



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES  
CANDIDATOS À QUALIDADE DA CARNE DE  
OVINOS PANTANEIROS ABATIDOS COM  
DIFERENTES CATEGORIAS DE PESO**

**Acadêmica: Jessica Cristina Gonçalves dos Santos**

Dourados - MS

Fevereiro - 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES  
CANDIDATOS À QUALIDADE DA CARNE DE  
OVINOS PANTANEIROS ABATIDOS COM  
DIFERENTES CATEGORIAS DE PESO**

**Acadêmica: Jessica Cristina Gonçalves dos Santos**  
**Orientadora: Alexeia Barufatti Grisolia**

Trabalho apresentado à Faculdade de  
Ciências Agrárias da Universidade  
Federal da Grande Dourados, como  
parte das exigências para obtenção  
do grau de bacharel em Zootecnia

Dourados - MS

Fevereiro - 2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S237a Santos, Jessica Cristina Goncalves dos

Avaliação da expressão de genes candidatos à qualidade da carne de ovinos pantaneiros abatidos com diferentes categorias de peso / Jessica Cristina Goncalves Dos Santos -- Dourados: UFGD, 2017.

23f. : il.; 30 cm.

Orientadora: Alexeia Barufatti Grisolia

Co-orientador: Elias Alberto Gutierrez Carnelossi

TCC (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias,  
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Adipogênese. 2. Expressão gênica. 3. Marmoreio. 4. Miogênese. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

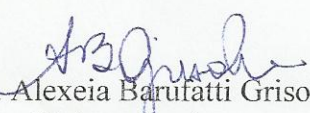
**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**TITULO:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS À QUALIDADE DA CARNE DE OVINOS PANTANEIROS ABATIDOS COM DIFERENTES CATEGORIAS DE PESO

**AUTORA:** Jessica Cristina Gonçalves dos Santos  
**ORIENTADORA:** Alexeia Barufatti Grisolia

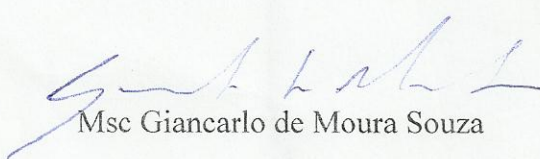
Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em **ZOOTECNIA** pela comissão examinadora.



Prof. Dr. Alexeia Barufatti Grisolia  
(Orientadora)

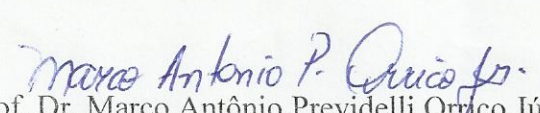


Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes



Msc Giancarlo de Moura Souza

Data de realização: 02 de Fevereiro de 2017



Prof. Dr. Marco Antônio Previdelli Orsico Júnior  
Presidente da comissão do TCC-Zootecnia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida, por esse sonho colocado em meu coração e por me dar forças a cada dia para que eu chegasse até aqui. Agradeço a minha família por me proporcionar essa oportunidade, por me apoiarem em cada escolha, estarem comigo independente de qualquer coisa e por me aturarem em dias difíceis. Agradeço a todos os meus professores da graduação, cada um com seu jeito único de transmitir conhecimento de maneira fantástica. Agradeço aos amigos que fiz durante a faculdade, pela companhia, pelos horários de almoço no RU, por cada riso, cada história compartilhada e vivida. Agradeço aos meus colegas da VI turma por proporcionarem momentos de alegria e boas conversas. Agradeço imensamente aos meus amigos do grupo de pesquisa por me proporcionarem momentos felizes, momentos de trabalho, idas a congressos, histórias vividas juntos, valeu cada dia convivido, vou levar para sempre! A professora Alexéia, meu muito obrigada, foi uma oportunidade incrível, de crescimento pessoal e profissional, obrigada por me receber e acreditar em mim. Ao Bruno, que sempre me ajudou durante os projetos e teve paciência para me ensinar. Ao Elias, pela ajuda durante a execução do projeto. Agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada e sei que cada um sabe da sua importância na minha vida. Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Capes pela concessão da bolsa e auxílio no desenvolvimento e execução do experimento.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

## SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	01
INTRODUÇÃO	02
REVISÃO DA LITERATURA	04
OBJETIVOS	09
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

## RESUMO

As características de carcaça e qualidade da carne incluem uma rede complexa de expressão de genes. Dentre esses podemos destacar o gene GDF-8 (*Growth Differentiation Factor 8*) associado a proliferação de mioblastos e formação da fibra muscular e o gene PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ) relacionado a lipogênese, adipogênese e oxidação dos ácidos graxos. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão desses genes no músculo *Longissimus* de ovinos Pantaneiros e a correlação com características de carcaça e desempenho. Para tanto, amostras do músculo *Longissimus* foram utilizadas para análise de expressão por meio de RT-qPCR em nove cordeiros Pantaneiros. Não houve correlação entre os diferentes pesos de abate com ambos genes estudados. Esse fato pode estar relacionado ao tamanho amostral reduzido. Porém, foi possível verificar que houve variações de expressão dos genes entre diferentes pesos. Não houve correlação significativa do gene GDF-8 para as características de carcaça e de desempenho. No entanto, a expressão do PPAR $\gamma$  apresentou correlação positiva para as características de marmoreio, textura avaliadas no *Longissimus* e pH dos músculos *Gluteobiceps*, *Triceps brachii*, *Semimembranosus* e *Longissimus*, e correlação negativa para eficiência alimentar e protéica. Houve correlação entre o aumento da expressão do gene PPAR $\gamma$  com quantidade de marmoreio, característica relacionada com a suculência da carne. Dessa forma, os resultados mostraram o potencial de aplicação do marcador PPAR $\gamma$  na seleção ovinos Pantaneiros para as características qualitativas da carne.

**Palavras chave:** Adipogênese, expressão gênica, marmoreio, miogênese

## ABSTRACT

The carcass traits and the meat quality include a complex network of gene expression. Among these, we can highlight the GDF-8 (*Growth Differentiation Factor 8*) gene associated with myoblast proliferation and muscle fiber formation and the PPAR $\gamma$  gene (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ) related to lipogenesis, adipogenesis and oxidation of fatty acids. In this context, the objective of the study was to evaluate the expression of these genes in the *Longissimus* muscle of Pantaneiros sheep and the correlation with carcass characteristics and performance. For this, samples of the *Longissimus* muscle were used for expression analysis by means of RT-qPCR in nine Pantaneiros lambs. There was no correlation between the different slaughter weights with both genes studied. This fact may be related to reduced sample size. However, it was possible to verify that there were variations of gene expression between different weights. There was no significant correlation of GDF-8 gene for carcass and performance characteristics. However, the PPAR $\gamma$  expression exhibited positive correlation for the marbling, texture characteristics evaluated in the *Longissimus* and pH of the *Gluteobiceps*, *Triceps brachii*, *Semimembranosus* and *Longissimus* muscles, and a negative correlation for feed conversion ratios and protein efficiency. There was a correlation between the increase in the expression of the PPAR $\gamma$  gene with amount of marbling, characteristic related to the succulence of the meat. Therefore, the results exhibit the potential of application of the PPAR $\gamma$  marker in the Pantaneiro sheep selection for the qualitative characteristics of meat.

**Key Words:** Adipogenesis, gene expression, marbling, myogenesis

## INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta alto potencial para a criação de ovinos, porém o rebanho é considerado pequeno quando comparado à criação de bovinos, principalmente devido a desorganização da cadeia produtiva, falta de padronização de cortes, problemas com a escala de produção, falta de plantas frigoríficas e existência de abates clandestinos. Todos esses fatores fazem com que a demanda não seja atendida e interferem na qualidade final do produto (Simplício et al., 2004).

