

ANO XIII- Nº 2

ISSN: 0872 - 7098

revista portuguesa de

ZOOTECNIA



ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE ENGENHEIROS ZOOTÉCNICOS

FICHA TÉCNICA

Director:

António Ferreira

Administrador:

J. Carlos Almeida

Editor:

António A. Fontainhas Fernandes

Editor-adjunto:

Miguel Rodrigues

Comissão editorial:

Alfredo Teixeira

Claudino Matos

Emídio Gomes

Jorge Azevedo

Oldemiro Rego

Raquel Lucas

Vasco Fitas Cruz

Propriedade:

Associação Portuguesa dos Engenheiros
Zootécnicos (APEZ)

Design gráfico e impressão:

Emílio Santos e Adelaide Ferreira
Serviços Gráficos da UTAD

Periodicidade: Semestral

Depósito Legal N° 76207/94

Tiragem: 600 exemplares

Preço: 7,50 euros

Distribuição gratuita aos sócios

O conteúdo dos artigos assinados é da
responsabilidade dos autores.

Endereço/Address:

Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal

Telef: (+351) 259 350531

Fax: (+351) 259 350560

fontain@utad.pt

<http://www.utad.pt/apez>

Apoios:



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

FCT

Fundação para a Ciência e Tecnologia

Fundação para a Ciência e Tecnologia

Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III

É permitida a reprodução do conteúdo desta revista

The reproduction of the content of this publication is permitted

Desejamos estabelecer permuta com outras publicações

We wish to establish exchange with other publications

Os trabalhos submetidos para publicação são analisados por especialistas

Papers submitted for publication are peer reviewed

ANO XIII - Nº 2

ANO XIII - Nº 2

APEZ 2006

REDUÇÃO 80%

ÍNDICE

EFEITO DOS NÍVEIS DE PAG NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA PÓS-PARTO EM BOVINOS DE LEITE F. BARBOSA, R. METELO, A. CHAVEIRO, P. SANTOS, M. ANDRADE, A. MARQUES e F. MOREIRA DA SILVA	1
REGULAÇÃO DA MIOGÈNESE J. H. R. DIAS CORREIA e A.A. DIAS CORREIA	9
CRESCIMENTO MUSCULAR, RECUPERAÇÃO MUSCULAR, CREATOPOIESE J. H. R. DIAS CORREIA e A.A. DIAS CORREIA	31
SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTOREIO COM SILAGEM DE ERVA. 2. EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR O.A. REGO, R.J.B.BESSA, H.J.D. ROSA, P.J. MIRANDA , C.M. VOUZELA e A.E.S. BORBA	51

EFFECT OF PAG LEVELS ON THE POST PARTUM REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN BOVINE

F. BARBOSA, R. METELO, A. CHAVEIRO, P. SANTOS, M. ANDRADE,
A. MARQUES e F. MOREIRA DA SILVA*

Departamento de Ciências Agrárias, Reprodução Animal, Universidade dos Açores,
9700 Angra do Heroísmo, Portugal, *jsilva@notes.angra.uac.pt

(Recepção: 29 de Julho de 2005; Aprovado: 5 de Maio de 2006)

ABSTRACT

The economic efficiency of a farm is conditioned by its animal's reproductive efficiency. After the isolation and characterization of the pregnant associated glycoproteins (PAG), it was possible to develop an early diagnose method of pregnancy relatively quick and precise. These proteins are produced in great quantity by the mono- and binucleate cells of the placenta and are released in the blood circulation where they can be detected between 3 to 5 weeks after fecundation. Even though the bPAG role is widely known in the recognition and maintenance of gestation, its effect on the reproductive efficiency of the post-partum period, where this protein level remains high, is unknown. Therefore the aim of this work is to relate the reproductive efficiency of Holstein-Friesian cows with the levels of bPAG in the post-partum period. In this study, blood samples were collected from a group of 104 animals. All the oestruses were identified by observation and the confirmation of gestation was made by the non-return to oestrus after artificial insemination. The bPAG levels were evaluated by the RIA method. It was possible to conclude that there was a relation between the bPAG levels in the blood of Holstein-Friesian cows and their reproductive efficiency in the post-partum period. High levels of bPAG condition the artificial insemination success putting at risk the economic efficiency of the farm.

Key Words: Bovine, pregnancy associated glycoproteins (PAG), postpartum

EFEITO DOS NÍVEIS DE PAG NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA PÓS-PARTO EM BOVINOS DE LEITE

RESUMO

Um dos factores que influencia em grande parte a rentabilidade das explorações é a eficiência reprodutiva dos animais. Os longos intervalos partos cios-fecundantes,

a baixa taxa de concepção e o longo intervalo entre partos são os principais indicadores de uma baixa eficiência reprodutiva nas explorações. Após o isolamento e caracterização das proteínas associadas à gestação (PAG), foi possível desenvolver um método de diagnóstico de gestação relativamente rápido e preciso. Estas proteínas são produzidas em grande quantidade pelas células mono- e binucleadas da placenta, sendo posteriormente libertadas na corrente sanguínea podendo ser aí detectadas entre as 3 e as 5 semanas pós fecundação. Apesar de ser conhecido o papel da PAG no reconhecimento e manutenção da gestação, o seu efeito sobre a eficiência reprodutiva dos animais, no período pós-parto em que os níveis destas proteínas se mantêm elevados, não é de todo consensual. Assim, pretende-se com este trabalho relacionar a eficiência reprodutiva de vacas da raça Holstein-Friesian com os diferentes níveis de bPAG no período pós-parto. Neste estudo foram colhidas amostras de sangue de 104 animais. Todos os cios foram identificados por observação, sendo a confirmação de gestação realizada pelo não retorno em cio após a inseminação artificial. Os níveis de bPAG foram avaliados pelo método de radioimunoensaio. Foi possível concluir que existe uma relação entre os níveis de bPAG presentes no sangue de vacas da raça Holstein-Friesian e a sua eficiência reprodutiva no período pós-parto. Níveis elevados de bPAG condicionam o sucesso da inseminação artificial, podendo assim por em risco a rentabilidade das explorações.

Palavras-chave: Bovinos, glicoproteínas associadas à gestação (PAG), pós-parto

INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva em bovinos de leite é um dos factores que influencia a rentabilidade das explorações, afectando tanto a produção de leite e as taxas de refugo dos animais, como a venda dos vitelos (Plaizier *et al.*, 1998). A eficiência reprodutiva é, em grande parte, função do tratamento e vigilância que é disponibilizada por todos aqueles que intervenham no maneio da exploração em geral. Actualmente, verifica-se uma tendência para o aumento dos efectivos e um incremento na mecanização agrícola na produção animal em geral, resultando numa redução do tempo disponível do tratador por animal, sendo este também um dos factores responsáveis pela diminuição da eficiência reprodutiva.

Através do diagnóstico precoce de gestação, é possível otimizar o intervalo entre partos, para além de detectar possíveis problemas de fertilidade que possam existir, podendo assim implementar-se uma boa estratégia de refugo dos animais ineficazes em termos reprodutivos.

O isolamento e a caracterização das proteínas associadas à gestação (PAG) ao longo dos últimos 20 anos, permitiu o desenvolvimento dum método de

diagnóstico precoce relativamente rápido e com elevada precisão, uma vez que estas proteínas são produzidas em grande quantidade pelas células mono- e binucleadas da placenta e depois libertadas na corrente sanguínea, podendo ser detectadas na circulação periférica entre as 3-5 semanas pós fecundação. Estudos realizados por Mialon *et al.* (1993), demonstram que a sua concentração plasmática aumenta a partir do 27º dia após inseminação artificial (I.A.) até ao final da gestação, sendo o aumento mais acentuado nas últimas 2-3 semanas de gestação. Estas glicoproteínas mantêm-se elevadas por um longo período, desaparecendo apenas cerca de 100 dias após o parto, cuja razão poderá ser explicada, essencialmente, devido à sua longa vida média (7.4 a 9 dias). Por outro lado, as elevadas concentrações plasmáticas existentes na altura do parto e o facto de algumas células binucleadas migrarem para o corpo da fêmea, permanecendo activas durante algumas semanas (Kiracofe *et al.*, 1993; Mialon *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 1997), poderá também explicar as elevadas concentrações plasmáticas destas glicoproteínas no período pós-parto.

Durante a gestação os níveis de bPAG são o factor principal para o reconhecimento e manutenção da gestação, não sendo ainda conhecido a sua influência na eficiência reprodutiva em geral, e em particular na regulação do anestro pós-parto.

Deste modo, este trabalho tem por objectivo relacionar a eficiência reprodutiva de vacas da raça Holstein-Friesian após o parto, que no momento da I.A. possuíam diferentes níveis de bPAG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foi utilizado um total de 104 vacas da raça Holstein-Frisian, provenientes de diversas explorações da Ilha de S. Miguel. Todos os cios foram identificados por observação. A confirmação da gestação foi efectuada pelo não retorno em cio entre os 18 e os 28 dias após a I.A.

Recolha das amostras de sangue

A recolha do sangue foi efectuada em tubos plásticos de 10 ml heparinizados. Imediatamente após a I.A., procedeu-se à recolha de sangue na veia caudal, sendo o plasma obtido por centrifugação a 1000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C até à sua análise.

Determinação dos níveis de bPAG

O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por ZOLI *et al.* (1992), com algumas modificações. Os tubos de ensaio foram preparados em duplicado e assinalados com TC (Total Count), NSB (Non Specific Binding), B0 (Blank-zero standard), STD de 1 a 8 (amostras padrão), para realização da curva padrão. A curva padrão foi obtida através da diluição de uma amostra de bPAG com uma concentração de 100 ng/ml. Esta diluição efectuou-se com o auxílio de Tris-BSA buffer, pH de 7,5, para obter concentrações de 25 a 0,2 ng/ml. Adicionou-se 100 µl de bPAG soro-livre aos tubos NSB, B0 e STD, para minimizar a interferência não-específica devido às proteínas do soro. Adicionou-se 100µl aos tubos B0, a cada um dos tubos STD e aos tubos das amostras do anticorpo (anti-bPAG#497). Por fim, todos os tubos foram agitados no vórtex e incubados durante a noite à temperatura ambiente. Na manhã seguinte adicionou-se 100 µl de “tracer” (¹²⁵I) a todos os tubos, seguindo-se um período de incubação de 4 h à temperatura ambiente. Nesta fase o volume total é de 0,5 ml em cada tubo. A separação da fracção “tracer” livre da fracção ligada (anti-bPAG ligada ao “tracer”) foi efectuada através da adição de 1 ml de um segundo anticorpo polietilenoglicol (PEG) a cada um dos tubos, excepto aos tubos TC. Após um período de incubação de 30 min com o 2º anticorpo-PEG, adicionou-se 2 ml de Tris-BSA buffer, exceptuando os tubos TC, procedendo-se logo de seguida à sua centrifugação (1000 g durante 20 min). Efectuou-se a decantação do sobrenadante. A radiação (¹²⁵I) existente no precipitado foi quantificada usando um contador de radiação gamma (Gamma-C12, DPC).

A curva com pré-incubação apenas fornece valores de bPAG até 25 ng/ml, sendo alguns valores relativamente elevados, o que conduziu a uma nova análise com os valores mais altos (superiores a 2 ng/ml), pois poderiam estar a ser subestimados. Desta vez, utilizou-se uma curva padrão sem pré-incubação que permite detectar valores de bPAG de 0,8 até 100 ng/ml.

A preparação foi idêntica com a diferença dos 100 µl de “tracer” (¹²⁵I) serem adicionados antes da incubação durante a noite à temperatura ambiente. Na manhã seguinte, foi adicionado o 2º anticorpo-PEG, sendo o restante processo igual ao anterior.

Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado de acordo com Snedecor e Cochran, (1967), tendo sido estudadas as distribuições dos níveis de

bPAG e da percentagem de vacas não gestantes. Foi determinada a curva de probabilidades das duas variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram relacionados os níveis de bPAG e a eficiência reprodutiva no período pós-parto. Tal como pode ser observado na Figura 1 os elevados níveis plasmáticos desta glicoproteína influenciaram significativamente a probabilidade da vaca não ficar gestante, condicionando o sucesso da I.A. Quando os níveis de bPAG se situaram até aos 0,29 ng/ml, a probabilidade da vaca não ficar gestante foi apenas de 22%, aumentando para 99% quando os níveis de bPAG aumentaram até 30,55 ng/ml.

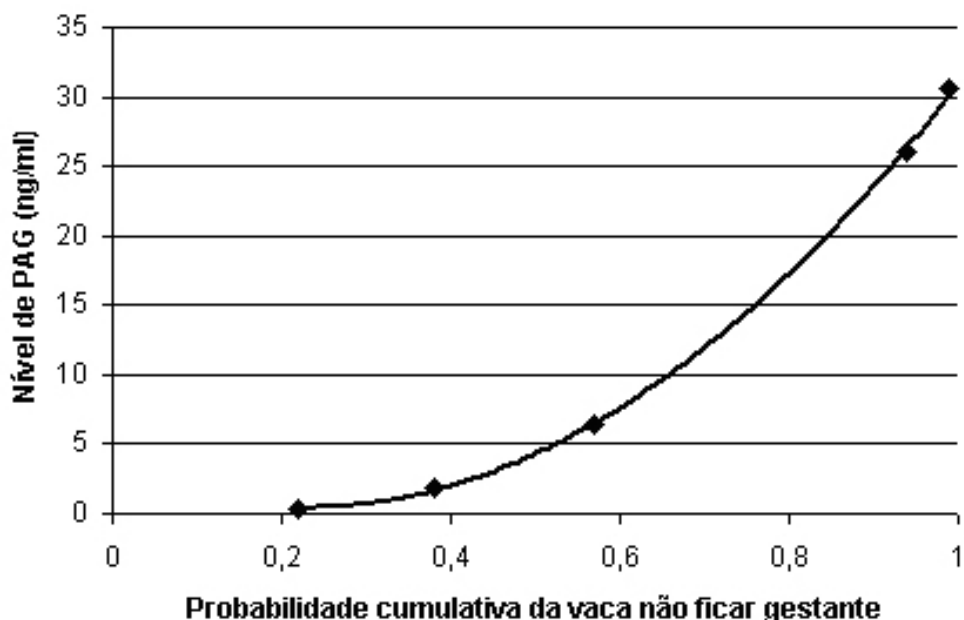


Figura 1. Probabilidade de uma vaca não ficar gestante em função dos diferentes níveis de bPAG (ng/ml).

