



THIAGO SANTOS ARAÚJO

**EFEITO DA RACTOPA MINA SOBRE O
METABOLISMO DE SUÍNOS EM FASE DE
TERMINAÇÃO**

LAVRAS - MG

2012

THIAGO SANTOS ARAÚJO

**EFEITO DA RACTOPAMINA SOBRE O METABOLISMO DE SUÍNOS
EM FASE DE TERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Co-orientadores

Dr.^a Laura Cristina Jardim Porto Pimenta

Dr. Luciano José Pereira

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Araújo, Thiago Santos.

Efeito da Ractopamina sobre o metabolismo de suínos em fase
de terminação / Thiago Santos Araújo. – Lavras : UFLA, 2012.
76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Raimundo Vicente de Sousa.
Bibliografia.

1. Agonistas β -adrenérgicos. 2. Lípase lipoproteica. 3. FAS. 4.
GLUT-4. 5. Nutrição. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.40877

THIAGO SANTOS ARAÚJO

**EFEITO DA RACTOPAMINA (AGONISTA β -ADRENÉRGICO) SOBRE
O METABOLISMO DE SUÍNOS EM FASE DE TERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de Maio de 2012

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Dr. Luciano José Pereira UFLA

Dr. Michel Cardoso de Angelis Pereira UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus avós (in memoriam)

Aos meus pais, Joaquim e Albanita, que me ajudaram diretamente para a realização do meu sonho, pelo apoio, carinho, amor, paciência, atenção e dedicação.

À minha irmã e amiga, Dulcinha, por todo apoio dado, pelo carinho, verdadeiro amor e pela certeza de que sempre poderei contar com ela em qualquer momento em minha vida.

DEDICO
AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve comigo durante toda a minha trajetória e que me deu forças para enfrentar as dificuldades pelas quais passei. Com certeza, sem a Sua ajuda não teria conseguido ter chegado aqui.

À Universidade Federal de Lavras que, com muito orgulho, posso afirmar que se tornou o meu lar desde 2010, momento em que larguei a minha cidade natal para desfrutar da honra de fazer parte da grande família UFLA.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras – PRPG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade que me foi dada de fazer um mestrado de excelente qualidade nesta que é uma instituição de grande prestígio nacional.

Ao orientador, Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, pelo voto de confiança, bem como por toda dedicação, amizade, apoio, respeito e compreensão.

Aos professores co-orientadores Luciano José Pereira e Márcio Gilberto Zangerônimo, pela orientação, grande ajuda e ensinamentos na elaboração desse trabalho. À professora co-orientadora Laura Cristina Jardim Porto, pela excelente profissional que é, sempre disposta a me ajudar, pela orientação, respeito, confiança e amizade construída.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade São Leopoldo Mandic, em Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga e a técnica Jeruza Bossonaro pela ajuda na realização dos *Western Blotting*.

À Prof^a Dr^a Leida Maria Botion, pela gentileza em ceder reagentes e equipamentos utilizados, bem como por ter permitido minha permanência em seu laboratório de pesquisa, pela amizade e por todo conhecimento que me passou.

Às meninas do laboratório de metabolismo celular da Universidade Federal de Minas Gerais, Angélica (Angel) e sua filha Cécys, Fabíola (Fabys), Letícia (Let's), Lili, Nayara (Nay) e Carolina (Kérol) pelos bons momentos vividos no período em que estive em Belo Horizonte, pela ajuda em minhas análises e pela amizade construída. Especialmente agradeço a Carol que andou comigo pela cidade de Belo Horizonte, dentro do SAMU e gentilmente me acompanhou à UPA. À Érica Mario Guilhen (Eriqueth), embora não tenha recebido a placa de neon tão almejada, aqui vai meu agradecimento muito mais que especial, por sua ajuda de enorme valia, sem a qual não seria possível ter meus resultados da atividade enzimática, pela paciência, compreensão e amizade. Agradeço também por toda sua coragem, Érica, no momento em que precisamos de alguém com pulso firme para poder expulsar o monstro (leia: ratazana) do nosso lab.

Aos meus tios que sempre me incentivaram e me ajudaram tantas vezes que precisei. Em especial, a Ricardo, Lila, Rosinha, Geraldo (*in memorian*), Márcia, Fernando e Silvana, que são minha segunda família, a quem devo muito respeito, carinho e gratidão como se fossem meus pais. Aos meus primos/irmãos: Juli, Lili, Marina, Rico e Mariana, principalmente pela amizade e presença constante em minha vida. O apoio incondicional de todos foi fundamental nessa conquista.

Aos meus “tios” e amigos: Mago, Gal, Nathália, Ana, Mauro, Cilene, Dona Vilma, Seu Careca, Frei Paulo, Zuca e tantos outros, cuja ajuda foi fundamental em toda essa minha trajetória. Agradeço enormemente cada gesto de carinho, cada abraço e cada sorriso que me foram dados. Tenho uma dívida de gratidão com todos vocês.

À minha amiga Silvana e à sua família que, com toda simplicidade e amor, me adotaram como membro da família e me ajudaram a enfrentar diversos

obstáculos. Às minhas amigas Bety e Meire, que mesmo distante se fizeram presente em minha vida, pelo carinho e principalmente pela amizade.

Aos amigos da República 7 Pecados: Lucas, Carol, Juliana, pelo incentivo, palavras de conforto e momentos únicos que me proporcionaram. Tantos almoços, brigas, alegrias e festas, culminaram numa amizade que irei levar eternamente em meu coração. Aos amigos da República Orfanato Raio de Luz: Paulo, João, Alex e Jairo, que já no final dessa minha trajetória me adotaram como membro da família orfanato. Valeu por tudo amigos.

Às minhas amigas Marcela e Alessandra, cuja amizade nasceu no início do mestrado e que levarei comigo para sempre. Bianca, Vivian, Renata e Matheus, amigos que fiz durante o mestrado: pelo apoio e ajuda.

Ao meu amigo Juliano Tavares, que me ajudou em tudo durante os meus dois anos aqui em Lavras, pela amizade sincera, paciência e pelos conselhos. Aos meus amigos: Adilson, Ney, Cris, Jonathan, Marcos, Deise, Pauline, Éverton, Renata e Claudia.

À Prof^ª Josefina Bressan pela ajuda dada ao meu projeto no momento de minha qualificação. Seus conselhos foram muito úteis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro dado ao projeto. À Ouro Fino Agronegócio pelo financiamento de alguns utilizados na pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação (MEC), pela bolsa de mestrado concedida.

Aos profissionais que compõem o Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

A todos aqueles não mencionados, cuja colaboração foi importante para a realização deste trabalho.

RESUMO

Compreender o metabolismo lipídico e seus mecanismos regulatórios ajudam desenvolver novas estratégias capazes de modificar a deposição de gorduras nos diferentes tecidos animais e, assim, melhorar a qualidade da carne produzida. Ao ativar receptores β -adrenérgicos específicos, acoplados às proteínas G, a ractopamina (RAC) modifica o padrão de sinalização celular nas células musculares e adiposas, gerando redução na deposição de gordura e/ou síntese de ácidos graxos e aumento da taxa de síntese proteica e crescimento muscular. Contudo, poucos trabalhos científicos detalham o mecanismo de ação e as possíveis rotas metabólicas da RAC em suínos. Diante disso, avaliou-se o efeito da suplementação com diferentes níveis de RAC no metabolismo de suínos em terminação. 40 suínos, machos castrados e fêmeas, híbridos comerciais (TOPIGS[®]), com peso inicial de 75 kg, foram alojados em baias individuais com piso de concreto dotadas de comedouros semiautomáticos e bebedouro tipo chupeta. As dietas experimentais, fornecidas por um período de 28 dias e formuladas à base de milho e farelo de soja, foram suplementadas com níveis distintos de RAC (ppm): 0, 5, 10, 15 e 20. O delineamento adotado foi blocos casualizados, com 5 tratamentos e 8 repetições. No momento do abate dos animais, coletaram-se amostras de tecido adiposo subcutâneo, perirrenal, tecido muscular e sangue a fim de avaliar a atividade total da lipase lipoproteica (LPL), o conteúdo de glicogênio muscular, a quantidade de insulina, dos transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT-4) e ácido graxo sintetase (FAS) e os níveis séricos de glicose, colesterol total, HDL-c e triacilglicerol. A RAC não alterou a atividade LPL nos tecidos estudados. De forma semelhante não foi verificada alterações nos níveis séricos de insulina, contudo houve um aumento linear nos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-c. A quantidade de FAS e GLUT4 presente no tecido adiposo dos animais não variou entre os tratamentos, mas o GLUT4 muscular apresentou efeito quadrático negativo com o aumento da concentração de RAC, sendo a menor quantidade do transportador (0,959) estimada para 15,5ppm do aditivo. Os níveis séricos de glicose aumentaram linearmente com a inclusão de RAC à dieta, mas verificou-se redução linear no conteúdo de glicogênio muscular. Os resultados indicam que a ractopamina quando administrada a suínos na fase de terminação atua sobre o metabolismo do tecido adiposo de forma a estimular a lipólise nestes animais, ao mesmo tempo, em que são ocasionadas mudanças no metabolismo de carboidratos que darão suporte ao crescimento de massa magra nos animais suplementados.

Palavras-chave: Agonistas β -adenérgicos. Lipase lipoproteica. FAS. GLUT-4.

ABSTRACT

Understanding the lipid metabolism and its regulatory mechanisms help the development of new strategies capable to modify the fats deposition in the different animal tissues and thus improve the quality of the meat produced. When activating β -adrenergic receptors, which are G protein-coupled receptors, the ractopamine (RAC) modifies the pattern of cell signaling in fat and muscle cells, resulting a reduction of the fat deposition and/or fatty acid synthesis, increasing the rate of protein synthesis and muscle growth. However, a few scientific studies detail the mechanism of action and the possible metabolic pathways of RAC in swine. Therefore, It was evaluated the effect of supplementation with different levels of RAC in the metabolism of finishing pigs. 40 pigs, barrows and gilts, commercial hybrids (TOPIGS[®]), with an initial weight of 75 kg, were housed in individual pens with concrete floors equipped with semi-automatic feeders and drinker-type pacifier. The experimental diets, supplied for a period of 28 days and formulated based on corn and soybean meal, were supplemented with different levels of RAC (ppm): 0 (control), 5, 10, 15 and 20. The experimental design was randomized blocks with 5 treatments and 8 replications. At slaughter, samples were collected from subcutaneous and perirenal adipose tissue, muscle tissue and blood in order to assess the total activity of lipoprotein lipase, glycogen content, amount of insulin, the insulin-dependent glucose transporters (GLUT-4) and fatty acid synthase (FAS) and serum levels of glucose, total cholesterol, HDL-C and triacylglycerol. The RAC did not affect the activity of lipoprotein lipase in the tissues studied. Similarly was not observed changes in insulin levels, but there was a linear increase in serum levels of triglycerides, total cholesterol and HDL-c. The amount of GLUT4 and FAS present in the animals adipose tissue did not differ between treatments, but the muscular GLUT4 showed negative quadratic effect with the RAC concentration increase, with the smallest amount of carrier (0.959) estimated for 15.5 ppm of the additive. Serum glucose increased linearly with RAC addition to the diet, but there was a linear decrease in glycogen content. The results indicate that ractopamine when administered to swine in the finishing phase acts on the adipose tissue metabolism in order to stimulate lipolysis in these animals, simultaneously, that occur changes in carbohydrate metabolism that will support the growth of lean body mass in supplemented animals.

Keywords: β -adenergetic agonists. Lipoprotein lipase. FAS. GLUT-4

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Estrutura do receptor adrenérgico β_3	20
Figura 2	Ciclo da proteína na formação do complexo agonista-receptor- proteína $G_{s\alpha\beta\gamma}$	22
Figura 3	Estrutura da ractopamina.....	25
Figura 4	Efeito do uso de ABA no particionamento de nutrientes.....	28

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Figura 1	Conteúdo do glicogênio muscular em função das concentrações de ractopamina nas dietas de suínos, machos castrados e fêmeas, híbridos comerciais na fase de terminação	54
Figura 2	Autorradiograma representativo de <i>western blotting</i> para as proteínas GLUT-4, FAS e α -tubulina no tecido adiposo subcutâneo de suínos machos híbridos.....	54
Figura 3	Autorradiograma representativo de <i>western blotting</i> para a proteína GLUT-4 e a α -tubulina no tecido muscular de suínos machos híbridos	55
Figura 4	Análise semi-quantitativa da proteína GLUT-4 presente no tecido muscular de suínos machos tratados com diferentes níveis de ractopamina (ppm). Os resultados foram expressos, a partir da relação GLUT-4/ α -tubulina, em unidades de densidade relativa.....	56

Figura 5 Níveis séricos de glicose (a), colesterol total (b), de HDL-c (c) e de triacilgliceróis (d), em função das concentrações de ractopamina nas dietas de suínos, machos castrados e fêmeas, híbridos comerciais na fase de terminação..... 57

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Tabela 1	Composição centesimal e valores calculados das dietas experimentais de suínos suplementados com diferentes níveis de ractopamina na fase de terminação.....	50
Tabela 2	Atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo perirenal (PR), tecido muscular (TM) e conteúdo de glicogênio muscular (GM) de suínos, machos castrados fêmeas, suplementados com diferentes níveis de RAC (ppm) na fase de terminação.	53
Tabela 3	Análise semi-quantitativa por <i>Western blotting</i> do conteúdo de do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) e da enzima ácido graxo sintetase (FAS) presentes nos tecidos adiposo subcutâneo e muscular de suínos machos híbridos, em terminação, em função da concentração de ractopamina na dieta	55
Tabela 4	Níveis séricos de glicose (GLI), colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL-c), triacilgliceróis (TAG) e insulina (IN) de suínos, machos castrados e fêmeas, em terminação, em função das concentrações de ractopamina.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAs	Agonistas β -adrenérgicos
AC	Adenilato ciclase
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Beta-ARK	Beta-adreno receptor quinase
CoA	Coenzima A
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
FAZ	Ácido graxo sintetase
GDP	Guanosina difosfato
GLUT-4	Transportador de Glicose dependente de insulina tipo 4
GPCRs	Receptores de membrana acoplados à proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
HSL	Lipase hormônio sensível
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
ISSO	Isoproterenol
LM	<i>Longissimus dorsi</i>
LPL	Lipase lipoproteica
MAP quinases	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>mTOR</i>	Mammalian target of rapamycin
MyHc	Miosina de cadeia pesada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas
RAC	Ractopamina

SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SREBP-1	Proteina um ligadora do elemento regulado por esteróis
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1.	INTRODUÇÃO..... 17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO..... 19
2.1	Agonistas de receptores β-adrenérgicos, AMP cíclico e lipólise 19
2.1.1	Receptores adrenérgicos..... 19
2.1.2	Catecolaminas, AMP cíclico e lipólise 21
2.1.3	Ractopamina..... 24
2.1.3.1	Efeito dos agonistas de receptores β-adrenérgicos no metabolismo do tecido adiposo e muscular 28
3.	CONCLUSÃO 36
	REFERÊNCIAS..... 37
SEGUNDA PARTE – ARTIGO (Elaborado de acordo com as normas do periódico Brazilian Archives of Biology and Biotechnology - versão preliminar) 47	
	ARTIGO Efeito da Ractopamina no Metabolismo Lipídico de Suínos em Terminação. 48
	RESUMO 48
1.	INTRODUÇÃO 49
2.	MATERIAL E MÉTODOS 49
3.	RESULTADOS 53
4.	DISCUSSÃO..... 58
	AGRADECIMENTOS 63
	REFERÊNCIAS..... 63
	ANEXO 70

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A deposição excessiva de gordura na carcaça de suínos constitui um risco de saúde para os consumidores, pois o consumo de níveis elevados de gordura na dieta está correlacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência insulínica, diabetes e obesidade. Nesse contexto, a compreensão do metabolismo lipídico e os mecanismos pelos quais é regulado têm ajudado no desenvolvimento de estratégias cada vez melhores, capazes de modificar a deposição de gorduras nos diferentes tecidos animais e, assim, melhorar a qualidade da carne produzida.