Entre os estados brasileiros, o Mato Grosso do Sul tem se destacado no setor, pela facilidade de acesso a grãos para a alimentação e também pela adaptação e rusticidade de diferentes raças na região (Gomes et al., 2007). O ovino pantaneiro apresenta potencial interessante para ser utilizado na exploração comercial da ovinocultura, principalmente por apresentar características zootécnicas importantes, como: rusticidade, prolificidade e adaptação ao clima. Assim sendo, atende a alguns critérios relacionados ao aspecto mercadológico (Sahin et al., 2008). Muitos estudos foram e estão sendo realizados em relação ao ovino pantaneiro, no entanto, são necessários estudos para determinar o peso ideal de abate, que é um dos fatores mais importantes, pois evita gastos desnecessários com alimentação e carcaças com grande quantidade de gordura (Osório & Osório, 2005).

Além de atender aspectos zootécnicos, é importante que características de qualidade da carne também sejam atendidas. A qualidade da carne é influenciada por fatores *ante-mortem* (genéticos, idade, sexo, nutrição e manejo) e *post-mortem* (resfriamento de carcaça, pH, cozimento e maturação) (Asghar & Pearson, 1980). Os processos bioquímicos envolvidos no *post-mortem* atuam na transformação do músculo em carne, e estes são influenciados pelos fatores *ante-mortem*, que estão envolvidos com a expressão de genes capazes de sintetizar proteínas que influenciam na qualidade da carne (Soria & Corva, 2004).

Há vários genes associados à deposição de músculo e gordura. Dentre os relacionados a miogênese destaca-se o gene da miostatina ou GDF-8 (*Growth Differentiation Factor 8*), que influencia no crescimento e diferenciação do músculo esquelético (Mcpherron et al., 1997). A miostatina atua no músculo, controlando a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares. Dessa forma, a quantidade de células musculares e o rendimento da carcaça podem estar relacionados com a sua expressão (Cieslak et al., 2003). E relacionado a adipogênese, o gene PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ) faz parte de uma família de receptores nucleares envolvidos na diferenciação de adipócitos influenciando na estocagem de ácidos graxos (AG) no tecido adiposo (Rangwala et al., 2000).



O estudo da expressão de genes por meio de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é uma ferramenta molecular que permite identificar respostas biológicas de importantes genes que estão relacionados com características de crescimento e desenvolvimento em animais de produção (Heid et al., 1996).

Dentro desse contexto, os genes GDF-8 e PPAR $\gamma$  podem ser genes candidatos por atuarem no músculo e tecido adiposo respectivamente, servindo como marcadores moleculares para avaliar as características de expressão gênica relacionadas ao desenvolvimento da musculatura da carne e adipogênese. Estudos a partir da biologia molecular, bem como, avaliação da expressão de genes determinantes para características quantitativas e qualitativas podem inferir sobre o padrão de crescimento e desenvolvimento, sendo uma ferramenta que pode contribuir para melhorar as características do grupamento genético Pantaneiro.

## REVISÃO DA LITERATURA

As raças ovinas (*Ovis aries*) foram introduzidas no Brasil durante a colonização e eram utilizadas para fins alimentares e produção de lã. Durante muito tempo a multiplicação desses animais ocorreu sem nenhuma interferência do homem, e estes adquiriram características adaptativas e produtivas resultantes da seleção natural pela qual passaram nas diferentes regiões brasileiras (Mariante & Egito, 2002).

A ovelha Pantaneira por muito tempo adaptou-se as condições ambientais do Pantanal sul matogrossense sem nenhum manejo reprodutivo ou sanitário. A adaptação do grupamento genético são evidenciadas em suas características, como a distribuição de lã no corpo (não possui lã na barriga e membros), o porte varia de pequeno a médio, apresenta precocidade sexual (machos e fêmeas) e não possuem sazonalidade reprodutiva (Ferreira et al., 2012). Os cordeiros nascem com aproximadamente 3 kg, são animais que apresentam aptidão para carne, leite, pele e lã (fins artesanais). Porém, é necessário definir critérios e objetivos de seleção para obter ganhos satisfatórios. Possui características de carcaça desejáveis e em sistemas intensivos ou semi-intensivos apresenta bom desempenho, sendo possível abater cordeiros com 5 meses de idade (Carmona, 2010).

Desde o século XX a ovinocultura vem apresentando um crescimento em seu rebanho e ao mesmo tempo iniciaram-se estudos de programas para o melhoramento genético de várias raças (Pereira, 2008). A ovinocultura é considerada uma atividade com potencial econômico, entretanto apresenta sistemas de produção de carne ainda ineficientes, como: abate clandestino e cortes não padronizados. Esses aspectos influenciam na disponibilidade e qualidade final do produto e conseqüentemente na aceitabilidade dos consumidores (Simplício et al., 2004).

A determinação do peso ideal é um importante fator, pois, além de estar relacionado com rendimento muscular também é relacionado com elevadas quantidades de gordura e componentes não constituintes da carcaça. Porém, a desorganização da cadeia produtiva e falta de programas de seleção por meio do melhoramento genético faz com que a característica não alcance os melhores valores de produtividade na ovinocultura (Garcia et al., 2004).

A qualidade da carne tem sido um aspecto relevante, é crescente a busca por uma carne com maior qualidade nutricional, assim como, suculenta e macia (Borges et al., 2006). Tanto aspectos genéticos quanto ambientais podem interferir na qualidade da carne. Pesquisas com genes candidatos que atuam na expressão de características que influenciam na qualidade

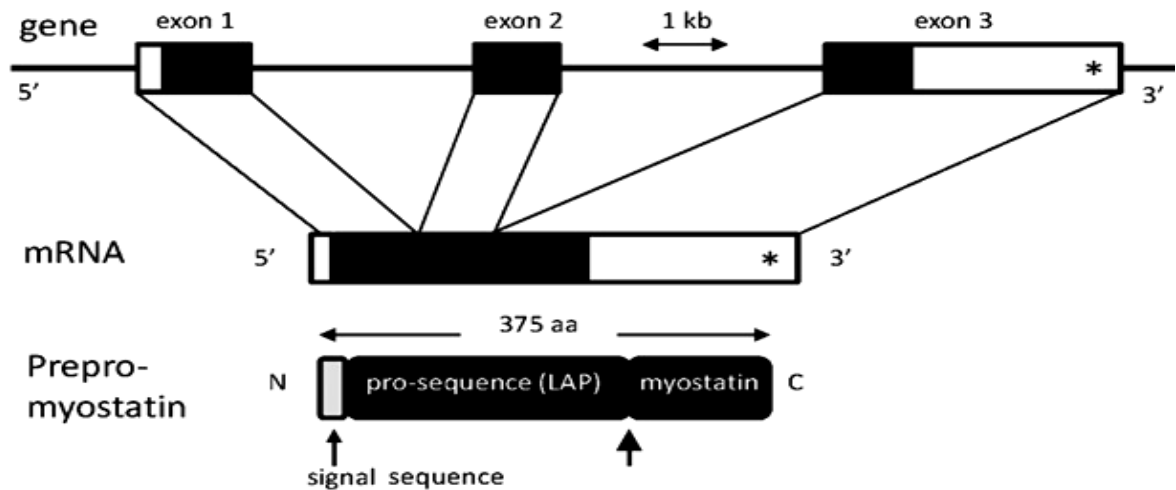
da carne contribuem para identificar marcadores que possibilitem obtenção de carne com maior qualidade e que atenda as características quantitativas (Bagatoli, 2013).