Foram construídas as curvas de probabilidades para as distribuições níveis de bPAG e vacas não gestantes (VNG), com uma escala uniformizada com o objectivo de comparar a existência de uma correlação entre as duas (Figura. 2). Observa-se que as distribuições dos níveis de bPAG e das vacas não gestantes não se regem por uma distribuição normal: as amostras não estão distribuídas aleatoriamente em todos os intervalos, existindo uma dependência/correlação

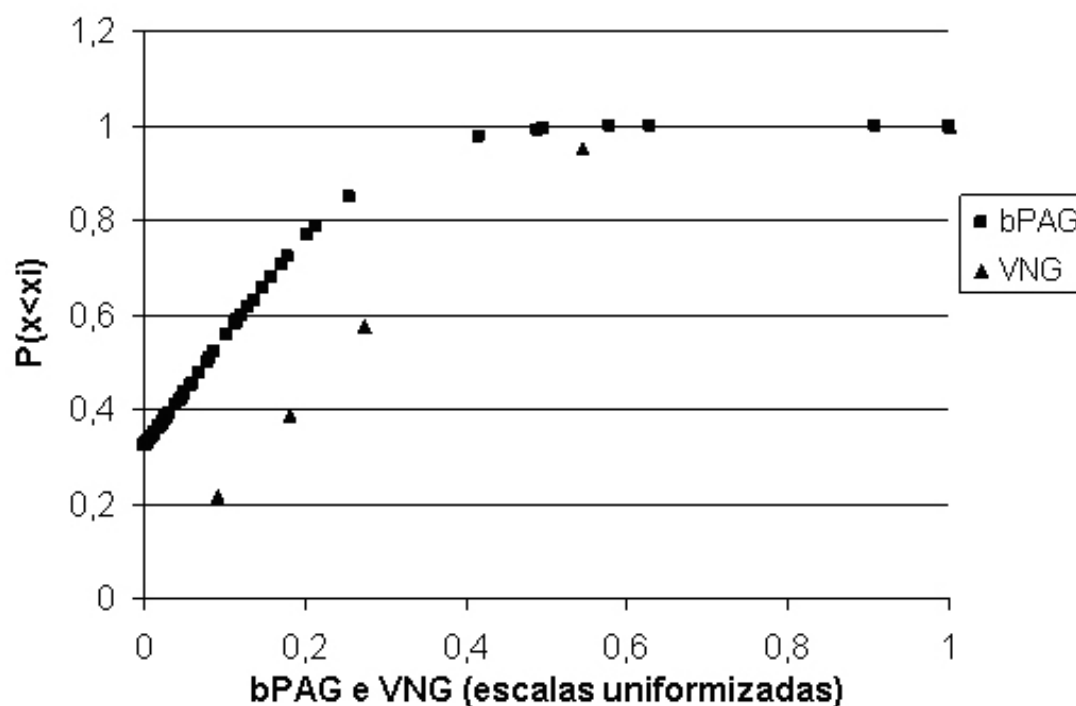


Figura 2. Curva de probabilidades das distribuições dos níveis de bPAG das vacas não gestantes (VNG).

entre as duas variáveis. O perfil das duas curvas é idêntico, tendo a mesma evolução: os valores mais elevados de bPAG coincidem com os mais elevados das vacas que não ficaram gestantes após a IA.

Echternkamp e Gregory (1999) ao estudar o efeito dos partos gemelares na performance reprodutiva do período pós-parto em vacas seleccionadas para produzir gémeos, verificaram que quando uma vaca tem gémeos, há uma redução de 5,9% na concepção no período pós-parto. A causa desta reduzida eficiência reprodutiva era associada a uma maior incidência de distócias e retenções de placenta devido aos partos gemelares. Uma vez que estas fêmeas apresentam concentrações de bPAG cerca do dobro da encontrada em fêmeas com partos simples durante a gestação (Dobson *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1995, 1997, 1998), este factor poderá ser uma das principais razões da diminuição das performances reprodutivas após o parto. Além disso, em situações patológicas onde se observa a retenção de placenta, foi demonstrado um aumento esperado das concentrações de bPAG durante o período pós-parto, podendo originar a reforma precoce da fêmea por problemas reprodutivos (Tefera *et al.*, 2001). Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, é provável que os elevados níveis de PAG sejam também uma causa da baixa eficiência reprodutiva.

CONCLUSÕES

Conclui-se que existe efectivamente uma associação entre os níveis plasmáticos de bPAG, de vacas da raça Holstein-Friesian no período pós-parto e a sua eficiência reprodutiva no mesmo período. Os elevados níveis de bPAG neste período fazem diminuir a eficiência reprodutiva dos animais em estudo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FLAD – projecto nº 379/03. Os autores agradecem ao Centro de Investigação e Tecnologia Agrária dos Açores bem como ao Professor A. Félix Rodrigues pela sua colaboração na estatística deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, M., Gebbie, F.E., Sinclair, K.D., Hutchinson, J.S.M., Beckers, J.F. e Broadbent, P.J., 1997. Half-life of serum bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG), post-partum anoestrus and performance of beef cows. *J. Reproduction Fertility, Abstract Series 20*, 25 (Abstract).
- Dobson, H., Rowan, T.G., Kippax, I.S. e Humblot, P., 1993. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 40: 411-425.
- Echternkamp, S.E. e Gregory, K.E., 1999. Effects of twinning on postpartum reproductive performance in cattle selected for twin births. *J. Anim. Sci.*, 77: 48-60.
- Kiracofe, G.H., Wright, J.M., Schalles, R.R., Ruder, C.A., Parish, S. e Sasser, R.G., 1993. Pregnancy-specific protein B in serum of post-partum beef cows. *J. Animal Sci.*, 71(8): 2199-2205.
- Mialon, N.M., Camous, S., Renand, G., Martal, J. e Ménissier, F., 1993. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutrit. Develop.*, 33: 269-282.
- Patel, O.V., Domeki, I., Sasaki, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasser, R.G. e Humblot, P., 1995. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology*, 44: 827-833.
- Patel, O.V., Sulon, J., Beckers, J.F., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N. e Domeki, I., 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Europ. Endocrin.*, 137: 423-428.
- Patel, O.V., Camous, S., Takenouchi, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N. e Domeki, I., 1998. Effect of stage of gestation and fetal number on plasma concentrations of a pregnancy serum protein (PSP-60) in cattle. *Research Vet. Sci.*, 65: 195-199.
- Plaizier, J.C.B., Lissemore, K.D., Kelton, D. e King, G.J., 1998. Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 81: 1848-1854.

- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1968. *Statistical Methods*. 6th ed., Iowa State, Univ. Press, Ames., 703 p.
- Tefera, M., Jeanguyot, N., Thibier, M. e Humblot, P., 2001. Pregnancy-specific protein B (bPSPB) and progesterone monitoring of postpartum dairy cows with placental retention. *J. Vet. Med. Pysiol. Pathol. Clin. Med.*, 48(6): 331-336.
- Zoli, A.P., Guibaut, L.A., Delahaut, P., Benitez-Ortiz, W. e Beckers, J.F., 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its Application for Pregnancy Diagnosis. *Biol. Reprod.*, 46: 83-92.

MUSCLE GROWTH, REGENERATION AND CREATOPOIESIS

J. H. R. DIAS CORREIA e A.A. DIAS CORREIA

CIISA, Departamento de Morfologia e Função. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa,
Rua Prof. Cid dos Santos, Pólo Universitário da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal
e-mail jhrdcorreia@fmv.utl.pt

(Recepção: 22 de Março de 2006; Aprovado: 6 de Maio de 2006)

ABSTRACT

The potencial for regulation of different steps from miogenesis by means of antibodies, folistatin, inactive forms of miostatin, and by other means, has been considered. The disadvantages and positive aspects that this regulation may bring have been reviewed, too. The role of satellite cells and other types of muscular cells in these processes has also been focussed.

Key words: cell cycle, myogenic regulatory factors (MRFs), myogenesis, myostatin (MSTN), satellite cells

CRESCIMENTO MUSCULAR, RECUPERAÇÃO MUSCULAR, CREATOPOIESE

RESUMO

Aborda-se a possível manipulação das diversas etapas da biologia molecular reguladora da miogénese com o recurso a anticorpos, folistatina, formas inactivas da miostatina e outros meios. Revêm-se ainda algumas vantagens e desvantagens que estas manipulações podem promover. O possível desempenho das células satélite e de outras células dos tecidos musculares é considerado nesta perspectiva.

Palavras-chave: células satélite, ciclo celular, factores miogénicos reguladores (MRF's), miogénese, miostatina (MSTN)

CARACTERÍSTICAS CONDICIONADORAS DA REGULAÇÃO DA MIOGÉNESE

Alterações no funcionamento da miostatina (MSTN) podem ser desencadeadas pela mutação dos genes que lhe correspondem, ou por

condicionamento farmacológico ou imunológico da MSTN ou das vias de transdução de sinal desencadeadas pela miostatina.

O funcionamento da MSTN parece ser o mesmo entre as diversas espécies animais.

A identificação de polimorfismos na MSTN que possam interromper o funcionamento desta, pode ser um poderoso meio para detectar animais seus portadores com as estratégias consequentes.

Também o conhecimento mais detalhado dos perfis de expressão da MSTN e cascatas de transdução de sinal por ela desencadeadas, pode permitir a identificação de agentes bloqueadores ou inibidores farmacológicos ou imunológicos que regulem de forma vantajosa essa expressão.

Os factores de crescimento desencadeiam a transdução de sinais que levam a respostas mitogénicas, através da fosfatação de proteínas, sendo a maioria dos receptores para estes factores de crescimento tirosina cinases transmembranares, ou então associados com tirosina cinases citoplasmáticas (Spiller *et al.*, 2002).

Outro tipo de receptores transmembranares funcionam como serina-treonina cinases, englobando-se nestes os receptores do tipo II para as activinas, e ainda os receptores beta TGF do tipo II e I (Kretser *et al.*, 1999).

Estes factores beta de transformação do crescimento (TGF- α) englobam como temos vindo a referir a miostatina.

Os receptores do tipo II para as activinas parecem accionar duas vias para transdução de sinais, induzindo a inibição do crescimento e a hipofosfatação da proteína retinoblastoma (Rb) (Kretser *et al.*, 1999).

A inactivação selectiva destes receptores do tipo II altera a resposta dos factores TGF- α , de uma forma análoga à inactivação da proteína Rb (Kretser *et al.*, 1999).

A família de proteínas activinas são também membros da superfamília TGF- α . As activinas influenciam diversos processos biológicos, sendo algumas das suas acções antagonizadas por inibinas.

Também as activinas são reguladas através da folistatina (FS), uma proteína que se liga às activinas A e B neutralizando a sua actividade biológica (Kretser *et al.*, 1999).

Como se compreende, os factores que regulam o equilíbrio entre as quantidades de inibinas e activinas são muito importantes na modulação da actividade das activinas A (Welt *et al.*, 2002).

A FS é pois um regulador local da activina e possivelmente de outros membros da família TGF- α .

A folistatina bovina (SWISS-Prot P50291) é segregada, funcionando como um antagonista da activina com a qual se liga directamente, contendo na sua estrutura três domínios “folistatina-like” e três outros domínios “kadal-like”, sendo uma glicoproteína.

O receptor do tipo II da activina nos bovinos (SWISS-Prot: Q28043) é um receptor para a activina A e B e para a inibina A, estando pois envolvido na sinalização transmembranária, fosfatando proteínas substrato.

Portanto, a actividade da activina pode ser regulada pela FS e pela inibina que são produzidas em diversos tecidos, ocorrendo esta acção reguladora, extracelularmente.

Os sinais, no entanto, desencadeados pela activina desenrolam-se através de diversas proteínas intracelulares que modulam as respostas das células.

Quantidades acrescidas de folistatina desencadeiam pois uma hipertrofia muscular marcada, na medida em que vão impedir que reguladores negativos da miogénese, como é o caso da MSTN e outros factores TGF- α , possam interagir com os seus receptores (Kretser *et al.*, 1999).

A actividade da MSTN é detectável no soro sanguíneo, parecendo que essa MSTN circula na forma de um complexo latente (Hill *et al.*, 2002).

A MSTN em circulação está ligada sobretudo a duas proteínas, o pró-péptido da miostatina e a um produto “folistatina-like” (FLRG), que parecem ser os principais reguladores negativos da MSTN (Hill *et al.*, 2002).