Análogos estruturais de hormônios coletivamente denominados catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e conhecidos como agentes de partição, os agonistas β -adrenérgicos (ABAs), por exemplo, o clenbuterol, salbutamol, terbutalina e a ractopamina, apresentam efeitos sobre o sistema endócrino, metabolismo proteico, metabolismo lipídico e metabolismo de carboidratos dos animais.

Particularmente, a ractopamina (RAC), amplamente pesquisada nos últimos 20 anos, é adicionada nas rações de suínos em fase de terminação, período em que os animais já atingiram a maturidade e a sua capacidade de síntese proteica começa a ser menor. Ao alcançar o tecido adiposo de suínos, a RAC pode se ligar aos receptores de agonistas β -adrenérgicos e ativar proteínas G_s que catalisarão a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e assim aumentar as taxas de lipólise e diminuir a atividade de enzimas lipogênicas no tecido adiposo.

Embora os benefícios da ractopamina sobre o desempenho e as características de carcaça de suínos sejam bastante conhecidos, poucos trabalhos científicos detalham o mecanismo de ação e as possíveis rotas metabólicas do

agonista nesses animais. Em razão disso, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes níveis de ractopamina no metabolismo de suínos machos castrados e fêmeas na fase de terminação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agonistas de receptores β -adrenérgicos, AMP cíclico e lipólise

2.1.1 Receptores adrenérgicos

Receptor é uma molécula ou complexo de moléculas, capaz de reconhecer e interagir com hormônio, droga ou neurotransmissor e, após esta interação, gerar sinal capaz de iniciar uma cadeia de eventos que resulta em resposta biológica (LIMBIRD, 2004). Os receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCRs), aos quais fazem parte os receptores adrenérgicos, constituem uma família de receptores transmembrana que medeiam os múltiplos efeitos metabólicos e neuroendócrinos celulares que podem ser causados por hormônios e neurotransmissores (COMAN et al., 2009; DEUPI; STANDFUSS, 2011; DROR et al., 2011). As proteínas G, membros de uma família de proteínas homólogas e triméricas, apresentam três subunidades designadas α , β e γ . De acordo com a estrutura e sequência de suas subunidades, as proteínas G, ligadas ao sistema adenilato ciclase, podem ser classificadas nas isoformas: Gs (ativa a adenilato ciclase) e Gi (inibe a atividade da adenilato ciclase) (MOURA; VIDAL, 2011; NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006).

Os receptores adrenérgicos podem ser divididos em duas classes: α e β receptores que, ainda podem ser subdivididos em $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1c$, $\alpha 2a$, $\alpha 2b$, $\alpha 2c$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, cujas diferenças residem nas suas afinidades e respostas a um grupo de agonistas e antagonistas (DROR et al., 2011; NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006; SILVA; ZANESCO, 2010). Os receptores β , ligados à proteína Gs (estimulatórias), são proteínas de membrana pertencentes à família de receptores do tipo serpentina que possuem sete segmentos transmembrana, cada um com 22 a 28 resíduos de aminoácidos (Figura 1) (COMAN et al., 2009; DEUPI; STANDFUSS, 2011).

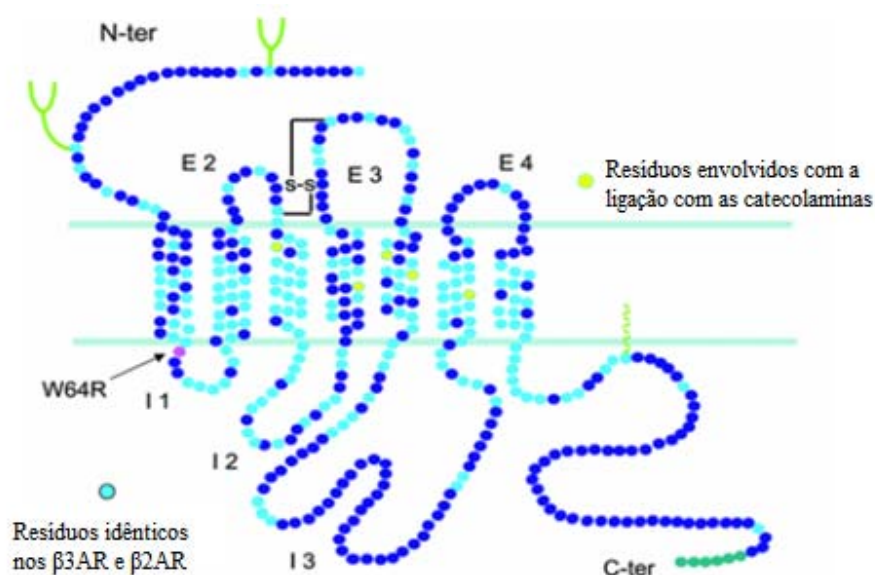


Figura 1 Estrutura do receptor adrenérgico β_3 . Em azul claro estão representados os resíduos de aminoácidos que permanecem constantes entre os β -receptores 3 e 2; em verde estão representados os resíduos de aminoácidos envolvidos com a ligação da catecolamina. Fonte: Adaptado de Coman et al. (2009)

Compondo a sua estrutura possuem uma cauda N-terminal localizada na região extracelular, uma cauda C-terminal, que é intracelular, três voltas extracelulares (E) e três intracelulares (I). Os receptores do tipo β_1 e β_2 apresentam em sua cauda C-terminal um sítio de ligação que pode ser fosforilado pela proteína quinase A (PKA) ou receptores beta quinase (beta-ARK) (COMAN et al., 2009). Warne et al. (2008) afirmam que as voltas intracelulares I2 e I3 em todos os β -receptores desempenham um papel importante na seletividade, ligação e ativação das proteínas G. Muito embora Bergen e Mersmann (2005) e Warne et al (2008) tenham informado que os subtipos de β -receptores apresentam diferenças, entre si e entre espécies, na sequência de aminoácidos que os compõem, Coman et al. (2009) verificaram

homologia estrutural de 51% entre os receptores β_3 e β_1 , 46% entre os receptores β_3 e β_2 e 54% entre os β_1 e β_2 receptores. A homologia entre humanos, bovinos, macacos, hamster, porcos da Índia, ratos e camundongos, ao menos para o subtipo β_3 , é considerada alta (aproximadamente 90%).

Verifica-se, ainda, que a distribuição desses β -receptores nos vários tecidos incluindo os adipócitos, é espécie-específica. Em roedores, por exemplo, 90% dos β -receptores presentes na membrana celular adipocitária é do subtipo 3, enquanto na maioria das outras espécies, esse subtipo representa aproximadamente 10% dos β -receptores presentes (BERGEN; MERSMANN, 2005; MERSMANN, 1995). Em suínos, a predominância são os receptores do subtipo β_1 (75%) e os subtipos de receptores β_2 e β_3 perfazem aproximadamente 20% e 5% cada um (MERSMANN, 2002; MILLS, 2002a). Devido a isso, o efeito final da ativação dos diferentes tipos de receptores beta depende especificamente do órgão-alvo e, principalmente, da espécie animal já que os animais podem transmitir sua especificidade para responder aos agonistas e antagonistas sintéticos ou naturais dos β -receptores (BERGEN; MERSMANN, 2005; BORTOLOTTI; CONSOLIM-COLOMBO, 2009).

2.1.2 Catecolaminas, AMP cíclico e lipólise

As catecolaminas são consideradas importantes, mas não os únicos reguladores da lipólise em células de gordura. Tanto o neurotransmissor noradrenalina e o hormônio adrenalina quanto seus análogos estruturais regulam a lipólise por meio dos receptores lipolíticos β -adrenérgicos e anti-lipolíticos α -adrenérgicos (indiretamente) (KIM et al., 2010; LANGIN, 2006; MILLS; SPURLOCK; SMITH, 2003).

A ligação desses agonistas β -adrenérgicos ao seu receptor induz rearranjos conformacionais nas extremidades citoplasmáticas dos segmentos transmembrana do GPCR os quais permitem a ligação com a proteína Gs. Durante a formação do complexo agonista-receptor-proteína $G_{s\alpha\beta\gamma}$, a guanosina difosfato (GDP) é liberada da subunidade α deixando o sítio de ligação livre para associação com a guanosina trifosfato (GTP). Uma vez que essa proteína reguladora se liga a subunidade α da proteína $G_{s\alpha\beta\gamma}$, ocorre uma alteração conformacional na molécula da proteína G que resulta na dissociação do complexo α GTP da subunidade $\beta\gamma$. O complexo α GTP induz uma modificação na fluidez da membrana celular que permite o seu deslocamento lateral. Ao entrar em contato com a enzima adenilato ciclase (AC), o α GTP altera a estrutura terciária dessa enzima, ativando-a. A proteína trimérica Gs retorna à sua configuração original ($G_{s\alpha\beta\gamma}$) a partir da hidrólise do GTP para GDP na subunidade α (Figura 2) (BARISIONE et al., 2010; MOURA; VIDAL, 2011; RASMUSSEN et al., 2011)

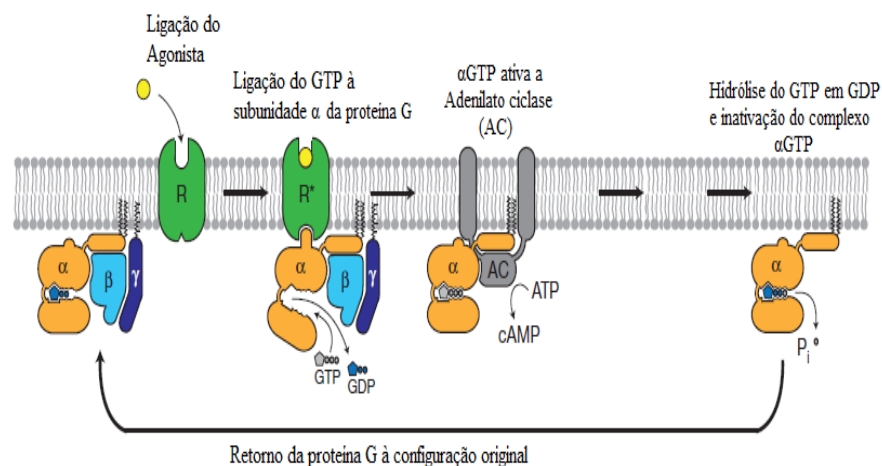


Figura 2 Ciclo da proteína na formação do complexo agonista-receptor-proteína $G_{s\alpha\beta\gamma}$. R: receptor; ATP: adenosina trifosfato; cAMP: adenosina monofosfato cíclico; P_i : Fosfato. Fonte: adaptado de Rasmussen et al. (2011)

A adenilato ciclase ativa converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e como resultado, há um aumento dos níveis intracelulares dessa molécula sinalizadora. O AMPc liga-se a subunidade regulatória da proteína quinase A (PKA) para liberar sua subunidade catalítica e tornar a proteína ativa. Após a ativação, a PKA regula enzimas intracelulares (Perilipina e HSL), fosforilando-as (GRANNEMAN et al., 2007). As perilipinas são as principais proteínas estruturais que revestem a superfície do adipossomo e atuam bloqueando o acesso das lipases a essas células (SZTALRYD et al., 2003). Dessa forma, a sua fosforilação é necessária para a translocação da HSL ativa (fosforilada) do citoplasma para a superfície da gota lipídica resultando no incremento da taxa lipolítica (BEZAIRE et al., 2009; GARCIA et al., 2004; TANSEY et al., 2003). A ativação dos α -adrenoreceptores inibe a lipólise, uma vez que estão acoplados com a proteína Gi, o que leva a uma inibição da adenilato ciclase e a redução dos níveis intracelulares de AMPc (BERGEN; MERSMANN, 2005; UETA, 2009).

A HSL é regulada por fosforilação e desfosforilação em resposta aos níveis intracelulares do AMPc que são controlados positivamente pelos hormônios glucagon, epinefrina e norepinefrina (YEAMAN, 2004) e negativamente pela insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004), cuja atuação decorre da inativação da lipase hormônio sensível a partir da fosfodiesterase que degrada essas (HOLM, 2003; WOLF, 2005).

Outra forma de regulação dessa enzima se dá por meio do processo de dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos que ocorre em resposta a ação prolongada de agonistas específicos. Nesse processo, o AMPc ativa a beta-adreno-receptor quinase (beta-ARK), uma proteína quinase que fosforila os receptores β_2 e β_1 em sua cauda C-terminal, inativando-o. Após a inativação ocorre o sequestro do complexo agonista-receptor para o meio intracelular, com o aparecimento, após algumas horas e/ou dias, de um fenômeno conhecido por

downregulation (COMAN et al. 2009; KENAKIN, 2011; RAJAGOPAL; RAJAGOPAL; LEFKOWITZ, 2010).

Esse fenômeno, segundo Coman et al. (2009), provoca a diminuição da síntese de mRNA dos β -receptores e, conseqüentemente, da quantidade de receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ na membrana. Os receptores $\beta 3$, no entanto, não sofrem essa dessensibilização induzida pelo agonista, tampouco o sequestro. O fenômeno de *down-regulation* nestes receptores é mediado pela ativação do AMPc e da proteína quinase C e não pela degradação do mRNA dos receptores $\beta 3$ -adrenérgicos.

Além do aumento da lipólise como resultado da estimulação dos receptores β -adrenérgicos, Coman et al. (2009) verificaram o efeito no metabolismo de carboidratos. Segundo esses autores, diferentes tipo de agonistas $\beta 3$ são capazes de normalizar a glicemia em roedores acometidos com diabetes tipo 2. Esse efeito anti-hiperglicêmico foi atribuído a distintos mecanismos de ação como a estimulação da secreção da insulina pelas células β pancreáticas; o aumento na sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos em resposta ao aumento na expressão de transportadores de glicose ou no aumento dos receptores de insulina; na diminuição da liberação de glicose pelo fígado e no aumento na captura de glicose não insulino-dependente e sua utilização pelos tecidos adiposo marrom, branco e músculo esquelético.

2.1.3 Ractopamina

A deposição de gordura na carne dos animais pode ser benéfica ou indesejável dependendo de sua quantidade e localização. Deposição excessiva de gordura tem sido reconhecida como prejudicial à qualidade da carcaça e constitui um risco de saúde para os consumidores, pois o consumo de níveis

elevados de gordura saturada na dieta está correlacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência insulínica, diabetes e obesidade (RANJIT et al, 2011; SULKOWSKA et al, 2006; ZHAO et al., 2010). Na produção de suínos, a compreensão do metabolismo lipídico e os mecanismos pelos quais é regulado têm ajudado no desenvolvimento de estratégias cada vez melhores para modificar a deposição de gorduras nos diferentes tecidos animais e, assim, melhorar a qualidade da carne entre elas, a suplementação com ractopamina (KUTZLER et al.; 2011; PATIENCE et al., 2009; ROSS et al., 2011).

Pereira et al. (2008), Souza et al. (2011) e Andretta et al. (2012), definem a ractopamina (RAC), como composto sintético que apresenta estrutura e propriedades químicas e farmacológicas similares às das catecolaminas naturais epinefrina e norepinefrina. Esse agonista de receptores β -adrenérgicos que pertence à família das fenetanolaminas é caracterizado pela presença, em sua estrutura, de um anel aromático substituível, uma cadeia lateral de etanolamina e um nitrogênio alifático (Figura 3) (SMITH, 1998).

