R_YR_frango	-----CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGCG	46

R_YR_peru_parcial	CGGATGATTACAGCACGGCGGGGCTCTACGGGAGCTTCATCCGGAGCCTGGACGCGCTG	135
R_YR_peru	CGGATGATTACAGCACGGCGGGGCTCTACGGGAGCTTCATCCGGAGCCTGGACGCGCTG	1260
R_YR_frango	CGGATGATTACAGCACGGCGGGGCTCTACGGGAGCTTCATCCGGAGCCTGGACGCGCTG	106

R_YR_peru_parcial	AGCTCTCGGGCCGCGGCGGGTGCAGGGAAACGCGGCTCTGCCCATCGCCGCGCTC	195
R_YR_peru	AGCTCTCGGGCCGCGGCGGGTGCAGGGAAACGCGGCTCTGCCCATCGCCGCGCTC	1320
R_YR_frango	AGCTCTCGGGCCGCGGCGGGTGCAGGGAAACGCGGCTCTGCCCATCGCCGCGCTC	166

R_YR_peru_parcial	CTCAGCCTCGGGATCTGATCGCTTATTTCCGCGCCCCGACACCGAGCTGCAGCAGGAG	255
R_YR_peru	CTCAGCCTCGGGATCTGATCGCTTATTTCCGCGCCCCGACACCGAGCTGCAGCAGGAG	1380
R_YR_frango	CTCAGCCTCGGGATCTGATCGCTTATTTCCGCGCCCCGACACCGAGCTGCAGCAGGAG	226

R_YR_peru_parcial	CAGCGCCAGAACCGCCTGCGCTCCTCGCGCCGCGCAGGACCTCTCCAGCAGGAGGGG	315
R_YR_peru	CAGCGCCAGAACCGCCTGCGCTCCTCGCGCCGCGCAGGACCTCTCCAGCAGGAGGGG	1440
R_YR_frango	CAGCGCCAGAACCGCCTGCGCTCCTCGCGCCGCGCAGGACCTCTCCAGCAGGAGGGG	286

R_YR_peru_parcial	ATGATCTCCCTGGTGTGAAGTGCATCGACCGGCTGAACGTGTACAGCACGGCCGCGCAC	375
R_YR_peru	ATGATCTCCCTGGTGTGAAGTGCATCGACCGGCTGAACGTGTACAGCACGGCCGCGCAC	1500
R_YR_frango	ATGATCTCCCTGGTGTGAAGTGCATCGACCGGCTGAACGTGTACAGCACGGCCGCGCAC	346

R_YR_peru_parcial	TTCGCCGAGTTCGCCGGGGAGGAGGGCGGCGCGCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTC	435
R_YR_peru	TTCGCCGAGTTCGCCGGGGAGGAGGGCGGCGCGCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTC	1560
R_YR_frango	TTCGCCGAGTTCGCCGGGGAGGAGGGCGGCGCGCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTC	406

R_YR_peru_parcial	TATGAGCTGCTGGCGTCTGATCCGGGGAAACGAACTGCGCCCTGTTCTCCACC	495
R_YR_peru	TATGAGCTGCTGGCGTCTGATCCGGGGAAACGAACTGCGCCCTGTTCTCCACC	1620
R_YR_frango	TACGAACTGCTCGGCTCGCTGATCCGGGGAAACGAACTGCGCGCTGTTCTCCACC	466

R_YR_peru_parcial	AACCTGGACTGGCTGGTCAAGCAACTGGACCGGCTGGAGGCGTCTGTCAGGGATCCTGGAG	555
R_YR_peru	AACCTGGACTGGCTGGTCAAGCAACTGGACCGGCTGGAGGCGTCTGTCAGGGATCCTGGAG	1680
R_YR_frango	AA-----	468
	**	
R_YR_peru_parcial	GTGCTTTACTGCGTCTGATCGAGAGCCCCGAGTTCTGAACATCATCCAGGAGAACCAC	615
R_YR_peru	GTGCTTTACTGCGTCTGATCGAGAGCCCCGAGTTCTGAACATCATCCAGGAGAACCAC	1740
R_YR_frango	-----	
R_YR_peru_parcial	ATCAAGTCCATCATCTCCCTGCTGGACAAAACAGGCCGCAACCATAAGGTCCTGGACGTG	675
R_YR_peru	ATCAAGTCCATCATCTCCCTGCTGGACAAAACAGGCCGCAACCATAAGGTCCTGGACGTG	1800
R_YR_frango	-----	
R_YR_peru_parcial	CTCTGCTCTCTGTGTCTGCAATGCTGTGGCCGTTCTGTTCC-----	717
R_YR_peru	CTCTGCTCTCTGTGTCTGCAATGCTGTGGCCGTTCTGTTCCCAACCAAAATCTCATCACC	1860
R_YR_frango	-----	

Figura 19 – Alinhamento global das sequências de α R_YR de perus e das sequências parciais de perus e frangos. N^{os} de acesso no GenBank: EU177005.1, AY372817.1, GQ337080 respectivamente. Os *primers* estão destacados em amarelo. O *primer* reverso teve sua sequência invertida para que fosse possível identificá-lo na sequência.

5.3.1 Experimento A

As sequências obtidas no experimento A que apresentaram alterações podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Identificação das amostras referentes ao experimento A que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações.

Amostra	Contigs
AN5	CGCGCTGTCGCA A CAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGGCGCGGATGATTTACAG 60
AP6	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGGCGCGGA C GATTTACAG 60
CONTROLE	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGGCGCGGATGATTTACAG 60
AP11	CACGGCGGGG-CTCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAGCTCTCGGGGCCG 119
AN10a	CACGGCGGGGG C GCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAGCTCTCGGGGCCG 120
CONTROLE	CACGGCGGGGGCTCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAGCTCTCGGGGCCG 120
AP4	TGGGG-CGGTGCGGGGAAACGCAGCTCTGCCATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA 179
AN5	TGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCT A CCCATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA 180
AN1	TGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA 179
AP2	TGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA 179
AP8	TGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCATCGCCGCCGTATCCTCAGCCT C CGGA 180
CONTROLE	TGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA 180
AP7	CCTGCGC C CCCTGCGGCGCCAGGACCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
AN4	CCTGCGCTCC C CGGGCGCCAGGACCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
AN6	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCAGGACCT C CCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
AN9	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCAGGACCTT C CGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
AP8	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCAGGACCTTCCAGCAGGAGGGGAT G A C CTCTCTGGT 300
CONTROLE	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCAGGACCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
AP12b	GCTG A GCTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
AN2	GCTGA A CTGCATCGACCG C CAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
AN1	GCTGA A CTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTCGC 359
AP2	GCTGA A CTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTCGC 359
CONTROLE	GCTGA A CTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
AP6	CGGGGAGG T GGCGGCCGCTCCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 420
AN5	CGGGGAGGCGGGCGCCGCT C CGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 420
AP4	CGGGGAGGCGGGCGCGCTCCTGGAT G GAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 419
AN10a	CGGGGAGGCGGGCGCCGCTCCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCT C ACGAACTGCTCGC 420
CONTROLE	CGGGGAGGCGGGCGCGCTCCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 420
AN10a	G CCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 468
AP10	GTCGCTGATCCGGGG-AACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 467
AN9	GTCGCTGATCCGGGGAAACCGCAC C ACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 468
AP3	GTCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCG C A C TGTTCTCCACCAA 468
AN5	GTCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCT A TTCTCCACCAA 468
AP6	GTCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCT A TTCTCCACCAA 468
CONTROLE	GTCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 468

Legenda: 1ª letra da sigla: Experimento em questão
 2ª letra da sigla: Reação ao halotano: P= positivo N=negativo
 Nucleotídeo em **vermelho**= Substituição
 Nucleotídeo em **azul**= inserção de fragmento
 Traço em **verde**= Deleção de nucleotídeo

Dois indivíduos, AN10 e AP12, apresentaram dois variantes de transcritos. Essa detecção de transcritos variantes em um mesmo indivíduo só foi possível graças à visualização do produto da digestão da extração plasmidial (ver item 5.2.3) e à seletividade da eletroforese em gel de agarose, que permitiu uma maior resolução da visualização dos insertos.

Duas amostras (AN1 e AP2) apresentaram uma mesma alteração: a deleção do nucleotídeo #151, uma citosina e a substituição de uma timina por uma citosina no nucleotídeo #352. As amostras AN5 e AP6 também apresentaram a substituição de uma guanina por uma adenina na posição #457.

O indivíduo AN10 apresentou nesta etapa fragmentos de tamanho diferente (Figura 16) e após o sequenciamento essa diferença de tamanho foi

confirmada e pode ser explicada pela inserção de 28 nucleotídeos em um de seus transcritos (AN10b) a partir do nucleotídeo #284 (Tabela 7). Este fragmento ficou então com um total de 496 nucleotídeos, bem diferente dos 468 usualmente encontrados. O transcrito AN10a foi alterado no nucleotídeo #72, onde uma timina foi trocada por uma guanina e nos nucleotídeos #407 e #422, trocando uma timina por uma citosina em ambos os casos.

Tabela 7 – Transcrito alterado com inserção de nucleotídeos detectado no experimento A. Amostra AN10.

Amostra	Contigs	
AN10b	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCGCCAGGACCTTTCCAGCAGGAGGTGCCGCCCCATAGCGC	300
CONTROLE	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCGCCAGGACCTTTCCAGCAGGAGG-----	284
AN10b	CTGTGGGGCGGGGATGATCTCTCTGGTGTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACA	360
CONTROLE	-----GGATGATCTCTCTGGTGTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACA	332
AN10b	GCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGCCGGGGAGGCGGCAGCCGCGTCCTGGAAGGAGA	420
CONTROLE	GCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGCCGGGGAGGCGGCAGCCGCGTCCTGGAAGGAGA	392

Legenda: Nucleotídeo em **vermelho**= Substituição
Nucleotídeo em **azul**= Inserção

Devido a artefatos possíveis de serem encontrados durante o sequenciamento, algumas amostras tiveram mais de um clone seqüenciado, o que revelou a existência de diferentes transcritos numa mesma amostra, como foi o caso do indivíduo AP12. Este indivíduo apresentou um transcrito normal (AP12a) e outro com uma alteração no nucleotídeo #306 (AP12b), onde uma adenina foi trocada por uma guanina, conforme pode ser observado na Tabela 6.

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram convertidas em seqüências preditas de aminoácidos através do programa Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) e utilizadas para alinhamento entre as amostras para visualizar as possíveis alterações (Tabela 8).

Variações nas seqüências de nucleotídeos podem ou não implicar em alterações na estrutura e função das proteínas. Com intuito de se verificar a consequência das variações encontradas nos nucleotídeos da seqüência α RYP de frangos e conseqüentemente na proteína, foi utilizado o programa SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant -<http://sift.jcvi.org/>). Este programa prevê se uma substituição de aminoácido afetará a função da proteína e se baseia na similaridade das seqüências e nas propriedades físicas dos aminoácidos. A partir das seqüências

de nucleotídeos e de aminoácidos alterados, tem-se a Tabela 9, que localiza as devidas alterações e faz previsões de seus efeitos na proteína, correlacionando com os dados de qualidade de carne e resposta ao halotano.

Tabela 8 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento A que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações.

Amostra	Tradução	
AN5	ALS H SRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
AP6	ALSLSRSQGEESQAAR T IYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
AN10a	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAG R YGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
CONTROLE	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
AP11	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAG STAASSGVWTR -----	34
AP4	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRG AVRG TQLCPSPSSSAFGT	60
AN1	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAAL PSPSSSAFGT	60
AP2	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAAL PSPSSSAFGT	60
AP7	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLR P RRRQDLFQQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AN4	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLR P RRRQDLFQQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AN6	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDL L QEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AN9	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDL F RQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AP8	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEG M TSLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AP12b	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVL S CIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AN2	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCIDR H NVYSTAAHFAEFA	120
CONTROLE	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
AN10b	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQE VPPHSACGAGDDL SGAELHRPPQRVQ	120
AN1	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSSRRG -----	95
AP2	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSSRRG -----	95
AP4	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSSRRG -----	95
AP6	GE V AAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN5	GE A AAAS R KKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN10a	GE A AAASWKEIVNLL H ELL P LIRGNRTNCALFST	155
AN9	GE A AAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRT D CALFST	155
CONTROLE	GE A AAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP10	GE A AAASWKEIVNLLYELLASLIR G T A P T A R C S P P	155
AN10b	HRRALR -----	126

Legenda: Aminoácido em **vermelho**: Substituição Sequência em **verde**= Alteração do quadro de leitura Traço em **azul**= Interrupção da tradução

Tabela 9 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento A, resposta ao halotano e qualidade de carne.