Entre os fatores que podem influenciar na qualidade durante a transformação do músculo em carne, o pH constitui um dos mais importantes, principalmente por atuar no estabelecimento do *rigor mortis* (Osório & Osório, 2000). O pH muscular do animal vivo varia entre 7,3 e 7,5 (Zeola et al., 2002). Após o abate, durante o processo de transformação do músculo em carne, a utilização do glicogênio muscular por meio da glicólise anaeróbica tem como consequência a formação de ácido lático, sendo este, um dos fatores que contribuem para a queda do pH que fica entre 5,5 a 5,8 após 24 horas do abate (Silva Sobrinho, 2005). O pH apresenta grande influência nas propriedades de cor, textura, capacidade de retenção de água, refletindo também na maciez, sabor e vida de prateleira do produto, sendo que valores acima de 6,0 fazem com que a carne tenha menor vida de prateleira, pois favorece o crescimento de microrganismos. (Ramos & Gomide, 2007).

A gordura intramuscular ou marmoreio é diretamente relacionada aos aspectos sensoriais da carne. Quando o animal atinge a maturidade há maior deposição de gordura na carcaça e conseqüentemente maior taxa de marmoreio (Bridi et al., 2011).

A textura da carne é avaliada visualmente através da granulação da superfície de corte e tem grande influência na aceitabilidade da carne. A textura fina indica um diâmetro menor das fibras musculares, confere melhor aparência e é uma característica apresentada pelos animais jovens (Huff & Parrish, 1993). Já a textura grosseira, indica diâmetro maior das fibras musculares, característica apresentada pelos animais à medida que envelhecem (Forrest et al., 1979).

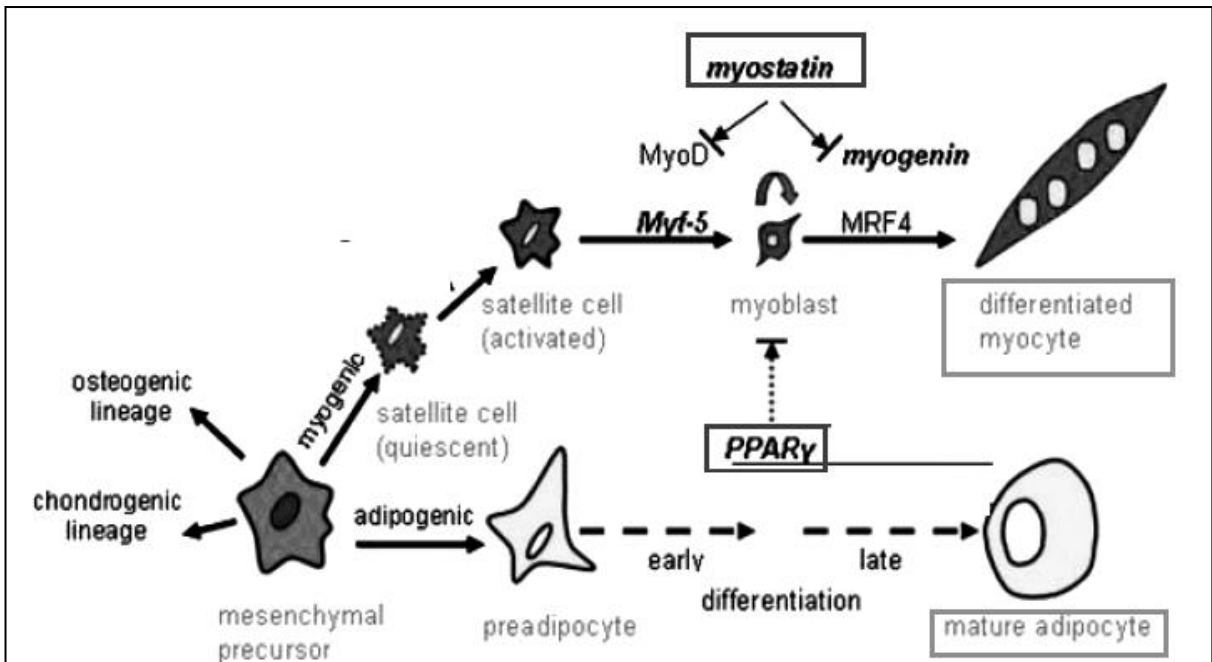
A miostatina faz parte da família das supercitocinas dos TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) cuja função é controlar a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares (Cieslak et al., 2003). Possui estrutura molecular altamente conservada, e o gene é constituído de três éxons e dois íntrons codificando um precursor de aproximadamente 375 aminoácidos (Guizoni et al., 2010) (Figura 1).



**Figura 1** – Representação do gene da miostatina ou GDF-8 e sua estrutura proteica (adaptado de Tellam et al, 2012).

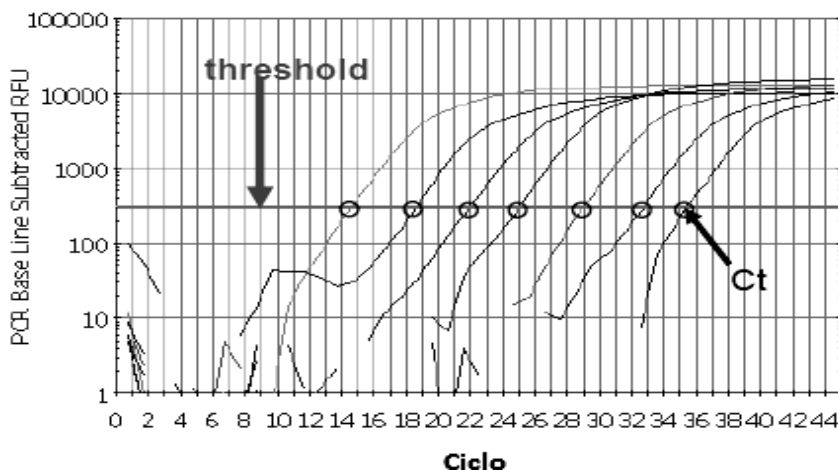
A disfunção dessa proteína pode ser ocasionada por uma mutação e simultaneamente alterar a estrutura muscular, a diminuição da expressão deste gene pode influenciar no aumento de três vezes a massa muscular (Lee & Mcpherron, 2001). Além de atuar na musculatura a miostatina também pode influenciar na deposição de gordura, o menor acúmulo de gordura é ocasionado pela deleção do gene que a codifica (Guizoni et al., 2010). Neste contexto, a miostatina é um gene candidato, pois pode influenciar no músculo esquelético controlando a proliferação dos mioblastos e a quantidade de fibras musculares (Cieslak et. al., 2003).

O gene  $PPAR\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$* ) pertence à superfamília de receptores nucleares que são proteínas que regulam o metabolismo lipídico e a adipogênese (Kliewer et al., 1995). Está localizado no cromossomo 19 em ovinos e constitui-se de 17 éxons, totalizando 121 pares de bases (pb). O gene é um dos principais reguladores centrais do processo de adipogênese e atua na diferenciação de adipócitos imaturos (pré-adipócitos) em adipócitos maduros (Ailhaud et al., 2004). Os ácidos graxos atuam como reguladores transcricionais e ativadores de genes como o  $PPAR\gamma$  (Amri et al., 1991).