“In vitro” está verificado que o pró-péptido da MSTN interage e inibe a miostatina. Parece que “in vivo” mais de 70% da miostatina do soro sanguíneo está ligado ao pró-péptido (Hill *et al.*, 2002).

Na miostatina bovina (SWISS-Prot:018836) o pró-péptido corresponde na cadeia polipeptídica completa da MSTN com 375 ácidos aminados, aos resíduos 19 a 266 (248 ácidos aminados)

A miostatina é sintetizada como uma pró-proteína que é activada por duas cisões proteolíticas. A remoção do péptido sinal (os primeiros 18 ácidos aminados) é seguida pela quebra posterior que origina um pró-péptido amino terminal 26 kDa e um péptido carboxi-terminal 12,5 kDa, que é um dímero biologicamente activo, como já referimos.

O bloqueio da MSTN endógena por injecções intraperitoneais de anticorpos contra a miostatina durante três meses, originou um aumento de peso e outras

características decorrentes em ratos de experiências, correlativamente com uma diminuição de degenerescências musculares em animais distróficos e das concentrações no soro sanguíneo de creatina cinases (Bogdanovich *et al.*, 2002;Whittmore *et al.*, 2003).

Parece pois que estratégias farmacológicas passando por esta via poderão alcançar objectivos interessantes, constituindo até uma via para ultrapassar os problemas levantados pela gene terapia em situações patológicas deste foro.

Estas experiências vieram também confirmar que a MSTN actua bem após o nascimento dos animais, o que sugere que a utilização de inibidores da MSTN pode ter elevado interesse, não só em produção animal mas também na recuperação de situações definidas.

A inactivação do gene da miostatina através de mutações ou do desenvolvimento de animais transgénicos pode provocar a hiperplasia muscular.

Tem todo o interesse a identificação de animais reprodutores que possuam mutações no seu genoma responsáveis por hiperplasia muscular, o que pode ser avaliado através da identificação de SNP, deleccção, etc.

Duas patentes foram recentemente anunciadas nestes sectores. A USPatent nº 6,103,466 intitulada “Double-muscling in mammals” de 15 de Agosto de 2000 e a Australian Patent nº 199884571 intitulada “Mutations in the myostatin gene cause double-muscling in mammals” de 18 de Janeiro de 2003.

Conhece-se bem que uma deleccção no gene da miostatina origina garupa dupla nos bovinos, tal como mutações de outro tipo (Kambadur *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 2003).

Também em ratos knockout para a miostatina, está assinalado o aumento da miogénese e a diminuição da adipogénese (McPherron e Lee, 2002; Grobet *et al.*, 2003).

Recentemente, um grupo de investigadores belgas da Faculdade de Medicina Veterinária de Liege verificou em ratos que a inactivação após o nascimento do gene da miostatina em músculos estriados é suficiente para originar uma hipertrofia muscular generalizada da magnitude daquela verificada em ratos “knockout” para o gene constitutivo da miostatina (Grobet *et al.*, 2003).

Nos bovinos Piedmontese a substituição de uma cisteína por tirosina nas moléculas de MSTN origina uma perda de actividade biológica desta com a consequente garupa dupla. Esta mutação parece afectar o processamento ou a estabilidade da MSTN madura sem alterar a sua segregação (Berry *et al.*, 2002).

O processamento da molécula do MSTN por proteólise parece ser reduzido quando as células são tratadas com inibidores de metaloproteases, o que leva a

admitir que as metaloproteases e seus inibidores estejam envolvidos na regulação do crescimento dos músculos do esqueleto e diferenciação celular (Huet *et al.*, 2001).

Nos bovinos Belgian Blue de “garupa dupla” a sequência do gene da miostatina contém uma deleção de onze nucleotídeos no terceiro exão (McPherron e Lee, 1997).

No gene da miostatina de porcos estão identificados polimorfismos, sendo estes mais frequentes nas raças chinesas (estão identificados três SNPs) (Li *et al.*, 2002).

Também em espécies animais não mamíferas está assinalada a presença de miostatina.

Estão assinalados em salmão do atlântico (*Salmo salar*) dois genes da MSTN em diversos tecidos, e o papel das duas isoformas I e II identificadas não parece restringir-se à regulação do crescimento dos músculos (Østbye *et al.*, 2001).

Também em peixes teleósteos (trutas) estão assinaladas duas formas de MSTN em diversos tecidos, tal como noutras espécies de peixes (Østbye *et al.*, 2001).

Em aves (frangos e codornizes) existem linhas com notáveis hiperplasias das miofibras, não parecendo a expressão da miostatina encontrar-se alterada em aves que exibam quer hiperplasia quer hipoplasia das miofibras (Mott e Ivarie, 2002).

Em ovinos foi assinalada uma mutação originando hipertrofia e não hiperplasia muscular, associada com carne mais magra e melhores índices de conversão, parecendo que esta característica da região “Callinpyge” ocorre no cromossoma 18 perto da terminação não centromérica (Cockett *et al.*, 1991).

Recentemente também foi assinalado o primeiro polimorfismo no gene myf 4 de miogenina de suínos (Ernst *et al.*, 1993).

Também polimorfismos RFLP (comprimento de fragmentos de restrição) estão assinalados no gene myo D de rato e no gene myf 5 de bovinos (Ernst *et al.*, 1993).

Existem metodologias que tornam possível averiguar da variação genética dentro dos genes MRF e da variação da regulação da sua expressão e relacionar isto com as características da produção animal (patente US 6,143,880 de 2000).

No que se refere à creatopoiése com interferência de práticas transgênicas, não queremos deixar de referir o que tem sido realizado no âmbito dos suínos, depois de se ter verificado que a administração por via injectável de GH recombinante promovia interessantes acréscimos de produção de carne com

menos gordura e melhores índices de conversão. No entanto, a produção de suínos transgênicos com a hormona bovina GH sob controlo do promotor metalotionina I exibiu alguns inconvenientes, tais como claudicações, susceptibilidades ao stress, úlceras gástricas, etc. (Forsberg *et al.*, 2003.).

A introdução nos transgenes de GH modificada de porcino, regulada por suplementação com zinco, ultrapassou aqueles inconvenientes, assim como a expressão nos músculos do esqueleto de IGF 1 utilizando um promotor de α -actina aviária alcançou os mesmos resultados (Forsberg *et al.*, 2003).

Ainda no que se refere à creatopoiése de suínos, foi assinalado recentemente (2002) que no Japão tinham sido produzidos suínos transgênicos que continham o gene FAD 2 de plantas, gene este que codifica a enzima dessaturase do oleato, implicada na formação dos ácidos gordos insaturados linoleato e α -linoleato, o que origina que a gordura dos suínos contenha menos 20% de gordura saturada (<http://www.newscientific.com>).

POSSÍVEIS CONSEQUÊNCIAS DA MUSCULATURA DUPLA

Animais exibindo hipertrofia muscular, ou seja, com musculatura dupla (garupa dupla ou double muscled) revelam peças de talho com menos gordura e com tenrura aumentada (Westhusin, 1997).

No entanto, estão assinalados nesses animais maior número de partos distócicos, assim como outras características fisiológicas indesejáveis (Arnold *et al.*, 2001)

Nos bovinos com hipertrofia muscular, de uma maneira geral, há quase completa ausência de gordura subcutânea, tal como no seu fenótipo estão assinalados menor proporção de ossos na conformação da carcaça bem como mais elevadas proporções das massas musculares e menores quantidades de gordura (Dumont, 1982; Hanset, 1986; Hanset, 1991).

Os pesos individuais de cada músculo também variam neste tipo de animais, embora o seu número permaneça o mesmo como é natural.

No entanto, nestes animais as fibras musculares são em maior número do que nos animais de conformação normal, sendo os seus crescimentos hiperplásticos os responsáveis pela “musculatura dupla”.

Já no estado fetal estes bovinos apresentam uma hiperplasia acentuada crescendo o número de células três vezes mais depressa do que nos animais normais, não sendo este crescimento hiperplástico normalmente acompanhado

de hipertrofia celular no estado fetal (Swatland e Kieffer, 1974; Gerrard e Judge, 1993).

No entanto, no estado post-fetal a hipertrofia é observada nos músculos do esqueleto de todo o corpo do animal (McPherron *et al.*, 1997; Lee e McPherron, 1999), concomitantemente com a presença de menos tecido conjuntivo o que em parte contribui para a maior tenrura dessa carne (Dumont e Schmitt, 1973; Bailey *et al.*, 1982; Hanset, 1986).

Existem também variações no que se refere às proporções entre os vários tipos de células musculares.

A menor quantidade de gordura destes animais de “garupa dupla” perturba o chamado marmoreado destas carnes, o que diminui a respectiva classificação tendo também adipocitos de menores dimensões na gordura subcutânea e na gordura interna, embora não suceda assim na gordura intramuscular.

Esta gordura de depósito intramuscular tem um conteúdo lipídico menor e um mais elevado teor em poliinsaturados (11% destes ácidos gordos, enquanto em animais normais, estes metabolitos oscilam entre 2,7 e 6,1%) (Webb *et al.*, 1998) e maiores concentrações de lípidos polares e de ácido linoleico (Webb *et al.*, 1998; Desmet *et al.*, 2000).

O perfil de ácidos gordos desta gordura intramuscular de bovinos Belgian Blue de garupa dupla assemelha-se com o perfil de ácidos gordos nos suínos (Webb *et al.*, 1998).

O conjunto de características antes referidas correspondem à produção de carne mais magra por estes animais.

As características patológicas associadas com animais de garupa dupla podem ser distribuídas nos seguintes grupos:

- Dificuldades reprodutivas.
- Anormalidades conformacionais.
- “Desvantagens” respiratórias e cardiovasculares.
- Atrasos no desenvolvimento reprodutivo, associados com uma maior incidência de distócias, estão bem assinaladas (Vissac *et al.*, 1973; Vissac *et al.*, 1974; Hanset, 1986; Hanset, 1991) com períodos de gestação mais longos, embora com pesos à nascença mais elevados nas respectivas crias.
- As anomalias associadas com o coração e os pulmões estão também identificadas nestes animais. Há um aumento de incidência e de severidade

das doenças da laringe, pulmões e coração, o que tende a ser justificado com anomalias surgidas na estrutura e função destes órgãos (Halnan, 1970; Oliver, 1968), havendo também a hipótese de uma rotura do equilíbrio hormonal endócrino nestes animais (Pomeroy e Williams, 1962; Arthur *et al.*, 1990), embora os níveis sanguíneos de GH e insulina, em comparação com animais normais, sejam mais baixos.

CÉLULAS SATÉLITE (C.S.) NO TECIDO MUSCULAR

Como já referimos, nos animais adultos, os músculos do esqueleto são constituídos por fibras musculares (miofibras) diferenciadas terminalmente, coabitando, no entanto, com uma pequena população de células residentes, chamadas células satélite (C.S.) (Hawke e Garry, 2001).

Nos mamíferos adultos, estes músculos do esqueleto adaptam-se notavelmente a diversas condições fisiológicas, tais como o crescimento, o exercício e as respostas a agressões de diversos tipos.

Estas adaptações recaem sobretudo nas células satélite.

Estas células satélite estão intimamente associadas com a periferia das fibras musculares multinucleadas, sendo no entanto fisicamente distintas e localizando-se entre o sarcolema e a lâmina basal (Muir, 1965), encontrando-se num estágio quiescente.

Os aspectos anatómicos característicos das células satélite quiescentes, tais como uma elevada relação núcleo/citoplasma, maior quantidade de heterocromatina, etc., desaparecem após activação ou proliferação da célula satélite em resposta ao crescimento, remodelação ou agressão muscular, significando que o DNA dos núcleos da célula satélite passa a integrar as novas fibras musculares em que se integram, aumentando conseqüentemente o potencial de biossíntese proteica dessas fibras musculares.

As fibras musculares adultas encontram-se terminalmente diferenciadas, como referimos anteriormente, sendo o crescimento muscular ou a sua recuperação realizada pelas células satélite que quando não respondem a qualquer estímulo se encontram num estado quiescente e não em proliferação.

Contudo, em resposta a estímulos as células satélite são activadas, multiplicando-se e exprimindo marcadores miogénicos, passando a designar-se mioblastos, acabando essas células por se fundir umas com as outras para formar novas fibras musculares (hiperplasia), ou então fundindo-se com fibras musculares

pré-existentes permitindo assim acréscimos (hipertrofia) ou a regeneração de possíveis alterações a nível muscular.

Os estímulos hipertróficos (por ex: culturismo muscular, exercícios, etc.) induzem a hipertrofia muscular desencadeando um processo de activação das células satélite, proliferação, quimiotaxia e fusão com miofibras já existentes, contribuindo assim para o crescimento dos músculos.

A quimiotaxia, ou seja a capacidade migratória das células satélite, depende da integridade da lâmina basal. Após a rotura ou solução de continuidade desta, em resposta aos estímulos hipertróficos, as C.S. podem migrar para miofibras adjacentes (Hawke e Garry, 2001).

Os estímulos hipertróficos do tipo exercícios físicos induzem um miotrauma que desencadeia uma resposta imunológica, com chamada de macrófagos do sangue para a região interessada. Estes macrófagos segregam uma série de citocinas que regulam o “pool” de C.S. promovendo a proliferação e diferenciação destas.

Sem resposta dos macrófagos, a “remodelação” muscular também não se processa (Hawke e Garry, 2001).