Amostra	Resp. ao Halotano	Qual. da carne	Alteração	Nucleot.	Prot.	Alteração	Efeito na proteína
AN5	Negativa	Normal	Substituição: T → A	#12	#4	L → H	Tolerável
			Substituição: G → A	#148			Sinônimo
			Substituição: T → C	#383	#128	W → R	Tolerável
			Substituição: G → A	#457			Sinônimo
AP6	Positiva	PSE	Substituição: T → C	#51	#17	M → T	Tolerável
			Substituição: T → C	#369	#123	A → V	Tolerável
AP11	Positiva	PSE	Deleção: G	#70	#24	L → S (AQL) (#34) IT	Truncada
AN10a	Negativa	PSE	Substituição: T → G	#72	#24	L → R	<i>Afeta a função</i>
			Substituição: T → C	#407	#136	Y → H	Tolerável
			Substituição: T → C	#422	#141	S → P	Tolerável
AP4	Positiva	PSE	Deleção: G	#126	#42	G → A (AQL) (#95) IT	Truncada
			Substituição: A → T	#387			
AN1	Negativa	Normal	Deleção: C	#151	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
			Substituição: T → C	#352			
AP2	Positiva	Normal	Deleção: C	#151	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
			Substituição: T → C	#352			
AP8	Positiva	PSE	Substituição: T → C	#175	#97	I → T	Tolerável
			Substituição: T → C	#291			Sinônimo
AP7	Positiva	PSE	Substituição: T → C	#248	#83	S → P	<i>Afeta a função</i>
AN4	Negativa	PSE	Substituição: T → C	#252	#84	L → P	<i>Afeta a função</i>
AN6	Negativa	Normal	Substituição: T → C	#271	#91	F → L	Tolerável
			Substituição: G → A	#457			Sinônimo
AN9	Negativa	PSE	Substituição: A → G	#276	#92	Q → R	Tolerável
			Substituição: A → G	#446	#149	N → D	Tolerável
AN10b	Negativa	PSE	Inserção de 28pb	#284	#95	G → V (AQL) (#126) IT	Truncada
AP12b	Positiva	PSE	Substituição: A → G	#306	#102	N → S	Tolerável
AN2	Negativa	Normal	Substituição: T → A	#321	#107	L → H	<i>Afeta a função</i>
AP10	Positiva	PSE	Deleção: G	#436	#146	N → T (AQL)	Truncada
AP3	Positiva	PSE	Substituição: G → A	#454			Sinônimo
AN3	Negativa	Normal	Sem alteração				
AN7	Negativa	PSE	Sem alteração				
AN8	Negativa	PSE	Sem alteração				
AP1	Positiva	PSE	Sem alteração				
AP12a	Positiva	PSE	Sem alteração				
AP9	Positiva	PSE	Sem alteração				
AP5	Positiva	Normal	Sem alteração				

Em negrito: amostras que apresentaram alteração na mesma posição de nucleotídeo.

Legenda: AQL – Altera o quadro de leitura

IT – Interrupção da tradução

5.3.2 Experimento B

As sequências obtidas no experimento B que apresentaram alterações podem ser visualizadas (Tabela 10), bem como as proteínas que foram alteradas (Tabela 11). A amostra BN10 apresentou dois variantes de transcritos, sendo que alterações de nucleotídeos do transcrito BN10a geraram uma proteína com estrutura primária alterada, enquanto que no transcrito BN10b essas alterações não se traduziram na proteína.

Tabela 10 – Identificação das amostras referentes ao experimento B que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações.

Amostra	Contigs	
BN10b	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGC	GGCGGGCGCGGATGATTTACAG 60
CONTROLE	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGGCGCGGATGATTTACAG	60
BP6	TGGGG-CGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCCATCGCCGCCGT	CATCCTCAGCCTTCGGGA 179
BN8	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCCATCGCCGCCGT	CATCCTCAGCCTCGGGA 180
CONTROLE	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCCATCGCCGCCGT	CATCCTCAGCCTTCGGGA 180
BN7	CCTCATCGGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGC	CAGCAGCAGCACCAGAGCCG 240
BN10a	CCTCATCGGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGC	CAGCAGCAGCAGCGC-AGAGCCG 239
CONTROLE	CCTCATCGGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGC	CAGCAGCAGCGCCAGAGCCG 240
BP4	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCGCCAGGACCTCTTCCAGCAGG	AGGGGATGATCTCTCTG-T 299
CONTROLE	CCTGCGCTCCCTGCGGCGCCGCCAGGACCTCTTCCAGCAGG	AGGGGATGATCTCTCTGGT 300
BN4	GCTGAAGTGC	TGCACCGCTCAACGTGTACAGCACCCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
BN8	GCTGAAGTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCCGCCG	CAGTTCAGTTCGC 360
CONTROLE	GCTGAAGTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCCGCCG	CAGTTCGC 360
BP1	CGGGGAGGCGGGCGCCGCGTCTGGAAGGAGATCGTCAACCT	CCTCTACGAACTGCTCC 420
CONTROLE	CGGGGAGGCGGGCGCCGCGTCTGGAAGGAGATCGTCAACCT	CCTCTACGAACTGCTCGC 420
BP6	GTCGCTGACCCGGGGAAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCT	CACCAA 467
CONTROLE	GTCGCTGATCCGGGGAAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCT	CACCAA 468

Legenda: 1ª letra da sigla: Experimento em questão
 2ª letra da sigla: Reação ao halotano: P= positivo N=negativo
 Nucleotídeo/aminoácido em **vermelho**= Substituição
 Traço em **verde**= Deleção de nucleotídeo

Tabela 11 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento B que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações.

Amostra	Tradução	
BN8	ALSLSRSQGEESQAARMYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSPRD	60
CONTROLE	ALSLSRSQGEESQAARMYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
BP6	ALSLSRSQGEESQAARMYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGAVRGTQLCPSPSSSAFGT	60
BN7	LIGYFRAPHTELQHEQHQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCDRLNVYSTAAHFAEFA	120
BN4	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCVDRLNVYSTAAHFAEFA	120
BN8	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCDRLNVYSTAAHTEFA	120
CONTROLE	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCDRLNVYSTAAHFAEFA	120
BP4	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISL-----	101
BN10a	LIGYFRAPHTELQHEQRAACAPCGAARTSSRRG-----	95
BP6	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSRRG-----	95
BP1	GEAAAASWKEIVNLLYELLPSLIRGNRTNCALFST	155
CONTROLE	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155

Legenda: Aminoácido em **vermelho**: Substituição
 Sequência em **verde**= Alteração do quadro de leitura
 Traço em **azul**= Interrupção da tradução

A deleção no nucleotídeo #126 da sequência proveniente da amostra BP6 originou uma alteração no quadro de leitura com conseqüente surgimento de um *stop*-códon prematuro. No caso da amostra BP4, a deleção do nucleotídeo #299 apenas originou um *stop*-códon prematuro, sem que houvesse a alteração prévia do quadro de leitura. Assim, a partir das sequências de

nucleotídeos e de aminoácidos alterados e seus prováveis efeitos na proteína, além da resposta ao halotano e qualidade de carne, tem-se a Tabela 12.

Tabela 12 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento B, resposta ao halotano e qualidade de carne.

Amostra	Resp. ao Halotano	Qual. da carne	Alteração	Nucleot.	Prot.	Alteração	Efeito na proteína
BN10b	Negativa	Normal	Substituição: A → G	#39			Sinônimo
BP6	Positiva	Normal	Deleção: G Substituição: T → C	#126 #429	#42	G → A (AQL) (#95) IT	Truncada
BN8	Negativa	Normal	Substituição: T → C Substituição: G → A	#174 #350	#58 #117	L → P A → T	<i>Afeta a função</i> Tolerável
BN7	Negativa	Normal	Substituição: G → A	#231	#77	R → H	<i>Afeta a função</i>
BN10a	Negativa	Normal	Deleção: C	#233	#78	Q → R (AQL) (#95) IT	Truncada
BP4	Positiva	Normal	Deleção: G	#299	#100	V → C (IT)	Truncada
BN4	Negativa	Normal	Substituição: A → G	#311	#104	I → V	Tolerável
BP1	Positiva	Normal	Substituição: G → C	#419	#140	A → P	<i>Afeta a função</i>
BN2	Negativa	PSE	Sem alteração				
BN6	Negativa	Normal	Sem alteração				
BN1	Negativa	PSE	Sem alteração				
BN3	Negativa	Normal	Sem alteração				
BN5	Negativa	Normal	Sem alteração				
BN9	Negativa	Normal	Sem alteração				
BP2	Positiva	Normal	Sem alteração				
BP3	Positiva	Normal	Sem alteração				
BP5	Positiva	Normal	Sem alteração				
BP7	Positiva	Normal	Sem alteração				

Legenda: AQL – Altera o quadro de leitura
IT – Interrupção da tradução

5.3.3 Experimento C

As sequências obtidas no experimento C que apresentaram alterações podem ser visualizadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Identificação das amostras referentes ao experimento C que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações.

Amostra	Contigs
CHET3	CGCGCTGTCGCA C AGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGCGGGATGATTTACAG 60
CH1	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGG-CGAGGAGTCGCAGGCGGCGGGATGATTTACAG 59
CHET5	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGA A GAGTCGCAGGCGGCGGGATGATTTACAG 60
CHET6	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGCGGGATGATT-ACAG 59
CONTROLE	CGCGCTGTCGCTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGCGGCGGGATGATTTACAG 60
CNET3	CACGGCGGGGCTCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAG C CTCGGGGCCG 120
CN3	CACGGCGGGGCTCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAG C CTCGGGGCCG 120
CONTROLE	CACGGCGGGGCTCTACGGCAGCTTCATCCGGAGTCTGGACGCGCTGAGCTCTCGGGGCCG 120
CH2	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCGTCACTCAGCCTTCGGGA 179
CHET4	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCGTCACTCAGCCTTCGGGA 179
CONTROLE	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCATCGCCGCGTCACTCAGCCTTCGGGA 180
CN3	CCTGCGCTCCCTGCGGGCGCCAGGACCTCTT C TAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
CNET3	CCTGCGCTCCCTGCGGGCGCCAGGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGAT G TCTCTCTGGT 300
CONTROLE	CCTGCGCTCCCTGCGGGCGCCAGGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT 300
CHET6	GCTG G ACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 359
CN3	GCTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
CH2	GCTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTCGC 359
CHET4	GCTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTCGC 359
CONTROLE	GCTGAACTGCATCGACCGCCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTCGC 360
CH1	CG A GGAGGCGGCGCCGCTCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 419
CHET6	CGGG G GGCGGCGCCGCTCCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 419
CONTROLE	CGGGGAGGCGGCGCCGCTCCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC 420
CHET5	GTCGCTGATCCGGGGAAACCG G CCTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 468
CONTROLE	GTCGCTGATCCGGGGAAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA 468

Legenda: 1ª letra da sigla: Experimento em questão
 2ª letra da sigla: Exposição ao Halotano: H= exposto N=não exposto
 3ª e 4ª letra da sigla: ET= submetido a Estresse térmico
 Nucleotídeo/aminoácido em **vermelho**= Substituição
 Traço em **verde**= Deleção de nucleotídeo

Observa-se inicialmente o mesmo padrão de alteração nas amostras CH2 e CHET4 que foi encontrado nas amostras AN1 e AP2, provenientes do experimento

A. Tem-se uma deleção da citosina (nucleotídeo #151) e a substituição de uma timina por uma citosina no nucleotídeo #352. Dessa forma, apresenta-se novamente uma tabela com as proteínas que foram alteradas (Tabela 14).

Tabela 14 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento C que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações.

Amostra	Tradução	
CHET3	ALS H SRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
CNET3	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSP R GRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
CN3	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSP R GRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
CONTROLE	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
CH2	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALP SPPSSSAFGT	60
CHET4	ALSLSRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALP SPPSSSAFGT	60
CHET6	ALSLSRSQGEESQAARMI TARRGSTAASSGVWTR -----	34
CH1	ALSLSRSQ ARSRRRRG -----	16
CNET3	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGM V SLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
CONTROLE	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
CN3	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLF-----	91
CH2	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSRRG -----	95
CHET4	SSGISAPHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSSRRG -----	95
CHET5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGN R NCALFST	155
CONTROLE	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGN R TNCALFST	155

Legenda: Aminoácido em **vermelho**: Substituição
 Sequência em **verde**= Alteração do quadro de leitura
 Traço em **azul**= Interrupção da tradução

Pode-se observar na Tabela 14 que apenas uma amostra que não foi exposta ao halotano/estresse térmico apresentou alteração na proteína (amostra CN3, stop-códon prematuro). Todas as outras amostras alteradas sofreram algum tipo de estresse, seja halotano, térmico ou ambos.

A partir destes dados, uma nova tabela foi montada, considerando as variáveis: exposição ao halotano, aplicação de estresse térmico, qualidade de carne e os dados referentes às sequências obtidas.

Tabela 15 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento C, exposição ao halotano, estresse térmico e qualidade de carne.