**Figura 2** - Representação esquemática do controle da miogênese e adipogênese pelos genes da miostatina e PPAR $\gamma$  (Adaptada de Frey et al., 2008)

Existem algumas metodologias utilizadas para a identificação e isolamento de genes expressos diferencialmente, entre estas destaca-se a reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). A técnica mensura quantitativamente a expressão de genes em determinado tecido ou amostra biológica a partir de uma quantidade mínima de ácidos nucleicos e representa grande avanço nos métodos moleculares (Heid, 1996). A RT-qPCR baseia-se na transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase sendo possível monitorar em tempo real o progresso de uma reação de PCR por meio da utilização de intercalantes fluorescentes, sem a necessidade de processamento pós-PCR e assim obter resultados quantitativos correspondentes a dados qualitativos (Bustin et al., 2005). Os valores de expressão são obtidos durante a fase exponencial da reação em tempo real. Sendo o Ct (*Cycle threshold*) o ponto no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (Figura 3).



**Figura 3** - Curva de amplificação do qPCR em Tempo Real. CT: Ciclo de quantificação (ponto no tempo) onde a reação cruza o limiar de detecção (Adaptado de Life Science Research).

O Ct permite a quantificação de ácidos nucleicos baseada na fluorescência, onde ligantes fluorescentes geram um sinal que aumentam em proporção direta à quantidade de produto da PCR. Os valores de fluorescência são avaliados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (Novais & Alves, 2004).

Para realizar a qPCR é necessário um termociclador com sistema ótico para excitação e coleta da emissão de fluorescência oriunda da amplificação, e um computador com um software para a análise final dos dados da reação (Novais & Alves, 2004).

Dois diferentes métodos são utilizados na análise de qPCR: quantificação absoluta e relativa. A absoluta determina o número de cópias do transcrito de interesse baseado numa curva padrão, enquanto que a relativa descreve a diferença de expressão entre dois grupos, no qual, geralmente se usa um gene controle ou referência (Livak & Schmittgen, 2001). Na quantificação relativa é essencial a escolha correta de genes para normalizar a expressão do gene alvo. Robinson et al., (2006) avaliando os genes 18S rRNA, Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Ribosomal Protein Large (RPLP0) e  $\beta$ -10 actina em bovinos verificaram que os genes GAPDH e  $\beta$ -actina obtiveram melhor eficiência como genes normalizadores. O gene normalizador é comparado com o gene de interesse através dos valores de Ct, e então normaliza os resultados obtidos, corrigindo as diferenças nas concentrações de cDNA nas reações de PCR (Livak & Schmittgen, 2001).

Dentro desse contexto, a técnica de qPCR permite a obtenção de resultados quantitativos da expressão de genes que atuam nas fases de desenvolvimento e crescimento de animais de produção. E, também é possível identificar genes que podem ser determinantes para características qualitativas e quantitativas da carne de ovinos Pantaneiros.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão dos genes GDF-8, PPAR $\gamma$  no músculo *Longissimus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a qualidade e integridade do RNA extraído proveniente de tecido muscular;
- Estabelecer protocolos padrão para obtenção de cDNA e PCR em tempo real (RT-qPCR);
- Correlacionar a expressão gênica dos genes GDF-8 e PPAR $\gamma$  no músculo *Longissimus* com características de carcaça e desempenho de ovinos Pantaneiros abatidos com diferentes categorias de peso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ANIMAIS

O grupo experimental foi constituído de nove cordeiros Pantaneiros, machos, não castrados e de idades similares. O experimento foi desenvolvido no módulo de confinamento do Centro de Pesquisa de Ovinos (CPO) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os cordeiros foram confinados em baias individuais recebendo a mesma dieta, constituída de feno de aveia e concentrado (ração comercial) com relação concentrado:volumoso (20:80). A dieta era fornecida duas vezes ao dia, às 7h30min e às 16 h com ajustes diários para permitir uma sobra de 15% do total fornecido e água disponível á vontade. Os animais permaneceram confinados até atingirem os pesos de abate pré-determinados (15, 25 e 35 kg de peso vivo). Quando os animais atingiam os pesos de abate, estes eram submetidos a 16 h de jejum de sólidos e insensibilizados por eletronarcese e abatidos por meio da sangria. Todos os procedimentos de abate obedeceram às normas do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (Brasil, 1952) e Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue (Brasil, 2000) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Grande Dourados, com o protocolo n° 018/2013.

### AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FENOTÍPICOS

#### Características de Desempenho

Os animais eram pesados semanalmente durante o período de confinamento e ao atingirem os pesos pré-determinados de 15, 25 e 35 kg de peso vivo eram abatidos.

A eficiência alimentar e protéica foram mensuradas por meio das fórmulas: eficiência alimentar = ganho de peso/consumo diário matéria seca, e eficiência protéica = ganho de peso/consumo diário proteína bruta (Tabela 1).

#### Características de Carcaça

Após o abate as carcaças foram resfriadas em câmara frigorífica por 24 horas a 4°C. Posteriormente foi realizada a mensuração do pH da paleta (*Triceps brachii*), do pernil (*Semimembranosus*), do lombo (*Longissimus*) e do *Gluteobiceps* utilizando pHmetro digital portátil (Tabela 1). Também foram avaliadas a textura (escala visual de 1 a 5) e marmoreio (escala visual de 1 a 5) (Tabela 1) segundo a metodologia descrita por Osório & Osório (2005) (Tabela 2).



Parâmetros	Pesos (kg)			Máximo	Mínimo	Desvio padrão
	15	25	35			
Marmoreio	1,33	1,50	1,67	2,00	1,00	0,354
Textura	4,00	4,00	4,67	5,00	3,00	0,795
pH <i>Longissimus</i>	5,57	5,67	5,67	5,82	5,44	0,104
pH <i>Semimembranosus</i>	5,53	5,70	5,72	5,92	5,50	0,140
pH <i>Gluteobiceps</i>	5,57	5,73	5,70	5,94	5,50	0,125
pH <i>Triceps brachii</i>	5,69	5,85	5,86	6,09	5,62	0,140
Eficiência alimentar	0,31	0,24	0,24	0,34	0,18	0,050
Eficiência protéica	2,09	1,53	1,51	2,39	1,12	0,410

**Tabela 2.** Escala de textura e marmoreio

Índice	Descrição Textura	Descrição Marmoreio
1,0	Muito grosseira	Inexistente
1,5		
2,0	Grosseira	Pouco
2,5		
3,0	Média	Bom
3,5		
4,0	Fina	Muito
4,5		
5,0	Muito fina	Excessivo

Adaptada de Osório & Osório (2005)

## COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após abate, amostras do músculo *Longissimus* entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela de cada animal foram coletadas para extração de RNA e posterior análise de expressão gênica. As amostras foram acondicionadas em microtubos criogênicos, devidamente identificados, congelados e armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram transferidas para ultrafreezer - 80° C até o momento da extração do RNA total.

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE PCR QUANTITATIVA

### Extração do RNA Total

O RNA total foi obtido do músculo *Longissimus*, de acordo com a metodologia de Chomczynski & Sacchi (1987) utilizando Trizol Reagent® (Sigma Aldrich). Inicialmente, as amostras de músculo de cada animal foram pesadas (100 mg) e, em seguida maceradas utilizando nitrogênio líquido até virar pó. Posteriormente o material biológico foi colocado em microtubos de 1,5 mL, adicionado 1mL de Trizol e homogeneizadas em *vortex* para que as

amostras dissolvessem completamente. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio. Em seguida foram homogeneizadas por inversão até ficar com aparência de rosa leitoso e mantidas em temperatura ambiente por 3 minutos. Logo após foram centrifugadas à 4°C por 15 minutos a 12.000 g em centrífuga refrigerada. A fase aquosa (sobrenadante) das amostras foi transferida para um outro microtubo de 1,5 mL e adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol e homogeneizadas imediatamente por inversão para evitar formação de precipitado e incubadas em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente à 4° C por 10 minutos a 12000 g, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de álcool 75% e novamente foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 12000 g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até que estivessem completamente secas. O RNA foi eluído em 30  $\mu$ L de solução tampão TE (Tris-EDTA) livre de RNase e foi submetido ao tratamento com 1  $\mu$ L da enzima DNase I (1u/ $\mu$ l) (Promega) para remoção de possível DNA genômico, posteriormente incubado a 37°C por 10 minutos. Em seguida os microtubos contendo RNA foram armazenados em ultrafreezer - 80°C.