Os estímulos atróficos resultantes por exemplo da má nutrição, deservação, paralisia, etc., originam atrofia muscular com diminuição do número de micronúcleos, sendo a resposta das células satélite a estas situações pleotrófica e dependente do estímulo atrófico.

Referem-se, seguidamente (Fig. 1), os possíveis papéis das células satélite na evolução das células musculares adultas, as etapas do ciclo celular das células

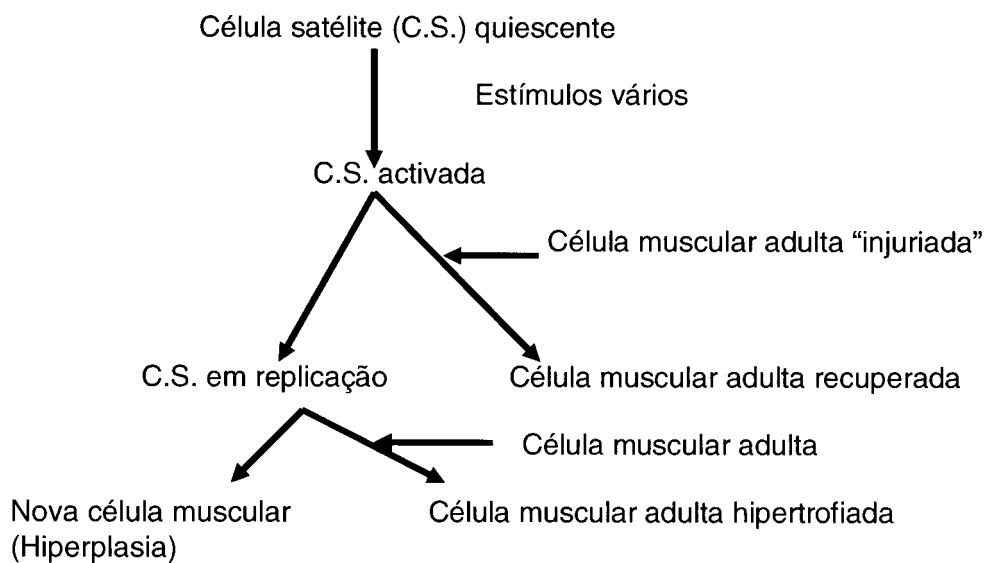


Figura 1. Papel das células satélite na evolução das células musculares adultas.

satélite quiescentes e ainda um esquema da resposta das células satélite a diversos estímulos (Fig. 2).

Etapas do ciclo celular das células satélite quiescentes

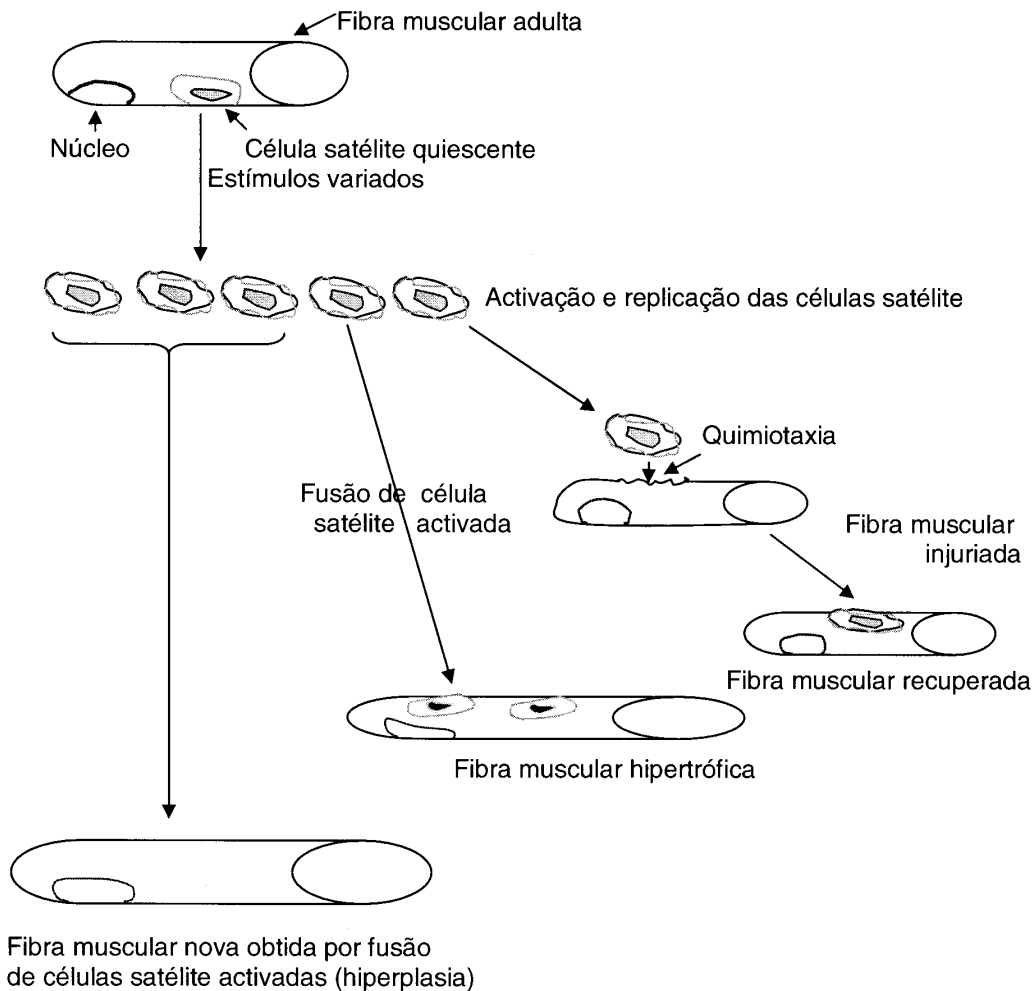
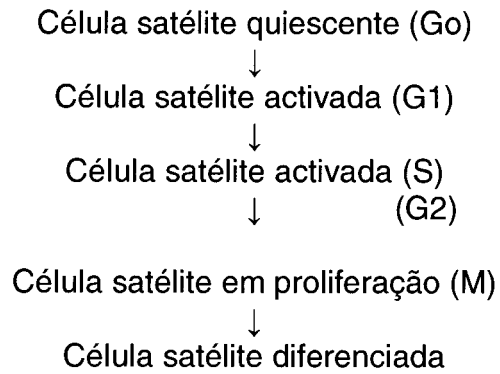


Figura 2. Esquema da resposta das células satélite a diversos estímulos.

Nestas diversas etapas do ciclo celular das células satélite intervêm os diversos reguladores positivos e negativos oportunamente referidos.

Como vimos anteriormente na miogénese dos músculos do esqueleto, a expressão da Myo D e myf 5 está implicada na determinação para as células precursoras originarem a linha miogénica, enquanto a miogenina e a MRF 4 estão associadas com a diferenciação terminal (Smith *et al.*, 1993 ; Rawls *et al.*,2000).

Os papéis dos membros da família Myo D são bem conhecidos durante a embriogénese. Nas miofibras dos animais adultos há provas da existência da Myo D e miogenina em miofibras adultas de contracção rápida e de contracção lenta admitindo-se que essas proteínas (Myo D e miogenina) tenham um papel como factores miogénicos reguladores da expressão de genes de proteínas contrácteis específicas das fibras musculares (Hughes *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1997; Seward *et al.*, 2001).

As populações de células satélite após o nascimento dos animais podem representar cerca de 30% da totalidade de células do tecido muscular do esqueleto.

As células precursoras dos mioblastos (por exemplo mioblastos embrionários, mioblastos fetais e células satélites) derivam dos somitos.

No entanto, admite-se que também células multipotenciais de proveniência não somitos podem ser precursoras de células satélites (De Angelis *et al.*, 1999; Ordahl, 1999).

As células satélite têm uma elevada relação núcleo/citoplasma e uma quantidade aumentada de heterocromatina, comparativamente aos mionúcleos (Schultz e Mc Cormick, 1994) das fibras musculares, sendo portanto relativamente quiescentes e menos activas quanto à transcrição.

Estas características modificam-se quando as células satélite entram em proliferação.

No entanto, são bem conhecidos diversos marcadores das células satélite, consoante elas se encontram no estado quiescente, activado ou proliferativo.

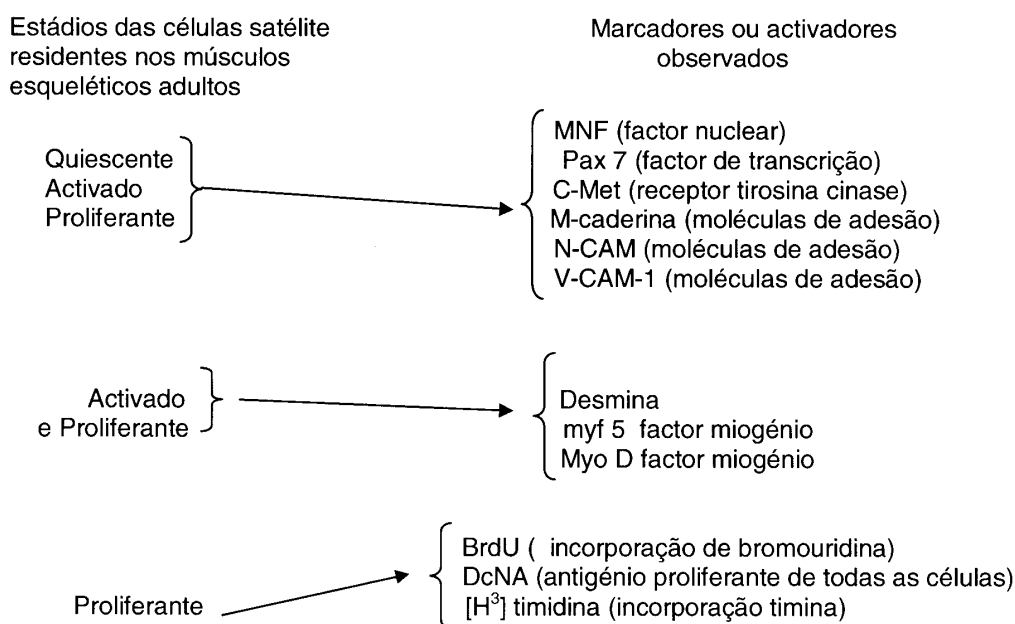
As células satélite quiescentes não exprimem factores reguladores miogénicos como o Myo D ou MEF 2 (Yablonka-Reuveni e Rivera, 1994; Megeney *et al.*, 1996; Cornelison e Wold, 1997).

A expressão da Myo D ocorre cedo, durante a activação das células satélite.

Durante o crescimento muscular e a regeneração muscular, as células satélite exprimem uma série de marcadores um tanto variável, consoante passam do estado quiescente para o estado activado e proliferativo, como referimos no quadro seguinte.

As células satélite quiescentes manifestam uma panóplia reduzida de marcadores, enquanto as activadas já revelam um maior grau de marcadores evidenciados, assumindo estes nas proliferantes um “arsenal” muito mais lato.

Perfis da expressão pelas células satélite residentes em músculos esqueléticos adultos, de marcadores de variados tipos (Hawke e Garry, 2001; Beauchamp *et al.*, 2000).



O número de células satélite varia consoante as espécies animais, idades e tipos de fibras musculares, conforme se esquematiza no Quadro I.

Quadro I - CONTEÚDO EM CÉLULAS SATÉLITE (C.S.) DE MÚSCULOS DO ESQUELETO_(HAWKE E GARRY, 2001).

Animais	Músculo	Idade	% de C.S.
Rato	Soleus	1 mês	9,6
	Soleus	1 ano	6,6
	Soleus	2 anos	4,7
	Longo	1 mês	7,0
	Extensor	1 ano	2,9
	Digitorum	2 anos	1,9
Codorniz	Longo	6 semanas	15,6
	Dorsal	(esticado)	16,7
Suíno	Sartorius	64 semanas	1,1
	Peroneus Longus	64 semanas	4,3

Nos ratos recém-nascidos as células satélite representam cerca de 30%, diminuindo para 4% nos adultos e 2% nos animais senis (29-30 meses) (Snow, 1977).

Os factores que podem modelar a actividade das células satélite quiescentes esquematizam-se seguidamente (Hawke e Garry, 2001) (Fig. 3).