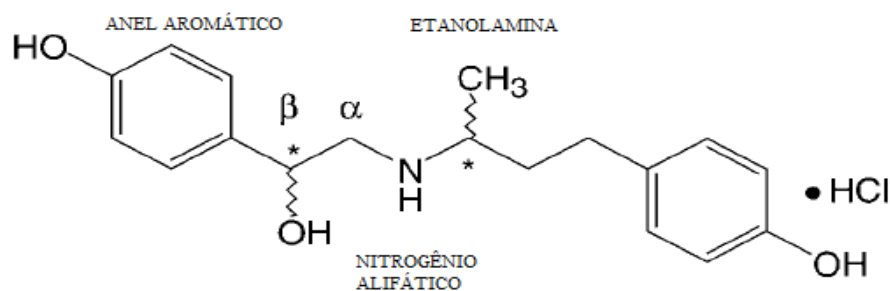


Figura 3 Estrutura da ractopamina. * Carbono quiral, assimétrico. Fonte: Mills et al. (2003)

Ricke et al. (1999) definem fenetanolaminas β -adrenérgicas agonistas como combinações quirais. Dessa forma, existe uma assimetria molecular no

carbono β hidroxilateral, um nitrogênio alifático e α para um grupo benzil substituído comum a todas as fenetanolamina. Ainda de acordo com esses autores, para um agonista β apresentar atividade biológica, é necessário que exista em sua constituição um anel aromático com seis membros substituíveis, um grupo hidroxil ligado ao carbono β do radical amina em configuração R e um nitrogênio com carga positiva no grupo etilamina, substituível no nitrogênio alifático para dar especificidade ao receptor do tipo β . Mills et al. (2003) e Mills, Spurlock e Smith (2003) explicam que a RAC apresenta dois centros quirais em sua constituição e pode formar quatro estereoisômeros RR, RS, SR e SS. O isômero RR é o mais lipolítico e é provavelmente o mais ativo e funcional que influencia o crescimento em suínos. Smith (1998) verificou, em seu estudo com roedores, que a ractopamina é seletiva para β 1-adrenoreceptores, mas nos suínos, conforme Mills (2002b), a RAC possui afinidade similar com os receptores adrenérgicos β 1 e β 2. No entanto, a resposta é mais eficiente quando ocorre a ligação de seu estereoisômero RR ao β 2. Isso dificulta a compreensão da ação desse isômero no tecido adiposo de suínos, já que nesses animais, como foi citado anteriormente, a maior predominância é dos receptores β 1 (MERSMANN, 2002; MILLS, 2002a).

A utilização da ractopamina na medicina veterinária ocorre principalmente por via oral e o pH do trato gastrointestinal influencia diretamente na sua absorção. No estômago, independentemente da espécie ou da idade do animal, ocorre a formação de um cátion na amina alifática, enquanto que no intestino, devido sua natureza mais neutra, a ractopamina sofre redução na ionização de seus compostos, os quais aumentam a absorção passiva através da mucosa intestinal. Após absorvida, a ractopamina é metabolizada pelo fígado originando três metabólitos identificados como monoglicuronídeos de ractopamina que após sua utilização e/ou interrupção do fornecimento é

eliminada predominantemente pela urina (PALERMO NETO, 2002; RAMOS; SILVEIRA, 2001).

O mecanismo de ação da ractopamina nos receptores β -adrenérgicos presentes no tecido adiposo dos suínos é similar ao descrito para as catecolaminas e também envolve a produção de um segundo mensageiro intracelular (AMPc) que irá fosforilar a PKA, tornando-a ativa. A PKA ativa irá fosforilar as enzimas lipolíticas, que respondem quebrando as reservas de gordura. Contudo, de acordo com Leeb-Lundberg et al. (1987), se o agonista atuar continuamente sob os receptores β , poderá causar uma redução na sua quantidade pelos processos de dessensibilização, sequestro e *down-regulation* explicados anteriormente e, como consequência, um decréscimo na resposta à estimulação β -adrenérgica da RAC (MILLS, 2002a; SPURLOCK; CUSUMANO; MILLS, 1993). Embora essa dessensibilização possa ser verificada no tecido adiposo, o mesmo não ocorre no tecido muscular. De acordo com Spurlock et al. (1994), parece que o processo de *down-regulation* tem pouca influência sobre esse tecido, já que o número de β -receptores no músculo esquelético de suínos alimentados com ractopamina por 28 dias não diminuiu.

Os resultados fisiológicos gerados em resposta a ação da RAC no corpo do animal são afetados pela atividade do composto no receptor, bem como, pelas suas taxas de absorção, metabolismo e eliminação (SMITH, 1998). Sabe-se que a ractopamina em suínos é capaz de particionar os nutrientes do tecido adiposo em favor do aumento da taxa de síntese proteica e do crescimento muscular (Figura 4). Ao ativar receptores adrenérgicos específicos que modificam os sinais metabólicos nas células musculares e adiposas, a RAC acaba gerando redução da deposição de gordura e/ou síntese de AG e, como resultado, é possível ter uma melhora na qualidade da carne produzida (APPLE et al., 2007; ROSS et al., 2011; WATANABE et al., 2011).

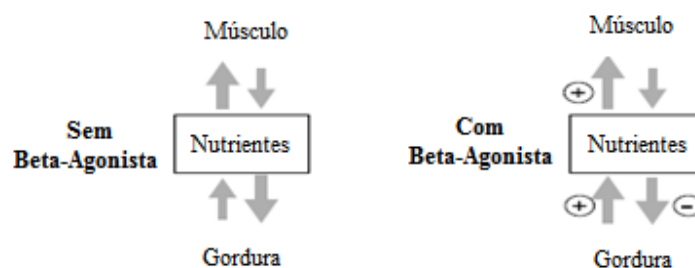


Figura 4 Efeito do uso de ABA no particionamento de nutrientes. Fonte: Anderson, Moody e Hancock (2005)

2.1.3.1 Efeito dos agonistas de receptores β -adrenérgicos no metabolismo do tecido adiposo e muscular

Conforme o que foi publicado por Mersmann (1998) e Bergen e Mersman (2005), os adipócitos da maioria dos mamíferos respondem muito bem à estimulação por agonistas β -adrenérgicos e insulina. Os efeitos mais profundos são melhor demonstráveis quando os tecidos ou adipócitos isolados são incubados *in vitro* e, respectivamente, são: aumento das taxas lipolíticas e diminuição das taxas lipogênicas. Por exemplo, Peterla e Scanes (1990), ao examinarem os efeitos *in vitro* da ractopamina e da insulina na lipólise e lipogênese em células do tecido adiposo de suínos, verificaram que a RAC foi capaz de estimular a lipólise nos adipócitos cultivados pelo aumento na liberação de ácidos graxos e/ou glicerol ao mesmo tempo em que inibia a lipogênese. Ao incubarem as amostras com insulina perceberam claramente uma redução dos efeitos lipolíticos com diminuição dos efeitos anti-lipogênicos desse β -agonista.

Mersman (1998) também procurou avaliar a taxa lipolítica e lipogênica *in vitro* do tecido adiposo de suínos tratados com insulina e com um agonista β -

adrenérgico (o isoproterenol - ISO), por meio da atividade das lipases LPL e HSL. O autor verificou que não houve modulação da atividade das lipases (LPL e HSL) ao incluir a insulina ou ISO durante o ensaio padrão e a pré-incubação dos fragmentos de tecidos com ambos resultou numa modulação discreta apenas na atividade da LPL. As tentativas de regular a atividade da LPL no ensaio enzimático padrão podem não ter sido bem sucedidas porque muitos dos componentes que participam do sistema de cascata de sinais gerados em resposta à insulina e a β -receptores adrenérgicos eram esperados para estarem nas frações centrifugadas diferentes das que foram utilizadas para análise da medida da atividade da LPL. Além disso, a própria ruptura física do receptor que pode ter sido ocasionada pelos processos de homogeneização, centrifugação e diluição provavelmente impedem a sua função (MERSMANN, 1998).

No entanto, essas dificuldades não foram encontradas por Ballart et al. (2003) os quais avaliaram a atividade da LPL no tecido adiposo de ratos estimulados *in vitro* e *in vivo* com o mesmo β -adrenérgico. Os autores conseguiram verificar que o agonista β -adrenérgico isoproterenol foi capaz de causar diminuição na atividade desta lipase *in vitro* em adipócitos isolados de ratos que não receberam injeção subcutânea de ISO, bem como na sua atividade em fragmentos de tecido adiposo de ratos tratados com o agonista. Adicionalmente, os resultados obtidos por Mersmann (1998) diferem daqueles reportados por Moody, Hancock e Anderson (2000). Segundo esses autores, estudos *in vitro* com suínos mostraram que agonistas beta-adrenérgicos são capazes de aumentar a produção de AMPc, os quais ativam proteínas quinases, que por sua vez, fosforilam (ativam) a enzima essencial da lipólise, a HSL. Essa enzima ativa quebra os TAG e, conseqüentemente, aumenta a taxa de lipólise (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Embora Liu et al. (1994) tenham verificado que suínos alimentados com RAC não apresentam modificações na atividade da acetil-CoA carboxilase ou

enzima málica tampouco a abundância do mRNA para acetil-CoA carboxilase e o GLUT-4 sejam afetadas no tecido adiposo subcutâneo dos animais, trabalhos mais recentes conseguiram verificar efeito dessa droga nesses e em outros genes relacionados com o catabolismo e anabolismo de lipídeos em suínos. Conforme Mills (2002a) e Mills (2002b) a ativação da PKA apresenta também efeitos anti-lipogênicos por meio da fosforilação e inativação do transportador de glicose (GLUT-4) e acetil-CoA carboxilase associados ou não a uma alteração na expressão e atividade de genes lipogênicos. Desta forma a atividade do agonista a nível celular não está relacionada apenas à modulação das enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, mas também atua sobre o metabolismo de glicose dos animais, reduzindo a sensibilidade à insulina. Halsey (2003) (citado por BERGEN; MERSMANN, 2005) verificou, após os suínos serem alimentados por um período superior a duas semanas com esse agonista β -adrenérgico comercial, uma expressão gênica diminuída de FAS e SREBP-1 no tecido adiposo.

Reiter et al. (2007) compararam a administração crônica de RAC na expressão diferencial de genes relacionados ao anabolismo (FAS; GLUT-4; estearoil-CoA dessaturase - SCD; SREBP-1 e leptina) e catabolismo (CPT-1 e acil-CoA desidrogenase) de lipídeos no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético de suínos. Os autores verificaram após a administração da RAC por 52 dias uma redução em ambas as raças estudadas (Pietrain e Duroc) na expressão dos genes FAS do tecido adiposo e fígado, SREBP-1 do tecido adiposo e GLUT-4 do músculo esquelético e um aumento na expressão gênica da acil-CoA desidrogenase do fígado e músculo. Enquanto a RAC diminuiu a expressão gênica da leptina no tecido adiposo apenas na raça Duroc, a abundância do mRNA para GLUT-4 no tecido adiposo foi significativamente diminuída apenas na raça Pietrain. Em ambas as raças estudadas, a expressão de

CPT-1 não foi afetada pela inclusão de RAC na dieta e foi verificada uma tendência à diminuição da quantidade do mRNA para SCD no tecido adiposo.

Halsey et al. (2011), estudaram o efeito da ractopamina na expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipídeos em suínos e puderam verificar uma diminuição da expressão gênica de SREBP-1, PPAR γ 2, FAS e GLUT-4 associado a um aumento da expressão de PPAR α , fator de transcrição relacionado com o metabolismo oxidativo.

Outro efeito da suplementação com RAC no metabolismo de lipídeos de suínos foi reportado por Hoshi et al (2005). Os autores ao avaliarem os parâmetros reprodutivos e plasmáticos de suínos fêmeas suplementadas com 20 ppm de RAC na ração, postularam que, provavelmente devido ao efeito lipolítico da droga, os animais suplementados em relação ao controle apresentaram níveis elevados de colesterol total (71,80 mg.dl⁻¹ vs 65,04 mg.dl⁻¹), triglicérides (42,30 mg.dl⁻¹ vs 37,00 mg.dl⁻¹) e colesterol HDL (59,40 mg.dl⁻¹ vs 53,40 mg.dl⁻¹).

Webster et al. (2007) mostraram que os suínos suplementados com RAC apresentaram um aumento linear na porcentagem de carne magra, associado ao aumento linear do acúmulo de proteína e diminuição do acréscimo de gordura. Ainda de acordo com os autores, incluindo lisina na dieta dos suínos suplementados com a RAC é possível ter uma redução linear na deposição de gordura dos mesmos.

De acordo com Weber et al. (2006), uma provável explicação, mesmo que parcial, para a menor quantidade de gordura na carcaça de suínos suplementados com RAC, poderia residir nos resultados obtidos por Page et al. (2004), os quais demonstram que a RAC aumenta a apoptose no tecido adiposo branco de camundongos. Contudo, Kim et al. (2010) trabalhando com outra classe de agonista β , o clenbuterol, não conseguiram verificar aumento na apoptose nos adipócitos, mas provaram uma direta estimulação lipolítica e

diminuição da lipogênese. Os distintos resultados comprovam a especificidade farmacológica da resposta à estimulação dos β -receptores adrenérgicos.

Além dos efeitos no metabolismo de lipídeos, a RAC é conhecida também por estimular o incremento da musculatura esquelética dos animais suplementados. Esse resultado foi observado por Ross et al. (2011) que verificaram que suínos suplementados com RAC aumenta a taxa de síntese protéica e tendem ao decréscimo na deposição lipídica. Conforme Depreux et al. (2002) as respostas da ação da RAC nas células musculares incluem aumento da lactato desidrogenase, diminuição das enzimas oxidativas e alteração nas propriedades contráteis do músculo. O aumento na lactato desidrogenase, de acordo com Vestergaard et al. (1994), indica um reforço na glicólise anaeróbica e aumento na capacidade glicolítica do músculo provavelmente pelo incremento na atividade celular e “*turnover*” proteico. Isso sugere que quando o animal é suplementado com a RAC, o metabolismo muscular desloca-se em direção ao metabolismo glicolítico ao invés do oxidativo. Gerrad (2008) demonstrou que o uso de RAC é capaz de alterar o tipo de fibra muscular e provocar mudanças no metabolismo *post-mortem*.

Vestergaard et al. (1994) e Gerrad (2008) relatam em seus trabalhos as mudanças que os ABAs podem ocasionar nas propriedades contráteis do músculo esquelético. De acordo com os primeiros autores, os quais verificaram essas alterações em bovinos, o cimaterol afeta a hipertrofia dos músculos de contração rápida, provavelmente devido ao aumento do fluxo sanguíneo observado nos animais suplementados com β_2 agonistas. Esse aumento no fluxo de sangue, conforme Mersmann (1998), pode oferecer uma maior quantidade de substratos necessários para a síntese de proteínas. Gerrad (2008) sugere que a RAC estimula mudanças nas propriedades contráteis dos músculos para uma contração de natureza mais rápida por meio do envolvimento de um controle diferencial via MAP quinases (*Mitogen activated protein kinases* – proteínas

quinases ativadas por mitógeno). Ainda segundo o autor, animais que não apresentam a capacidade de expressar o fenótipo muscular de contração rápido não respondem totalmente à alimentação com o ABA.

Contudo, Hoshi et al. (2005) ao avaliarem indiretamente possíveis alterações na contração muscular dos animais suplementados com RAC por meio da quantificação dos níveis plasmáticos da creatinina, um produto da contração do músculo cuja síntese está aumentada em animais mais ativos, não obtiveram resultados significativos entre os tratamentos. Isso indicaria que as drogas beta-adrenérgicas possam apresentar uma ação “negligenciável” na contração do músculo dos animais. Ainda segundo esses autores, os níveis plasmáticos encontrados de nitrogênio na forma de ureia que diferiram entre os grupos experimentais (controle apresentou maiores níveis em relação do grupo suplementado com RAC), indicam um menor catabolismo de proteína e isso provavelmente pode acarretar no incremento do desenvolvimento muscular dos animais.

Agbenyega e Wareham (1990), Dodd et al. (1996) e Ryall, Sillence e Lynch (2006) demonstraram que a administração crônica de agonistas de receptores β -adrenérgicos particularmente os β_2 , pode aumentar o conteúdo de proteína da miofibrila e então induzir uma hipertrofia no músculo esquelético de mamíferos. Aalhus et al. (1992) também relataram que a suplementação com RAC causa hipertrofia das fibras musculares, especificamente as brancas e intermediárias, gerando um aumento no diâmetro das fibras do músculo esquelético. As mudanças verificadas pelos autores incluem aumento no tamanho e no número das fibras brancas (tipo IIb) dentro do tecido muscular, diminuição da quantidade de fibras intermediárias (tipo IIa) e diminuição do tamanho das fibras vermelhas (tipo I). Bark et al. (1992), Busquets et al. (2004) e Navegantes et al. (2006) explicam as possíveis causas para essas mudanças

apresentadas e acredita-se que possam ser em decorrência de uma maior síntese proteica e/ou diminuição da sua degradação (proteólise).