### **Análise da Integridade e Pureza do RNA Total**

A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,5%) a partir da presença das bandas 18S e 28S que correspondem aos RNAs ribossomais. As amostras de RNA foram analisadas em nanofotômetro (DS-11 DeNovix) para determinação da sua concentração e pureza. Para tanto foram avaliadas pela relação entre a absorvância em 260 e 280 nm. Posteriormente, foram armazenadas em ultrafreezer - 80 °C até a realização da síntese de cDNA.

### **Síntese de cDNA**

A partir do RNA total, foi obtido o cDNA utilizando do Kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega®), seguindo o protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada por meio de duas reações: (1) preparação do RNA (1  $\mu$ L de RNA total (1000 ng), 0,5  $\mu$ L de Oligo (dT), 0,5  $\mu$ L de Random primers, 7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura) com volume final de 10  $\mu$ L para cada amostra, este foi incubado a 70°C por 5 minutos e posteriormente incubado no gelo até a preparação do mix da reação (2) de transcriptase reversa (4  $\mu$ L de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1  $\mu$ L PCR Nucleotide Mix, 0,5  $\mu$ L de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 1  $\mu$ L GoScript™ Reverse Transcriptase e 1,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O livre de nucleases) com volume final de 10  $\mu$ L para cada amostra. Após a preparação das reações, foi adicionado na reação (1) o mix da reação (2),

obtendo volume final de 20 µL para cada amostra. Posteriormente incubou-se por 5 minutos a 25°C para anelamento e por 15 minutos a 70°C para extensão final. Para conferir a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA foi realizada a síntese de um controle (sem a adição de transcriptase reversa durante a síntese de cDNA). Após a síntese do cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer - 20°C para posterior realização da quantificação por meio de RT-PCR.

### Descrição dos genes

A avaliação da expressão foi realizada utilizando 2 genes de interesse (GDF-8 e PPAR $\gamma$ ) e os resultados foram correlacionados com características de carcaça e de desempenho e como controle endógeno da reação de RT-qPCR foi utilizado o gene GAPDH (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*). As sequências dos *primers* e os números de acesso ao GenBank dos genes utilizados estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Sequência dos primers utilizados, tamanho do fragmento (TF) e temperatura de anelamento (TA) para os genes GDF-8, PPAR $\gamma$  e GAPDH.

Genes <sup>1</sup>	Sequência dos primers (5' -> 3') Forward e Reverse	TF (pb)	TA (°C)	Acesso no Genbank	Referência
<b>GDF-8</b>	ACCCATGAAAGACGGTACAAG CAATGCTCTGCCAAATACCAG	86	60	AB076403	Bagatoli et al., 2013
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	CTTGCTGTGGGGATGTCTC GGTCAGCAGACTCTGGGTTC	121	60	AY137204	Dervishi et al., 2011
<b>GAPDH</b>	ATGCCTCCTGCACCACCA AGTCCCTCCACGATGCCAA	76	60	HM043737	Dervishi et al., 2011

<sup>1</sup>GDF-8: Growth Differentiation Factor 8; PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ ; GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase. Pb: pares de base

### PCR

A PCR convencional para amplificação dos genes alvos foi realizada para padronizar a amplificação, verificar a qualidade do cDNA e ausência de material contaminante. As reações foram constituídas de 9,5 µL de água ultrapura, 1µL de *primer Forward* (10 µM), 1µL de *primer Reverse* (10 µM), 12,5 µL PCR Master Mix (Promega®) e 1 µL do cDNA (1000 ng) totalizando volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas no termociclador da BIORAD® modelo *MyCycler<sup>TM</sup> thermalcycler*. O protocolo utilizado para as reações de amplificação foi constituído de: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 15 segundos para desnaturação do cDNA a 95°C, 30 segundos para anelamento dos *primers* a 60°C, 30 segundos para extensão a 72°C, e 15 minutos para extensão final a 72°C. Os ciclos para desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 35 vezes no termociclador.

### **PCR em Tempo Real (RT-qPCR)**

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o sistema SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR) seguindo o protocolo recomendado pelas instruções do fabricante. Para cada reação foi utilizado 2,0 µL de cDNA, 0,3 µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) e 5,0 µL de Master Mix Syber Green e 2,4 µL de H<sub>2</sub>O para um volume final de 10,0 µL por amostra, em uma placa para reação com 96 poços (Bio-Rad Hard-Shell® PCR Plates). Todo o experimento de RT-qPCR para cada gene foi realizado a partir de cDNAs diferentes, obtidos por meio de 3 repetições biológicas (pesos 15, 25 e 35 kg) e três réplicas técnicas (15 (3); 25 (3) e 35 (3)).

Os valores de Ct foram normalizados em relação ao Ct da expressão do gene referência (GAPDH) para cada amostra e gene estudado de acordo como o método  $\Delta$ Ct e ( $\Delta\Delta$ Ct) (Livak; Schmittgen, 2001). Além disso, para cada gene foram realizadas curvas de diluição ( $1^{-1}$  a  $1^{-5}$ ) para obter o valor de eficiência de amplificação.

A RT-qPCR foi realizada no termociclador em tempo real CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) no Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (LPCS) da UFGD. As condições de reação foram 3 minutos a 95°C, 3 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C seguidos por 39 ciclos e finalizando com 5 segundos a 95°C.

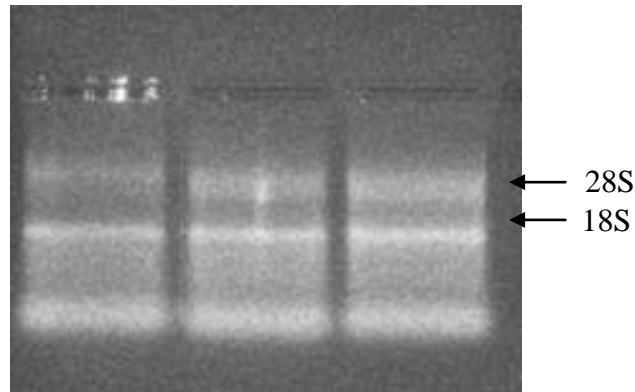
Os dados foram coletados e avaliados no software Bio-Rad CFX Manager 3.1. Os resultados de expressão obtidos por meio da RT-qPCR foram correlacionados com características de carcaça e de desempenho.