Amostra	Exp. ao Halotano	Est. Térm.	Qual. da carne	Alteração	Nucleot.	Prot.	Alteração	Efeito na proteína
CHET3	Sim	Sim	Normal	Substituição: T → A	#12	#4	L → H	Tolerável
CH1	Sim	Não	Normal	Deleção: G Substituição: G → A	#27 #363	#9	G → A (AQL) (#16) IT	Truncada
CHET5	Sim	Sim	PSE	Substituição: G → A Substituição: A → G	#31 #443	#148	T → A	Sinônimo Tolerável
CHET6	Sim	Sim	PSE	Deleção: T Substituição: A → G Substituição: A → G	#56 #305 #366	#19	Y → T (AQL) (#34) IT	Truncada
CNET3	Não	Sim	Normal	Substituição: T → C Substituição: A → G	#110 #290	#37 #97	S → P I → V	Tolerável Tolerável
CN3	Não	Não	Normal	Substituição: T → C Substituição: T → C Substituição: C → T	#110 #275 #344	#37 #91	S → P IT	Tolerável Truncada
CH2	Sim	Não	Normal	Deleção: C Substituição: T → C	#151 #352	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
CHET4	Sim	Sim	PSE	Deleção: C Substituição: T → C	#151 #352	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
CN2	Não	Não	Normal	Sem alteração				
CN1	Não	Não	PSE	Sem alteração				
CNET1	Não	Sim	PSE	Sem alteração				
CNET4	Não	Sim	PSE	Sem alteração				
CNET5	Não	Sim	PSE	Sem alteração				
CNET2	Não	Sim	Normal	Sem alteração				
CH3	Sim	Não	PSE	Sem alteração				
CH4	Sim	Não	PSE	Sem alteração				
CHET2	Sim	Sim	PSE	Sem alteração				
CHET1	Sim	Sim	Normal	Sem alteração				

Em negrito: amostras que apresentaram alteração na mesma posição de nucleotídeo.

Legenda: AQL – Altera o quadro de leitura
IT – Interrupção da tradução

5.3.4 Experimento D

As sequências obtidas no experimento D que apresentaram alterações podem ser visualizadas na Tabela 16. Nas amostras DPET1 e DPET2 deste experimento observou-se novamente um padrão de alterações encontradas anteriormente (AN1, AP2, CH2 e CHET4): a deleção da citosina (nucleotídeo #151) e a substituição de uma timina por uma citosina no nucleotídeo #351.

Tabela 16 – Identificação das amostras referentes ao experimento D que foram detectadas alterações de nucleotídeos e suas localizações.

Amostra	Contigs	
DPET8	CGCGCTGTCA ACT CAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGGCGGGATGATTTACAG	60
DP4	CGCGCTGT CG CTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGGCGGGATGATT C ACAG	60
DPET4	CGCGCTGT CG CTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGGCGGGATGATTT T CAG	60
CONTROLE	CGCGCTGT CG CTCAGCCGCTCGCAGGGCGAGGAGTCGCAGGGCGGCGGGATGATTTACAG	60
DPET1	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA	179
DPET2	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCC-ATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA	179
DNET2	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCCATCGCCGCCGTATCCT CG GCCTTCGGGA	180
CONTROLE	TGGGGGCGGTGCGGGGAACGCAGCTCTGCCCATCGCCGCCGTATCCTCAGCCTTCGGGA	180
DPET5	CCTCA CC GGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGCACGAGCAGCCAGAGCCG	240
DPET2	CCTCATCGGG C ATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGCACGAGCAGCCAGAGCCG	239
DP4	CCTCATCGGGTATT C CCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGCACGAGCAGCCAGAGCCG	240
DP3	CCTCATCGGGTATTTCCGCG CT CACACACGGAGCTGCAGCACGAGCAGCCAGAGCCG	240
DPET4	CCTCATCGGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGCAC A AGCAGCCAGAGCCG	240
CONTROLE	CCTCATCGGGTATTTCCGCGCCCCACACACGGAGCTGCAGCACGAGCAGCCAGAGCCG	240
DPET4	CC CGCGCTCCCTGCGGGCGCCGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT	300
DN1	CCTGCGCTCCCTG C AGCGCCGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT	300
DP5	CCTGCGCTCCCTGCGGGCGCCGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCT A GT	300
CONTROLE	CCTGCGCTCCCTGCGGGCGCCGACCTCTTCCAGCAGGAGGGGATGATCTCTCTGGT	300
DPET1	GCTGAACTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTTCGC	359
DPET2	GCTGAACTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCG C GAGTTTCGC	359
CONTROLE	GCTGAACTGCATCGACCGCTCAACGTGTACAGCACCGCCGCGCACTTCGCTGAGTTTCGC	360
DPET5	CC GGGAGGCGGGCGCCGCTCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC	420
CONTROLE	CGGGGAGGCGGGCGCCGCTCTGGAAGGAGATCGTCAACCTCCTCTACGAACTGCTCGC	420
DP1	GTCA CT GATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA	468
CONTROLE	GTCGCTGATCCGGGGGAACCGCACCAACTGCGCGCTGTTCTCCACCAA	468

Legenda: 1ª letra da sigla: Experimento em questão
 2ª letra da sigla: Reação ao halotano: P= positivo N=negativo
 3ª e 4ª letra da sigla: ET= submetido a Estresse térmico
 Nucleotídeo/aminoácido em **vermelho**= Substituição
 Traço em **verde**= Deleção de nucleotídeo

Abaixo, na Tabela 17, pode-se observar as proteínas originadas a partir dos contigs alterados.

Tabela 17 – Tradução predita das amostras referentes ao experimento D que foram detectadas alterações de aminoácidos e suas localizações.

Amostra	Tradução	
DPET4	ALSLRSQGEESQAARMI F STAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
DP4	ALSLRSQGEESQAARMI H STAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
DNET2	ALSLRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVIL L RD	60
CONTROLE	ALSLRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD	60
DPET1	ALSLRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALP SP SSSA F GT	60
DPET2	ALSLRSQGEESQAARMIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALP SP SSSA F GT	60
DPET5	L TGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
DP4	LIGY S RAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
DP3	LIGYFRAS H TEHQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
DPET4	LIGYFRAPHTELQ H KQRQSR P SLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
DN1	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
CONTROLE	LIGYFRAPHTELQHEQRQSRLRSLRRRQDLFQEGMISLVLNCIDRLNVYSTAAHFAEFA	120
DPET1	SSGIS APHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSS SSRRG -----	96
DPET2	SSGIS APHTRSCSTSSARAACAPCGAARTSS SSRRG -----	96
DPET5	RE AAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CONTROLE	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155

Legenda: Aminoácido em **vermelho**: Substituição
 Sequência em **verde**= Alteração do quadro de leitura
 Traço em **azul**= Interrupção da tradução

A partir dos dados das tabelas 16 e 17, montou-se uma outra tabela correlacionando estes resultados com a previsão do efeito dessas alterações na proteína, além da resposta ao halotano, aplicação de estresse térmico, qualidade de carne.

Tabela 18 – Correlação entre os resultados dos sequenciamentos das amostras do experimento D, resposta ao halotano, estresse térmico e qualidade de carne.

Amostra	Exp. ao Halotano	Est. Térm.	Qual. da carne	Alteração	Nucleot.	Prot.	Alteração	Efeito na proteína
DPET8	Positiva	Sim	PSE	Substituição: G → A	#10			Sinônimo
DP4	Positiva	Não	PSE	Substituição: T → C	#56	#19	Y → H	Tolerável
				Substituição: T → C	#195	#65	F → S	<i>Afeta a função</i>
DPET4	Positiva	Sim	PSE	Substituição: A → T	#57	#19	Y → F	Tolerável
				Substituição: G → A	#224	#75	E → K	Tolerável
				Substituição: T → C	#243	#81	L → P	<i>Afeta a Função</i>
DPET1	Positiva	Sim	PSE	Deleção: C Substituição: T → C	#151 #352	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
DPET2	Positiva	Sim	PSE	Deleção: C Substituição: T → C Substituição: T → C	#151 #191 #352	#51	I → S (AQL) (#95) IT	Truncada
DNET2	Negativa	Sim	PSE	Substituição: A → G	#170	#57	S → G	Tolerável
DPET5	Positiva	Sim	PSE	Substituição: T → C	#186	#62	I → T	<i>Afeta a Função</i>
				Substituição: G → C	#362	#121	G → R	Tolerável
DP3	Positiva	Não	PSE	Substituição: C → T	#203	#68	P → S	Tolerável
DN1	Negativa	Não	PSE	Substituição: G → A	#255	#85	R → Q	<i>Afeta a função</i>
DP5	Positiva	Não	PSE	Substituição: G → A	#298			Sinônimo
DP1	Positiva	Não	Normal	Substituição: G → A	#424			Sinônimo
DNET1	Negativa	Sim	PSE	Sem alteração				
DPET3	Positiva	Sim	PSE	Sem alteração				
DPET6	Positiva	Sim	PSE	Sem alteração				
DPET7	Positiva	Sim	PSE	Sem alteração				
DP6	Positiva	Não	PSE	Sem alteração				
DP7	Positiva	Não	PSE	Sem alteração				

Em negrito: amostras que apresentaram alteração na mesma posição de nucleotídeo.

Legenda: AQL – Altera o quadro de leitura

IT – Interrupção da tradução

6 DISCUSSÃO

A região do α RyR de frangos sequenciada neste trabalho apresentou similaridade com o domínio pfam 01365, o também denominado domínio RIH devido à homologia existente entre os receptores de rianodina e de Inositol Trifosfato (IP3R). É caracterizado como um domínio extracelular e pode fazer parte de dois tipos de canais de cálcio: o RyR e o IP3R (receptor de inositol 1,4,5 trifosfato) (SANGER INSTITUTE, 2009). Esse fato é confirmado por MacLennan (2000), em que o autor menciona a similaridade de algumas sequências existentes na região N-terminal (aminoácidos 1 – 614) do RyR1 com a região ligante do IP3R, que é um canal liberador de Ca^{2+} localizado no retículo endoplasmático e é ativado pelo IP3. Isso pode indicar que os aminoácidos de 1 – 614 formam um domínio regulatório no RyR no que se refere a ativação do canal pelo ligante (MACLENNAN, 2000).

Localizando a sequência de frangos dentro do gene RYR1 de humanos (nº de acesso no GenBank: NM_000540), esta compreende os exons 12-15, mais especificamente o intervalo dos nucleotídeos #1284-1755. Considerando o gene da α RyR de perus (nº de acesso no GenBank: EU177005.1), o intervalo começa no nucleotídeo #1155 e se estende até o #1622.

Procurando esta sequência no banco de dados do genoma do frango (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Index) não foi encontrada identidade com nenhuma sequência de RYR. Entretanto, no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), existe uma sequência genômica, que através de análises computacionais automatizadas (usando o programa GNOMON, que faz a predição de genes) identificou dois pequenos fragmentos que foram anotados como sendo parte do gene da α RyR. Esta sequência genômica foi obtida através do International Chicken Genome Sequencing Consortium, que sequenciou o genoma completo do frango. O genoma do frango foi seqüenciado a partir de uma linhagem pura denominada UCD001, que é derivada de uma população selvagem do Red Jungle Fowl da Malásia, nos anos de 1930. A ave utilizada era uma fêmea desta linhagem pura com o objetivo de minimizar a heterozigose e fornecer as sequências dos dois cromossomos sexuais, já que no frango, é a fêmea que é heterogamética, enquanto o macho é

homogamético (NCBI, 2009; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

Entretanto, não houve alinhamento entre as sequências de α RYRs de *Gallus gallus* disponíveis no GenBank (n^os de acesso: X95266, XM_424193, XM_428139, XM_427376) e a sequência encontrada neste trabalho, isso porque as sequências se encontram em partes diferentes deste gene (Figura 7). A sequência encontrada neste trabalho está entre os nucleotídeos #1155 – 1622, em relação ao gene da α RYR de perus (n^o de acesso: EU177005.1). Já as sequências disponíveis no GenBank, em comparação com o α RYR de perus (n^o de acesso: EU177005.1) localizam-se: #9204 – 9436 para XM_424193, #12150 – 12297 para XM_428139, #12300-12710 para XM_427376, e #13242-15153 mais 142 nucleotídeos para X95266, sendo esta última, o primeiro relato da sequência de α RYR em frangos por Ottini et al., 1996.

6.1 DETECÇÃO DE TRANSCRITOS VARIANTES

Os transcritos variantes em um mesmo indivíduo só foram possíveis de detectar graças à visualização do produto da digestão da extração plasmidial, conforme descrito no item 5.2.3 e relatado com maiores detalhes no item 5.3.1. Provavelmente, a detecção desses diferentes transcritos só foi possível nesta etapa porque enquanto a eletroforese dos produtos da PCR era feita em gel de agarose 1%, neste momento, para os produtos da digestão plasmidial, o gel utilizado era de agarose 1,2%, o que permitiu a melhor separação e visualização dos diferentes transcritos.

Outros transcritos, originados de outras alterações como substituições, deleções e uma inserção de nucleotídeos foram encontrados. Sua visualização foi possível durante o alinhamento com a sequência da amostra padrão (N^o de acesso: GQ337080) encontrada neste trabalho. Em revisão de literatura, depara-se com vários relatos como este, principalmente em humanos sendo que Brini (2004) afirma que até o momento, mais de 40 mutações missense foram detectadas em humanos para o RYR1. Já Yang et al. (2003), citam que 60 mutações missense e por deleções foram associadas com resultados anormais ao teste de

contratura muscular *in vitro* e/ou sinais clínicos de HM e CCD (Central Core Disease). Sambuughin et al. (2001), relataram em humanos com HM uma alteração numa região diferente da comumente diagnosticada. A alteração que levava ao desenvolvimento da condição era a deleção do aminoácido ácido glutâmico, na posição 2347 do gene RYR1. Além disso, indivíduos afetados também apresentavam um padrão de contração muscular alterado mesmo sem a presença de medicamentos. Isso foi verificado após a biópsia para realização do teste de contratura muscular (SAMBUUGHIN et al., 2001). Entretanto, anormalidades na função de liberação de Ca^{2+} do RS também foram indicadas mesmo na ausência de mutações no RYR1 sugerindo que talvez outros loci, possivelmente codificando proteínas acessórias à RyR1 podem estar envolvidas na origem do fenótipo de humanos com HM (YANG et al., 2003).