De fato foi verificado por Beermann (2002) que suínos alimentados com RAC não apresentam alteração na atividade das enzimas relacionadas com a degradação de proteínas como a catepsina. Contudo Sainz et al. (1993) afirmaram que o músculos de suínos suplementados com este ABA apresentam uma menor ação da calpaína, protease dependente de cálcio, sobre a proteólise muscular. Moloney e Beermann (1996) comprovaram que na suplementação com RAC há uma diminuição significativa na excreção de um produto resultante do catabolismo proteico, a 3-metil-histidina. Além disso, Bergen et al. (1989) e Liu et al. (1994) já tinham verificado que quando suínos recebem RAC na ração, o músculo esquelético desse animais responde retendo mais nitrogênio e aumentando a expressão do mRNA da α -actina necessário para a síntese proteica.

Navegantes et al. (2001) verificaram em ratos que a administração de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e clenbuterol reduzem as taxas musculares esqueléticas da proteólise dependente de Ca^{2+} , provavelmente por meio de suas ligações ao receptores β 2-adrenergicos presentes nos músculos esqueléticos brancos e vermelhos e ativação das vias intracelulares que envolvem a proteína quinase dependente do AMPc. Yimlamai et al. (2005) também verificaram que o clenbuterol é capaz de induzir alterações específicas no músculo como por exemplo atenuar a sua atrofia, por meio dos efeitos causados na via proteolítica da ubiquitina-proteossoma. Conforme esses autores, ratos tratados com esse ABA apresentaram redução da ativação da proteólise causada pela via da ubiquitina-proteossoma nos músculos de contração rápida, provavelmente por ação do IGF-1. Esse peptídeo é responsável pela ativação da PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) com posterior ativação da proteína quinase B (Akt), que uma vez ativa, irá fosforilar a proteína quinase alvo da rapamicina

dos mamíferos (*mTOR* - *mammalian target of rapamycin*) com posterior aumento da síntese de proteínas por meio da ativação de reguladores-chave envolvidos na regulação e síntese proteica (p70S6K e 4E-BP1). Sendo assim a inibição desta via no músculo pode estar relacionada com a progressão de sua atrofia (ZHANG; CHEN; FAN, 2007)

Outra explicação para tais modificações foi proposta por Gunawan et al. (2007). Como um dos principais determinantes da velocidade de contração é a abundância relativa das isoformas da miosina de cadeia pesada (MyHC) e os genes que as codificam são regulados na transcrição, então a RAC provavelmente pode alterar a expressão do gene MyHC. Para comprovar essa hipótese, os autores determinaram no músculo *Longissimus dorsi* (LM) de suínos alimentados com ractopamina, por meio de PCR em tempo real, a abundância relativa dos transcritos dos tipos de fibras I, IIa, IIx e IIb. Muito embora, os autores tenham verificado que a expressão do gene MyHC das fibras tipo I não tenha sido afetada pela administração do ABA, a expressão do MyHC das fibras do tipo IIb foi mantida em níveis elevados e a expressão do MyHC das do tipo IIx permaneceu diminuída durante toda a duração do experimento. Apesar dos resultados apresentados pelos autores sugerirem que a RAC induz de forma diferente a expressão do gene MyHC das fibras do tipo IIb à custa das demais isoformas, deve-se levar em consideração que nesse experimento a RAC foi administrada aos porcos durante a fase de terminação e nesse período os animais normalmente já exibem hipertrofia muscular. Dessa maneira, não pode ser subestimado que seja possível o músculo apresentar essas características como resultado de seu crescimento rápido e/ou experiência hipertrófica (GUNAWAN et al., 2007).

3. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas a suinocultura no Brasil tornou-se uma atividade bastante dinâmica devido os consumidores terem aumentado as suas exigências em relação à qualidade da carne procurando por produtos com baixo teor de gordura. Nesse contexto, os suinocultores buscando melhores características zootécnicas vêm adotando como recurso nutricional a utilização de agonistas beta-adrenérgicos como aditivos que agem na modificação do metabolismo do animal.

A ractopamina, análoga estrutural das catecolaminas, é conhecida como um agente de partição que tem efeito principalmente no metabolismo muscular e lipídico, atuando neste último de forma a promover a redução do teor de gordura do corpo. Amplamente pesquisada nos últimos 20 anos, a ractopamina foi aprovada para uso em vários países, inclusive no Brasil (FDA, 2000). A droga é administrada nas rações de suínos em fase de terminação e como pôde ser observado por meio dos trabalhos apresentados nesta primeira parte, os suínos suplementados com ractopamina apresentam uma diminuição da deposição de gordura e um aumento do crescimento muscular por mecanismos diversos.

Visando compreender o mecanismo de ação e as possíveis rotas metabólicas da ractopamina em suínos na fase de terminação, como poderá ser visto na segunda parte deste trabalho, procurou-se verificar se a suplementação com ractopamina altera nos animais suplementados a resposta metabólica sanguínea, a sensibilidade insulínica do transporte de glicose, as vias metabólicas responsáveis pelo armazenamento de gordura nos adipócitos e no músculo e pelo armazenamento de carboidratos.

REFERÊNCIAS

AALHUS, J. L. et al. The effect of ractopamine on myofibre distribution and morphology and their relation to meat quality in swine. **Meat Science**, Barking, v. 31, n. 4, p. 397-409, Dec. 1992.

AGBENYEGA, E. T.; WAREHAM, A. C. Effect of clenbuterol on normal and denervated muscle growth and contractility. **Muscle & Nerve**, New York, v. 13, n. 3, p. 199-203, Mar. 1990.

ALVARENGA NETO, M.; RASCADO, R. R.; BENDHACK, L. M. Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 1, p. 3-12, jan./mar. 2006

ANDERSON, D.; MOODY, D. E.; HANCOCK, D. L. Beta adrenergic agonists. In: POND, W. G.; BELL, A. W. (Ed.). **Encyclopedia of animal science**. New York: M. Dekker, 2005. p. 104-107.

ANDRETTA, I. et al. Meta-analysis of the relationship between ractopamine and dietary lysine levels on carcass characteristics in pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 91-96, Jan. 2012.

APPLE, J. K. et al. Meta-analysis of the ractopamine response in finishing swine. **Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 23, n. 3, p. 179-196, June 2007.

BALLART, X. et al. Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte medium and in rat plasma. **Biochimie**, Paris, v. 85, n. 10, p. 971-982, Oct. 2003.

BARISIONE, G. et al. Beta-adrenergic agonists. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 3, n. 4, p. 1016-1044, Apr. 2010.

BARK, L. J. et al. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3391-3400, Nov. 1992.

BEERMANN, D. H. Beta-adrenergic receptor agonist modulation of skeletal muscle growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 18-23, July 2002. Supplement.

BERGEN, W. G. et al. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 9, p. 2255-2262, Sept. 1989.

BERGEN, W. G.; MERSMANN, H. J. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 135, n. 11, p. 2499-2502, Nov. 2005.

BEZAIRE, V. et al. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADs adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 27, p. 18282-18291, July 2009.

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 215-220, out./dez. 2009.

BUSQUETS, S. et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6725-673, Sept. 2004.

COMAN, O. A. et al. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Bucuresti, v. 50, n. 2, p. 169-179, Apr. 2009.

DEPREUX, F. F. S. et al. Paylean alters myosin heavy chain isoform content in pig muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1888-1894, July 2002.

DEUPI, X.; STANDFUSS, J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 21, n. 4, p. 541-551, Aug. 2011.

DODD, S. L. et al. Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 28, n. 6, p. 669-676, June 1996.

DROR, R. O. et al. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 18, n. 32, p. 13118-13123, July 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Freedom of information summary**: original new animal drug application. New York: Pharmacia & Upjohn, 2009. 34 p.

GARCIA, A. et al. The amino and carboxyl termini of perilipin A facilitate the storage of triacylglycerols. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 9, p. 8409-8416, Feb. 2004.

GERRARD, D. Beta agonist regulation of muscle proteins. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON FARM ANIMAL ENDOCRINOLOGY, 6., 2008, Roanoke. **Proceedings...** Roanoke: CSREES, 2008. Disponível em: <<http://www.cpe.vt.edu/ICFAE/schedule.html>>. Acesso em: 15 out. 2011.

GRANNEMAN, J. G. et al. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 8, p. 5726-5735, Feb. 2007.

GUNAWAN, A. M. et al. Ractopamine induces differential gene expression in porcine skeletal muscles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2115-2124, Sept. 2007.

HALSEY, C. H. C. et al. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1011-1019, Apr. 2011.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 803-811, Dec. 2004.

HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 31, n. 6, p. 1120-1124, Dec. 2003.

HOSHI, E. H. et al. Effects of the use of ractopamine in pregnant sows on reproductive and blood parameters. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 3, n. 2, p. 213-219, June 2005.

KENAKIN, T. Functional selectivity and biased receptor signaling. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 336, n. 2, p. 296-302, Feb. 2011.

KIM, H. K. et al Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 66, n. 3, p. 197-203, Sept. 2010.

KUTZLER, L. W. et al. Comparison of varying doses and durations of ractopamine hydrochloride (Paylean®) on late finishing pig carcass characteristics and meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2176-2188, July 2011.

LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v. 53, n. 6, p. 482-491, June 2006.

LEEB-LUNDBERG, L. M. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: I., agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1- adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 7, p. 3098-3105, Mar. 1987.

LIMBIRD, L. E. The receptor concept: a continuing evolution. **Molecular Interventions**, Bethesda, v. 4, n. 6, p. 326-336, Dec. 2004.

LIU, C. Y. et al. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

MERSMANN, H. J. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. E24-E29, July. 2002. Supplement.

_____. Lipoprotein and hormone-sensitive lipases in porcine adipose tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 1396-1404, May 1998.

_____. Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 6, p. 1777S-1782S, June 1995. Supplement.

MILLS, S. E. Biological basis of the ractopamine response. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. E28-E32, Aug. 2002a. Supplement.

MILLS, S. E. Implications of feedback regulation of beta-adrenergic signaling. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 30-35, July 2002b. Supplement.

MILLS, S. E. et al. Stereoselectivity of porcine β -adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 122-129, Jan. 2003.

MILLS, S. E.; SPURLOCK, M. E.; SMITH, D. J. Beta-adrenergic receptor subtypes that mediate ractopamine stimulation of lipolysis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 662-668, Mar. 2003.

MOLONEY, A. P.; BEERMANN, D. H. Mechanisms by which β 3-adrenergic agonists alter growth and body composition in ruminants. In: ENNE, G.; KUIPER, H. A.; VALENTINI, A. (Ed.). **Residues of veterinary drugs and mycotoxins in animal products**. Wageningen: Wageningen Press, 1996. p. 124-136.

MOODY, D. E.; HANCOCK, D. L.; ANDERSON, D. B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: MELLO, J. P. F. d' (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Oxon: CAB International, 2000. p. 65-96.

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 31-36, jan./mar. 2011.

NAVEGANTES, L. C. et al. Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 281, n. 3, p. E449-454, Sept. 2001.

_____. CL 316,243, a selective beta3-adrenergic agonist, inhibits protein breakdown in rat skeletal muscle. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlin, v. 451, n. 5, p. 617-624, Feb. 2006.

PAGE, K. A. et al. Beta-adrenergic receptor agonists increase apoptosis of adipose tissue in mice. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 26, n. 1, p. 23-31, Jan. 2004.

PALERMO NETO, J. Agonistas de receptores β 2-adrenérgicos e produção animal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNADI, M. M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 545-557.

PATIENCE, J. R. et al. The effect of ractopamine supplementation at 5 ppm of swine finishing diets on growth performance, carcass composition, and ultimate pork quality. **Canadian Journal of Animal Sciences**, Ottawa, v. 89, n. 1, p. 53-66, Mar. 2009.

PEREIRA, F. A. et al. Efeitos da ractopamina e de dois níveis de lisina digestível na dieta sobre o desempenho e características de carcaça de leitões em terminação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 943-952, ago. 2008.

PETERLA, T. A.; SCANES, C. G. Effect of beta-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 4, p. 1024-1029, Apr. 1990.

RAJAGOPAL, S.; RAJAGOPAL, K.; LEFKOWITZ, R. J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. **Nature Reviews: Drug Discovery**, London, v. 9, n. 5, p. 373-386, May 2010.

RAMOS, F.; SILVEIRA, M. I. N. Agonistas adrenérgicos β 2 e produção animal: II., relação estrutura-atividade e farmacocinética. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Coimbra, v. 96, n. 540, p. 167-175, out./dez. 2001.

RANJIT, S. et al. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF- α to control lipolysis in murine adipocytes. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 52, n. 2, p. 221-236, Feb. 2011.

RASMUSSEN, S. G. et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. **Nature**, London, v. 477, n. 7366, p. 549-557, Sept. 2011.

REITER, S. S. et al. Lipid metabolism related gene-expression profiling in liver, skeletal muscle and adipose tissue in crossbred Duroc and Pietrain Pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 200-206, Sept. 2007.

RICKE, E. A. et al. Effects of ractopamine HCL stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 701-707, Mar. 1999.

ROSS, K. A. et al. The impact of ractopamine hydrochloride on growth and metabolism, with special consideration of its role on nitrogen balance and water utilization in pork production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2243-2256, July 2011.

RYALL, J. G.; SILLENCE, M. N.; LYNCH, G. S. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 147, n. 6, p. 587-595, Mar. 2006.

SAINZ, R. D. et al. Effects of ractopamine in pig muscles: histology, calpains and β -adrenergic receptors. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 44, n. 7, p. 1441-1448, July 1993.

SILVA, A. S.; ZANESCO, A. Exercício físico, receptores β -adrenérgicos e resposta vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 47-56, jun. 2010.

SMITH, D. J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 173-194, Jan. 1998.

SOUZA, E. O. et al. Digestible lysine levels in diets supplemented with ractopamine. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 10, p. 2186-2191, out. 2011.

SPURLOCK, M. E.; CUSUMANO, J. C.; MILLS, S. E. The affinity of ractopamine, clenbuterol, and L-644,969 for the beta-adrenergic receptor population in porcine adipose tissue and skeletal muscle membrane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2061-2065, Aug. 1993.

SPURLOCK, M. E. et al. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 75-80, Jan. 1994.

SULKOWSKA, M. et al. Leptin: from regulation of fat metabolism to stimulation of breast cancer growth. **Pathology Oncology Research**, Budapest, v. 12, n. 2, p. 69-72, 2006.

SZTALRYD, C. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 16, n. 6, p. 1093-1103, June 2003.

TANSEY, J. T. et al. Functional studies on native and mutated forms of perilipins: a role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 10, p. 8401-8406, Mar. 2003.

UETA, C. B. **Papel dos receptores adrenérgicos β_1 e β_2 na termogênese facultativa**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VESTERGAARD, M. et al. The effect of cimaterol on muscle fiber characteristics, capillary supply, and metabolic potentials of *longissimus* and *semitemdinosus* muscles from young *Friesian* bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 9, p. 2298-2306, Sept. 1994.

WARNE, T. et al. Structure of a β_1 -adrenergic G-protein coupled receptor. **Nature**, London, v. 54, n. 7203, p. 486-492, July 2008.

WATANABE, P. H. et al. Ractopamine in diets for finishing gilts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 4, p. 827-833, abr. 2011.

WEBER, T. E. et al. Evaluation of the effects of dietary fat, conjugated linoleic acid, and ractopamine on growth performance, pork quality, and fatty acid profiles in genetically lean gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 720-732, Mar. 2006.

WEBSTER, M. J. R. D. et al. Interactive effects between ractopamine hydrochloride and dietary lysine on finishing pig growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue accretion. **Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 23, n. 6, p. 597-611, Dec. 2007.