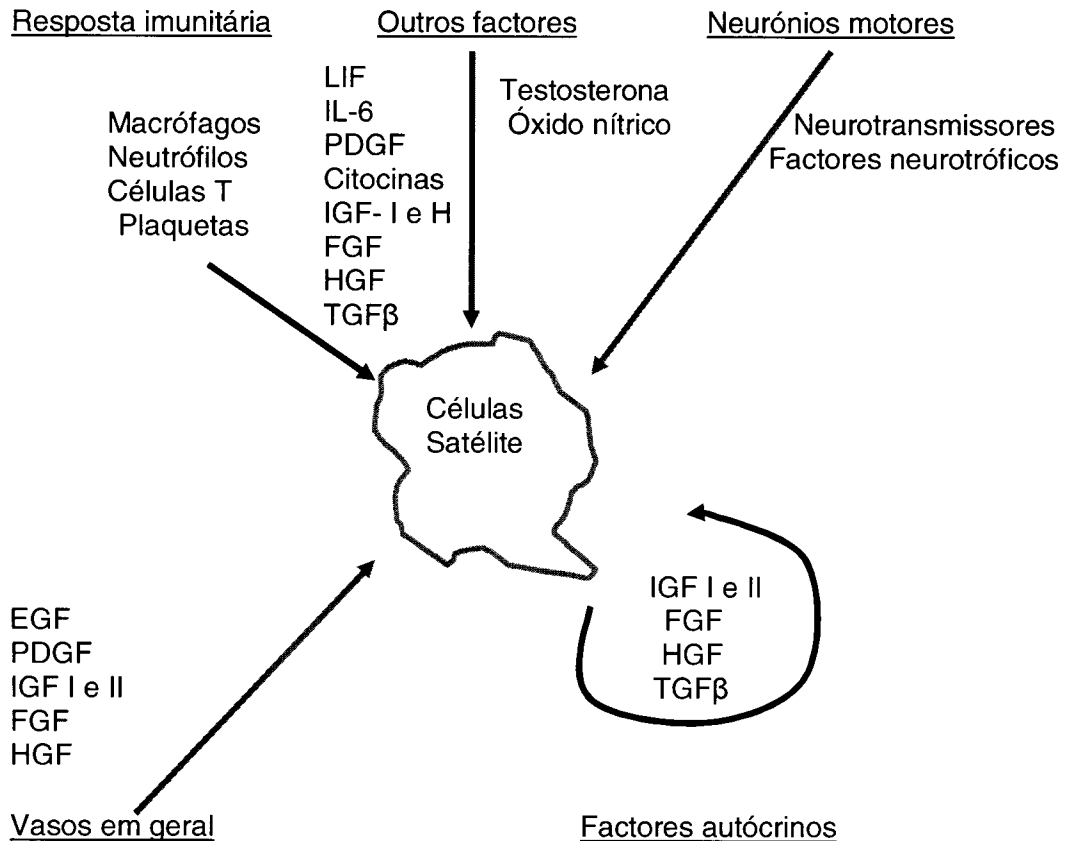


Figura 3. Factores que modelam a actividade das células satélite quiescentes.

Recorda-se que as células dos músculos do esqueleto são incapazes de se dividir após a fusão dos mioblastos, e no adulto o número de células polinucleadas dos músculos do esqueleto é atingido muito cedo (nos humanos antes do nascimento), sendo o subsequente enorme aumento do volume muscular alcançado pelo alongamento e alargamento de cada célula.

O aumento de comprimento depende do recrutamento de mais mioblastos provenientes de células satélite quiescentes activadas para fusão com as células multinucleadas existentes, aumentando também o número de núcleos.

O aumento transversal ou do perímetro transversal do músculo depende do aumento do tamanho e do número de miofibrilhas contrácteis que cada célula

muscular contém, mais do que da alteração do número de células musculares ou do número dos seus núcleos.

Contudo, nos adultos persistem células satélite quiescentes e em reserva, digamos assim, em contacto com as células musculares maduras, e essas células satélite podem ser activadas para proliferação e a sua descendência fundir-se e formar novas células musculares.

A notável capacidade dos músculos do esqueleto de animais adultos para se adaptarem ao crescimento, ao exercício-treino e às agressões de vária natureza a que estão sujeitos, é em grande parte atribuído às células satélite.

Nos factores de crescimento que regulam a população de células satélite o IGF I e IGF II aumentam a proliferação e diferenciação das C.S. "in vitro".

O factor de crescimento do hepatocito (HGF) é um activador das células satélite e inibidor da diferenciação dos mioblastos.

A família FGF (factor de crescimento dos fibroblastos) com as suas nove isoformas diferentes aumentam a proliferação das células satélite..

A família TGF- α (factor de crescimento transformante α) inibe a proliferação muscular e a sua diferenciação (Allen e Boxhorn, 1989; Greene e Allen, 1991; Zentella e Massague, 1992; Katagiri *et al.*, 1997; Kocamis *et al.*, 2001), ao silenciar a activação e transcrição dos membros da família Myo D (Martin e Olson, 1992).

Após um programa completo de desenvolvimento muscular, pode haver um aumento da regeneração das miofibras mercê da activação e proliferação das células satélite residentes nos adultos, que podem por exemplo ir repovoar um músculo atrofiado (Mozdziak *et al.*, 2000; Wanek e Snow, 2000).

À medida que os animais envelhecem, independentemente das células satélite continuarem a possuir capacidade para proliferar, esta capacidade vai-se reduzindo.

Um espessamento da lâmina basal (Snow, 1997) uma fibrose aumentada dentro dos músculos do esqueleto (Marshall *et al.*, 1989) e uma densidade menor dos vasos capilares (Coggan *et al.*, 1992), contribuem para aqueles efeitos, assim como para uma diminuição dos factores inflamatórios e macrófagos (Danon *et al.*, 1989).

Classicamente refere-se que a hipertrofia muscular descrita nos bovinos e ovinos de musculatura acrescida, consiste num aumento anormal de tecido muscular originado inteiramente por um alongamento e alargamento das células musculares existentes, e não pela hiperplasia muscular na qual o aumento do tecido muscular é devido à formação e crescimento de novas células musculares normais.

Contudo, há referências que apontam para que a “garupa dupla” nos bovinos é caracterizada por uma hiperplasia muscular com um aumento do número de fibras musculares, mais do que pelo aumento do seu diâmetro individual (<http://www.ncbi.nlm.gov/htbin-post/omim/dispmim?601788>).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É possível que através da “manipulação” das etapas miogénicas sobretudo com regulação negativa, com o recurso a anticorpos, folistatinas, formas latentes ou inativas de miostatina, ou por outros meios, se consigam alcançar ineludíveis vantagens produtivas e terapêuticas. O mesmo pode suceder com a utilização de “manipulação” genética, quer identificando animais com polimorfismos, ou SNP, ou mutações por deleção ou substituição, quer ainda pela criação de animais transgênicos, ou mesmo por terapia genética, tudo isto levando à obtenção de animais de maior interesse reprodutivo. É necessário, contudo, contrabalançar as conhecidas vantagens possivelmente obtidas com as desvantagens que estas “manipulações” podem promover. Será o conhecimento mais aprofundado dos mecanismos básicos da regulação da miogénese e das suas implicações em saúde pública, que poderá ajudar a delinear com maior segurança a evolução futura desta matéria. O mesmo sucede com o melhor conhecimento do papel que as células satélite quiescentes e outras células, ou ainda a hipotética desdiferenciação dos miotubos terminalmente diferenciados, podem desempenhar em todo este contexto.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, R.E. e Boxhorn, L.K., 1989 .Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol.*, 138: 311-315.
- Arnold, H., Della-Fera, M.A. e Baile, C.A., 2001. Review of myostatin history, physiology and applications. *Int.Arch.Biosci.*, 1014-1022.
- Arthur, P.F., Makarechia, M., Salmon R.K. e Price, M. A., 1990. Plasma growth hormone and insulin concentrations in double-muscled and normal bull calves. *J.Anim.Sci.*, 68:1609-15.
- Bailey, A.F., Enser, M.D., Dransfield, E., Restal, D.J. e Avery, N.C., 1982. Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fibre diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. In: J.B. King and Mennissier

- (eds). Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production, Martinus Nijhoff Publishers, Hague, 178p.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S.W., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Werning, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., e Zammit, P.S., 2000. Expression of CD34 and Myf 5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biology*, 151(6): 1221-1234.
- Berry, C., Thomas, M., Langley, B., Sharma, M. e Kambadur, R., 2002 .Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.*, 283:135-141.
- Bogdanovich, S., Krag, T., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittmore, L.A., Ahima, R.S. e Khurana, T.S., 2002 .Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade.*Nature*, 420: 418-421.
- Cockett, N.E., Jackson, S. P., Shay, T.L., Nielsen, D., Moore, S.S., Steele, M.R., Barendse, W., Green,R.D. e Georges, M. , 1991 . Chromosomal localization of the Callipige gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proc. National Ac. Sci*, 91: 3019-3023.
- Coggan, A.R., Spina, R.J., King, D.S., Rogers, M.A., Brown, M., Nemeth, P.M. e Holloszy, J.A., 1992 .Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and woman. *J. Gerontol.B. Psychol.Sci.Soc.Sci.*, 47:B71-B76.
- Cornelison,D.D. e Wold, B.J., 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells.*Dev.Biol.*, 191: 270-283.
- Danon, D., Kowatch, M. A. e Roth, G.S., 1989. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 86: 2018-2020.
- De Angelis, K., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M.G.,Ponzetto, C. e Cossu,G., 1999 . Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration.*J.Cell Biol.*, 147:869-878.
- De Smet, S., Webb, E.C., Claeys, E., Uytterhaegen, L. e Demeyer, D., 2000. Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular fat in double-musled Belgian Blue bulls. *Meat Science*, 56: 73-79.
- Dumont, B.L., 1982. Carcase composition and muscle structure in hypertrophied animals In J. B. King and Mennissier (eds) Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Martinus Nijhoff Publishers, Hague, 111-113 p.
- Dumont, B.L.e Schmitt, O., 1973 .Consequences de l'hypertrophie musculaire héréditaire sur la trame conjonctive du muscle de bovin.*Ann. Genet. Sel. Anim.*, 5: 499-506.
- Ernst, C.W., Vaske, D.A., Larson, R.G. e Rothschild, M.F., 1993 .Rapid communication Msp7 restrition fragment length polymorphism at the swine Myogenin locus.*J. Anim. Sci.*, 71: 3479.
- Forsberg, G.W., Golovan, S.P., Phillips, J.P., Ajakaiye, A., Fan, M. e Hacker, R.R., 2003 .Transgenic approaches to enhance the environmental and physiological characteristics of pigs and their impact on the pork industry. *Manitoba Swine Seminar* edited by Seddon, pp. 17:71-88 http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/swine/pdf/bab17_s06.pdf

-
- Gerrard, D.E. e Judge, M.D., 1993. Induction of myoblast proliferation in L6 myoblast cultures by fetal serum of double-musled and normal cattle. *J.Anim.Sci.*,71: 1464-70.
- Greene, E.A. e Allen, R.E., 1991 .Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro .*J.Anim.Sci.*, 69: 146-152.
- Grobet, L., Pirottin, D., Famir, F., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Christians, E., Desmecht, D., Coignoul, F., Khan, R. e Georges, M., 2003 .Modulating skeletal muscle mass by postnatal muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 35: 227-238.
- Halnan, C.R., 1970. Ventricular septal defect in a double-musled Angus dwarf heifer. *Aust.Vet.J.*, 46: 549-51.
- Hanset, R., 1986. Double muscling in cattle. In: C. Smith, J. W. King, J. E. McKay (eds) .Exploiting new technologies in animal breeding-genetic developments.Oxford University Press, pp. 71-80.
- Hanset, R., 1991. The major gene of muscular hypertrophy in the Belgian Blue cattle breed. In J. B. Oween e R. F. E. Axford (eds). *Breeding for disease resistance in farm animals*. C.A.B. International, pp. 467-478.
- Hawke, T.J. e Garry, D.J. , 2001 .Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Applied Physiology*, .91: 534-551.
- Hill, J.J., Davis, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman ,N.M. e Qiu, Y., 2002. The myostatin propeptide and FLRG are inhibitory proteins of myostatin in normal serum.*J.Biol.Chem.*,10.1074/jbc.M206379200.
<http://www.newscientific.com>
<http://www.ncbi.nlm.gov/htbin-post/omim/dispmim?601788>
- Huet, C., Liz, Z.F., Liu, H.Z., Black, R.A., Galliano, M.F. e Engvaill, E., 2001 .Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases: myostatin as a potencial mediator.*A.J.P. Cell Physiology*, 281(5): 1624-1634.
- Hughes, S.M., Koishi, K., Rudnicki, M. e Maggs, A.M., 1997 .Myo D protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents.*Mech.Dev.*, 61:151-163.
- Hughes, S.M., Taylor, J.M., Tapscott, S.J., Gurley, C. M. Carter, W.J. e Peterson, C. A., 1993 .Selective accumulation of Myo D and myogenin mRNA in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*, 118: 1137-1147.
- Kambadur, R.,Sharma, M., Smith, T. P. L. e Bass, J. J., 1997 .Mutations in myostatin(GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle.*Genome Research* 7(9): 910-915.
- Katagiri, T., Akyama, S., Namik, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Rosen, V., Wosney, J.M., Sehara, A.F. e Suda, T., 1997 .Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by supressing the transcriptional activity of Myo D and myogenin. *Exp.Cell Res.*, 230:342-351.
- Katz, F.R.S., 1961 .The termination of the afferent nerve fiber in the muscle spindle of the frog. *Philos.Trans.R.Soc.Lon. B. Biol. Sci.*, 243: 221-225.
-

- Kocamis, H., McFarland, D.C. e Killefer, J., 2001. Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken. *J. Cell Physiol.*, 186: 146-152.
- Kretser, de D.M., Hedger, M. P. e Philips, D. J., 1999. Activin A and follistatin :their role in the acute phase reaction and inflammation. *J. Endocrinology*, 161: 195-198.
- Lee, S.J. e McPherron, A.C., 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9: 604-607.
- Li, S.H., Xiong, Y. Z., Zheng, R., Ay, L., Deng, C. Y., Jiang, S. W., Lei, M. G. Wen, Y. Q. e Cao, G. C., 2002. Polymorphism of porcine myostatin gene. *Yi Chuan Xue Bao*, 29(4): 326-331.
- Marshall, P.A., Williams, P.E. e Goldspink, G., 1989 .Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in tmdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve*, 12: 528-537.
- Martin, J.F., Li, L. e Olson, E.N., 1992. Repression of myogenin function by TGF- β 1 is targeted at the basic helix-loop-helix motif and is independent of E2A products. *J. Biol. Chem.*, 267: 10956-10960.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M. e Lee, S.J., 1997 .Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- McPherron, A.C. e Lee, S.J., 1997 .Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12457-12461.
- McPherron, A.C. e Lee, S.J., 2002 .Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 109(5): 595-601.
- Megoney, L.A., Kablar, B., Garret, K., Anderson, J.E. e Rudnicki, M.A., 1996 .MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.*, 10: 1173-1183.
- Mott, I. e Ivarie, R., 2002. Expression of myostatin is not altered in lines of poultry exhibiting myofiber hyper and hypoplastic. *Poult. Sci.* 81 (6): 799-804.
- Mozdziak, P.E., Pulvermacher, P.M. e Schultz, E., 2000 .Unloading of juvenile muscle results in a reduced muscle size 9 wk after reloading. *J. Appl. Physiol.*, 88: 158-164.
- Muir, A.B., Kanji, A.H. e Albrook, D., 1965. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J. Anat.*, 99: 435-444.
- Oliver, V. W. e Cartwright, T. C., 1968. Double muscling in cattle: a review of expression genetics and economic implication. Texas Agricultural Experiment Department of Animal Science Technical Report 12, 58 p.
- Ordahl, C.P., 1999. Myogenic shape-shifters. *J. Cell Biol.*, 147: 695-698.
- Ostbye, Tone-Kari, Galloway, T. F., Nielsen, C., Galstad, I., Bardal, T. e Andersoen, O., 2001 .The two myostatin genes of atlantic salmon (*Salmo Salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.*, 268: 5249-5257.
- Pomeroy, R.W. e Williams, D.R., 1962. Muscular hypertrophy in cattle. *Animal Production* 4: 302-312.
- Rawls, A., Wilson-Rawls J. e Olson, E.N., 2000. Genetic regulation of somite formation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 47:131-154.