A origem de todas essas alterações é variada e envolve complexos mecanismos. Uma dessas vias que podem provocar a alteração de nucleotídeos é o *splicing* alternativo. Em humanos, o gene RYR contém 106 exons, e dois deles sofrem *splicing* alternativo no mRNA para originar diferentes isoformas da proteína (MACLENNAN, 2000). A detecção de *splicing* alternativo nos RYRs, particularmente em mamíferos, está condicionada ao tecido de localização e ao tipo da molécula, sendo que o RYR3 é o que mais se detecta vias de *splicing* cuja variação está relacionada ao tecido estudado (MARZIALI et al., 1996; MIYATAKE et al., 1996; JIANG et al., 2003). O RYR3 é típico nos estudos em mamíferos, pois ele apresenta diferentes propriedades farmacológicas e funcionais, dependendo do tecido em que se localiza, de forma que a heterogeneidade tecido dependente do RYR3 se dá principalmente pelas vias de *splicing* alternativo (JIANG et al., 2003).

Entretanto, Chiang et al. (2007) encontraram resultados em *perus* que sugerem que a ocorrência de *splicing* alternativo no α RYR pode ser regulado durante o desenvolvimento e também ambientalmente. Um dos transcritos encontrados pelo grupo apresentava a deleção de 81 nucleotídeos na região hot-spot 1 do α RYR, a mesma estudada na presente pesquisa, porém, esse transcrito foi encontrado apenas quando se provocava estresse térmico por calor nas aves, indicando que a temperatura ambiental poderia modular a expressão deste transcrito específico. Neste trabalho, na já delimitada região estudada do α RYR, não foi encontrado nenhum transcrito semelhante a esse e a outros detectados por Chiang et al. (2004, 2007), isso porque as deleções e substituições aqui verificadas eram de

apenas um nucleotídeo. O significado fisiológico dessas alterações é desconhecido, mas vários estudos relatam que mudanças na estrutura primária das RyRs, originados por mutações de ponto afetam a atividade de liberação de Ca^{2+} destas proteínas canais (ROBINSON et al., 2006; GEORGE et al., 2007).

Ainda não existem relatos de detecção de mutações no α RyR de frangos. Chiang *et al.* (2007) detectaram SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* – Polimorfismo de um único nucleotídeo) no β RyR de perus, semelhantes às detectadas neste trabalho nos transcritos do α RyR de frango. Contudo, em perus todos eles eram sinônimos, ou seja, nenhum deles resultou na mudança do resíduo de aminoácido (CHIANG *et al.*, 2007). Alterações consideradas sinônimas estão relacionadas aos códons no mRNA. Códons com mesmo significado, ou seja, que codificam um mesmo aminoácido, são denominados sinônimos. Já as alterações consideradas não-sinônimas refletem uma alteração do códon que levará a troca do aminoácido na estrutura protéica (LEWIN, 2008).

Neste trabalho, das 75 amostras analisadas, 62 alterações de nucleotídeos foram detectadas nos transcritos, entre substituições (sinônimas e não-sinônimas) e deleções, com algumas delas se repetindo em mais de uma amostra, além de uma inserção de nucleotídeos. Entre as substituições, 10 foram consideradas sinônimas já que na tradução, não se alterou o aminoácido na mesma posição. Isso também foi observado em perus, onde Chiang *et al.* (2007) detectaram no gene completo β RyR, 10 SNPs sinônimos que foram classificados em 8 haplótipos. Além disso, entre as substituições não-sinônimas (37), 24 delas foram consideradas toleráveis pelo programa SIFT, outras 12 alterariam a função da proteína e 1 delas originou um *stop*-códon prematuro e conseqüentemente uma proteína truncada. Das 9 deleções, todas elas provocaram a mudança no quadro de leitura e *stop*-códon prematuro. Na amostra com inserção de nucleotídeos, também houve uma alteração do quadro de leitura com *stop*-códon prematuro.

Embora alterações não-sinônimas são as mais prováveis de provocarem alterações diretas na proteína, análises da estrutura secundária do mRNA na região em que ocorrem substituições sinônimas, revelam que alguns nucleotídeos divergentes provavelmente causariam mudanças na estrutura secundária do mRNA e afetariam a estabilidade da molécula. Neste caso, essas moléculas de mRNA alteradas, podem apresentar problemas na taxa de

degradação, bem como problemas na tradução protéica já que a eficiência desse evento é afetada pela estrutura secundária do mRNA (NACKLEY *et al.*, 2006).

O maior número de repetições de uma mesma alteração não-sinônima foi localizado nos nucleotídeos #151 (deleção de uma citosina) e no nucleotídeo #352 (substituição de uma timina por uma citosina) na mesma sequência. Esta alteração foi identificada em seis amostras: AN1, AP2, CH2, CHET4, DPET1 e DPET2. A deleção da C151 alterou o quadro de leitura de nucleotídeos e originou um stop-códon prematuro e por consequência, proteína truncada. Além disso, os indivíduos AP4, AP10 e AP11 também sofreram uma deleção que provocou a alteração do quadro de leitura e originaram um stop-códon prematuro. Entretanto, outros transcritos normais devem existir nestes animais, caso contrário o animal não se encontraria vivo até o momento que foi realizado o experimento. Fato semelhante a esse foi encontrado por Chiang *et al.* (2004), que encontraram até três transcritos variantes num mesmo indivíduo, mas nunca apenas o transcrito defeituoso, pois isso impediria a sobrevivência do animal ou este animal seria um mutante Crooked Neck Dwarf (cn) cuja consequência é a falha em produzir proteínas RyR1 normais (PERCIVAL *et al.*, 1994).

Sequências que originam proteínas truncadas com terminação prematura da tradução são pouco prováveis de existirem biologicamente, isso porque os mRNAs são monitorados para erros que surgem durante a expressão gênica e a célula conta com mecanismos de reparação eficientes como a via de decaimento de RNA mensageiros sem sentido (Nonsense-mediated mRNA decay – NMD). Essa via marca os mRNAs que possuem os códons de terminação (UAA, UAG, UGA) prematura (nonsense – sem sentido) para que esses mRNAs, que produziram proteínas truncadas sejam degradados mais rapidamente. A presença dessa via por si só já torna esses mRNAs nonsense altamente instáveis. Esse mecanismo é importante, pois se essas sequências defeituosas fossem traduzidas, produziram proteínas truncadas com ganho de função (alguns até deletérios) (CULBERTSON, 1999; CHANG *et al.*, 2007).

A via metabólica NMD funciona como um mecanismo de controle de qualidade celular que elimina transcritos anormais. Estima-se que um terço dos splicing-alternativos de mRNA que ocorrem naturalmente são substratos da via NMD. Pouco se sabe como funciona o reconhecimento de um stop-códon prematuro. Os códons nonsense em teoria podem surgir de mutações na sequência

gênica, erros durante a transcrição, splicing-alternativo, entre outros. Entretanto, em humanos, estima-se que 60% dos genes tem sua expressão regulada pela via NMD cujos códons nonsense originados por splicing-alternativo do pré-mRNA são o substrato. Menos de 30% dos mRNA que derivam de splicing-alternativo e originam códons nonsense participam da via NMD (LEJEUNE; MAQUAT, 2005). Isso se deve em partes, a localização da mutação. Mutações que ocorrem perto da região 3' terminal de um gene parecem não afetar as taxas de degradação de mRNAs pela via NMD, enquanto as mutações na região 5' terminal ativam a NMD (CULBERTSON, 1999).

Em mamíferos, o splicing do pré-mRNA é a principal fonte de produção de códons nonsense como forma de regular a expressão gênica ou acidentalmente, como resultado da inacurácia ou ineficiência do splicing (LEJEUNE; MAQUAT, 2005). Adicionalmente, a existência de splicing do pré-mRNA ocorre em praticamente todas as espécies eucarióticas, prevalentemente nos organismos multicelulares e representam um mecanismo modulador da atividade biológica em resposta aos diferentes estágios do desenvolvimento ou às condições ambientais (BRIMACOMBE; LADD, 2007, STRASBURG; CHIANG, 2009).

A amostra AN10 apresentou dois transcritos sendo que em um deles (b), havia uma inserção de 28 pb que levou a uma alteração no quadro de leitura a partir do aminoácido #95 e posteriormente a uma interrupção da tradução prematura. Chiang et al. (2007) também detectaram um transcrito variante da α RyR em perus com inserção de 82 aminoácidos logo após o resíduo de aminoácido #4485. Os autores identificaram este fragmento inserido como sendo parte de um íntron, que normalmente teria sido removido pelo mecanismo de splicing. O fragmento inserido em perus não apresentou similaridade significativa com nenhuma sequência de RyR conhecida e nenhuma sequência consenso foi identificada nesta inserção, da mesma maneira que foi detectado neste trabalho. Entretanto, as consequências na funcionalidade da proteína dessa inserção são desconhecidas (STRASBURG; CHIANG, 2009).

De maneira geral, as deleções e substituições não-sinônimas de nucleotídeos, que representam a maioria das alterações encontradas neste trabalho (81,6%), neste domínio específico (RIH, pfam 01365), causariam alterações na atividade da α RyR, já que conforme foi sugerido em uma revisão por Strasburg e Chiang (2009), seria a região de contato entre o DHPR e a α RyR durante a

contração muscular. Também, de acordo com Maclennan (2000), este é um domínio regulatório importante para o correto funcionamento da liberação de íons Ca^{2+} . Portanto, a remoção de nucleotídeos e conseqüentemente de aminoácidos poderiam modular a interação DHPR- αRyR , o que em contrapartida poderia alterar a cinética de liberação de Ca^{2+} (STRASBURG; CHIANG, 2009).

6.2 MUTAÇÕES X CARNES PSE

Não foi possível detectar uma alteração comum entre todos os grupos testados. O que parece ter influenciado em maior amplitude a ocorrência de carnes PSE foram os fatores ambientais, como o tempo de jejum e o não resfriamento da carcaça pós-abate. Os experimentos B e D foram bem contrastantes nesse sentido.

No experimento B, no qual as aves foram submetidas ao teste do halotano e abatidas no mesmo dia, o jejum alimentar foi muito prolongado (~24 hs), o que provavelmente esgotou as reservas de glicogênio muscular e estas foram insuficientes para promover o abaixamento do pH no post mortem. A maioria das amostras (88,2%), desenvolveram carnes normais e nenhuma das alterações de função das proteínas (AF) ou proteínas truncadas (TR) encontradas ocorreram em amostras que produziram carnes PSE. Isso talvez possa ser explicado pelo tempo de jejum alimentar que as aves foram submetidas (mais de 24 horas), devido a problemas de logística. O glicogênio muscular foi consumido e mesmo com a sensibilidade identificada em alguns animais, o que poderia provocar a hiperativação da αRyR , talvez não houvesse glicogênio suficiente no músculo para provocar o abaixamento brusco do pH que faz parte de todo o mecanismo biológico que promove o desenvolvimento de carnes PSE. Ainda, de acordo com Yost et al. (2002), o transporte também contribui com a depleção das reservas de glicogênio, e com isso o metabolismo muscular é diminuído graças à diminuição de substrato.

A regulação da liberação de Ca^{2+} pelo RS durante condições de extrema fadiga e com fibras energeticamente comprometidas, como parece ser o caso do experimento B, é diferenciada, ou seja, a liberação de cálcio é diminuída, pois se torna necessário diminuir a atividade muscular para evitar injúrias

irreparáveis. Reduções nos níveis de ATP também levariam a defosforilação dos RyRs em sítios específicos que seriam necessários para a atividade normal do canal desde que na presença de níveis adequados de magnésio (já que a abertura do RyR1 é inibida por concentrações fisiológicas de Mg^{2+} e em músculos com fadiga os níveis de magnésio estão aumentados), reduzindo assim a atividade desta estrutura. Outra observação digna de nota é que a atividade dos canais de RyRs *in vitro* é diminuída nas situações de pH baixo, tais como naquelas em que ocorre um acúmulo de ácido láctico como pode ser provocado pela fadiga (SUTKO; AIREY, 1996; BALOG et al. 2001). Assim, todos esses mecanismos controladores da abertura deste canal de Ca^{2+} durante o comprometimento energético induzido pelo prolongado jejum, podem ser uma das explicações para não se ter observado carnes PSE neste experimento.