### **ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados de concentração de expressão de ambos genes (GDF-8 e PPAR $\gamma$ ) associados com as características fenotípicas descritas, foram avaliados utilizando pacotes estatísticos do software GraphPad Prism, v.5;01. Neste, os valores da expressão das amostras e os valores fenotípicos de cada característica foram submetidos à análise de correlação não-paramétrica - Spearman, com intervalo de confiança de 95% e análises de Regressão linear com intervalo de 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de RNA foi eficiente como observado no gel de agarose desnaturante 1,5% (Figura 4). Assim como os resultados de concentração e pureza provenientes das análises em nanofotômetro (Tabela 4)

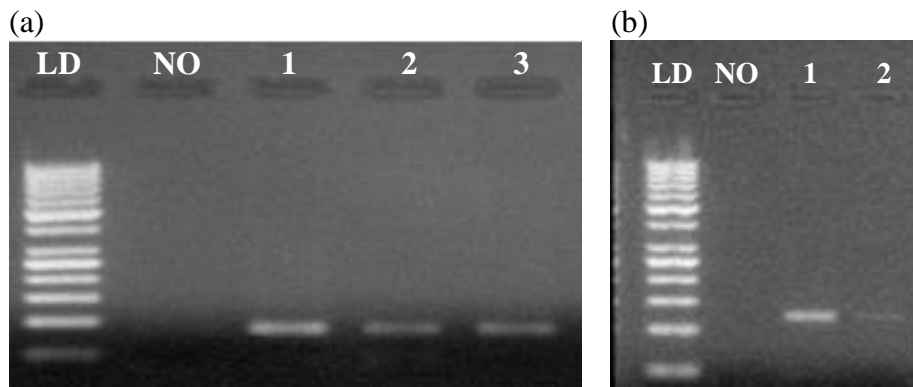


**Figura 4.** Amostras de RNA total isolado de músculo *Longissimus* separadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% corado com brometo de etídio. As bandas maiores correspondem a RNAs ribossomais 28S e 18S.

**Tabela 4.** Avaliação da concentração e razão do RNA extraído

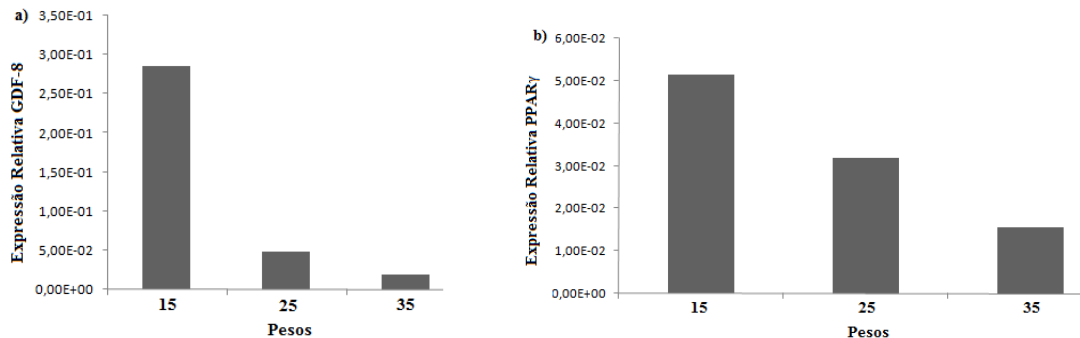
Amostras	Concentração( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Razão (280/260)
1	663,7	1,84
2	279,5	1,69
3	234	1,79
4	444,2	1,84
5	260	1,94
6	842,1	1,84
7	656	1,70
8	722	1,90
9	543,8	1,90

Os genes GDF-8 e PPAR $\gamma$  foram amplificados por PCR convencional (Figura 5), indicando que o material (cDNA) pode ser utilizado para etapas posteriores.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 2% evidenciando a amplificação do gene GDF-8 (86 pb) e PPAR $\gamma$  (121 pb). NO: controle negativo. LD: Ladder de 50 pb.

Os resultados da expressão gênica relativa dos genes GDF-8 (a) e PPAR $\gamma$  (b) estão apresentados na Figura 6.



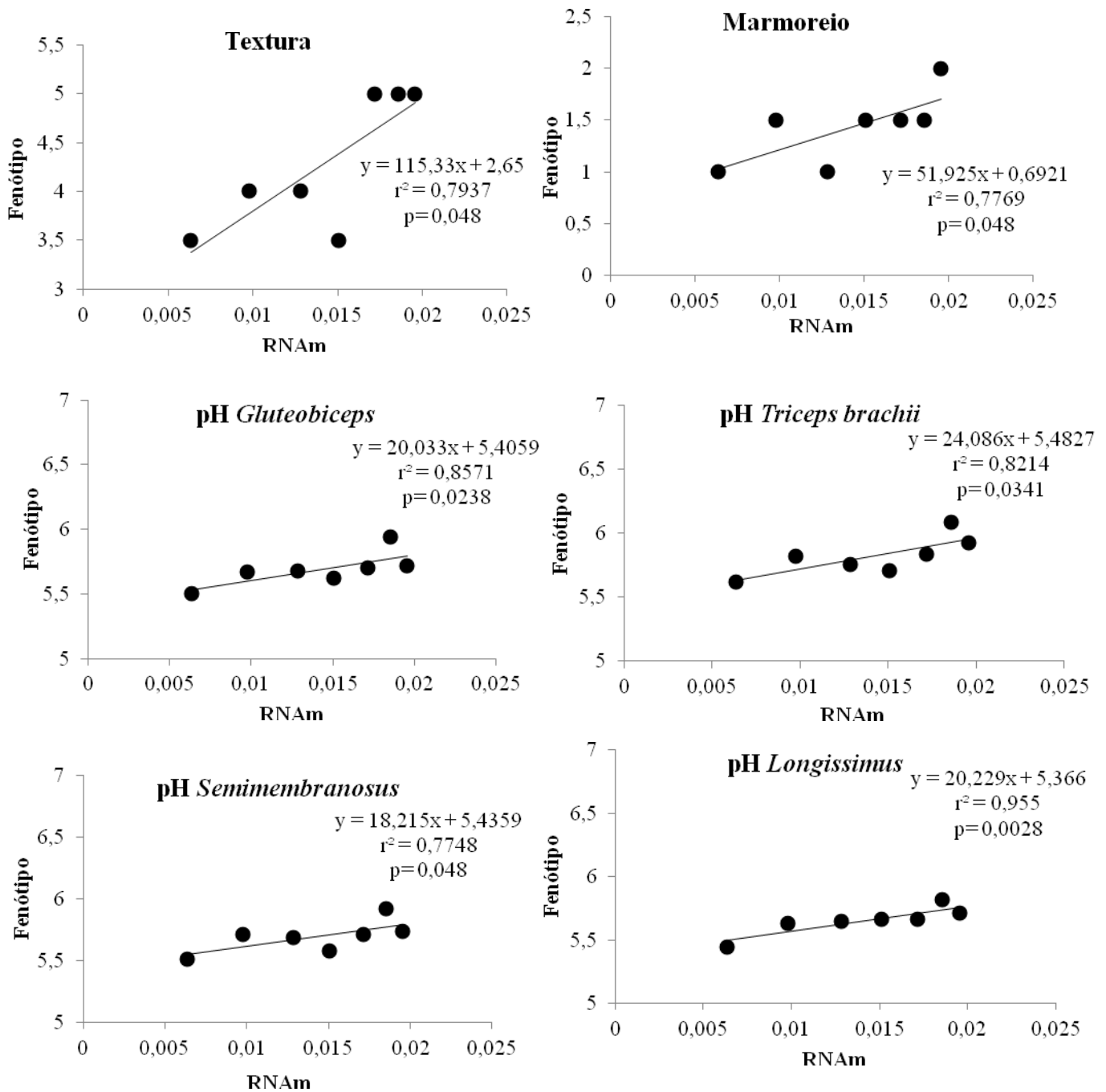
**Figura 6.** Diferença de expressão relativa dos genes GDF-8 (a) e PPAR $\gamma$  (b) em músculo *Longissimus* de ovinos Pantaneiros abatidos com 15, 25 e 35 kg.

Nos pesos de 15 kg os animais eram alguns dias mais jovens que os animais com 35 kg. Esse fato pode ter influenciado na diferença de expressão desse genes. No entanto não houve diferença estatística significativa. Porém, estudo com um grupo mais representativo pode demonstrar de maneira mais efetiva tal possibilidade.