-
- Schultz, E. e McCormick, K.M., 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 123: 213-257.
- Seward, D.J., Haney, J.C., Rudnicki, M.A., e Swoap, S.J., 2001. HLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280: 408-413.
- Smith, T.H., Block, N.E., Rhodes, S.J., Koniesczny, S.F. e Miller, J.B., 1993. A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development*, 117:1125-1133.
- Snow, M.H., 1997. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.*, 185: 399-408.
- Spiller, M.P., Kambadur, R., Jeanplong, F., Thomas, M., Martyn, J. K., Bas, J. J. e Sharma, M., 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20): 7066-7082.
- Swatland, H.J. e Kieffer, N.M., 1974. Fetal development of the double muscled condition in cattle. *J. Anim. Sci.*, 38: 752-757.
- Vissac, B., Menissier, F. e Perrau, B., 1973. Etude du caractere culard.VII.Croissance et musculature des femelle, desequilibre morphologique au vélage. *Ann. Genet. Se. Anim.*, 5: 23-38.
- Vissac, B., Perreau, B., Mauleon, P. E., Menissier, F., 1974. Etude du caractere culard.IX.Fertilité des femelles et aptitude maternelle. *Ann. Genet. Sel. Anim.*, 6: 35-48.
- Yablonka-Reuveni, Z. e Rivera, J.A., 1994. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev. Biol.*, 164: 588-603.
- Wanek, L.J. e Snow, M.H., 2000. Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. *Anat.Rec.*, 258: 176-185.
- Webb, E.C., De Smet, S., Van Nevel, C., Martens, B. e Emeyer, D. I., 1998. Effect of anatomical location on the composition of fatty acids in double muscled Belgian Blue cows. *Meat Science*, 50: 45-53.
- Welt, C., Sidis, Y., Keutmann, A. e Schneyer, A., 2002. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millenium. *Experim. Biol. Medic.* (Maywood), 227: 724-752
- Westhusin, M., 1997. From mighty mice to mighty cows. *Nat.Genet.*, 17: 4-5.
- Whittemore, L.A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davis, M., Girgenrath, S., Hill, J. J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., Maylor, R., O'Hara, D., Pearson, A., quazi, A., Ryersen, S., Tan, X. Y., Tomkinson, K. N., Veldman, G.M., Widom, A., Wright, J.F., Wudyka, S., Zhao, L. e Wolfman, N.M., 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300(4): 965-971.
- Zentella, A. e Massague, J., 1992. Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc. Natl. Acad.Sci.*, 89: 5176-5180.
-

SUPPLEMENTATION OF GRAZING DAIRY COWS WITH GRASS SILAGE. 2. EFFECT UPON FEEDING BEHAVIOUR

O.A. REGO¹*, R.J.B.BESSA², H.J.D. ROSA¹, P.J. MIRANDA¹,
C.M. VOUZELA¹ e A.E.S. BORBA¹

¹ Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores,
9701-851 Angra do Heroísmo, Açores * Email: orego@mail.angra.uac.pt
² Departamento de Nutrição Animal, Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa,
2000-763 Santarém

(Recepção: 27 de Fevereiro de 2006; Aprovado: 14 de Junho de 2006)

ABSTRACT

Aimed at studying various parameters of feeding behaviour, fifteen dairy cows in mid lactation were grouped by live weight, milk production and stage of lactation and randomly allocated to three treatments as follows: 20 h of grazing daily (P); tied indoors during 2 h (9 to 11 a.m.) with access to grass silage *ad libitum* plus 18 h of grazing daily (SE2); 8 h of grazing daily plus tied indoors with 12 h of access to grass silage *ad libitum* at night (SEN). The experiment took place during winter (from mid January to mid March) and followed a latin square design (5 animal groups x 3 treatments x 3 periods). Each period had the duration of 22 days (15 days of adaptation + 7 days of data collection). Cows were stocked at 2.5 /ha and were supplemented with 4 kg concentrate daily. Grazing time decreased ($p < 0.001$) and rumination time increased ($p < 0.001$) with the increase in silage dry matter (DM) intake. Grazing time decreased by 28 minutes, for each kg DM of ingested silage. Treatments had no significant effect on biting rate/minute, intake per bite and rate of intake in pasture. Number of grazing bouts decreased with the increase of silage intake ($p < 0.001$) and the duration of grazing bouts was lower on treatment SEN ($p < 0.001$). Number of rumination bouts increased with silage DM intake ($p < 0.001$) and the duration of rumination bouts was not affected by treatments. Eating time of silage at the through was higher in treatment SEN ($p < 0.001$) with cows showing a higher frequency of short duration meals. The mean duration of individual meals ($p < 0.05$) and rate of intake ($p < 0.01$) were higher in treatment SE2. It was concluded that in the Azorean conditions of pasture feeding dairy cows, the buffer feeding with grass silage seems to be more suitable than the storage feeding.

Key words: buffer feeding, dairy cows, feeding behaviour, grass silage, pasture

SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTOREIO COM SILAGEM DE ERVA.

2. EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR

RESUMO

Quinze vacas leiteiras em fase média da lactação foram distribuídas em 5 grupos utilizadas num delineamento de 5 quadrados latinos 3 x 3 com o objectivo de estudar o efeito do modo de suplementação de vacas leiteiras em pastoreio com silagem de erva sobre o comportamento alimentar. Os 3 tratamentos consistiram em: só pastoreio com 20 h de acesso à pastagem (P); 2 h de estabulação presa com acesso a silagem de erva *ad libitum* e 18 h de acesso à pastagem (SE2); 8 h de acesso diurno à pastagem e 12 h de estabulação presa com acesso a silagem de erva *ad libitum* durante a noite (SEN). Os 3 períodos experimentais decorreram durante o Inverno (meados de Janeiro a meados de Março) e tiveram a duração de 22 dias cada (15 dias de habituação e 7 dias de medições). Os animais pastorearam a um encabeçamento fixo de 2,5 vacas por ha e foram suplementados com 4 kg de concentrado por dia. O tempo de pastoreio decresceu associado ao aumento na ingestão de silagem ($p < 0,001$). O decréscimo médio no tempo de pastoreio por kg MS de silagem ingerida foi de 28 min. O número de turnos de pastoreio decresceu com o aumento na ingestão de silagem ($p < 0,001$), sendo a sua duração menor para o tratamento SEN ($p < 0,001$). Os tratamentos não exerceram efeito significativo sobre o ritmo de preensão, ingestão por preensão e a taxa de ingestão da pastagem. O tempo utilizado na ingestão de silagem foi maior no tratamento SEN ($p < 0,001$), com um maior número de pequenas refeições ($p < 0,001$); pelo contrário, a duração média de cada refeição ($p < 0,05$) e a taxa de ingestão ($p < 0,01$) foram maiores no tratamento SE2. O tempo de ruminação e o número de turnos de ruminação aumentaram ($p < 0,001$) com a suplementação com silagem, não sendo a sua duração afectada pelos tratamentos. Nas condições de manejo alimentar das vacas leiteiras vigentes na Região Açores, em que o valor alimentar das pastagens é normalmente superior ao das silagens de erva, suplementar as vacas em lactação com silagens por curtos períodos durante o dia parece ser mais aconselhável do que a suplementação por um período mais longo durante a noite, quer em termos de exequibilidade logística, quer em termos de performance.

Palavras chave: comportamento alimentar, pastagem, silagem de erva, vacas leiteiras

INTRODUÇÃO

O clima temperado húmido da Região dos Açores, associado a solos vulcânicos bastante férteis, favorece a produção de pastagens naturais e melhoradas, que formam a base da alimentação do efectivo bovino. Embora o

pastoreio seja possível durante todo o ano, há épocas de menor crescimento de pastagem, em que o recurso a suplementos forrageiros se torna necessário a fim de manter o encabeçamento desejável e de impedir fortes penalizações no desempenho produtivo da vaca leiteira. Os períodos mais críticos no crescimento da pastagem são o Verão nas terras junto ao litoral das ilhas (seca estival), ou em altitude durante os meses de Inverno. Nestas épocas de menor produção de pastagem, é prática corrente de manejo suplementar as vacas em lactação com alimento concentrado e forragens conservadas (sobretudo silagens de milho e erva).

A suplementação de animais em pastoreio com silagens deverá ser efectuada de modo a interferir minimamente com o tempo utilizado em actividade de pastoreio, desenvolvido sobretudo nas horas de luz natural. Assim, uma estratégia sustentável consiste em suplementar as vacas em lactação com silagens por curtos períodos durante o dia (*buffer feeding*), ou em caso de maiores restrições de pastagem, durante a noite (*storage feeding*) (Phillips, 1988). A aplicabilidade destes regimes de suplementação às condições de manejo praticadas nos Açores e os efeitos do aumento da ingestão de silagem de erva sobre o desempenho produtivo e ingestão de vacas leiteiras foram testados por Miranda *et al.* (2002). Concluiu-se desse ensaio, que com o aumento no tempo de acesso à silagem de erva, a ingestão desta aumentou e a ingestão de pastagem decresceu, não afectando significativamente as diferenças entre tratamentos, para a ingestão total de MS. Contudo, como a digestibilidade da MS da silagem era 17 unidades percentuais inferior à da pastagem (ver secção de materiais e métodos), a ingestão de energia metabolizável e a produção de leite e de sólidos, decresceram linearmente associadas à ingestão de silagem.

As respostas produtivas à suplementação de vacas leiteiras em pastoreio com silagens de erva, depende sobretudo do nível de racionamento da pastagem e da relação entre o valor nutritivo das duas forragens. Quando a pastagem disponível é restringida e a digestibilidade da silagem é igual ou superior à da pastagem, as respostas no desempenho produtivo das vacas em lactação, são positivas. Pelo contrário, quando a pastagem está disponível *ad libitum* e é de valor nutritivo superior à silagem (como no caso do ensaio de Miranda *et al.*, 2002), as respostas são geralmente negativas (revisão de Phillips, 1988).

Para melhor compreender o efeito da suplementação com silagem de erva, sobre a ingestão e performance de vacas leiteiras em pastoreio apresentamos informação complementar sobre o comportamento alimentar colhida durante o ensaio descrito por Miranda *et al.* (2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, dietas e delineamento experimental

Utilizaram-se 15 vacas leiteiras com 18 ± 2 kg (média \pm DP) de produção diária de leite, 560 ± 51 kg de peso vivo, aos 194 ± 46 dias em lactação e com $2,6 \pm 0,1$ pontos de condição corporal (escala de 1 a 5). Os animais foram divididos em 5 grupos de 3 animais de acordo com a produção leiteira, peso vivo e dias em lactação de modo a permitir a realização simultânea de 5 quadrados latinos 3×3 (3 tratamentos \times 3 períodos \times 3 animais). Cada período experimental foi de 22 dias com 15 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias para recolha de dados. O ensaio decorreu de 20 de Janeiro a 28 de Março.

Os tratamentos consistiram em: pastoreio com 20 h de acesso à pastagem (P): 2 h de estabulação com acesso a silagem de erva *ad libitum* após a ordenha da manhã (das 9 às 11 h) e acesso à pastagem durante 18 h (SE2); pastoreio no espaço de tempo compreendido entre as 2 ordenhas (8 h) e 12 h de estabulação com acesso nocturno a silagem de erva *ad libitum* (SEN). Todos os animais foram suplementados com 4 kg de concentrado por dia fornecidos no momento das 2 ordenhas, em partes iguais.