Já no experimento D não foi feito o jejum pré-abate nem o resfriamento da carcaça. A reserva de glicogênio muscular no momento do abate também é um fator crucial para o desenvolvimento de carnes PSE, já que uma maior reserva de glicogênio significaria uma maior síntese de ácido láctico (BOWKER et al., 2000), como parece ter ocorrido nesta situação. Assim como o resfriamento da carcaça pós abate ou chiller, fator esse já abordado na revisão bibliográfica. Rathgeber et al. (1999) afirmam que a velocidade de queda da temperatura na carcaça contribui significativamente para a perda da funcionalidade proteica na carne. Também foi confirmado por James et al. (2006) que o peito é a região em que a temperatura cai mais lentamente. Em perus, a redução da temperatura da carcaça para abaixo de $25^{\circ}C$ dentro de 60 minutos post mortem auxilia na prevenção da ocorrência de PSE (LESIK et al., 1997). Como neste experimento esta etapa de resfriamento não foi realizada devido a alguns problemas, esse fator, em conjunto com a ausência de jejum podem ter sido os responsáveis pela alta incidência de PSE já que do total de 18 amostras analisadas, 17 produziram carnes PSE (94,5%).

Bowker et al. (2000), em uma revisão sobre metabolismo muscular e carnes PSE em suínos, estabelece alguns fatores responsáveis pela ocorrência dessas carnes, frisando que esses fatores não são completamente independentes um do outro: a regulação nos níveis de Ca^{2+} , a atividade da ATPase muscular, enzimas glicogenolíticas e a regulação do substrato (glicogênio), somando-se ainda, o tipo da fibra muscular, que é considerado um fator adjacente dentro dos já referidos pontos em potencial de regulação da atividade glicolítica muscular.

Portanto, analisando estes dados, o fator ambiental e o manejo pós abate, nestes dois experimentos (B e D), ainda parece ser determinante e se sobrepõe aos transcritos defeituosos encontrados, quando se considera o desenvolvimento de carnes PSE.

No experimento C, em que se procurava caracterizar dois fatores estressantes (halotano imediatamente antes do abate (HAL) e estresse térmico (ET)), detectou-se apenas proteínas TR (5 amostras), sendo que somente as amostras (2) que haviam também sido submetidas ao ET é que originaram carnes PSE.

No experimento A, a correlação parece ter sido um pouco diferente. Das 10 amostras que apresentaram proteínas com AF ou TRs, 7 originaram carnes PSE. Entretanto, em relação à resposta ao halotano, a tendência é outra, como será relatado a seguir.

6.3 MUTAÇÕES X TESTE DO HALOTANO

Até o momento, nenhuma pesquisa foi realizada tentando correlacionar o teste do halotano com o sequenciamento de alguma região do gene α R_{YR} em frangos, como foi feito neste trabalho.

Cavitt et al. (2004) demonstraram que os frangos exibem reações ao halotano, da mesma maneira que detectado por este trabalho, entretanto, a seleção através do teste do halotano, em conjunto com a aplicação de succinilcolina não foi suficiente para detectar frangos (4 semanas de idade) susceptíveis a desenvolver PSE quando estes foram processados com 7 semanas. Quando transportados por duas horas antes do abate, perus submetidos ao teste do halotano (animais positivos e negativos) não apresentaram sinais significativos de desenvolvimento de carnes PSE o que pode indicar uma limitação do teste ou que o transporte não foi um agente estressor apropriado para desencadear a condição PSE (OWENS et al., 2000b).

Já dados de Owens *et al.* (2000a) indicam que a sensibilidade ao halotano está associada ao estresse térmico no que se trata de desenvolvimento de carnes PSE na idade comercial de abate. Por isso, o teste do halotano pode ser um

melhor previsor do desenvolvimento de carnes PSE quando as aves passam por um estresse térmico, nas linhagens de peru selecionadas para maior rendimento de peito, em comparação com linhagem selecionada para rápido crescimento.

No experimento C, o halotano parece ter funcionado como estressor pois nos frangos expostos ao anestésico, apenas proteínas TR foram detectadas, que podem ter sido originadas durante erros no momento do *splicing* e na falha da via NMD, provavelmente induzidos pelo ação deste agente. Das cinco amostras em que foram detectadas alterações de nucleotídeos, quatro haviam sido expostas ao halotano e todas originaram proteínas TRs. Entretanto, essa relação não foi observada no desenvolvimento de carnes PSE, já que dessas quatro amostras, apenas as duas aves que haviam também sido expostas ao estresse térmico é que desenvolveram carnes PSE. Essa relação pode indicar que o estresse térmico parece culminar para a ocorrência de PSE nas aves previamente sensibilizadas pelo halotano. Corroborando os dados de Owens *et al.* (2000a) que também verificaram que o halotano selecionou as aves propensas a desenvolverem PSE, mas apenas quando foi aplicado o estresse térmico conjuntamente, como um gatilho para originar o problema nestes animais suscetíveis.

Nos outros experimentos, essa mesma correlação parece não ter se repetido, pois outros fatores (ambientais, manejo, intervalo entre o teste do halotano e o abate e fatores desconhecidos) parecem ter influenciado nessa correlação.

No experimento A, mesmo com a ausência de estresse térmico, e o tempo de jejum dentro do usual, não foi possível encontrar alterações (mutações capazes de alterar a função da proteína de acordo com o programa SIFT ou que levem a uma proteína truncada) que pudessem ter sido correlacionadas com os resultados do teste do halotano e a ocorrência de carnes PSE. Das dez amostras alteradas detectadas no experimento, apenas quatro eram HAL+ e que originaram carnes PSE (três originadas por deleções, codificando proteínas TRs e uma substituição que AF da proteína), além do que amostras HAL- que também tinham alterações nos transcritos originaram carnes PSE. Porém, considerando apenas a resposta ao halotano, das cinco amostras positivas e com alterações, quatro delas originaram proteínas TRs e apenas uma com AF. Enquanto nas amostras negativas quatro indivíduos apresentaram alterações, sendo que um mesmo indivíduo apresentou dois transcritos: um que AF da proteína e o outro, uma proteína truncada. Nos outros três indivíduos, dois animais apresentaram proteínas com AF.

Este fato talvez possa indicar alguma habilidade do halotano em selecionar animais propensos a originarem proteínas TRs, não funcionais, mas que não necessariamente levariam ao desenvolvimento de carnes PSE.

No experimento B, das três amostras positivas ao halotano e com transcritos que levaram a alteração na proteína, duas delas eram TRs e uma tinha chance de ter sua função alterada. Enquanto nas amostras negativas (três), duas tinham proteínas com AF enquanto uma apenas era TR. O que reforça a hipótese do halotano como indicador de animais propensos a originarem proteínas truncadas.

Como se pode observar, a aplicação do teste do halotano demonstra que inúmeras variáveis devem ser levadas em conta quando se utiliza este método para prever a ocorrência de carnes PSE, como ocorreu no experimento D. Neste experimento não foi realizado o jejum pré abate assim como não houve o resfriamento da carcaça logo após o abate, o que fez com que quase 94,5% das amostras fossem PSE. Considerando a resposta ao halotano, das seis amostras com transcritos alterados, cinco eram positivas, dentre os quais, quatro deles haviam sido submetidos ao estresse térmico. Isso reforça a hipótese da ação conjunta do halotano, como possível selecionador de amostras mais propensas a originarem proteínas truncadas, quando adicionalmente as aves são submetidas a um estresse térmico. Reforçado pelo fato de que sem o estresse térmico, apenas uma amostra Hal+ apresentou alteração da função. Porém, seria necessário mais amostras negativas e que passaram por ET para análise dos transcritos, já que o surgimento de transcritos sem sentido pode ser modulado apenas pelo estresse térmico, conforme verificou Chiang et al. (2007).

Considerando as amostras AN1, AP2, CH2, CHET4, DPET1 e DPET2, pois todas tiveram deleção da C151 que alterou o quadro de leitura de nucleotídeos e originou um stop-códon prematuro, percebe-se que apenas a amostra AN1 não apresentou resposta ao halotano ou foi exposta a ele, e não foi submetida ao estresse térmico. Isso pode indicar novamente que o halotano (AP2, DPET1, DPET2) em conjunto com a ação de agentes estressores como a temperatura ambiental elevada (CHET4, DPET1, DPET2) e o próprio halotano como agente estressor (CH2, CHET4) podem determinar o surgimento de mutações que originam proteínas truncadas.

Em suínos, a correlação entre os animais sensíveis ao halotano (fenótipo para a HM suína) e que possuem a mutação no RYR1 (Arg615Cys) é 95%

efetiva para a detecção de animais homozigotos, e também em menor porcentagem aos heterozigotos (MACLENNAN; PHILLIPS, 1992). Em suínos, essa alta correlação parece ser explicada pela propagação deste gene por um ancestral comum às raças de suínos e pela seleção de animais com mais cobertura muscular e menos gordura. O RYR1 parece estar relacionado a essa característica fenotípica por um mecanismo fisiológico: uma liberação anormal de Ca^{2+} poderia estimular contrações musculares espontâneas nos animais sedentários. O estímulo contínuo provocaria uma hipertrofia das fibras e devido a grande quantidade de energia utilizada, a limitação na deposição de gordura, características muito procuradas na seleção (MACLENNAN; PHILLIPS, 1992).

Como as aves possuem duas isoformas do RYR (α e β) que controlam a saída de cálcio do RS, e, sabendo-se que a ativação ocorre de maneira diferente entre as duas isoformas, esse deve ser um ponto a mais a se considerar. Strasburg e Chiang (2009) sugerem que o problema pode se concentrar em apenas uma isoforma ou em ambas. Especula-se várias hipóteses: uma mutação na proteína formadora do canal levando a liberação descontrolada de Ca^{2+} ; splicing alternativo produzindo uma proteína com diferentes propriedades de liberação de Ca^{2+} em relação a proteína normal; modificações pós-transcricionais do RYR e mudanças na expressão e abundância das proteínas formadoras de canal (STRASBURG; CHIANG, 2009).

Os estudos em modificações pós-transcricionais que relacionam o remodelamento da estrutura da RyR em resposta ao estresse são poucos. Outros componentes que poderiam estar interagindo e modulando a atividade deste canal incluem a calmodulina, junctina, proteínas fosfatases entre outras. Quando a relação é com a qualidade de carne, os estudos são ainda mais raros (STRASBURG; CHIANG, 2009).

Dainese et al. (2009), (apud Strasburg e Chiang, 2009) produziram um modelo mutante em rato que não possuía a isoforma presente em músculo esquelético da calsequestrina (uma proteína com alta capacidade de se ligar ao Ca^{2+} (ROSSI; SORRENTINO, 2004) e verificaram que estes animais eram suscetíveis ao estresse térmico e ao halotano, apresentando sintomatologias muito similares as encontradas em casos típicos de PSS e HM. Assim, alterações como mutações, splicing alternativo ou mudanças pós-transcricionais na calsequestrina poderiam também levar as carnes PSE.

Já Smith e Northcutt (2009) afirmam claramente que as aves tem um comportamento diferente – em comparação com suínos – considerando a suscetibilidade ao halotano e ao desenvolvimento de carnes PSE justamente pela diferença entre mamíferos e aves. Para esses autores, é muito claro que o fenômeno PSE da mesma maneira que ocorre em suínos não ocorre nas aves, o que pode ser corroborado com os dados encontrados neste trabalho. Adicionalmente, é sugerido até a mudança de terminologia de “carne PSE” para *pale chicken muscle* (músculo pálido de frangos) ou *pale poultry muscle syndrome* (síndrome do músculo pálido de frangos) (SMITH; NORTH CUTT, 2009).

Ponderando a complexidade de eventos celulares que parecem estar envolvidos nesta situação, mais estudos considerando as variáveis halotano e estresse térmico pré-abate no desenvolvimento de carnes PSE, poderiam ser feitos na tentativa de chegar a uma conclusão precisa. Isso inclui estudos em outras regiões do α RyR e também de outros genes envolvidos na codificação de proteínas que participam do mecanismo de contração muscular.

7 CONCLUSÕES

O teste do halotano não foi eficaz para determinar amostras que teriam alterações no mRNA do gene α RYS, na região estudada.

O estresse térmico em conjunto com a exposição ao halotano parecem determinar o aparecimento de códons sem sentido do α RYS (proteínas truncadas) e de carnes PSE. Mas, há grandes indícios de que foram as condições de manejo (tempo de jejum e resfriamento da carcaça) que contribuíram na maior ou menor ocorrência de carnes PSE, mediante as condições em que este trabalho foi desenvolvido.

Não houve uma mutação em comum entre os grupos testados que pudesse ser caracterizada e correlacionada com o surgimento de carnes PSE e a resposta ao halotano. Fatores ambientais, como o estresse térmico, podem ter modulado a expressão gênica, o que explicaria o grande número de transcritos alterados do α RYS na região estudada principalmente quando esta variável foi aplicada.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência desta nova sequência do α RYR de frangos irá auxiliar no desenho de novos primers para o futuro sequenciamento completo deste gene.