Não houve correlação significativa entre os resultados da expressão do gene GDF-8 com os dados fenotípicos referentes aos pesos, avaliação de características de carcaça e desempenho.

Para o gene PPAR $\gamma$  não houve correlação em relação aos pesos. No entanto houve correlação positiva significativa entre a expressão do PPAR $\gamma$  com as características de textura, marmoreio, pH dos músculos *Gluteobiceps*, *Triceps brachii*, *Semimembranosus* e *Longissimus* (Figura 7) e correlação negativa significativa para eficiência alimentar e eficiência protéica (Figura 8).

A deposição de gordura intramuscular (marmoreio) está associada principalmente com fatores genéticos e nutricionais (Pethick et al., 2004). Dentre os fatores genéticos, há genes que participam na formação do tecido adiposo (Robinson & Grieve, 2009) e estão envolvidos na ligação, absorção e armazenamento de ácidos graxos (Wu et al., 1995) como o PPAR $\gamma$ . Este gene faz parte de uma família de receptores nucleares que influenciados por ácidos graxos desempenham importante papel na regulação do metabolismo de nutrientes e na homeostase energética (Lemay & Hwang, 2006).



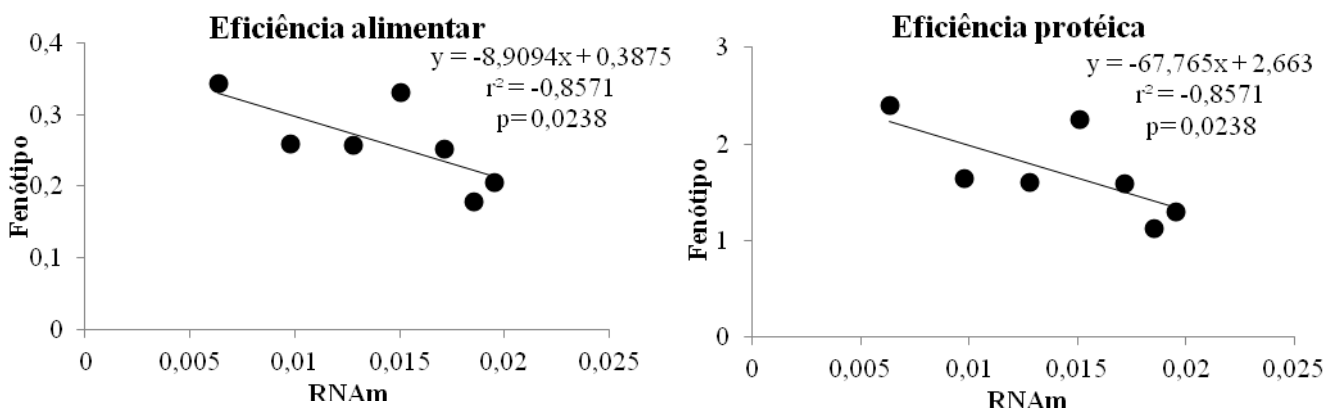
**Figura 7.** Representação gráfica da correlação positiva entre as características de carcaça e expressão do gene PPAR $\gamma$ .

De acordo com os resultados, a expressão do gene PPAR $\gamma$  apresentou correlação positiva com a maior deposição de gordura de marmoreio. Isso indica que o gene está diretamente relacionado com esta importante característica de interesse comercial (Barendse et al., 2004) que têm influencia na suculência e sabor da carne (Hocquette et al., 2010). Estudos realizados por Rakhshandehroo et al., (2010) demonstraram que o PPAR $\gamma$  está ativo no tecido adiposo de ruminantes e que este desempenha função semelhante em monogástricos, como a participação na regulação da adipogênese e sensibilidade a insulina.

Para os valores de textura também houve correlação positiva significativa. Segundo Campion et al., (1975), é desejável que a carne apresente teor de gordura intramuscular superior a 2%, para favorecer as características de qualidade, como suculência e percepção de maciez. E, quando as médias de gordura no músculo *Longissimus* são inferiores a esse valor, pode influenciar de forma negativa na textura da carne.

Após abate, acontecem eventos bioquímicos que atuam na transformação do músculo em carne. Esses processos são resultados das reações químicas *post-mortem* e a velocidade da queda do pH, causada pelo acúmulo de ácido láctico, constitui um dos fatores que podem interferir na qualidade da carne (Pardi et al., 1993). A gordura atua como isolante térmico durante o processo de resfriamento, dessa forma, quando em maior quantidade, diminui a intensidade de refrigeração da carcaça e interfere na aceleração da glicólise e resultando na diminuição rápida do pH (Smith et al., 1976).

A expressão do gene PPAR $\gamma$  foi correlacionada negativamente (Figura 8) com a eficiência alimentar e protéica, estas são relacionadas ao desempenho em relação ao consumo de MS (matéria seca). Foi observado que quanto maior a expressão do gene, menores foram os valores de eficiência alimentar e protéica, ou seja, o animal está conseguindo converter eficientemente os nutrientes presentes na dieta com menor consumo de alimento, e o gene está favorecendo esse processo.



**Figura 8.** Representação gráfica da correlação negativa entre eficiência alimentar e protéica e expressão do gene PPAR $\gamma$ .

Segundo Valadares Filho et al., (2006) a deposição de gordura, em termos energéticos, é mais onerosa que a deposição de músculo, pois a gordura contém o dobro da energia contida na proteína e dessa forma, quando o animal inicia a deposição de gordura na carcaça os valores de eficiência alimentar aumentam, pois há um gasto de energético relativamente maior e conseqüentemente diminuição na conversão alimentar.



Embora neste estudo tenha sido realizada análise em número reduzido de amostras e com animais abatidos em intervalos de peso grande, os resultados obtidos indicam que a expressão do gene PPAR $\gamma$  influencia na deposição de gordura intramuscular que é uma importante característica que confere maior suculência na carne.

## **CONCLUSÃO**

A partir dos protocolos utilizados para extração do RNA, síntese de cDNA e qPCR foi possível obter eficientes resultados, assim como correlacionar a expressão dos genes GDF-8 e PPAR $\gamma$  como as características de carcaça e desempenho de ovinos Pantaneiros abatidos com diferentes categorias de peso. Houve correlação entre o aumento da expressão do gene PPAR $\gamma$  com quantidade de marmoreio, característica relacionada com a suculência da carne. Dessa forma, os resultados mostraram o potencial de aplicação do marcador PPAR $\gamma$  na seleção de ovinos Pantaneiros para as características qualitativas da carne.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of white adipose tissue. In: Bray AGB, editor. **Handbook of obesity: etiology and pathophysiology**. New York, USA: Marcel Dekker; 2004.
- AMRI, E.Z; BERTRAND, B.; AILHAUD, G.; GRIMALDI, P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. **The Journal of Lipid Research**, v.32, n.9, p.1449-56, 1991.
- ASGHAR, A.; PEARSON, A.M. Influence of ante and postmortem treatments upon muscle composition and meat quality. **Advanced Food Research**, v.26, p.53-213, 1980.
- BAGATOLI, A.; GASPARINO, E.; SOARES, M.A.M.; AMARAL, R.M.; MACEDO, F.A.F.; VOLTOLINI, D.M.; DEL VESCO, A.P. Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.4, p.6168-6175, 2013.
- BARENDSE, W.; BUNCH, J.R.; THOMAS, M.; ARMITAGE, S.; BAUD, S.; DONALDSON, N. The TG5 Thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p.669-674, 2004.
- BORGES, A.S.; ZAPATA, J.F.F.; GARRUTI, D.S. Medições instrumentais e sensoriais de dureza e suculência na carne caprina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p. 891-896, 2006.
- BRASIL. Decreto nº. 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1952.
- BRASIL. Instrução Normativa nº. 3, de 17 de janeiro de 2000. Ministério da Agricultura. **Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue**. S.D.A./M.A.A. Diário Oficial da União, Brasília, 2000.
- BRIDI, A.M.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M.A. Qualidade da carne de bovinos produzidos a pasto. Universidade estadual de Londrina, 2011.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p.597–601, 2005.
- CAMPION, D.R.; CROUSE, J.D.; DIKEMAN, M.E. Predictive value of USDA beef quality grade factors for cooked meat palatability. **Journal of Food Science**, v.40, p.1225-1228, 1975.
- CARMONA, R. **Morfometria de Carneiros do grupo genético pantaneiro do CTO**. 2011. 43 p. Dissertação (Mestrado em Produção e Gestão Agroindustrial). Campo Grande: MS. Universidade Anhanguera-UNIDERP, 43p., 2011.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N., Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.