A composição química e o valor nutritivo dos alimentos foram apresentados em pormenor por Miranda *et al.* (2002). A pastagem consistia numa consociação em que as espécies dominantes eram o azevém perene e o trevo branco. A erva para ensilar foi cortada às 10 semanas e sofreu uma pré-fenação de 24 h, sob condições atmosféricas favoráveis. Apresentava uma boa qualidade fermentativa, com $\text{pH}=4,3$ e com azoto amoniacal de 3,9% do N total. A pastagem e a silagem possuíam em relação à MS respectivamente, 31,2 e 13,3% de proteína bruta, 51,3 e 63,2% de fibra insolúvel em detergente neutro (NDF) e 2,0 e 6,6% de lenhina (ADL). A digestibilidade *in vivo* da MS (determinada com carneiros) foi respectivamente de 77,9 e 60,5% e a energia metabolizável (EM) estimada (MAFF, 1975) de 11,5 e 9,1 MJ.kg MS⁻¹. A ingestão de silagem foi de 5,2 e 9,3 kg MS vaca.dia⁻¹, respectivamente para os tratamentos SE2 e SEN e a ingestão estimada de pastagem com base na performance animal (MAFF, 1975) foi 13,0, 8,3 e 3,7 kg MS vaca.dia⁻¹, respectivamente para os tratamentos P, SE2 e SEN.

As condições experimentais (maneio e medições) foram descritas em pormenor por Miranda *et al.* (2002). Em síntese, os animais pastorearam a mesma área de pastagem, a um encabeçamento de 2,5 vacas.ha⁻¹, de acordo com o desenho experimental descrito. As vacas que foram suplementadas com silagem

de erva *ad libitum* (15% acima da ingestão do dia anterior, peso fresco), foram individualmente submetidas a estabulação presa. Os animais experimentais foram submetidos a 2 ordenhas (duração de 4 h por dia), uma pela manhã (8 h) e a outra à tarde (17 h), com medição da produção individual de leite.

Medições do comportamento alimentar

A avaliação do comportamento alimentar dos animais em pastoreio e em estabulação foi efectuada por observação visual no final de cada período experimental. Um grupo de quatro observadores analisou durante 24 horas consecutivas os animais registando o tempo de pastoreio e o tempo de ruminação. Estas foram feitas continuamente durante o dia e a intervalos de 5 min durante a noite com utilização de uma lanterna. Os turnos de pastoreio e de ruminação, foram medidos, tendo em consideração que os animais permanecessem em cada uma dessas actividades pelo menos durante 5 min (Phillips e Leaver, 1986). O ritmo de preensão de pastagem por minuto, foi registado 2 vezes por dia, com duas medições por cada animal nos maiores períodos de pastoreio após as ordenhas da manhã e da tarde. Determinou-se o número de preensões consecutivas, durante períodos de 90 s, pelo movimento da cabeça das vacas (a uma distância impeditiva de perturbar a actividade normal dos animais com auxílio de binóculos), com a restrição de que se a actividade fosse interrompida por mais do que 5 s, se recomeçaria com nova medição (Phillips e Hecheimi, 1989). A ingestão por preensão de pastagem foi calculada de um modo indirecto, dividindo a ingestão total de pastagem determinada pelo método da performance animal, descrito por Baker (1982), pelo produto do tempo de pastoreio com o do ritmo de preensão. A taxa de ingestão de pastagem foi calculada pelo produto da ingestão por preensão com o do ritmo de preensão (Leaver, 1986).

Nas vacas estabuladas registou-se o tempo total utilizado nas actividades de ingestão e de ruminação, o número e duração de cada refeição, o número e duração dos turnos de ruminação e calculou-se a taxa de ingestão de silagem. As observações dos animais estabulados fizeram-se sempre com intervalos de 5 min.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância recorrendo ao Proc GLM do programa informático SAS (SAS, 1999). O modelo utilizado para análise de vários quadrados latinos simultâneos foi o seguinte:

$$Y_{ij(k)m} = \mu + Q_m + A(Q)_{im} + P_j + T_{(k)} + \hat{a}_{ij(k)m}$$

onde:

$Y_{ij(k)m}$ = observação $ij(k)m$

μ = média global

Q_m = efeito do quadrado latino m

$A(Q)_{im}$ = efeito do animal i dentro do quadrado m

P_j = efeito do período j

$T_{(k)}$ = efeito do tratamento k

$\hat{a}_{ij(k)m}$ = erro residual

Quando se observou que o efeito do tratamento era significativo ($P < 0,05$), as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do modo de suplementação de silagem de erva sobre o comportamento alimentar dos animais está presente no Quadro I.

Quadro I - EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR DAS VACAS LEITEIRAS

	P	SE2	SEN	EPM	Prob
Pastoreio					
tempo gasto (min.)	462 ^c	351 ^b	145 ^a	12,0	0,0001
turnos (nº.d ⁻¹)	4 ^b	3 ^a	3 ^a	0,2	0,0001
duração dos turnos (min.)	108 ^b	110 ^b	57 ^a	6,7	0,0001
ritmo de preensão (nº. min ⁻¹)	53	53	52	0,8	0,83
ingestão por preensão (mg MS)	536	449	533	36,3	0,17
taxa de ingestão (g MS.min ⁻¹)	28	24	28	1,9	0,16
Ingestão de silagem					
tempo gasto (min.)	-	69	168	9,3	0,0001
nº de refeições	-	3	12	0,4	0,0001
duração das refeições (min.)	-	27	14	2,9	0,01
taxa de ingestão (g MS.min ⁻¹)	-	78	59	5,3	0,03
Ruminação					
tempo gasto (min.)	364 ^a	427 ^b	476 ^c	13,7	0,0001
turnos (nº.d ⁻¹)	9 ^a	11 ^b	10 ^b	0,4	0,001
duração dos turnos (min.)	43	41	47	1,7	0,08

O tempo total em actividade de pastoreio (tempo de pastoreio) diminuiu significativamente com a suplementação de silagem. O modo como a suplementação foi realizada também afectou o tempo de pastoreio que foi menor ($p < 0.05$) para os animais em regime de “storage feeding” (SEN) do que para os animais em regime de “buffer feeding” (SE2). Considerando que os animais do tratamento SE2 e SEN ingeriram 5,2 e 9,3 kg MS.dia⁻¹ de silagem respectivamente (Miranda *et al.*, 2002) verificou-se que o tempo de pastoreio decresceu 21 e 34 min.kg MS⁻¹ de silagem ingerida, respectivamente para os tratamentos SE2 e SEN. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por diversos autores que referiram decréscimos no tempo de pastoreio entre 14 e 48 min.kg MS⁻¹ de silagem ingerida (Phillips e Leaver, 1986; Murray-Evans *et al.*, 1988). Davison *et al.* (1982) calcularam decréscimos no tempo de pastoreio de 39 min.kg MS⁻¹ de silagem de milho ingerida e disponível *ad libitum* durante a noite.

O número de turnos de pastoreio foi menor em animais suplementados com silagem (SE2 e SEN) do que em animais do exclusivamente alimentados em pastoreio (P). A duração dos turnos de pastoreio não foi afectada pela suplementação com silagem em regime de “buffer feeding” (SE2) mas reduziu-se para cerca de metade (menos 52 min por turno) quando o regime de suplementação da silagem foi o “storage feeding” (SEN). Phillips e Hecheimi (1989) também não encontraram reduções na duração média dos turnos de pastoreio quando vacas em pastoreio eram suplementadas com silagem em regime de “buffer feeding”. Estes autores referiram uma diminuição no número de turnos de pastoreio associados à complementação com silagem, embora as diferenças só tenham sido significativas na Primavera e não no Outono.

O reduzido número de turnos de pastoreio verificado no presente ensaio foi compensado pela sua longa duração. A justificação deverá ser encontrada na estação do ano em que decorreu o ensaio (Inverno), em que a redução no fotoperíodo obriga os animais a comprimir o pastoreio nas horas de luz, já que são relutantes em pastorear durante a noite, fazendo-o em poucos mas longos turnos de pastoreio. Diversos estudos no âmbito do comportamento alimentar de vacas leiteiras na pastagem calcularam uma marcada redução no número de turnos de pastoreio, compensada pelo aumento no seu tempo de duração, da Primavera para o Outono (Phillips e Leaver, 1986; Rego e Almeida, 1998).

A suplementação de vacas em pastoreio com silagem de erva não afectou o ritmo de preensão, a ingestão por preensão e a taxa de ingestão de pastagem. A ausência de efeito da suplementação com silagem sobre o ritmo de preensão de

pastagem foi também encontrado por Phillips e Leaver (1986) em vacas leiteiras em pastoreio e com tempos de acesso à silagem semelhantes aos do presente trabalho.

O comportamento alimentar das vacas durante o período de estabulação foi afectado pelo tempo de acesso à silagem na manjedoura. As vacas que dispuseram de 2 h de acesso à silagem (SE2), passaram menos tempo em actividades de ingestão ($p < 0,001$), com um número de refeições 4 vezes mais reduzido ($p < 0,001$) mas com uma maior duração média em cada refeição e maior taxa de ingestão. Por outras palavras, o decréscimo no tempo de acesso ao alimento, reduziu o tempo utilizado em actividade de ingestão e o número de refeições, procurando os animais compensar com o aumento na velocidade e duração de cada refeição. Phillips e Leaver (1985) observaram uma tendência semelhante, em que as vacas com menor tempo de acesso à silagem apresentavam uma taxa de ingestão mais elevada. O valor de $78 \text{ g MS} \cdot \text{min}^{-1}$ calculado no presente estudo, aproxima-se dos valores referidos por Phillips (1988) em vacas em pastoreio, com 2 h de acesso a silagem durante o Outono.

Para vacas com longo tempo de acesso a uma única distribuição de alimento, os animais tendem a fazer uma primeira longa refeição (40 a 50% do tempo total), seguida de um número elevado de pequenas refeições (Jarrige *et al.*, 1995), o que está de acordo com os resultados do presente estudo. Neste ensaio, o tempo médio gasto na primeira refeição para o tratamento SEN, foi de 65 min., o que representa cerca de 40% do total.

O sistema de "buffer feeding" baseia-se na observação de que os animais podem num período curto de acesso diário ao alimento ingerir rapidamente o suplemento, de modo a interferir ao mínimo com o tempo disponível para pastoreio durante as horas de luz natural, já que esta actividade se desenvolve sobretudo durante o dia. Neste ensaio a taxa de ingestão de silagem foi 2 a 3 vezes mais elevada do que a taxa de ingestão na pastagem, valores que estão de acordo com Phillips e Leaver (1985) para condições experimentais semelhantes.

A suplementação com silagem aumentou o tempo de ruminação, aumentando o número de turnos nesta actividade ($p < 0,001$), mas não a sua duração. Phillips e Hecheimi (1989) determinaram uma tendência para o aumento no número de turnos de ruminação e da sua duração associados à ingestão de silagem, mas as diferenças não atingiram significância estatística. O aumento significativo no tempo de ruminação provocado pela complementação com silagem, deveu-se ao aumento na ingestão de fibra (63% NDF) (Miranda *et al.*, 2002), sendo estes resultados

confirmados por trabalhos de Phillips e Leaver (1986). Está bem estabelecido que o tempo de ruminação aumenta proporcionalmente com o incremento na ingestão de fibra, quer na pastagem, quer em condições de estabulação (Jarrige *et al.*, 1995).

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a suplementação de vacas leiteiras em pastoreio rotacional com silagem de erva, decresceu o tempo e o número dos turnos de pastoreio, sem afectar o ritmo de preensão, a ingestão por preensão ou a taxa de ingestão de pastagem. O tempo e o número dos turnos de ruminação aumentaram com o incremento na ingestão de silagem.

O aumento do tempo de acesso à silagem no estábulo, aumentou o tempo total em actividade de ingestão e o número de refeições, mas decresceu a sua duração e taxa de ingestão. Contudo, a taxa de ingestão de silagem foi 2 a 3 vezes mais elevada do que a de pastagem.

Nas condições de manejo alimentar da vaca leiteira usualmente praticadas nos Açores, em que normalmente as silagens de erva possuem menor valor nutritivo do que as pastagens, suplementar as vacas em lactação com silagens por curtos períodos durante o dia, parece-nos mais aconselhável de implementar do que a sua suplementação durante a noite, não só em termos de desempenho produtivo, mas também de logística.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam os seus agradecimentos a José Suarez e Nuno Salvador pelo apoio logístico durante as observações do comportamento alimentar.

BIBLIOGRAFIA

- Baker, R.D., 1982. Estimating herbage intake from animal performance. In: *Herbage Intake Handbook*. J.D. Leaver (Ed.). Brit. Grassl. Soc., pp. 77-93.
- Davison, T.M., Marschke, R.J. e Brown, G.W., 1982. Milk yields from feeding maize silage and meat-and-bone meal to Friesian cows grazing a tropical grass and legume pasture. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 22: 147-154.
- Jarrige, R., Dulphy, J.P., Faverdin, P., Baumont, R. e Demarquilly, C., 1995. Activités d'ingestion et de rumination. In: *Nutrition des Ruminants Domestiques - Ingestion et Digestion*.