Os fatores ambientais influenciando a expressão gênica desta região do α RYR podem se consolidar como uma nova área para estudos futuros visando a melhor compreensão do funcionamento deste canal de cálcio e os mecanismos que levam a ocorrência de carnes PSE. Particularmente, a verificação da ação do halotano como modificador da expressão gênica poderia até auxiliar na compreensão do mecanismo de ação deste anestésico.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVARADO, C. Z.; SAMS, A. R. Turkey carcass chilling and protein denaturation in the development of pale, soft and exudative meat. **Poultry Science**, v. 83, p. 1039-1046, 2004.
- AVICULTURA INDUSTRIAL Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>> Acesso em: 13 mar. 2009
- BALOG, E. M. et al. Divergent effects of the malignant hyperthermia-susceptible Arg⁶¹⁵ →Cys mutation on the Ca²⁺ and Mg²⁺ dependence of the RyR1. **Biophysical Journal.** v. 81, p. 2050-2058, 2001.
- BARBUT, S. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. **Journal of muscle foods**, n. 9, p. 35-49, 1998.
- BARBUT, S.; ZHANG, L.; MARCONE, M. Effects of pale, normal and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins and cooking of marinated fillets. **Poultry Science**, v. 84, p. 797-802, 2005.
- BARBUT, S. et al. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. **Meat Science**, v. 79, p. 46-63. 2008.
- BELLAVER, C. O mito do hormônio na carne de frangos. 2006 Disponível em: <<http://www.asbran.org.br/novo/Noticias.asp?dsid=123>> <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=240> Acesso em: 09 set. 2009
- BERRI, C. et al. Effect of selection improved body composition on muscle meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. **Poultry Science**, v. 80, p. 833-838, 2001.
- BOWKER, B. C. et al. Muscle metabolism and PSE pork. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 2000. Disponível em: <<http://www.asas.org/symposia/0601.pdf>> Acesso em: 10 jun. 2009

BRIMACOMBE, K.R.; LADD, A.N. Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 2216-2224. 2007.

BRINI, M. Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 322, p. 1245-1255, 2004.

BROWN, T.A. **Genética: um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

CAVITT, L. C.; HARGIS, B. M.; OWENS, C. M. The use of halothane and succinylcholine to identify broilers prone to developing pale, soft and exudative meat. **Poultry Science**, v. 83, p. 1440-1444, 2004.

CHANG, Y. F.; IMAM, J. S.; WILKINSON, M. F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway, **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 51–74. 2007.

CHEAH, A. M. Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 648, p. 113-119, 1981.

CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A2 and the interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 638, p. 40-49, 1981.

CHIANG, W. et al. Identification of two α RyR alleles and characterization of alpha RyR transcript variants in turkey skeletal muscle. **Gene**, v. 330, p. 177-184, 2004.

CHIANG, W. et al. Divergent mechanisms in generating molecular variations of α RyR and β RyR in turkey skeletal muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 28, p. 343-354. 2007.

CHIANG, W.; BOOREN, A., STRASBURG, G. The effect of heat stress on thyroid hormone response and meat quality in turkeys of two genetic lines. **Meat Science**, v. 80, p. 615-622. 2008.

CULBERTSON, M. R. RNA surveillance – unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. **Trends in Genetics**, v.15, p.74-80. 1999.

DAINESE, M. et al. Anesthetic and heat-induced sudden death in calsequestrin-1 knockout mice. **FASEB J.** doi: 10.1096/fj.08-121335

DEBUT, M. et al. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. **Poultry Science**, v. 82, p. 1829-1838, 2003.

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

DROVAL, A. A. **Carne PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos: mutações no gene receptor da rianodina tipo 3 e alterações no perfil de ácidos graxos.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

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

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; Unraveling the ryanodine receptor. **Biophysical Journal.** New and Notable. v. 67, p. 2135-2136, 1994.

FRISCHMEYER, P. A.; DIETZ, H. C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. **Human Molecular Genetics**, v. 8, p. 1893-1900. 1999

FUJII, J. et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. **Science.** v. 253, p. 448-451. 1991.

GEORGE, C. H. et al. Ryanodine receptors and ventricular arrhythmias: emerging trends in mutations, mechanism and therapies. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, p. 34-50. 2007.

GUARNIERI, P. D. et al. Preslaughter handling with water shower spray inhibits PSE (*Pale, Soft, Exudative*) broiler breast meat in a commercial plant. Biochemical and ultrastructural observations. **J. Food Biochemistry** v.28 n. 3, p.269-277, 2004.

GUIMARÃES, L. D.; MORAES, A. N. Anestesia em aves: agentes anestésicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 6, p. 1073-1081. 2000.

HAMILTON, S. L.; SERYSHEVA, I.; STRASBURG, G. M. Calmodulin and excitation-contraction coupling. **News Physiol. Sci.** v. 15, p. 281-284. 2000.

HAMILTON, S. L. Ryanodine receptors. **Cell calcium**, v. 38, p. 253-260, 2005.

HARRISON, G. G. The porcine hyperthermia and stress syndromes. IN: OHNISHI, S. T.; OHNISHI, T. **Malignant hyperthermia: a genetic membrane disease**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 81-104

INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, p. 695-716. 2004.

JAMES, C. et al. The primary chilling of poultry carcasses: a review. **International Journal of Refrigeration**, n. 29, p. 847-862. 2006.

JIANG, D. et al. Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3 Ca^{2+} release channel (Ryanodine Receptor). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.7, p. 4763-4769. 2003.

JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. **J. Clin. Invest.**, v.115, n.8, p. 2000-2009, 2005.

LARA, J. A. F. et al. Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Frangos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, supl. 4, p. 15, 2002.

LARA, J. A. F. et AL. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em suínos e aves: uma abordagem comparativa. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 1, p. 36-39, 2003.

LARA, J. A. F. **Carne PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos: ocorrência de mutações no gene receptor da rianodina**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

LAVILLE, E. et al. Characterisation of PSE zones in *semimembranosus* pig muscle. **Meat Science**, v. 70, p. 167-172. 2005.

LE BIHAN-DUVAL, E. **Genetic variability of poultry meat quality**. 2003. Disponível em: <<http://www.poultryscience.org/pba/19522003/2003/2003%20Duval.pdf>> Acesso em: 15 abr. 2007.

LE BIHAN-DUVAL, E. et al. Estimation of the genetic parameters of meat characteristics and of their correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. **Poultry Science**, v. 80, p. 839-843, 2001.

LEJEUNE, F.; MAQUAT, L.E. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 309-315, 2005.

LESIAK, M. T. et al. Effects of post-mortem time before chilling and chilling temperatures on water-holding capacity and texture of turkey breast muscle. **Poultry Science**, v. 76, p. 552-556. 1997.

LEWIN, B. Using the genetic code. In: _____ **Genes IX**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers. 2008. p. 190-191.

LI, C. T.; WICK, M. Improvement of the physicochemical properties of pale soft and exudative (PSE) pork meat products with an extract from mechanically deboned turkey meat (MDTM). **Meat Science**. v. 58, p. 189-195. 2001.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. n. 144, p. 11-17. 2006.

MACLENNAN, D. H. Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. **Biophysical Journal**. v. 58, p. 1355-1365, 1990.

MACLENNAN, D. H. Ca^{2+} signalling and muscle disease. **Eur. J. Biochem**. v. 267, p. 5291-5297, 2000.

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

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/COMERCIALIZACAO_AGRICOLA/CARNES-2009.PDF
Acesso em: 13 mar. 2009

MARCHI, D. F. **Avaliação da sensibilidade de frangos ao halotano e ao estresse térmico e sua relação com qualidade da carne**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MARZIALI, G. et al. cDNA cloning reveals a tissue specific expression of alternatively spliced transcripts of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) calcium release channel. **FEBS Letters**. v. 394, p. 76-82, 1996.

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

MILLER, E. M.; NICKOLOFF, J. A. Escherichia coli electrotransformation. In: NICKOLOFF, J. A. (ed.) **Electroporation Protocols for Microorganisms**. Totowa: Humana Press, 1995. p 105-114.

MITCHELL, M. A.; SANDERCOCK, D. A. Spontaneous and stress induced myopathies in modern meat birds: a cause for quality and welfare concerns. **Proc. Aust. Poult. Sci. Sym.** n. 16, p. 100-108, 2004.

MIYATAKE, R. et al. Tissue-specific alternative splicing of mouse brain type ryanodine receptor/calcium release channel mRNA. **FEBS Letters**. v. 395, p. 123-126. 1996.

NACKLEY, A. G. et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. **Science**, v. 314, p. 1930-1933. 2006.

NCBI – **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**. Disponível em : <www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 19 maio 2009.

N'DRI, A. L. et al. Interactions between the naked neck gene, sex, and fluctuating ambient temperature on heat tolerance, growth, body composition, meat quality, and sensory analysis of slow growing meat-type broilers. **Livestock Science**. n. 110, p. 33-45, 2007.

ODA, S. H. I. et al. Detecção de cor de filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, v. 27, p. 24-32, 2003.

ODA, S. H. I. et al. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em Aves e Suínos: diferenças e Semelhanças. **Revista Nacional da Carne**, v. 28, p. 108-113, 2004.

O'BRIEN, P. J. Canine malignant hyperthermia / canine stress syndrome. In: OHNISHI, S.T.; OHNISHI, T. **Malignant hyperthermia: a genetic membrane disease**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 105-116

OLIVO, R. et al. Dietary Vitamin E Inhibits Poultry PSE and Improves Meat Functional Properties. **J. Food Biochem.** v. 25, n.4, p.271-283, 2001.

ODA, S. H. I. **Análises moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e a ocorrência de carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos**. 2006. 147f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

OHNISHI, S. T.; OHNISHI, T. **Malignant hyperthermia: a genetic membrane disease**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

OTTINI, L. et al. α and β isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. **Biochem. J.**, v. 315, p. 207-216. 1996.

OWENS, C. M. et al. The development of pale, exudative meat in two genetic lines of turkeys subjected to heat stress and its prediction by halothane screening. **Poultry Science**, n. 79, p. 430-435. 2000a.

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. **Poultry Science**, n. 79 p. 789-795. 2000b.

PERCIVAL, A.L. et al. Chicken skeletal muscle ryanodine receptor isoforms: ion channel properties. **Biophysical Journal**, v. 67, p. 1834-1850. 1994.

PIETRZAK, M.; GREASER, M. L.; SOSNICKI, A. A. Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in *Pectoralis major* muscle of domestic turkey. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 2106-2116, 1997.

PROTASI, F. et al. RYR1 and RYR3 have different holes in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. **Biophysical Journal**, v. 79, p. 2494-2508. 2000.

PROTASI, F. et al. Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with α 1S-dihydropyridine receptors in skeletal muscle. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 3230-3244. 2002.

RATHGEBER, B. M. Thermally induced changes in protein extractability of postrigor turkey breast meat measured by two methods. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, 1999.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (ed.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

ROBINSON, R. et al. Mutations in RYR1 in malignant hypertermia and central core disease. **Hum Mutat**, v. 27, p. 977-989. 2006.

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

SAMBUUGHIN, N. et al. Single-amino-acid deletion in the RYR1 gene, associated with malignant hyperthermia susceptibility and unusual contraction phenotype, **Am. J. Hum. Genet.** v. 69, p. 4-8. 2001.

SANGER INSTITUTE. 2009. Disponível em :
<<http://pfam.sanger.ac.uk/family?PF01365>> Acesso em: 25 abr. 2009.

SANTOS, T. N. S. et al. Teste do halotano um possível método simplificado para detecção das aves fornecedoras de carnes PSE (Pale, Soft, Exudative). **Revista Nacional da Carne**, v. 30, p. 146-147, 2006.

SMITH, D. P.; NORTHCUTT, J. K. Pale poultry muscle syndrome. **Poultry Science**, v. 88, p. 1493–1496. 2009.

SOARES, A. L. et al. Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 48., 2002, Rome. **Proceedings...** Rome: 48th ICoMST, 2002. v. 48. p.540-541.

SOARES, A. L. et al. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, *Pale, Soft, Exudative*, meat. **J Food Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 309-319, 2003.

SOARES, A.L. et al. Similaridades entre os sintomas da Síndrome do Estresse das Aves (PtSS) e da Síndrome do Estresse Suíno (PSS), originando as carnes PSE de frangos. **Revista Nacional da Carne**, p. 69-74. 2007.

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

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W. Genetic basis for pale, soft and exudative turkey meat. In: AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 56, 2003, Missouri. **Proceedings ...** Missouri, University of Columbia, 2003. p.15-18.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W. Pale, soft, exudative turkey: the role of ryanodine receptor variation in meat quality. **Poultry Science**, v.88, p. 1497-1505, 2009.

SUTKO, J. L.; AIREY, J. A. Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function? **Physiological Reviews**. v. 76, n. 4, 1996.

SWATLAND, H. J. How pH causes paleness or darkness in chicken breast meat. **Meat Science**, v. 80, p. 396-400. 2008.

UBA – União Brasileira de Avicultura. Disponível em:

<http://www.uba.org.br/estatistica2008/9_exportacao_da_carne_de_frango_em_uss_2008.pdf> Acesso em: 13 mar. 2009

WILHELM, A. E. et al. Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Food Chemistry**, v. 11, p. 1201-1204, 2009.

YAMAMOTO, T.; EL-HAYEK, R.; IKEMOTO, N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca^{2+} channel regulation. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 16, p. 11618-11625. 2000.

YANG, T. et al. 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.