- CIESLAK, D.; BLICHARSKI, T.; KAPELANSKI, W.; PIERZCHALA, M. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Czech Journal of Animal Science**, v.48, n.2, p.69–75, 2003.
- DERVISHI, E.; SERRANO, C.; JOY, M.; SERRANO, M.; RODELLAR, C.; CALVO, J. H. The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. **Meat Science**, v. 89p. 91–97, 2011.
- FERREIRA, M.B; FERNANDES, L.H.; CARMONA, R. Ovelha Pantaneira: uma nova raça de animais com 300 anos de história. **Revista Cabra & Ovelha**, n. 72, 2012.
- FORREST, J.C., ABERLE, E.D., HEDRICK, H.D et al. Fundamentos de ciencia de la carne. Zaragoza: Acribia,. p.364,1979.
- FREY, E.; REGENFELDER, F.; SUSSMANN, P.; ZUMSTEIN, M.; GERBER C.; BORN, W.; FUCHS, B. Adipogenic and Myogenic Gene Expression in Rotator Cuff Muscle of the Sheep after Tendon Tear. **Journal Of Orthopaedic Research**, v.27, p.504–509, 2009.
- GARCIA, I.F.F.;PEREZ, J.R.O.; BONAGURIO, S.; et al. Desempenho de Cordeiros Santa Inês Puros e Cruzas Santa Inês com Texel, Ile de France e Bergamácia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1591-1603, 2004.
- GOMES, W.S.G.; ARAUJO, A.R.; CAETANO, A.R.; MARTINS, C.F.; et al. Origem e diversidade genética da Ovelha Crioula do Pantanal, Brasil. **In: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina y El Caribe**. UniversidadeAutônoma Chapingo, México, 2007.
- GUIZONI, D.M.; LIMA, A.R.R.; MARTINEZ, P.F.; DAMATTO, R.L.; CEZAR, M. D.M.; BONOMO, C.; OKOSHI, K.; PAI-SILVA, M.D.; OKOSHI, M.P. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n.3, p.266-71, 2010.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p.986-994, 1996.
- HOCQUETTE, J.; GONDRET, F.; BAÉZA, E.; MÉDALE, F.; JURIE, C.; PETHICK, D: Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, v.4, p.303–319, 2010.
- HUFF, E.J., PARRISH, J.R. Bovine longissimus muscle tenderness as affected by postmortem aging time, animal age and sex. **Journal of Food Science**, v.58, n.4, p.713-716, 1993.
- KLIEWER, S.A.; LENHARD, J.M.; WILLSON, T.M; PATEL, I.; MORRIS, D.C.; LEHMANN, J.M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v.83, n.5, p.813-9,1995.
- LEE, Se-J.; McPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.16, p.9306–9311, 2001.

- LEMAY, D.G.; HWANG, D.H. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. **Journal of Lipid Research**, v.47, n.7, p.1583-1587, 2006.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$  Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, 57: 223–235, 2002.
- MCPHERRON, A.C.; LAWER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v.387, n.6628, p.83-90, 1997.
- NOVAIS, C.M. & ALVES, M.P. qPCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição n° 33. p. 10 – 13. Julho/Dezembro, 2004.
- OSÓRIO, M.T.M. e OSÓRIO, J.C.S. Condições de abate e qualidade de carne. In: EMBRAPA. Curso de qualidade de carne e dos produtos cárneos. Bagé/RS: EMBRAPA, v. 4, cap. 7, p. 77-128, 2000.
- OSÓRIO, J.C.S.; OSÓRIO, M.T.M. Produção de carne ovina: Técnicas de avaliação “in vivo” e na carcaça. 2ed. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Edição Universitária, 82p., 2005.
- PARDI, M.C; SANTOS, I.F. SOUZA, E.R; PARDI, H.S. Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da sua obtenção e transformação. Goiânia: Centro Editorial e Gráfico Universidade de Goiás, 1993. v.1, 586p.
- PEREIRA, J.C.C. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. 5ª ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008.
- PETHICK, D.W.; HARPER,G.S.; ODDY, V.H. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p.705–715, 2004.
- RAKSHSHANDEHROO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **PPAR Research**, New York, v.1, n.8, p.1-20, 2010.
- RAMOS, E.M. e GOMIDE, L.A.M. Avaliação da qualidade de carnes, fundamentos e metodologias. Viçosa, v.1, p.120-270, 2007.
- RANGWALA, S.M.; LAZAR, M.A. Transcriptional control of adipogenesis. . **Revista de Nutrição**. 20:535–59, 2000.
- ROBINSON, E., GRIEVE, D.J. Significance of peroxisome proliferator- activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. **Pharmacol. Ther.**v.122, p.246–263, 2009.
- ROBINSON, T.L.; SUTHERLAND, I.A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR, **Veterinary Immunopathology** v.10.1016 p.9 - 12, 2006.

SAHIN, E. H. et al. The use of ultrasound to predict the carcass composition of live Akkaraman lambs. **Meat Science**, v.79, n.4, p.716-721, 2008.

SILVA SOBRINHO, A.G.; PURCHAS, R.W.; KADIM, I.T. et al. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.1070-1078, 2005.

SIMPLÍCIO, A.A.; WANDER, A.E.; LEITE, E.R.; LOPES, E.A. A Caprino-ovinocultura de Corte como Alternativa para a Geração de Emprego e Renda. **Sobral: EmbrapaCaprinos**, 2004.

SMITH, G.C; DUTSON, T.R; HOSTETLER, R.L; CARPENTER, Z.L. Fatness, rate of chilling and tenderness of lamb. **Journal of Food Science**, v.41, p.748-756, 1976.

SORIA, L. A.; CORVA, P. M. Factores genéticos y ambientales que determinan La ternera de la carne bovina. **Archivos Latino americanos de Producción Animal**, v.12, n.2, p.73-88, 2004.

TELLAM, R. L.; COCKETT, N. E.; VUOCOLO, T.; BIDWELL, C. A. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. **Frontiers in genetics**, v. 3, 2012.

VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K.A. Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos br-corte . Viçosa: UFV/DZO, 2006.142p

WU, Z.; XIE, Y.; BUCHER, N.L.; BUCHER, N.L.R.; FARMER, S.R. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. **Genes & Development**, v.9, p.2350–2363, 1995.

ZEOLA, N.M.B.L.; SILVA SOBRINHO, A.G.; GONZAGA NETO, S.; SILVA, A.M. Influência de diferentes níveis de concentrado sobre a qualidade da carne de cordeiros Morada Nova. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, 97(544): 175-180, 2002.