WOLF, G. The mechanism and regulation of fat mobilization from adipose tissue: desnutrin, a newly discovered lipolytic enzyme. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 63, n. 5, p. 166-170, May 2005.

YEAMAN, S. J. Hormone-sensitive lipase: new roles for an old enzyme. **Biochemical Journal**, London, v. 379, p. 11-22, Apr. 2004.

YIMLAMAI, T. et al. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 99, n. 1, p. 71-80, July 2005.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses**, Penrith, v. 69, n. 2, p. 310-321, 2007.

ZHAO, S. et al. Impact of dietary protein on lipid metabolism-related gene expression in porcine adipose tissue. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 7, n. 6, p. 1-13, Jan. 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO (Elaborado de acordo com as normas do periódico *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology*)

ARTIGO Efeito da Ractopamina no Metabolismo Lipídico de Suínos em Terminação

Thiago Santos Araújo^{1,*}, Erica Guilhen Mario², Matheus Soares da Silva Ferreira¹, Laura Cristina Jardim Porto³, Marcio Gilberto Zangerônimo¹, Luciano José Pereira¹, Leida Maria Botion², Raimundo Vicente de Sousa¹

¹ Setor de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras; ² Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais; ³ Setor de Nutrição, Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), Universidade Federal de Lavras

* Autor de correspondência (Tel.: +55-35-3829-1148; fax: +55-35-3829-1735; E-mail: thiagobiocouto@gmail.com).

Resumo

Avaliou-se o efeito da suplementação com diferentes níveis de RAC no metabolismo lipídico de suínos em fase de terminação. Amostras de tecido adiposo subcutâneo, perirenal, muscular e sangue foram coletadas no momento do abate de 40 suínos híbridos comerciais (TOPIG). Os animais utilizados foram suplementados com os seguintes níveis de RAC (ppm): 0 (Controle), 5, 10, 15 e 20. A RAC não alterou a atividade da lipase lipoprotéica nos tecidos estudados. Não foram verificadas alterações nos níveis séricos de insulina, contudo houve um aumento linear nos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-c. A quantidade de FAS e GLUT4 do tecido adiposo dos animais não variou, mas o GLUT4 muscular apresentou efeito quadrático negativo. Os níveis séricos de glicose aumentaram linearmente, ao mesmo tempo em que foi verificada uma redução linear no conteúdo de glicogênio muscular. Os resultados indicam que a ractopamina quando administrada a suínos na fase de terminação atua sobre o metabolismo do tecido adiposo de forma a estimular a lipólise nestes animais, ao mesmo tempo, em que são ocasionadas mudanças no metabolismo de carboidratos que darão suporte ao crescimento de massa magra nos animais suplementados.

Palavras-Chave: Agonista β -adrenérgico, lipase lipoproteica, FAS, GLUT-4

1. INTRODUÇÃO

A deposição de gordura na carne dos animais pode ser benéfica ou indesejável dependendo de sua quantidade e localização. Deposição excessiva de gordura tem sido reconhecida como prejudicial à qualidade da carcaça e constitui um risco de saúde para os consumidores, pois o consumo de níveis elevados de gordura saturada na dieta está correlacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência insulínica, diabetes e obesidade (Sulkowska et al. 2006; Zhao et al. 2010; Ranjit et al. 2011). Na produção de suínos, a compreensão do metabolismo lipídico e os mecanismos pelos quais é regulado contribuem no desenvolvimento de estratégias capazes de modificar a deposição de gorduras nos diferentes tecidos animais e, assim, melhorar a qualidade da carne, como por exemplo, a suplementação com ractopamina (Patience et al. 2009; Kutzler et al. 2011; Ross et al. 2011).

Acredita-se que a ractopamina (RAC), agonista de receptores β -adrenérgicos, por apresentar estrutura e propriedades químicas e farmacológicas similares às das catecolaminas naturais, possa controlar a adiposidade em suínos através de vias metabólicas importantes relacionadas à deposição e liberação de gordura no tecido ao ativar receptores β -adrenérgicos específicos (Apple et al. 2007; Ranjit Souza et al. 2011). Como consequência, há a produção de carcaças com teores inferiores de gordura resultantes do melhor particionamento dos nutrientes do tecido adiposo em favor do crescimento muscular (Ferreira et al. 2011; Watanabe et al. 2011; Andretta et al. 2012).

Alguns efeitos da ação da suplementação com ractopamina sobre o metabolismo lipídico de suínos incluem: regulação da expressão de genes relacionados com a quebra de gordura corporal (acil-CoA desidrogenase, carnitina palmitoil transferase 1 e receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas) e dos genes de enzimas que participam do processo de lipogênese (ácido graxo sintetase, proteína 1 ligadora do elemento regulado por esteróis e acetil-CoA carboxilase) (Bergen e Mersmann 2005; Reiter et al. 2007; Halsey et al. 2011). Contudo, ainda se faz necessário mais estudos que possam ajudar a compreender as possíveis vias metabólicas da droga nesses animais, haja vista, que enzimas metabolicamente importantes, como por exemplo a lipase lipoprotéica, carecem de maiores investigações nesse modelo animal. Sendo assim, procurou-se avaliar o efeito da suplementação com diferentes níveis de ractopamina sobre o metabolismo de suínos em fase de terminação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta suínos híbridos comerciais (TOPIGS) provenientes do Centro Experimental de Suínos (CES) do Departamento de Zootecnia da Universidade

Federal de Lavras (UFLA), machos castrados e fêmeas, foram utilizados para a coleta das amostras de tecido adiposo subcutâneo (TAS) e perirenal (PR), de tecido muscular (TM) e sangue. Durante todo o período do experimento, os animais foram alojados em baias individuais com piso de concreto (2,3 x 1,5 m) dotadas de comedouros semiautomáticos e bebedouro tipo chupeta, tendo acesso *ad libitum* à água. A ração foi fornecida duas vezes ao dia às 07h e às 16h.

Os tratamentos experimentais foram: dieta controle, formulada à base de milho e farelo de soja, sem a adição de ractopamina (RAC); dieta + suplementação de 5ppm (RAC); dieta + suplementação de 10ppm (RAC); dieta + suplementação de 15ppm (RAC) e dieta + suplementação de 20ppm (RAC). Na tabela 1 está apresentada a composição centesimal e os valores calculados das dietas experimentais.

Tabela 1 Composição centesimal e valores calculados das dietas experimentais de suínos suplementados com diferentes níveis de ractopamina na fase de terminação

Ingredientes (%)	Dieta Experimental				
	0ppm	5ppm	10ppm	15ppm	20ppm
Milho	71,43	71,43	71,43	71,43	71,43
Farelo de soja	22,73	22,73	22,73	22,73	22,73
Óleo de soja	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Fosfato Bicálcico	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Calcário Calcítico	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
Sal comum	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Premix Mineral ¹	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix Vitamínico ²	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina 99%	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
L-Lisina HCL 78%	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
L-Treonina 98%	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Caulim	0,490	0,465	0,440	0,415	0,390
Tylan ³	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Ractosuin ⁴	0,00	0,025	0,05	0,075	0,10
Composição calculada					
Proteína bruta (%)	16,20	16,20	16,20	16,20	16,20
EM (kcal/kg)	3310	3310	3310	3310	3310
Lisina digestível (%)	1,003	1,003	1,003	1,003	1,003
Metionina digestível (%)	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Treonina digestível (%)	0,717	0,717	0,717	0,717	0,717
Fósforo disponível (%)	0,263	0,263	0,263	0,263	0,263
Cálcio (%)	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559

^a Composição, por kg de produto. Cálcio: 98.800mg; cobalto: 185mg; ferro: 26.650mg; cobre: 15,750mg; iodo: 1.470mg; manganês: 41.850mg; zinco: 77.999mg.

^b Composição, por kg de produto. Ácido fólico: 116,55mg; ácido pantotênico: 2.333,5mg; biotina: 5,28mg; niacina: 5.600mg; piridoxina: 175mg; riboflavina: 933,3mg; tiamina, 175mg; Vit. A: 1.225.000 U.I.; Vit. D₃: 315.000 U.I.; Vit. E: 1.400mg; Vit K₃: 700mg; Vit. B₁₂: 6.825mg; selênio: 105mg; antioxidante: 1.500mg.

^c Antibiótico à base de tilosina granulada.

^d Cloridrato de ractopamina 2,05%

As amostras de TAS, PR e TM e sangue foram coletadas no momento do abate dos animais, o qual ocorreu ao final do período experimental de 28 dias, após dessensibilização elétrica, em abatedouro comercial, de acordo com as normas do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Todos os animais abatidos haviam passado por jejum sólido de 12 horas.

Fragmentos de TAS, PR com no mínimo 1 cm de espessura e 1 cm de profundidade foram coletados em duplicata no menor espaço de tempo após o óbito do animal, durante a evisceração das carcaças. Os fragmentos do músculo *Longissimus dorsi* (TM), de mesma espessura e profundidade, foram coletados, igualmente em duplicata, da carcaça esquerda dos animais na câmara fria. Ambos os procedimentos foram realizados com auxílio de instrumentos estéreis. Cada fragmento coletado foi armazenado em sacos plásticos resistentes, com rótulos identificados individualmente, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O material coletado foi dividido, transportado em tambores de nitrogênio líquido para os laboratórios de Bioquímica Celular, da Universidade Federal de Minas Gerais, e de Biologia Molecular, da Faculdade São Leopoldo Mandic, e armazenados em *freezer* (-80°C) até as respectivas avaliações nestes laboratórios da atividade total da lipase lipoproteica, quantificação do conteúdo de glicogênio e análises semi-quantitativas da expressão do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) e ácido graxo sintetase (FAS). Especificamente, as análises semi-quantitativas foram realizadas somente com as amostras dos suínos machos castrados, uma vez que esses animais apresentam um melhor padrão de resposta a ractopamina.

O sangue dos animais foi coletado em duplicata durante o ato da sangria, a qual foi realizada por meio de corte dos grandes vasos do pescoço, com os animais posicionados na vertical e suspensos por um dos membros posteriores. O armazenamento das amostras de sangue dos animais foi em tubos de ensaio sem anticoagulante com capacidade de 10 mL, individualmente identificados. O material foi mantido sob refrigeração (2°C a 8°C) durante o transporte até a Universidade Federal de Lavras, cujo percurso foi realizado em no máximo 30 minutos. No setor de Fisiologia e Farmacologia, as amostras foram centrifugadas a 1.000 g por 15 minutos para obtenção do soro e armazenadas a -20°C em microtubos de polietileno para posterior dosagem dos seguintes parâmetros

metabólicos: glicose (GLI), colesterol total (CT), HDL-c e triacilgliceróis (TAG). O soro utilizado para dosagem de insulina (IN) permaneceu armazenado em *freezer* a -80°C .

Para efetuar a análise da atividade total da lipase lipoproteica (LPL) os fragmentos de TAS, PR e TM (150mg) foram homogeneizados em tampão contendo detergentes (Iverius e Ostlund-Lindqvist 1986) e a atividade total da LPL foi medida utilizando um substrato emulsificado com lecitina (Nilsson-Ehle e Schotz 1976) e contendo $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ -trioleína e plasma de rato em jejum por 24h como fonte de apo-CII. A reação foi interrompida com mistura de extração (Belfrage e Vaughan 1969) e os $[^3\text{H}]$ -ácidos graxos livres liberados foram quantificados por espectroscopia de cintilação líquida (Beckman LS 7600). A atividade da enzima foi expresso como $\text{nmol de } [^3\text{H}]\text{-ácidos graxos liberados x mg do tecido avaliado}^{-1} \text{ x minuto}^{-1}$.

O conteúdo de glicogênio muscular foi determinado pelo método proposto por Hassid e Abraham (1957). O glicogênio foi extraído de amostras de TM (200mg) em água fervente por 1h utilizando uma solução de KOH (30%), seguido da adição de Na_2SO_4 saturado e álcool absoluto, para precipitar o glicogênio a partir da digestão alcalina. O material foi centrifugado a $978 \times g$ por 10min, com posterior lavagem do glicogênio em água destilada e nova precipitação em álcool absoluto e centrifugação. O glicogênio precipitado foi dissolvido em 10mL de água destilada e esta solução final foi armazenada em tubos Falcon de 15mL. A mistura de antrona foi cuidadosamente adicionada em uma alíquota de 1mL da diluição final, com posterior aquecimento das amostras em água fervente por 10 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada no espectrofotômetro a 620nm. Glicose a diferentes concentrações foi utilizada para a curva de calibração.

As análises semi-quantitativas da expressão do GLUT-4 e da FAS por *Western blotting* foram realizadas homogeneizando as amostras de TAS e TM em tampão de lise contendo inibidores de proteases, seguida de centrifugação (12000g, 10min, 4°C), a fim de remover o infranadante e, assim, quantificar as proteínas das amostras utilizando o método proposto por Bradford (1976). Em seguida, $20\mu\text{g}$ de proteína das amostras foram aquecidas a 95°C por 10min e aplicadas em gel de poliacrilamida a 12% com dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) e, posteriormente, foram transferidas eletroforéticamente (tampão: Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20%) para uma membrana de nitrocelulose, sob voltagem de 110 Volts, por 1h. O transportador de glicose GLUT-4, a ácido graxo sintetase, a α -tubulina (controle endógeno), todos da Santa Cruz Biotechnology[®], foram sondados com um anticorpo primário policlonal *anti-goat* (Santa Cruz Biotechnology[®]). O anticorpo secundário utilizado foi o *rabbit anti-goat IgG* (Santa Cruz Biotechnology[®]). A revelação quimioluminescente foi realizada em filme radiográfico e as bandas imunoreativas foram quantificadas por densitometria

no software livre Image J quant, da National Institute of Health, USA. Os resultados foram expressos a partir da relação GLUT-4/ α -tubulina e FAS/ α -tubulina em unidades de densidade relativas.

As concentrações de GLI, CT e HDL-c do soro foram quantificadas respectivamente pelas metodologias da glicose oxidase, colesterol oxidase e PEG 6000 modificado utilizando testes enzimáticos da empresa DOLES (Goiânia, GO) e de acordo com as normas do fabricante. O TAG foi quantificado pela metodologia Enzimático-Trinder utilizando o teste enzimático da empresa LABTEST (Lagoa Santa, MG), de acordo com as normas do fabricante. A concentração de IN foi quantificada pelo método de ELISA conforme as normas do fabricante do teste comercial para insulina de rato (MILLIPORE, St. Charles, MO – USA).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com cinco tratamentos e oito repetições. Após teste de normalidade e homogeneidade das variâncias (testes de *Shapiro-Wilk* e de *Levene*, respectivamente), os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico *Statistic Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0 para Windows, sendo realizadas análises de regressões múltiplas até o terceiro grau. O nível de significância adotado foi de 0,05.

3. RESULTADOS

Não foi verificado efeito significativo da suplementação com os diferentes níveis de ractopamina na atividade da enzima lipase lipoproteica presente nos capilares que circundam o tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo perirenal (PR), tecido muscular (TM) (Tabela 2) dos suínos.

Tabela 2 Atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo perirenal (PR), tecido muscular (TM) e conteúdo de glicogênio muscular (GM) de suínos, machos castrados fêmeas, suplementados com diferentes níveis de RAC (ppm) na fase de terminação.

	Doses de Ractopamina (ppm)					C.V ¹ Regressã		P
	0	5	10	15	20	, %	o	
Atividade da LPL^a								
TAS	0,024	0,023	0,021	0,019	0,018	22,39	-	0,114
PR	0,025	0,023	0,023	0,022	0,022	13,00	-	0,197
TM	0,026	0,028	0,029	0,029	0,029	13,48	-	0,542
Conteúdo de Glicogênio								
GM ^b	87,40	84,84	84,00	80,97	81,08	6,23	Linear	0,001

¹ Coeficiente de Variação

^a Resultados expressos em número de moles de ácidos graxos liberados x mg de tecido⁻¹ x min.⁻¹

^b Resultados expressos em mg glicogênio/g de tecido

Foi verificada uma redução linear (Figura 1; P=0,001) na quantidade de glicogênio armazenado no tecido muscular esquelético dos animais em função do aumento das doses de ractopamina na dieta, após 28 dias de suplementação.