YOST, J. K. et al. Influence of selection for breast muscle mass on myosin isoform composition and metabolism of deep pectoralis muscles of male and female turkeys. **Poultry Science**. v. 81, p. 911-917. 2002

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de Preparação de Plasmídeos em Microplacas – Miniprep ABI 3100-1

- 1) Em uma microplaca de 96 poços, adicionar 1mL de meio Circle Grow contendo 100µg/mL de ampicilina.
- 2) Selecionar 4 colônias características de cada amostra e com auxílio de palito de dentes estéril inocular cada colônia individualmente. Selar a placa com adesivo e fazer um furo sobre cada poço para garantir a aeração.
- 3) Incubar a 37°C, com agitação de 320rpm por 22 horas.
- 4) Após o crescimento, fazer cultura permanente em placas: 65µL de glicerol 50% estéril e 65µL de bactéria, estocar a -80°C.
- 5) Selar a placa com adesivo e centrifugar a 4000rpm, 6 min, 4°C.
- 6) Remover o adesivo, descartar o sobrenadante, inverter a placa sobre papel. Caso necessário, nesta etapa a placa pode ser armazenada em freezer 20°C.
- 7) Adicionar em cada poço, 200 µL de GET, selar a placa com adesivo e agitar (Vortex) por 2 min. para ressuspender as células.
- 8) Centrifugar 4000rpm, 9 min, 4°C.
- 9) Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante. Deixar a placa invertida em papel absorvente.
- 10) Adicionar 65µL da solução GET+RNase A (Em um recipiente misturar bem 6mL de GET + 500µL de RNase A (10mg/mL) (quantidade suficiente para uma placa) a cada poço.
- 11) Ressuspender e transferir todo o material para uma placa de fundo em “U”.

12) Adicionar a cada poço 65 μ L da solução de: NaOH 0,2N/SDS 1% (2mL de SDS 10% + água ultra-pura q.s.p. 20mL + 1 mL NaOH 4M – para duas placas, preparar na hora de usar). OBS: Adicionar as soluções nesta ordem pois NaOH após SDS provoca precipitação, usar a água como intermediário.

13) Selar bem a placa com um novo adesivo e misturar de 5 a 10X por inversão. Incubar por 10 min. em temperatura ambiente. Centrifugar por alguns segundos para que não fique solução no adesivo.

14) Adicionar a cada poço 60 μ L de KOAc 3M (estocado a 4°C) selar a placa com adesivo e misturar 10X por inversão.

15) Incubar por 10 min. no gelo.

16) Centrifugar a 4000rpm, 15 min., 4°C.

17) Fixar com fita adesiva uma placa Millipore™ (MAGVN22) no topo de uma microplaca de fundo em “V”. Verificar se todos os poços estão bem alinhados.

18) Após a centrifugação, transferir 100 μ L do sobrenadante (evitando os debrís celulares) para a placa Millipore™ e centrifugar sem a tampa a 4000rpm, 5 min., 4°C, ou até todo volume descer para a outra placa.

19) Remover e descartar a placa Millipore™. Adicionar 90 μ L de isopropanol ao filtrado na microplaca. Selar bem com adesivo resistente a álcool e misturar 10X por inversão.

20) Centrifugar a 4000rpm, 45 min., 4°C.

21) Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante invertendo a placa.

22) Adicionar 150 μ L de etanol 70% gelado.

23) Centrifugar a 4000rpm, 5 min., 4°C.

24) Inverter a placa descartando o sobrenadante e deixar secar por 2 h. na bancada.

25) Após a secagem, adicionar 30 μ L de água ultra-pura, selar com adesivo e deixar ressuspensão *overnight* a 4°C.

26) Armazenar a -20°C.

GET (Glicose, EDTA, Tris) 20% glicose filtrada → 23mL 0,5M EDTA pH 8 autoclavado → 10mL 1M Tris HCl pH 7,4 autoclavado → 13mL Água q.s.p → 500mL Armazenar a 4°C.

KOAc 3M 60mL KOAc (Acetato de potássio) 5M 11,5mL Ácido acético glacial 28,5mL água ultra-pura autoclavada Armazenar a 4°C.

ANEXO B – Médias do valor de L* e classificação de carnes PSE e normais nos experimentos realizados.

Experimento A

Amostra	L* médio	Classificação
AN1	51,8	NORMAL
AN2	47,9	NORMAL
AN3	52,34	NORMAL
AN4	55,08	PSE
AN5	52,13	NORMAL
AN6	50,85	NORMAL
AN7	55,02	PSE
AN8	58,10	PSE
AN9	56,39	PSE
AN10	54,73	PSE
AP1	54,17	PSE
AP2	52,79	NORMAL
AP3	54,95	PSE
AP4	53,98	PSE
AP5	51,06	NORMAL
AP6	56,38	PSE
AP7	53,16	PSE
AP8	56,02	PSE
AP9	56,87	PSE
AP10	58,95	PSE
AP11	58,87	PSE
AP12	55,17	PSE

Experimento C

Amostra	L* médio	Classificação
CN1	53,42	PSE
CN2	52,21	NORMAL
CN3	51,59	NORMAL
CNET1	53,60	PSE
CNET2	51,68	NORMAL
CNET3	52,44	NORMAL
CNET4	54,53	PSE
CNET5	53,26	PSE
CH1	51,61	NORMAL
CH2	50,13	NORMAL
CH3	55,76	PSE
CH4	55,26	PSE
CHET1	52,57	NORMAL
CHET2	53,15	PSE
CHET3	52,9	NORMAL
CHET4	53,86	PSE
CHET5	54,21	PSE
CHET6	54,96	PSE

Experimento B

Amostra	L* médio	Classificação
BN1	56,57	PSE
BN2	53,05	PSE
BN3	49,56	NORMAL
BN4	50,5	NORMAL
BN5	52,6	NORMAL
BN6	48,78	NORMAL
BN7	50,91	NORMAL
BN8	52,70	NORMAL
BN9	48,89	NORMAL
BN10	52,31	NORMAL
BP1	48,66667	NORMAL
BP2	48,98333	NORMAL
BP3	52,40667	NORMAL
BP4	50,18	NORMAL
BP5	50,37333	NORMAL
BP6	51,36333	NORMAL
BP7	52,99667	NORMAL

Experimento D

Amostra	L* médio	Classificação
DN1	58,58	PSE
DNET1	54,19	PSE
DNET2	55,15	PSE
DP1	52,02	NORMAL
DP2	56,61	PSE
DP3	55,31	PSE
DP4	58,2	PSE
DP5	54,75	PSE
DP6	60,19	PSE
DP7	56,67	PSE
DPET1	59,94	PSE
DPET2	60,81	PSE
DPET3	55,63	PSE
DPET4	58,2	PSE
DPET5	55,45	PSE
DPET6	61,22	PSE
DPET7	53,47	PSE
DPET8	56,98	PSE

Legenda: 1ª letra: Refere-se ao experimento em questão (A, B, C, ou D).

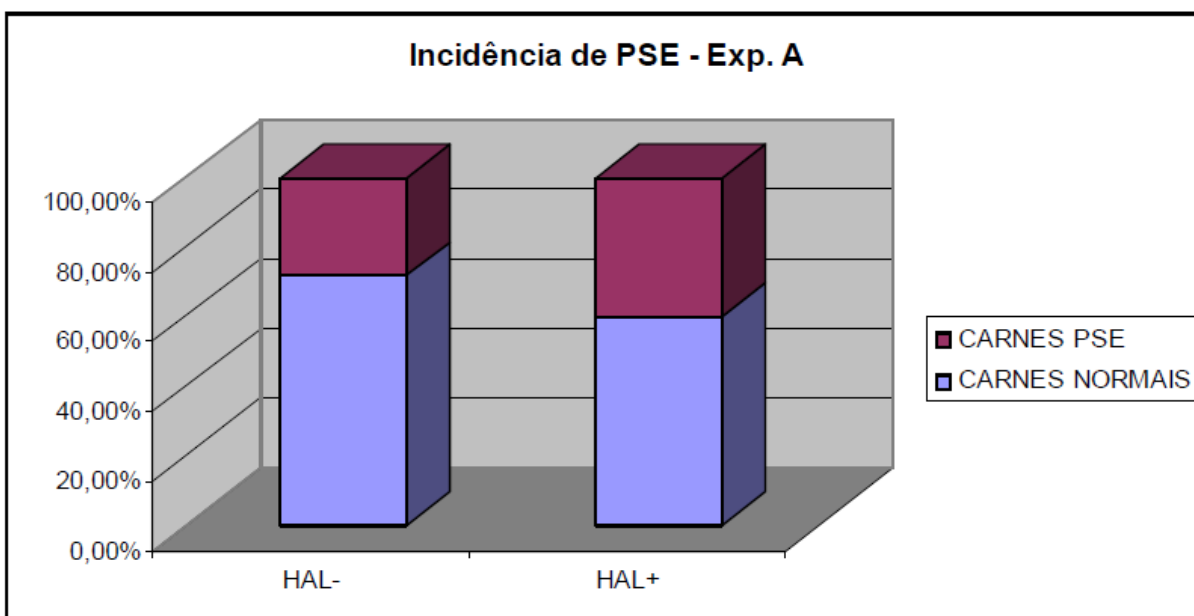
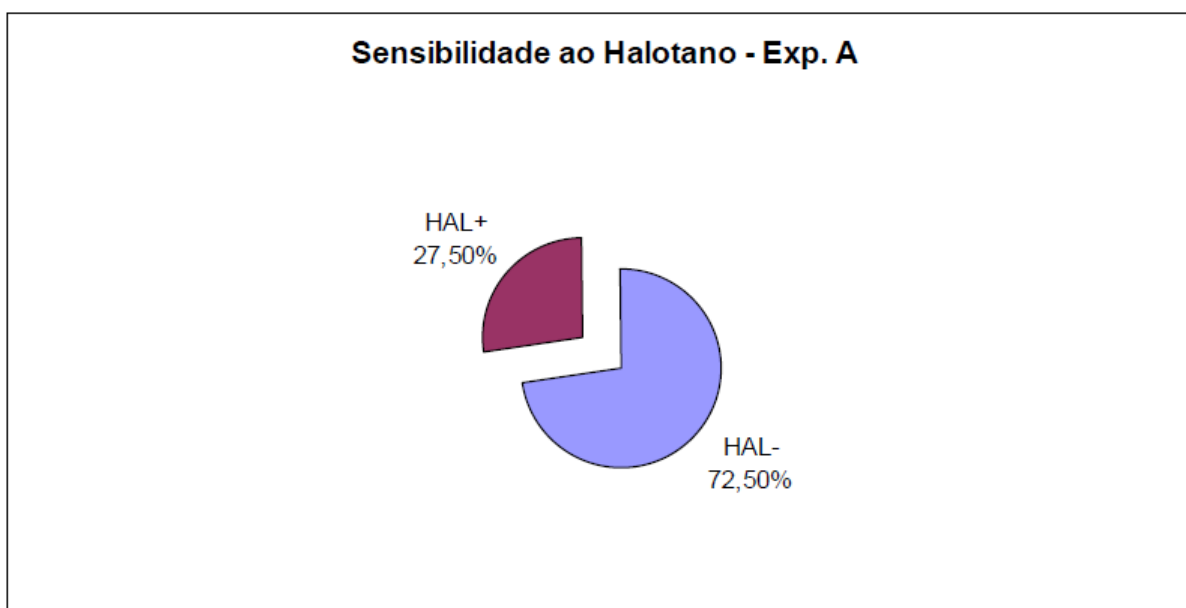
2ª letra: Refere-se a resposta ou a exposição ao halotano (P= Hal positivo, N= Hal negativo; H= exposto ao halotano, N= não exposto ao halotano – conforme o experimento em questão)

3ª e 4ª letras: Referem-se a aplicação de estresse térmico quando houver (ET)

Número: Identificador da amostra

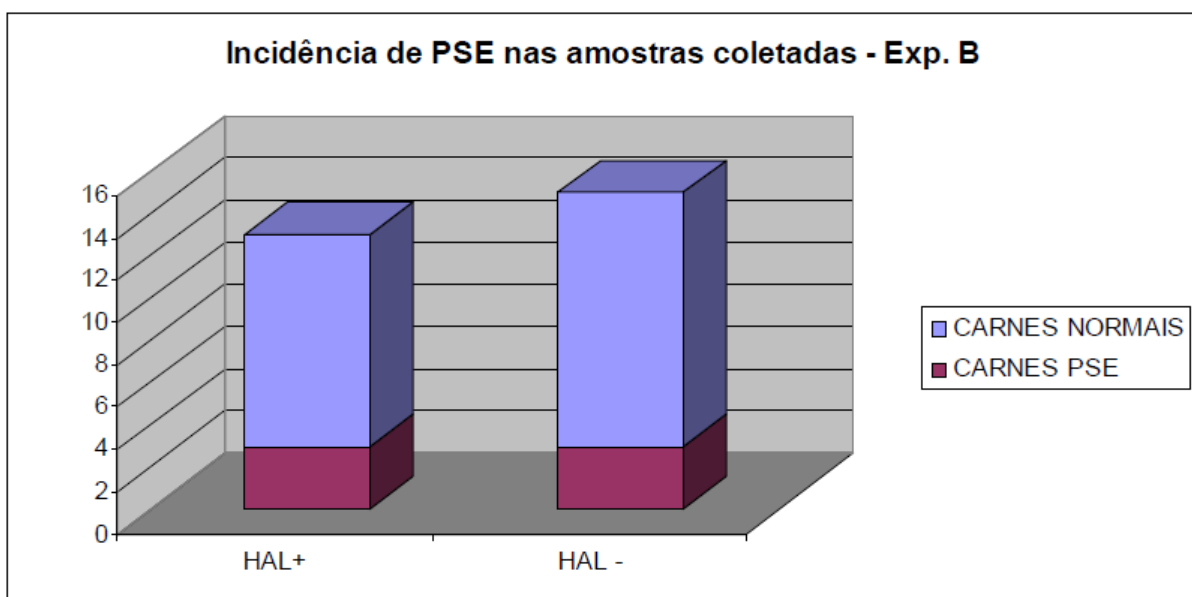
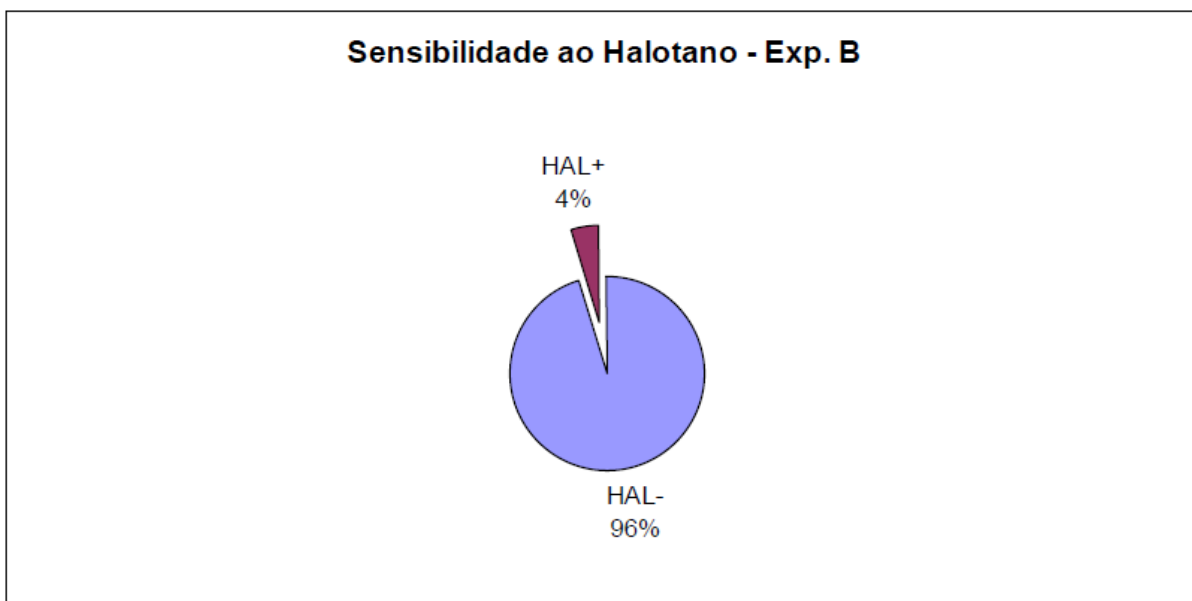
ANEXO C – Avaliação de 352 frangos machos, de linhagem comercial com 44 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, e a produção de carnes PSE. Incidência destes parâmetros no Experimento A.

Fonte: Marchi, 2008

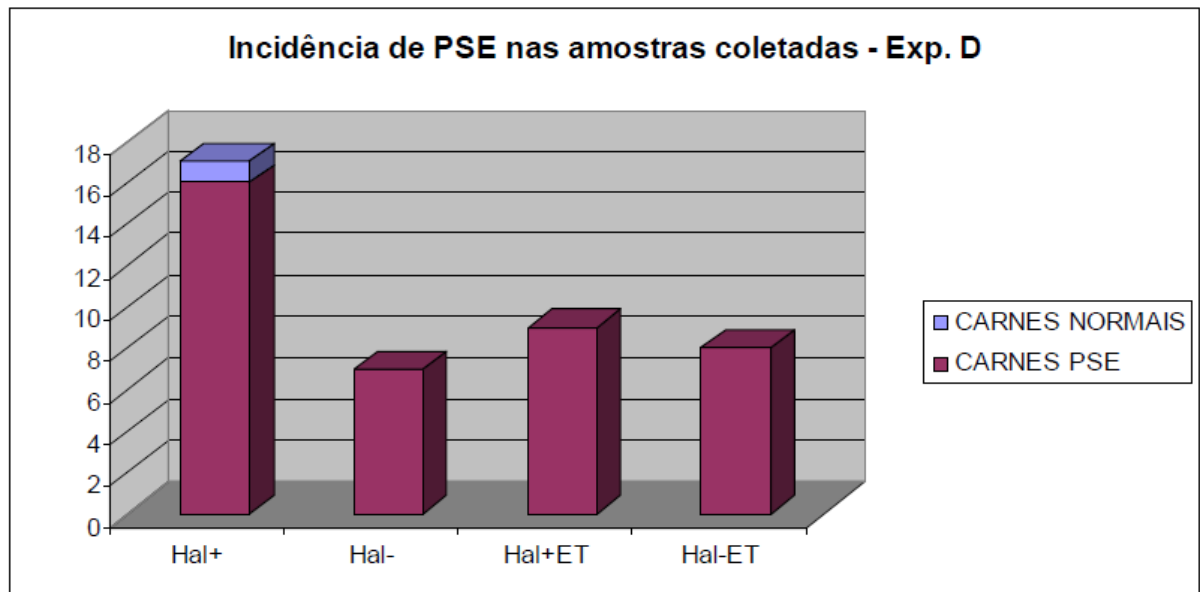
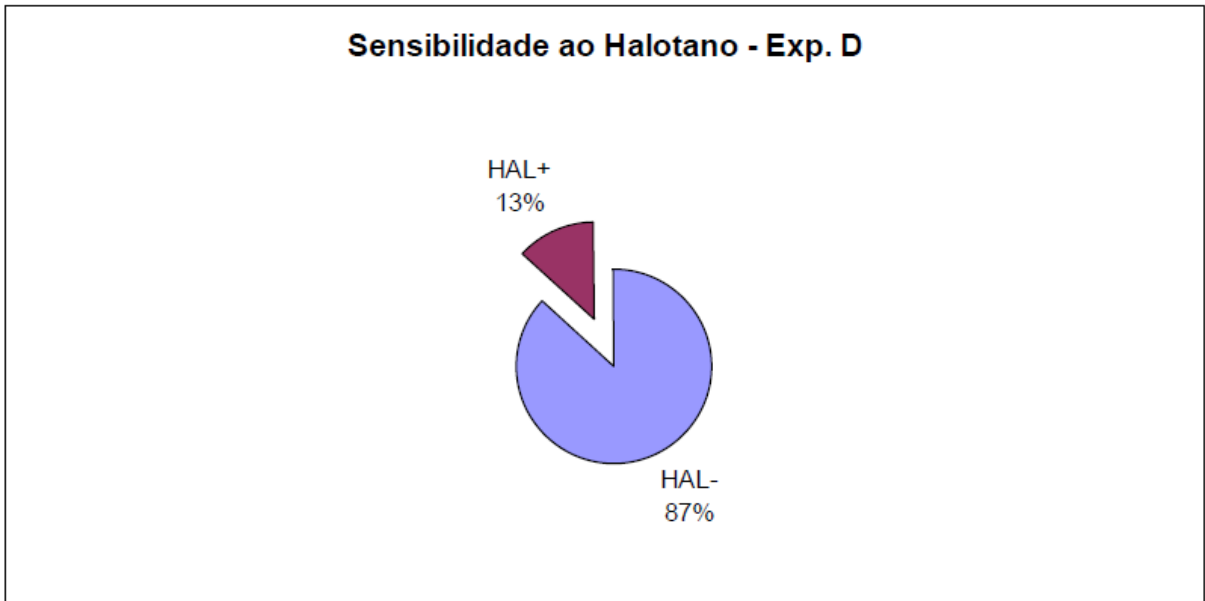


ANEXO D – Avaliação de 298 frangos machos, bisavózeiros, com 44 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, e a produção de carnes PSE. Incidência destes parâmetros no Experimento B.

Fonte: Marchi, 2008



ANEXO E – Avaliação de 201 frangos, machos, de linhagem comercial com 45 dias de idade, submetidos ao teste do halotano e classificados em reativos (HAL+) e não reativos (HAL -) ao halotano, expostos ao estresse térmico (ET), e a produção de carnes PSE dentro destes grupos. Incidência destes parâmetros no Experimento D.



AN3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP10	CGCTGTTCTCCACCAA	467
BP3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN9	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CH4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET6	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DN1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN8	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CHET6	CGCTGTTCTCCACCAA	467
DP4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP12a	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CNET5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN9	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CHET5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP11	CGCTGTTCTCCACCAA	467
BP5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CN1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CHET1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DNET2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN10b	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BP4	CGCTGTTCTCCACCAA	467
DP5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BP2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN6	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CH3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DP7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP8	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CN3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CNET3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN1	CGCTGTTCTCCACCAA	467
AP2	CGCTGTTCTCCACCAA	467
CH2	CGCTGTTCTCCACCAA	467
CHET4	CGCTGTTCTCCACCAA	467
DPET1	CGCTGTTCTCCACCAA	467
DPET2	CGCTGTTCTCCACCAA	467
AP9	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CNET4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DP6	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP3	CACTGTTCTCCACCAA	468
DP3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN8	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN10a	CGCTGTTCTCCACCAA	467
BP7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CN2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CHET2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP7	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DP1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET4	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP4	CGCTGTTCTCCACCAA	467
BP6	CGCTGTTCTCCACCAA	467
AP1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
BN1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CNET1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DNET1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN6	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP12b	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DPET8	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN10a	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP5	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CH1	CGCTGTTCTCCACCAA	467
BN2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CNET2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
DP2	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AN10b	CGCTGTTCTCCACCAA	496
BP1	CGCTGTTCTCCACCAA	468
CHET3	CGCTGTTCTCCACCAA	468
AP6	CGCTATTCTCCACCAA	468
AN5	CGCTATTCTCCACCAA	468

* * * *****

ANEXO G – Alinhamento global de todos as seqüências de proteínas encontradas.

```

DP3                ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN10b             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DNET2             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILGLRD 60
BN7               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DN1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN4               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN6               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP4               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DPET4             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CHET3             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN5               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP2               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP5               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP6               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP7               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DNET1             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DPET3             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CN2               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CH3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CH4               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CNET1             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP2               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP5               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP7               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN2               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN6               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP5               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP9               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP12a             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN8               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN7               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN9               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN5               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CHET2             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CHET1             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CNET5             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CNET4             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CNET2             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CN1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DPET8             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DPET7             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DPET6             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
DP1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP6               ALSLSRSQGEESQAARTIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP7               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN8               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSPRD 60
DPET5             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CNET3             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSPRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP8               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP12b             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN2               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN4               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP1               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CHET5             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN10a             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGRYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN9               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BP4               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AP10             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CN3               ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSPRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
BN10a            ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
AN10b            ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPIAAVILSLRD 60
CHET6             ALSLSRSQGEESQAARMITARR---GS-----TAASS---G-----VWT-R- 34
AP11             ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTA---GS-----TAASS---G-----VWT-R- 34
DPET1            ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
DPET2            ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
CH2              ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
CHET4            ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
AN1              ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
AP2              ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGGGAGNAALPSPPPSSAFGT 60
BP6              ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGAVRGTQLCPSPPPSSAFGT 60
AP4              ALSLSRSQGEESQAARMYIYSTAGLYGSFIRSLDALSSRGRGAVRGTQLCPSPPPSSAFGT 60
CH1              ALSLSRSQ-----AR-----R-----R-----R-----R-----R-----R----- 16
*** ** ** *

```


DP3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN10b	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DNET2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DN1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN6	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CHET3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN5	GEAAAASRKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP6	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DNET1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CN2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CH3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CH4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CNET1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BP2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BP3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BP5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BP7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN6	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP9	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP12a	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN8	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN9	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CHET2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CHET1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CNET5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CNET4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CNET2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CN1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET8	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET6	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DP1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP6	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP7	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN8	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
DPET5	REAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CNET3	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP8	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AP12b	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
AN2	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BN4	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
BP1	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTNCALFST	155
CHET5	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRANCALFST	155
AN10a	GEAAAASWKEIVNLLHELLAPLIRGNRTNCALFST	155
AN9	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGNRTDCALFST	155
BP4	-----	
AP10	GEAAAASWKEIVNLLYELLASLIRGTAPTARCSP	155
CN3	-----	
BN10a	GAARTSSSR-----RG-----	95
AN10b	GAELHRPPQRVQHR-----RALR-----	126
CHET6	-----	
AP11	-----	
DPET1	-----	
DPET2	-----	
CH2	-----	
CHET4	-----	
AN1	-----	
AP2	-----	
BP6	-----	
AP4	-----	
CH1	-----	