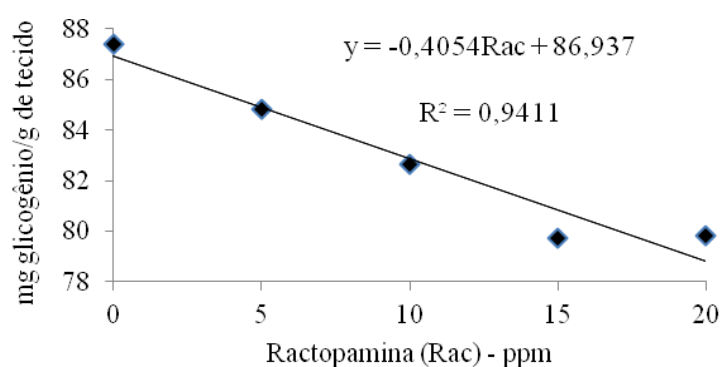


Figura 1 Conteúdo do glicogênio muscular em função das concentrações de ractopamina nas dietas de suínos, machos castrados e fêmeas, híbridos comerciais na fase de terminação.

A figura 2 mostra um autoradiograma representativo das bandas de GLUT-4 (54KDa) e de FAS (250 KDa), juntamente com as bandas da proteína α -tubulina (55 KDa), no tecido adiposo subcutâneo e a figura 3 mostra um autoradiograma representativo das bandas de GLUT-4 e da proteína α -tubulina, no tecido muscular de suínos machos castrados suplementados com concentrações distintas de ractopamina.

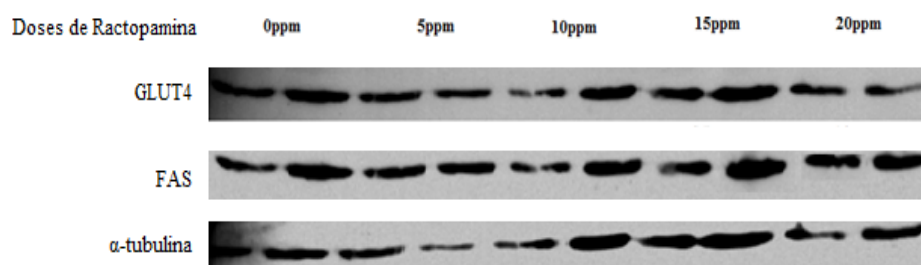


Figura 2 Autorradiograma representativo de *western blotting* para as proteínas GLUT-4, FAS e α -tubulina no tecido adiposo subcutâneo de suínos machos híbridos.

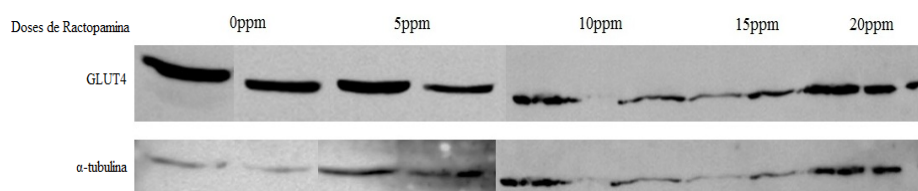


Figura 3 Autorradiograma representativo de *western blotting* para a proteína GLUT-4 e a α -tubulina no tecido muscular de suínos machos híbridos.

Os conteúdos de GLUT-4 e FAS do tecido adiposo subcutâneo não foram afetados pelos diferentes níveis de ractopamina na dieta (Tabela 3).

Tabela 3 Análise semi-quantitativa por *Western blotting* do conteúdo de do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) e da enzima ácido graxo sintetase (FAS) presentes nos tecidos adiposo subcutâneo e muscular de suínos machos híbridos, em terminação, em função da concentração de ractopamina na dieta

	Doses de Ractopamina (ppm)					C.V. ¹		
	0	5	10	15	20	%	Regressão	P
Tecido adiposo subcutâneo								
GLUT-4 ^a	0,780	0,765	0,696	0,655	0,595	11,57	-	0,263
FAS ^b	0,495	0,680	0,660	0,610	0,655	16,21	-	0,450
Tecido muscular								
GLUT-4 ^a	1,785	1,325	1,025	1,020	1,010	8,91	Quadrática	0,003

¹ Coeficiente de variação.

^aResultados expressos a partir da relação GLUT-4/ α -tubulina em unidades de densidade relativas

^bResultados expressos a partir da relação FAS/ α -tubulina em unidades de densidade relativas

Em relação ao GLUT-4 presente na musculatura esquelética dos animais suplementados com a ractopamina durante a fase de terminação foi verificado um efeito quadrático negativo ($P=0,002$) (Figura 4), com o aumento da concentração de ractopamina nas dietas, sendo a menor quantidade do transportador de glicose dependente de insulina (0,959) estimada para a concentração de 15,5ppm de ractopamina na dieta.

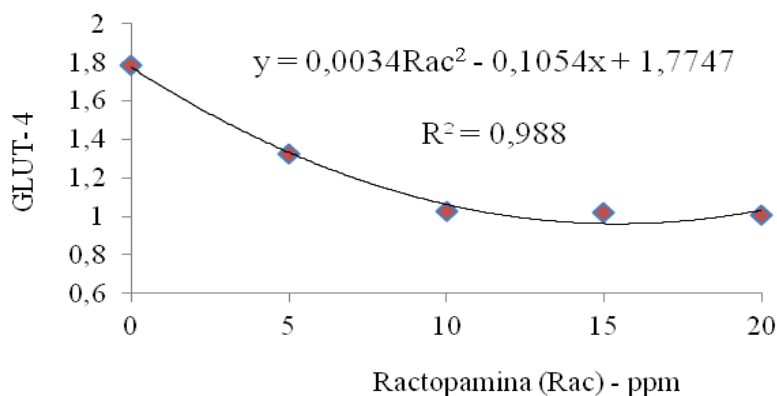


Figura 4 Análise semi-quantitativa da proteína GLUT-4 presente no tecido muscular de suínos machos tratados com diferentes níveis de ractopamina (ppm). Os resultados foram expressos, a partir da relação GLUT-4/ α -tubulina, em unidades de densidade relativa

Não foi verificado efeito da adição de ractopamina sobre os níveis séricos de insulina (IN) (Tabela 4). Para os níveis de glicose (GLI), colesterol total (CT), HDL-c e de triacilgliceróis (TAG) no sangue, foram encontrados aumentos lineares ($P=0,040$; $P=0,002$; $P=0,000$ e $P=0,002$, respectivamente), com o aumento da concentração de ractopamina nas dietas (Figura 5).

Tabela 4 Níveis séricos de glicose (GLI), colesterol total (CT), colesterol HDL (HDL-c), triacilgliceróis (TAG) e insulina (IN) de suínos, machos castrados e fêmeas, em terminação, em função das concentrações de ractopamina.

Variáveis	Doses de ractopamina (ppm)					CV ¹ , Regressã		
	0	5	10	15	20	%	o	P
GLI (mg.dl ⁻¹)	83,80	92,24	98,11	99,46	99,90	11,88	Linear	0,040
CT (mg.dl ⁻¹)	68,85	77,33	81,17	87,29	90,50	12,95	Linear	0,002
HDL-c (mg.dl ⁻¹)	35,34	38,00	40,82	42,29	43,23	7,08	Linear	0,000
TAG (mg.dl ⁻¹)	50,07	56,27	56,69	61,41	63,89	11,25	Linear	0,002
IN (ng.ml ⁻¹)	0,116	0,107	0,106	0,100	0,094	33,03	-	0,766

¹Coeficientes de variação

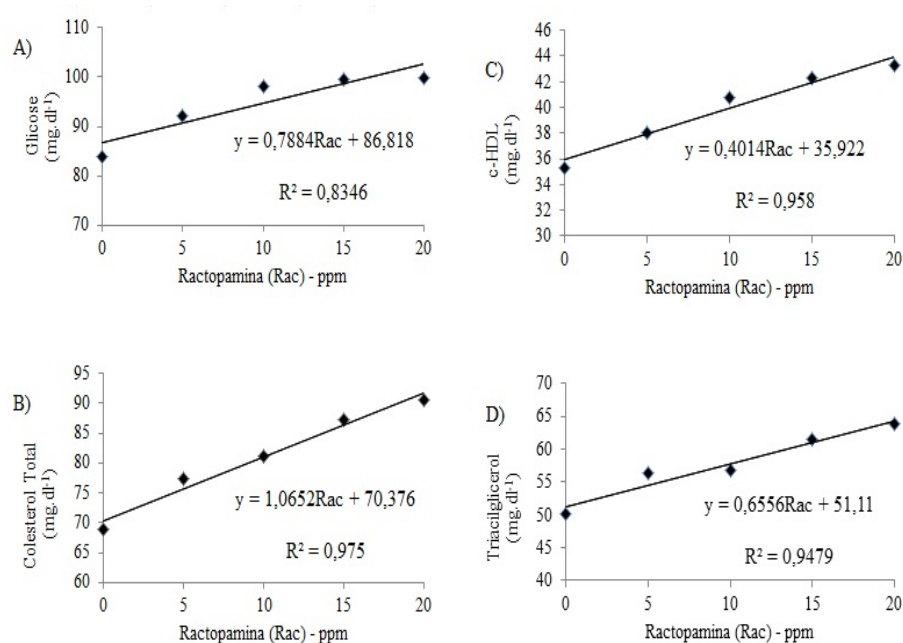


Figura 5 Níveis séricos de glicose (a), colesterol total (b), de HDL-c (c) e de triacilgliceróis (d), em função das concentrações de ractopamina nas dietas de suínos, machos castrados e fêmeas, híbridos comerciais na fase de terminação.

4. DISCUSSÃO

A lipase lipoproteica (LPL) é uma enzima essencial para o controle do direcionamento de triacilgliceróis entre os tecidos muscular e adiposo, aumentando os estoques lipídicos ou fornecendo energia na forma de ácidos graxos para o crescimento muscular (Elkattawy et al. 2009; Schittmayer e Birner-Gruenberger 2009). Avaliar a atividade desta enzima, sobretudo no tecido adiposo, pode ser um instrumento, não o único, válido para o estudo da via anabólica (Mersmann 1998). Vários autores estudaram extensivamente a regulação da atividade da LPL por agonistas de receptores β -adrenérgicos em distintos modelos animais (Ballart et al. 2003; Smith et al. 2007; Bryant et al. 2010), contudo os estudos envolvendo a sua regulação em suínos especificamente por ação da ractopamina carecem de maiores investigações. Baseado nos efeitos que as catecolaminas exercem sobre a atividade da LPL do tecido adiposo e muscular, diminuição e aumento, respectivamente, conforme Fonseca-Alaniz et al. 2007 e Goldberg et al. 2009, esperava-se que os suínos também pudessem apresentar alteração na atividade da mesma em função da suplementação realizada com ractopamina, no entanto este efeito não foi observado provavelmente porque não atua diretamente sobre a atividade da lipase lipoproteica de suínos.

Outro parâmetro válido para o estudo da via anabólica, a ácido graxo sintetase (FAS), também foi avaliada neste experimento. Esta é uma importante enzima que participa dos processos de síntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa através de precursores menores como o acetil-CoA e malonil-CoA (Carvalho et al. 2002). Como informado anteriormente, a ractopamina não alterou a quantidade de FAS presente no tecido adiposo subcutâneo dos animais suplementados na fase de terminação, muito embora a redução na quantidade do mRNA de FAS neste mesmo tecido tenha sido verificada em suínos suplementados com 20ppm do agonista durante um período de 28 dias (Halsey et al. 2011) e por um período de 52 dias (Reiter et al. 2007). Ressalta-se que nenhum dos trabalhos abordados assemelha-se metodologicamente com este experimento e por este motivo deve ser levada em consideração que as respostas aqui obtidas podem ter variado das dos demais devido à linhagem utilizada, tempo de exposição ao agonista e do nível administrado, conforme teoria proposta por See et al. (2004).

Devido aos resultados discutidos anteriormente, acredita-se, portanto, que a suplementação de suínos com ractopamina altere o metabolismo lipídico do animal ocasionando estímulo na lipólise e não bloqueio da lipogênese, muito embora o tecido adiposo desses animais apresente menor concentração de receptores lipolíticos β 3-adrenérgicos (Peterla e Scanes 1990; Mcnell e Mersmann 1999). Esta pode ser uma provável explicação para a diminuição na deposição de gordura na carcaça de suínos suplementados com o aditivo na fase

de terminação encontrada por diversos autores (Pérez et al. 2006; Amaral et al. 2009; Cantarelli et al. 2009). De fato, Dunshea et al. (1998) ao estimarem a lipogênese a partir da incorporação de C^{14} aos estoques lipídicos de suínos suplementados com ractopamina na dieta e recebendo doses intravenosas de glicose-[U- C^{14}], verificaram que o aditivo não influenciou a taxa de lipogênese do tecido adiposo dos animais no estudo. Por outro lado, Peterla e Scanes (1990) verificaram *in vitro* que adipócitos de suínos tratados com ractopamina apresentam aumento na liberação de glicerol. Provavelmente, segundo Adeola et al. (1992), a ractopamina quando melhora o desempenho e composição da carcaça dos suínos, também induz uma mudança no metabolismo do animal ao aumentar a utilização de gordura para a oxidação e potencializando a capacidade de resposta do tecido adiposo a estímulos lipolíticos, no entanto os resultados na literatura acerca da redução *in vivo* da gordura são inconclusivos (Moore et al. 2009; Boler et al. 2010; Kutzler et al. 2010).

Diversos estudos demonstraram que alterações no metabolismo lipídico em distintos níveis repercutem diretamente nos níveis séricos das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e lipoproteínas ricas em colesterol (Bernardes et al. 2004; Scherr e Ribeiro 2008). Hoshi et al. (2005) verificaram que, provavelmente devido ao efeito lipolítico da droga, suínos suplementados com 20 ppm de RAC na ração apresentaram aumento linear do colesterol total, triacilgliceróis e HDL-c. De forma semelhante, estes mesmos parâmetros apresentaram-se aumentados com a inclusão da ractopamina neste estudo. Provavelmente, por outros mecanismos não esclarecidos com essa pesquisa, a ractopamina possa ter acarretado diminuição na captação dos quilomicra remanescentes e lipoproteínas circulantes e na captação do colesterol pelo fígado o que pode ter afetado respectivamente o nível sérico de triacilgliceróis e colesterol total, bem como o de HDL-c (maior fração presente no suíno).

Enquanto que a ractopamina é capaz de ativar a via lipolítica no tecido adiposo de suínos, a insulina apresenta um papel lipogênico sobre este tecido (Almeida et al. 2012). Este hormônio promove o armazenando de triacilgliceróis (TAGs) por meio da estimulação do transporte de glicose, mediado pela ativação dos receptores insulina substrato (Kahn e Flier 2000), estimulação da captação dos TAGs circulantes por meio do aumento da atividade da lipase lipoproteica (Buijs et al. 2003) e reesterificação de ácidos graxos livres (Enoksson et al. 1998; Van Harmelen et al. 1999). Embora Dunshea e King (1994, 1995) tenham verificado que suínos suplementados com ractopamina apresentam níveis basais de insulina diminuídos, neste experimento esse efeito não ficou demonstrado. Possivelmente a ractopamina possa ter diminuído a sensibilidade à insulina e/ou a ligação da insulina ao adipócito dos suínos suplementados, como fora verificado anteriormente em estudos *in vitro* por (Liu e Mills 1990; Mills et al. 1990). Associado a isto, o tecido hepático em resposta à estimulação por este agonista

pode ter reduzido a extração da insulina o que pode ter ajudado na manutenção dos níveis elevados deste hormônio (Hermsdorf e Monteiro 2004).

Medir a concentração de um metabólito no plasma não necessariamente indica uma taxa das alterações metabólicas que ocorram em um tecido específico, uma vez que as concentrações destes metabólitos circulantes dependem de uma série de fatores, como por exemplo, ingestão alimentar, taxa de produção, taxa de captação e taxa de liberação para o plasma, reutilização intracelular, o fluxo sanguíneo e da complexa interação de hormônios (Adeola et al. 1992; Mersman 1998). Desta forma, as mudanças verificadas no presente experimento não podem ser unicamente expostas como o resultado de um único evento, mas sim, também podem ter surgido a partir de eventos metabólicos complexos e integrados ao metabolismo lipídico animal, como por exemplo, em resposta a prováveis alterações no metabolismo de carboidratos do animal.

É sabido que a ractopamina além de atuar em vias metabólicas importantes relacionadas com o metabolismo proteico e lipídico, também é conhecida por apresentar efeito sobre o metabolismo de carboidratos dos animais suplementados, e desta forma integrada, redireciona os nutrientes presentes na dieta favorecendo a síntese de proteínas em detrimento da deposição de gordura na carcaça (Andretta et al. 2012; Gunawan et al. 2007; Watanabe et al. 2011). Assim como ocorre com as catecolaminas, o uso deste β -agonista sintético pode ocasionar o aumento das concentrações de glicose e ácidos graxos não esterificados no plasma dos animais suplementados, tendo estas mudanças já sido relatadas (Adeola et al. 1992; Barth et al. 2007).

A hiperglicemia pode, portanto, ser considerada uma marca da resposta metabólica frente ao uso de catecolaminas e seus agonistas β -adrenérgicos similares e, ao contrário do que foi verificado por Dunshea e King (1994), este efeito ficou demonstrado neste experimento. Os suínos suplementados com ractopamina apresentaram aproximadamente um aumento máximo de 19% nos níveis séricos de glicose. Estes resultados aproximam-se dos obtidos por Mersman (1987), cujo experimento, que visava avaliar os efeitos metabólicos agudos da suplementação com o mesmo agonista na dieta de suínos, mostrou como resultado aumento no volume de glicose em 24% e Vandenberg et al. (1998) que trabalhou com peixes. Provavelmente, a estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos hepáticos pela ractopamina pode ter resultado no aumento do catabolismo de glicogênio (glicogenólise e/ou gliconeogênese, indiretamente), gerando um maior nível plasmático de glicose (Arinze e Kawai 1983; Ghosh *et al.* 2012), presumivelmente para apoiar o aumento verificado por diversos autores na deposição proteica que ocorre no músculo esquelético desses animais durante a suplementação com a RAC (Andretta et al. 2012; Cantarelli et al. 2009; Ferreira et al. 2011).

Na musculatura esquelética, o conteúdo de glicogênio tanto pode servir como uma reserva energética para essas células (Jensen et al. 2006, Kishore et al.

2006) como também é utilizado no complexo processo de conversão do músculo em carne (Koohmaraie et al. 1995, Huff-lonergan e Lonergan 1999). O efeito glicogenólico discutido anteriormente frente à administração de catecolaminas também pode ser verificado neste tecido (Gunawan et al. 2007) e esse trabalho mostrou esta diminuição no conteúdo de glicogênio muscular dos suínos suplementados com a RAC. Os resultados demonstrados para os níveis séricos de glicose e conteúdo muscular de glicogênio podem dar suporte para as alterações encontradas por Gunawan et al. (2007) para a expressão da glicogênio sintetase em seu experimento com suínos. Inicialmente, o aumento da disponibilidade de glicose na circulação devido a mobilização das reservas energéticas a partir do fígado estimula a expressão da glicogênio sintetase (GS). Com administração crônica da RAC, aumenta a necessidade de energia associada ao crescimento muscular continuamente estimulado pelo aditivo. A partir deste momento, não seria mais necessária para a célula muscular manter níveis elevados da GS que sofreria *downregulation* de seu gene com concomitante necessidade de quebra das reservas de glicogênio do músculo por meio da atuação da enzima glicogênio fosforilase. Novos estudos neste campo são encorajados a fim de poder esclarecer esta hipótese levantada.

A suplementação com RAC aumenta a lipólise por meio da ligação deste aditivo a receptores β -adrenérgicos presentes na membrana do adipócito com posterior ativação de uma cascata de sinalização que envolve a síntese de AMPc, com posterior ativação da lipase hormônio sensível pela proteína quinase A (Almeida et al. 2012; Bergen and Merkel 1991; Lefkowitz 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que a proteína quinase A (PKA), por meio do aumento da fosforilação da serina, apresenta efeitos inibitórios em diversas reações que participam do processo de conversão de glicose à triacilglicerol e seu posterior armazenamento (Liu et al. 1994). Os hormônios que ativam a PKA, de forma aguda, interferem tanto no transporte da glicose e translocação do receptor GLUT4 para a membrana celular (Joost et al. 1987) quanto na via de sinalização da insulina (Häring et al. 1986). Foi demonstrado que uma exposição crônica leva ao aumento do AMPc que induz a supressão gênica e a abundância do mRNA de GLUT4 (Cooke and Lane 1999; Kaestner et al. 1991; Qi et al. 2009; Yu et al. 2001). Contudo, o mecanismo pelo qual o AMPc pode modular a expressão de GLUT4 ainda não está bem estabelecido (Halsey et al. 2011).

Da mesma forma que o proposto por Liu et al. (1994), era esperado que os suínos suplementados com RAC apresentassem uma diminuição na taxa de lipogênese com conseqüente decréscimo da atividade das enzimas envolvidas com a síntese de lipídeos e do transportador de glicose GLUT4, que participa metabolismo de lipídeos e de carboidratos. No entanto, ao contrário do que foi verificado por Halsey et al. (2011) e Reiter et al. (2007), esse resultado só foi obtido com a quantidade de GLUT-4 presente no tecido muscular esquelético dos animais (Figura 4). Halsey et al. (2011) verificaram que 28 dias de

suplementação com a RAC é capaz de diminuir a quantidade de mRNA de GLUT-4 presente no tecido adiposo dos animais. Reiter et al. (2007), mesmo aumentando o tempo de exposição ao agonista (52 dias), conseguiu obter resultados semelhantes para o mRNA do GLUT-4 presente no tecido adiposo e ainda provaram que o mesmo efeito (decréscimo) também é verificado no tecido muscular esquelético.

O fato da quantidade de GLUT-4, FAS no tecido adiposo dos suínos não terem variado entre os tratamentos não indica que a RAC não possa ser um agonista no tecido adiposo desses animais. Os efeitos característicos da RAC enquanto agonista já está bem demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Dickerson-Weber et al. 1991; Mills et al. 1990). Provavelmente, a suplementação com RAC por 28 dias, induziu *downregulation* dos receptores beta-adrenérgicos presentes no tecido adiposo dos animais, gerando um decréscimo na resposta beta-adrenérgica, o que explicaria os resultados obtidos. Está bem definido que a ação prolongada do agonista pode induzir a dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos, com posterior sequestro do complexo agonista-receptor para o meio intracelular e aparecimento do fenômeno *downregulation* (Coman et al. 2009; Kenakin 2011). Todos esses processos causam uma redução na quantidade dos receptores β_1 , β_2 e β_3 na membrana (Leeb-Lundberg et al. 1987). De acordo com Spurlock et al. (1994), a dessensibilização parece não ocorrer no tecido muscular ou o processo de *downregulation* parece ter pouca influência sobre esse tecido, já que o número de β -receptores no músculo esquelético de suínos alimentados com ractopamina por 28 dias não diminuiu em seu experimento. De certa forma, os resultados obtidos com essa pesquisa confirmam o postulado pelos autores, haja vista que houve uma diminuição na quantidade dos transportadores de glicose nos animais suplementados.

Adicionalmente, é sabido que ambos os genes e as enzimas lipogênicas são extremamente sensíveis ao status energético do animal (Sul e Wang 1998; Halsey et al. 2011). Antes do abate neste experimento, os animais passaram por um período de 12 horas de jejum. Desta forma, as amostras de TAS, PR e TM obtidas após o abate podem não refletir o real cenário da quantidade de enzimas ativas no tecido adiposo do animal vivo (Halsey et al. 2011). Nos trabalhos de Halsey et al. (2011) e Reiter et al. (2007) está claro que os suínos foram abatidos sem nenhum período de privação de alimentação e isto pode ter refletido nos resultados obtidos por estes autores. Liu et al. (1994), no entanto, não explica se os animais em seu experimento ficaram ou não em jejum, mas os seus resultados mostram que a RAC não afetou a quantidade de mRNA do GLUT4 presente no tecido adiposo dos animais.

As mudanças nos metabólitos sanguíneos e no metabolismo lipídico e de carboidratos observados no presente estudo e discutidos com base em observações anteriormente publicadas por outros autores representam alguns dos componentes metabólicos dos efeitos da repartição de nutrientes causada pela

ractopamina que resultam na redução de gordura, aumento da massa muscular e incremento da eficiência produtiva. Ficou demonstrado que a ractopamina não exerce influência *in vivo* sobre a atividade da lipase lipoprotéica de suínos. Por mecanismos levantados e discutidos anteriormente, os animais suplementados com o aditivo apresentaram aumento nos níveis séricos de colesterol total, HDL-c, triacilgliceróis e de glicose, sem haver alterações nos níveis de insulina. A fim de suportar, o crescimento muscular estimulado pela administração do agonista β -sintético as reservas de glicogênio foram diminuídas. O conteúdo do GLUT4 e FAS presente no tecido adiposo dos suínos suplementados, provavelmente, por *downregulation* não responderam à suplementação da ractopamina na dieta para os suínos em terminação, no entanto, este efeito não foi verificado no tecido muscular. Conclui-se que a ractopamina quando administrada a suínos na fase de terminação atua sobre o metabolismo do tecido adiposo de forma a estimular a lipólise nestes animais, ao mesmo tempo, em que são ocasionadas mudanças no metabolismo de carboidratos que darão suporte ao crescimento de massa magra nos animais suplementados. Novos estudos neste campo são necessários a fim de ajudar na compreensão das possíveis rotas metabólicas da ractopamina em suínos na fase de terminação e com isso melhorar a eficiência dos animais no sistema de produção e também a qualidade da carne produzida.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento desta pesquisa; à Faculdade São Leopoldo Mandic, representada por Jeruza Bossonaro, pela realização das análises de proteínas GLUT-4 e FAS; ao Prof^o Dr^o Vinicius de Souza Cantarelli, chefe do Centro Experimental de Suínos (CES) – DZO/UFLA, por ter cedido os animais de seu experimento para a coleta das amostras utilizadas nessa pesquisa e aos alunos Renato Machado, Cinthya Penoni e Bruna Resende, que auxiliaram na coleta do material e análises dos parâmetros bioquímicos.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse relacionado com este estudo.

REFERÊNCIAS

Adeola O, McBride BW, Young LG. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. J Nutr. 1992; 122(6): 1280-6.

- Almeida VV, Nuñez AJC, Miyada VS. Ractopamine as a Metabolic Modifier Feed Additive for Finishing Pigs: A Review. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2012; 55(3): 445-456.
- Amaral NO, Fialho ET, Cantarelli VS, Zangeronimo MG, Rodrigues PB, Girão LVC. Ractopamine hydrochloride in rations for barrows and gilts from 94 to 130 kg. *Rev. Bras. Zootec.* 2009; 38(8): 1494-1501.
- Andretta I, Kipper M, Lehnen CR, Demori AB, Remus A, Lovatto PA. Meta-analysis of the relationship between ractopamine and dietary lysine levels on carcass characteristics in pigs. *Livest. Sci.* 2012; 143(1): 91-6.
- Apple JK, Rincker PJ, Mckeith FK, Carr SN, Armstrong TA, Matzat PD. Meta-analysis of the ractopamine response in finishing swine. *Prof. Anim. Sci.* 2007; 23(3): 179-196.
- Arinze I, Kawai Y. Adrenergic regulation of glycogenolysis in isolated guinea-pig hepatocytes: Evidence that beta2-receptors mediate catecholamine stimulation of glycogenolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983; 225(1): 196-202.
- Ballart X, Siches M, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero D, Llobera M, Ramírez I, et al. Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte medium and in rat plasma. *Biochimie.* 2003; 85(10): 971-982.
- Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, et al. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med.* 2007; 35(9) 508-518.
- Belfrage P, Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lipid. Res.* 1969; 10(3): 341-4.
- Bergen WG, Merkel RA. Body composition of animals treated with partitioning agents: Implications for human health. *FASEB J.* 1991; 5(14): 2951-7.
- Bergen WG, Mersmann HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J. Nutr.* 2005; 135(11): 2499-2502.
- Bernardes D, Manzoni MSJ, Souza CP, Tenório N, Dâmaso AR. Effects of a high-fat diet and swimming moderate training on post exercise metabolism in male adult rats. *Rev. bras. Educ. Fís. Esp.* 2004; 18(2): 191-200.
- Boler DD, Holmer SF, Duncan DA, Carr SN, Ritter MJ, Stites CR, et al. Fresh meat and further processing characteristics of ham muscles from finishing pigs fed ractopamine hydrochloride. *J. Anim. Sci.* 2010; 89(1): 210-220.
- Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Bryant TC, Engle TE, Galyean ML, Wagner JJ, Tatum JD, Anthony RV, et al. Effects of ractopamine and trenbolone acetate implants with or without estradiol on growth performance, carcass characteristics, adipogenic enzyme activity, and blood metabolites in feedlot steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 2010; 88(12): 4102-4119
- Buijs MM, Burggraaf J, Wijbrandts C, Kam ML, Frolich M, Cohen A, et al. Blunted lipolytic response to fasting in abdominally obese women: evidence for involvement of hypohomotropism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003;77(3): 544-50.
- Cantarelli VS, Fialho ET, Almeida EC, Zangeronimo MG, Amaral NO, Lima JA. Carcass characteristics and economic viability of the use of ractopamine for finishing swine with *ad libitum* or restricted feeding. *Cienc. Rural.* 2009; 39(3): 844-851.

- Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2002; 46(4): 419-425.
- Coman OA, Păunescu H, Ghiță I, Coman L, Bădărău A, Fulga I. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. Rom. J. Morphol. Embryol. 2009; 50(2): 169-179.
- Cooke DW, Lane MD. Transcription factor NF1 mediates repression of the GLUT4 promoter by cyclic-AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 260(3): 600-604.
- Dickerson-Weber PS, Helferich WG, Merkel RA, Bergen WG. Pretranslational control of adipogenic enzyme activity in TA1 cells by ractopamine. FASEB J. 1991; 5:A1307.
- Dunshea FR, King RH. Responses to homeostatic signals in ractopamine-treated pigs. Br J Nutr. 1995; 73(6): 809-818.
- Dunshea FR, King RH. Temporal response of plasma metabolites to ractopamine treatment in the growing pig Aust. J. Agr. Res. 1994; 45(8): 1683-1692.
- Dunshea FR, Leur BJ, Tilbrook AJ, King RH. Ractopamine increases glucose turnover without affecting lipogenesis in the pig. Aust. J. Agric. Res. 1998; 49(7): 1147-1152.
- Elkattawy AM, El-Shazly SA, Kahilo KA, Hassan IF. Lipoprotein lipase mRNA expression in different tissues of farm animals. EJBMB. 2009; 27(1): 107 – 116.
- Enoksson S, Degerman E, Hagstrom-Toft E, Large V, Arner P. Various phosphodiesterase subtypes mediante the *in vivo* antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man. Diabetologia. 1998; 41(5): 560-8.
- Ferreira MSS, Sousa RV, Silva VO, Zangerônimo MG, Amaral NO. Ractopamine hydrochloride in diets for finishing pigs. Acta. Sci. Anim. Sci. 2011; 33(1): 25-32.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr (Rio J). 2007; 83(5Suppl): S192-203.
- Ghosh PM, Shu ZJ, Zhu B, Lu Z, Ikeno Y, Barnes JL, et al. A role of β -adrenergic receptors in regulation of hepatic fat accumulation during aging. J Endocrinol. 2012; 213(3): 251-261.
- Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. J Lipid Res. 2009; 50 Suppl: S86-90.
- Gunawan AM, Richert BT, Schinckel AP, Grant AL, Gerrard DE. Ractopamine induces differential gene expression in porcine skeletal muscles. J Anim Sci. 2007; 85(9): 2115-2124.
- Halsey CH, Weber PS, Reiter SS, Stronach BN, Bartosh JL, Bergen WG. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. J. Anim. Sci. 2011; 89(4): 1011-1019.
- Häring H, Kirsch D, Obermaier B, Ermel B, Machicao F. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment *in vitro*. Biochem. J. 1986; 234(1): 59-66

- Hassid WZ, Abraham S. Chemical procedures for analysis of polysaccharide I. Determination of glycogen and starch - Determination of glycogen with the anthron reagent. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods of Enzymology* 3, New York: Academic Press; 1957. 35-6.
- Hermesdorff HH, Monteiro JB. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 48(6): 803-811.
- Hoshi EH, Fonseca NAN, Pinheiro JW, Marçal WS, Silva CA. Effects of the use of ractopamine in pregnant sows on reproductive and blood parameters. *Span. J. Agric. Res.* 2005; 3(2): 213-219.
- Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Postmortem mechanisms of meat tenderization: the roles of the structural proteins and the calpain system. In: Xiong YL, Ho CT, Shahidi F, editors. *Quality attributes of muscle foods*. New York: Plenum; 1999. 229–251.
- Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM. Preparation, characterization, and measurement of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.* 1986; 129: 691-704.
- Jensen J, Jebens E, Brennesvik EO, Ruzzin J, Soos MA, Engebretsen EML, et al. Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290: E154-E162.
- Joost HG, Weber TM, Cushman SW, Simpson IA. Activity and phosphorylation state of glucose transporters in plasma membranes from insulin-, isoproterenol-, and phorbol ester-treated rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(23): 11261-7.
- Kaestner KH, Flores-Riveros JR, McLenithan JC, Janicot M, Lane MD. Transcriptional repression of the mouse insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(5): 1933–1937.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106(4):473-81.
- Kenakin T. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336(2): 296-302.
- Kishore P, Gabriely I, Cui MH, Di Vito J, Gajavelli S, Hwang JH, et al. Role of hepatic glycogen breakdown in defective counterregulation of hypoglycemia in intensively treated type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55(3): 659-666.
- Koohmaraie M, Shackelford SD, Wheeler TL, Lonergan SM, Doumit ME. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J. Anim. Sci.* 1995; 73(12): 3596-3607.
- Kutzler LW, Holmer SF, Boler DD, Carr SN, Ritter MJ, Parks CW, et al. Comparison of varying doses and durations of ractopamine hydrochloride (Paylean®) on late finishing pig carcass characteristics and meat quality. *J. Anim. Sci.* 2011; 89(7): 2176-2188.
- Kutzler LW, Peterson CM, Ellis M, Carr SN, Ritter MJ, Armstrong TA, et al. Ractopamine (Paylean) response in heavy-weight finishing pigs. *Prof. Anim. Sci.* 2010; 26(2): 243-249.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

- Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, DeBlasi A, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1- adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1987; 262(7): 3098-105.
- Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: A brief personal retrospective. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1768(4): 748–755.
- Liu CY, Grant AL, Kim KH, Ji SQ, Hancock DL, Anderson DB, et al. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. *Anim Sci.* 1994; 72(1): 62-7.
- Liu CY, Mills SE. Decreased insulin binding to porcine adipocytes *in vitro* by beta-adrenergic agonists. *J. Anim. Sci.* 1990; 68(6): 1603-1608.
- McNeel RL, Mersmann HJ. Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. *J Anim Sci.* 1999; 77(3):611-21.
- Mersmann HJ. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. *Am J Physiol.* 1987; 252(1 Pt 1): E85-95.
- Mersmann HJ. Lipoprotein and hormone-sensitive lipases in porcine adipose tissue. *J Anim Sci.* 1998; 76(5): 1396-404.
- Mills SE, Liu CY, Gu Y, Schinckel AP. Effects of ractopamine on adipose tissue metabolism and insulin binding in finishing hogs. Interaction with genotype and slaughter weight. *Domest Anim Endocrinol.* 1990; 7(2): 251-63.
- Moore KL, Dunshea FR, Mullan BP, Hennessy DP, D'Souza DN. Ractopamine supplementation increases lean deposition in entire and immunocastrated male pigs. *Anim. Prod. Sci.* 2009; 49(12): 1113-1119.
- Nie NH, Hull CH, Jenkins JG, Steinbrenner K, Bent DH. *Statistical Package for the Social Sciences.* 2nd edition. New York, McGraw-Hill; 1975.
- Nilsson-Ehle P, Schotz MC. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid. Res.* 1976; 17(5): 536-41.
- Patience JF, Shand P, Pietrasik Z, Merrill J, Vessie G, Ross KA, et al. The effect of ractopamine supplementation at 5 ppm of swine finishing diets on growth performance, carcass composition and ultimate pork quality. *Can. J. Anim. Sci.* 2009; 89(1): 53-66.
- Pérez A, Obispo NE, Palma J, Chicco CF. Effect of ractopamine and lysine on lean yield of leaning pigs in the finishing phase. *Zootecnia Trop.* 2006; 24(4): 435-455.
- Peterla TA, Scanes CG. Effect of beta-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue *in vitro*. *J Anim Sci.* 1990; 68(4): 1024-9.
- Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, et al. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 2009; 9(3): 277–286.

- Ranjit S, Boutet E, Gandhi P, Prot M, Tamori Y, Chawla A, et al. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF- α to control lipolysis in murine adipocytes. *J Lipid Res.* 2011; 52(2): 221-36.
- Reiter SS, Halsey CH, Stronach BM, Bartosh JL, Owsley WF, Bergen WG. Lipid metabolism related gene-expression profiling in liver, skeletal muscle and adipose tissue in crossbred Duroc and Pietrain Pigs. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2007; 2(3): 200-6
- Ross KA, Beaulieu AD, Merrill J, Vessie G, Patience JF. The impact of ractopamine hydrochloride on growth and metabolism, with special consideration of its role on nitrogen balance and water utilization in pork production. *J. Anim. Sci.* 2011; 89(7): 2243-2256.
- Scherr C, Ribeiro J.P. What the cardiologist should know about trans fats. *Arq. Bras. Cardiol.* 2008; 90(1): e4-e7.
- Schittmayer M, Birner-Gruenberger R. Functional proteomics in lipid research: Lipases, lipid droplets and lipoproteins. *J. Proteomics.* 2009; 72(6): 1006–1018.
- See MT, Armstrong TA, Weldon WC. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 2004; 82(8): 2474-2480.
- Smith KR, Duckett SK, Azain MJ, Sonon RN Jr, Pringle TD. The effect of anabolic implants on intramuscular lipid deposition in finished beef cattle. *J Anim Sci.* 2007; 85(2): 430-40.
- Souza EO, Haese D, Kill JL, Haddade IR, Lacerda EG, Saraiva A, et al. Digestible lysine levels in diets supplemented with ractopamine. *R. Bras. Zootec.* 2011; 40(10): 2186-2191.
- Spurlock ME, Cusumano JC, Ji SQ, Anderson DB, Smith CK 2nd, Hancock DL, et al. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. *J Anim Sci.* 1994; 72(1): 75-80.
- Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr.* 1998; 18:331-51.
- Sulkowska M, Golaszewska J, Wincewicz A, Koda M, Baltaziak M, Sulkowski S. Leptin – from regulation of fat metabolism to stimulation of breast cancer growth. *Pathol. Oncol. Res.* 2006; 12(2): 69–72.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Cianflone K, Degerman E, Hoffstedt J, Nilselli K, et al. Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J Biol Chem* 1999; 274(26): 18243-51.
- Vandenberg GW, Leatherland FJ, Moccia RD. The effects of the β -agonist ractopamine on growth hormone and intermediary metabolite concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 1998; 29(2): 79–87.
- Watanabe PH, Thomaz MC, Pascoal LAF, Ruiz US, Daniel E, Cristani J. Ractopamine in diets for finishing gilts. *Rev. Bras. Zootec.* 2011; 40(4): 827-833.
- Yu ZW, Burén J, Enerbäck S, Nilsson E, Samuelsson L, Eriksson JW. Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by

vanadate but counteracted by cAMP and high glucose: Potential implications for insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1535(2): 174–185.

Zhao S, Wang J, Song X, Zhang X, Ge C, Gao S. Impact of dietary protein on lipid metabolism-related gene expression in porcine adipose tissue. *Nutr. Metab. (Lond).* 2010; 7(6): 1-13.

VERSÃO PRELIMINAR

ANEXO

Brazilian Archives of Biology and Technology - INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. GENERAL INFORMATION

The journal Brazilian Archives of Biology and Technology – BAPT publishes original articles of research, short notes and review articles in the following areas: Agriculture, Agribusiness and Biotechnology; Human and Animal Health; Biological and Applied Sciences; Food/Feed Science and Technology; Environmental Sciences; Engineering, Technology and Techniques.

The submission of a manuscript to the Brazilian Archives of Biology and Technology implies that:

- The manuscript is presented in English; We suggest the manuscript to be reviewed by someone whose first language is English and that, preferably, be a scientist in the area;
- The manuscript hasn't been partial or entirely published; not to be in selection process for publishing in another journal and/or another language;
- The submission must have been approved for all the co-authors and whenever necessary, by the authorities of the institution where the work was developed;
- The veracity of the information and of the bibliographic citations is of exclusive responsibility of the authors;
- The journal does not take responsibility and/or takes part in eventual lawsuits related to the published articles.

The submitted manuscripts are pre-evaluated in its content referring to scientific relevance and/or technological and originality. Also referring to its form, observing the conformity to the norms, grammatical quality and English language. Manuscripts accepted in this stage will be forwarded for review with specialists, and sent for judgment for at least two referees.

2. PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

The manuscript must be prepared in one column with 12 pages in most for original and review manuscripts; 2 to 4 pages for short notes (including tables, graphics, figures, images and references), in MS-Word (.doc) format, simple line spacing, paper size A-4 (210x297cm), with margins (2,5cm left, right 2,0cm, top and bottom 3,0cm).

The entire article must be written in Times New Roman font. *Save the file in doc. Format. Do not send docx files. **The journal is only published in gray scale.

- Title (Font 18 and Bold): With initials capitalized up to 250 characters. Running title: with up to 40 characters (letters and spaces). Authors and institutional affiliation. There must not be information which identify authorship, institutional address or e-mail, because these information are registered at the moment of the submission of the manuscript.
- Abstract (Font 12 and bold): Text – Font 10, italicized with up to 200 words (100 words for short notes). The Font style must be normal for scientific names, being highlighted in the text.
- Key-words (Font 10 and bold): Font 10, separated by a comma. There must be at least 3(three) and up to 6(six) terms.
- INTRODUCTION (Font 12, bold, and caps lock): Text – Font 11, 1 column, simple space and no retreat in the paragraphs.

- MATERIAL AND METHODS (Font 12, bold and caps lock): Text – Font 11, one column, simple space and no retreat in the paragraphs.
 - For Titles and Subtitles, use the following levels:
 - First level – Other sections can be created: uppercase, font 12, bold.
 - Second level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, bold
 - Third level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, italicized.
- RESULTS AND DISCUSSION (Font 11, bold, and caps lock): Text – Font 11, 1 column, simple space and no retreat in the paragraphs.
- CONCLUSIONS (Font 12, bold and caps lock): Text – Font 11.
- ACKNOWLEDGMENTS (Font 12, bold and caps lock): Text – Font 11, simple space and no retreat in the paragraphs.
- REFERENCES (Font 12, bold and caps lock): Text – Font 10, with special retreat of 0,3cm.

The titles of the journals must be abbreviated. There is a list of abbreviations to be consulted:

- Biological Journals and Abbreviations
- Index Medicus - abbreviations of journal titles
- For abbreviations of titles of national and Latin-American journals: “Biblioteca Virtual em Saúde”.

For citation, use the author’s last name and the date:

- An author:
Bacila (1946) or (Bacila 1946)
- Two authors:

(Maack and Bodziak 1946) or Maack and Bodziak (1946).

- Three or more authors:
Last name of the first author followed by et al.: Bacila et al. (1946) or (Bacila et al. 1946).
- Obs: more than one reference from the same author (s) in the same year, must be identified by the letters “a”, “b”, ”c”, etc, put after the year of publication: (Bacila et al. 1910a) e (Bacila et al. 1910b) e. (Bacila et al. 1910c).

Examples of references:

- Journal Article: Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal, abbreviated italicized. Date of publication; volume (number/supplement): initial-final page of the article.

Examples:

- One author up to six authors:
 - Pandey A. Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.* 1992; 27: 109-117.
 - Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002; 347(4): 284-7.
- More than six authors: (list the first six authors followed by "et al.")
 - Arakaki AH, Vandenberghe LPS, Soccol VT, Masaki R, Rosa Filho EFda, Gregório A, et al. Optimization of Biomass Production with Copper Bioaccumulation by Yeasts in Submerged Fermentation. *Braz Arch Biol Technol.* 2011; 54(5): 1027-1032.

- Web article: Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal abbreviated italicized [journal in the internet]. Date of publication [date of access]; volume(number): number of pages. Available from: address of the website.

Example:

- Nandan A, Gaurav A, Pandey A, Nampoothiri KM. Arginine specific aminopeptidase from *Lactobacillus brevis*. *Braz Arch Biol Technol* [Internet]. 2010 [cited 2011 Oct. 19]; 53 (6): 1443-1450. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S151689132010000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=en

- Thesis: Author. Title of the work [type of document]. City of publication: Publisher; year of thesis defense.

Example:

- Chang CW. Effect of fluoride pollution on plants and cattle [PhD Thesis]. Varanasi, India: Banaras Hindu University; 1975.

- In books: Authors. Book title. Edition. City: Publisher; Year.

Example

- Bacila M. *Bioquímica Veterinária*. 2nd ed. São Paulo: Robe; 2003.

- Chapter in book: Authors. Chapter Title. In: Editors. Book title. Edition. City: Publisher; Year. Pages of citation.

Example:

- Tengerdy RP. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey A, editor. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Educational Publishers & Distributors; 1998. p. 13-16.

- UNITS AND ABBREVIATIONS

The “SI” system must be used. In the case of other units, these must be added in parentheses. Only the standard abbreviations for the units must be used. Dots must not be included in the abbreviations, also must be used % and / instead of “per cent” and “per”.

- TABLES

Must be numbered consecutively in Arabic digits and inserted in proper place in the text. A brief and descriptive title must be included above each table and the explanations put below as a subtitle.

• Formatting of Tables:

- Font Times New Roman 10, title and content.
- Font Times New Roman 9, footnotes.
- Width 16,5 cm.
- Vertical and Diagonal lines must not be used in tables.
- The tables must be elaborated and edited in cells, using the resources of the text editor.

Obs: Tables in figure format (jpg, tif or png) are not accepted. or that contain lines drawn

- FIGURES

Must be numbered consecutively in Arabic digits and cited in the text in numerical order.

- Parts of figures must be indicated by uppercase (A,B,C, etc).
- The figures must be presented in gray scale, clear and with high contrast.
- Letters and numbers must have readable size after reduction or print, use the following fonts: Arial or Times New Roman.
- The image must be adjusted to the width (16,5 cm) of the page, and must be smaller than the page to allow the inclusion of the subtitle.

The illustrations must be cited in the text with the word “Figure”, without being abbreviated when it is part of a sentence. When it appears in parentheses , it must be abbreviated “(Fig.)”.

The text file containing the final paper submitted should not exceed 400kB. If the final text file has exceeded 400kB, please, see here the "Suggestion to reduce the manuscript file size".

- Page charges: There will be no page charges.
- Proofs: After the layout, the manuscript is converted to pdf (proof sheet) and forwarded to the authors for approval. The Proofs must return to the Editorial Production in the stipulated date. Other changes in the original manuscript won't be accepted in this stage.