- R. Jarrige, Y. Ruckebush, C. Demarquilly, M.H. Farce et M. Journet (Eds.) Editions INRA, pp. 123 -182.
- Leaver, J.D., 1986. Effects of supplements on herbage intake and performance. In: Grazing Animals. J. Frame (Ed.). Occ. Symp. nº 19. Brit. Grassl. Soc., pp. 79-88.
- Maff, 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Technical Bulletin nº 33. London, HMSO.
- Meus, J.A.C., 1981. Herbage intake by grazing dairy cows. Agric. Res. Reports nº 909. Centre For Agric. Publ. and Documentation, Wageningen. 264 p.
- Miranda, P. J., Rego, O.A., Borba, A.S. e Vouzela, C.M., 2002. Suplementação de vacas leiteiras em pastoreio com silagem de erva 1. Efeito sobre a produção e composição do leite. Rev. Ciências Agr., XXV: 133-145.
- Murray-Evans, J.P., Hecheimi, K. e Phillips, C.J.C., 1988. The effects of herbage height and the provision of high and low quality silage for dairy cows grazing a high clover pasture on sward composition, milk production and ingestive behaviour. Anim. Prod., 46: 488 (Abstr.).
- Phillips, C.J.C., 1988. The use of conserved forage as a supplement for grazing dairy cows. Grass For. Sci., 43: 215-230.
- Phillips, C.J.C. e Hecheim, K., 1989. The effect of forage supplementation, herbage height and season on the ingestive behaviour of dairy cows. Appl. Anim. Behav. Sci., 24: 203-216.
- Phillips, C.J.C. e Leaver, J.D., 1985. Supplementary feeding of forage to grazing dairy cows. 2. Offering grass silage in early and late season. Grass For. Sci., 40: 193-199.
- Phillips, C.J.C. e Leaver, J.D., 1986. The effect of forage supplementation on the behaviour of grazing dairy cows. Appl. Anim. Behav. Sci., 16: 233-247.
- Rego, O.A. e Almeida, J.A.A., 1998. Efeito sazonal e do nível de suplementação sobre o comportamento alimentar de vacas leiteiras em pastoreio rotacional. Rev. Port. Zoot., V (2): 85-95.
- SAS, 1989. SAS/STAT user's guide. SAS Inst.,Inc., Cary,NC.

MYOGENIC REGULATION

J. H. R. DIAS CORREIA e A.A. DIAS CORREIA

CIISA, Departamento de Morfologia e Função, Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa,
Rua Prof. Cid dos Santos, Pólo Universitário da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal
e-mail jhrdcorreia@fmv.utl.pt

(Recepção: 22 de Março de 2005; Aprovado: 6 de Maio de 2006)

ABSTRACT

In this article the authors have reviewed the control both by positive factors (MRFs) and by negative factors (MSTN) of the growth of muscular tissue. The main features of this control of muscle growth have been highlighted. The review has been carried out on the perspectives of animal production (creatopoiesis), of an increase in performance, and of the treatment of muscle's pathology.

Key words: cell cycle, myogenic regulatory factors (MRFs), myogenesis, myostatin (MSTN), satellite cells

REGULAÇÃO DA MIOGÈNESE

RESUMO

É feita uma revisão do crescimento do tecido muscular e da sua regulação por factores positivos (MRF's) e negativos (MSTN) e as suas características principais, numa perspectiva de produção animal (creatopoiese) ou de acréscimo de performance, ou de terapêutica de situações patológicas com sede no tecido muscular.

Palavras-chave: células satélite, ciclo celular, factores miogénicos reguladores (MRF's), miogénese, miostatina (MSTN)

INTRODUÇÃO

Na regulação da miogénese nos mamíferos, após o nascimento, há que considerar a franca maioria das células de constituição dos músculos do esqueleto, as fibras ou células musculares, perfeitamente diferenciadas (mas que até atingirem a sua diferenciação terminal sofreram uma série de etapas evolutivas

desde as suas origens nos somitos e nos mioblastos) e sem capacidade replicativa, portanto com relativamente poucas potencialidades numa perspectiva de acréscimo de massas musculares (creatopoiese) ou de musculação e/ou recuperação de tecidos musculares lesados (animais de desporto, touros de lide, etc.).

Ao lado desta população celular normal e largamente predominante existe uma outra população celular muito reduzida, constituindo as células satélite (C.S.) que se encontram num estado de quiescência (fase Go do ciclo celular), mas que perante estímulos adequados pode ser activada e entrar em replicação. Estas células, fundindo-se umas com as outras, podem constituir novas fibras musculares multinucleadas (hiperplasia) após a adequada diferenciação, ou podem simplesmente contribuir para o desenvolvimento e/ou regeneração de miofibras pré-formadas (células musculares), inclusivamente fundindo-se com estas (hipertrofia).

Fontes alternativas de mioblastos proliferantes têm sido recentemente referidas por Odelberg (2000), que assinala que miotubos ou miofibras diferenciadas terminalmente são capazes de se desdiferenciar para formar mioblastos, os quais têm capacidade para adoptar depois outros fenótipos.

Passamos a considerar adiante a regulação da miogénese em geral, aspectos pontuais desta regulação e características consequentes, para num outro trabalho (crescimento muscular, recuperação muscular, creatopoiese) introduzirmos a questão das células satélite.

Recorda-se que as células dos músculos do esqueleto são incapazes de se dividir após a fusão dos mioblastos, e no adulto o número de células polinucleadas dos músculos do esqueleto é atingido muito cedo (nos humanos antes do nascimento), sendo enorme o subsequente aumento do volume muscular, alcançado pelo alongamento e pelo alargamento de cada célula pré-existente. O aumento de comprimento depende do recrutamento de mais mioblastos provenientes de células satélite quiescentes activadas, para fusão das suas extremidades com as células multinucleadas existentes, aumentando também o número de núcleos.

O aumento transversal ou do perímetro transversal do músculo depende do aumento do tamanho e do número de miofibrilhas contrácteis que cada célula muscular contem, mais do que da alteração do número de células musculares ou do número dos seus núcleos.

Contudo, como referimos, nos adultos persistem células satélite quiescentes e digamos assim de reserva e em contacto com as células musculares “maduras”,

podendo essas células satélites ser activadas para proliferação e a sua descendência fundir-se e formar novas células musculares.

A notável capacidade dos músculos do esqueleto de animais adultos para se adaptarem ao crescimento, ao treino-exercício e às agressões de vária natureza, é em grande parte atribuída às células satélite.

Nos seres humanos, após o nascimento, continua o desenvolvimento muscular até cerca dos 18 anos de idade, ou até mais tarde, sendo mesmo possível a partir dessas idades, por meios um tanto variados, alcançar um desenvolvimento muscular impressionante como sucede no “culturismo” físico-muscular.

Também com os animais, após o nascimento, o desenvolvimento muscular ainda continua, sendo este um tanto variável consoante as espécies animais. De tudo isto se tira partido em produção animal jogando com índices de conversão vantajosos economicamente (relação entre os alimentos consumidos e as carnes produzidas pelo animal após o abate). Assim, os frangos podem atingir este “pico” máximo de produção de carne em menos de oito semanas, os suínos em menos de cinco meses e os vitelos em menos de nove meses.

Não conhecemos como se desenrola, após o nascimento, a hiperplasia e a hipertrofia das fibras musculares das diversas espécies animais, nem pormenores da sua conversão (somitos, mioblastos, miotubos), mas aceitamos que o número de fibras musculares não varie muito significativamente dos animais recém-nascidos para os adultos, ficando o desenvolvimento muscular posterior ao nascimento, a cargo sobretudo da hipertrofia das fibras musculares e da activação e proliferação das respectivas células satélite.

A tudo isto é de atender quando se encaram hipóteses de regulação da miogénese nos animais, quer numa perspectiva de creatopoiese de impacto económico quer numa perspectiva terapêutica (recuperação de patologias musculares) ou funcional (animais de desporto como touros de lide, etc.).

ETAPAS DA MIOGENÉSE

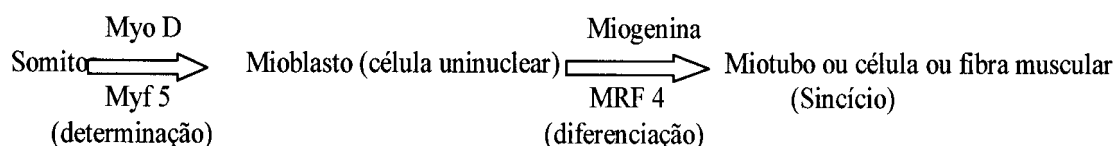
Há que considerar as seguintes etapas na miogénese:

- 1- Determinação das células progenitoras em linhagens miogénicas.
- 2- Migração das células estaminais “stem cells” miogénicas (mioblastos) para locais apropriados no embrião.
- 3- Proliferação dos mioblastos e células não miogénicas dos tecidos musculares.

- 4- Diferenciação terminal dos miocitos (como por exemplo a fusão dos mioblastos) e expressão e organização dos produtos específicos dos genes, apenas nas células musculares diferenciadas terminalmente.
- 5- Manutenção do estágio diferenciado terminal e modulação das miofibras em vários tipos em função da idade dos animais e dos desempenhos fisiológicos.

A expressão do fenótipo dos músculos do esqueleto diferenciados envolve pois a determinação inicial das células da mesoderme para a linha miogénica, seguida pela sua proliferação bem como depois pela paragem irreversível do seu ciclo celular.

Em esquema geral resume-se seguidamente essa evolução bem como alguns factores miogénicos que a regulam.



Durante a formação dos somitos intervêm factores de crescimento diversos (tais como: Wnt proteínas, “sonic hedge hog”, proteínas morfogénicas do osso, etc.) e factores de transcrição (Myf5, Myo D, Pax 3, etc.) (Hawke e Garry, 2001).

Os mioblastos param o ciclo celular e fundem-se em miotubos (Israels e Israels, 2001).

A especificação da linhagem miogénica e a diferenciação dos músculos do esqueleto dependem de factores de transcrição proteicos contendo domínios bHLH (básico-hélice, ansa, hélice), como é o caso da família dos factores de regulação muscular positiva (MRF ou Myogenic regulator factors) onde se incluem a Myo D (descoberta em 1987), Myf 5, miogenina e MRF 4 (reguladores positivos) (Israels e Israels, 2001).

A Myo D e Myf 5 estão implicadas na determinação das linhagens miogénicas e a miogenina e a MRF 4 controlam o processo de diferenciação terminal, embora a Myo D e a Myf 5 pareçam também ter um papel importante na iniciação da diferenciação dos mioblastos (Israels e Israels, 2001).

A Myo D também induz uma paragem do ciclo celular dos mioblastos, uma parte que integra a diferenciação miogénica.

Também os inibidores p21 e p57 (CdK I) das cinases dependentes de ciclinas (CdK) regulam negativamente a progressão no ciclo celular (Israels e Israels, 2001; Diffley e Labib, 2002).

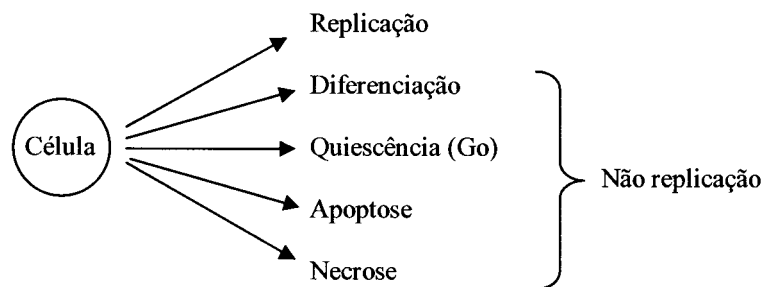
A diferenciação dos mioblastos é pois regulada por factores actuantes positivos e negativos.

A miostatina (MSTN ou GDF-8) é um regulador negativo da massa dos músculos do esqueleto, originando nestes hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares.

Em condições experimentais, o gene de diferenciação-inibição desencadeado pela MSTN depende da sua concentração no meio de cultura.

A miostatina inibe reversivelmente a diferenciação dos mioblastos ao inibir a expressão do gene Myo D-MRF.

Os possíveis destinos das células em geral, podem esquematizar-se da seguinte forma:



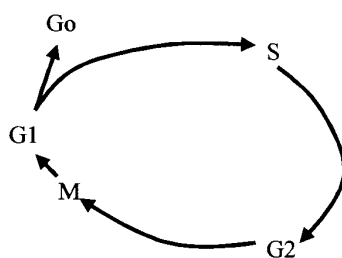
A diferenciação é um processo que envolve em geral mudanças na expressão dos genes e através das quais uma célula precursora se transforma num tipo de célula especializada distinta.

Afirme-se, desde já, que a replicação e a diferenciação das células dos músculos do esqueleto são processos que se excluem mutuamente e que os efeitos epigenéticos passam de uma célula especializada para a sua descendência sem qualquer alteração.

CICLO CELULAR

Classicamente, as fases do ciclo celular esquematizam-se da seguinte forma (Assoian, 1997; Sherr e Roberts, 1999).

A fase G1 é um intervalo entre a mitose (fase M) e a síntese de DNA (fase S).



Durante a fase G1 a célula recebe estímulos de mitogénios extracelulares e de factores de crescimento, o que faz avançar a fase G1 e processar a síntese de DNA na fase S.

A fase G2 é um intervalo entre a efectivação completa da síntese de DNA (S) e a mitose (M).

Nesta fase M formam-se os feixes mitóticos bipolares, e ocorre a segregação dos pares de cromátídeos e a divisão celular.

O ciclo celular necessita que as ocorrências que se sucedem em cada fase estejam completadas antes de se entrar na fase seguinte, havendo pontos de controlo (para controlar a integridade do DNA) na última parte da fase G1 e na interface entre G2/M.

Estes pontos de controlo destinam-se a evitar que ocorra progressão e propagação do ciclo das células que sofrem mutações ou que foram alteradas.

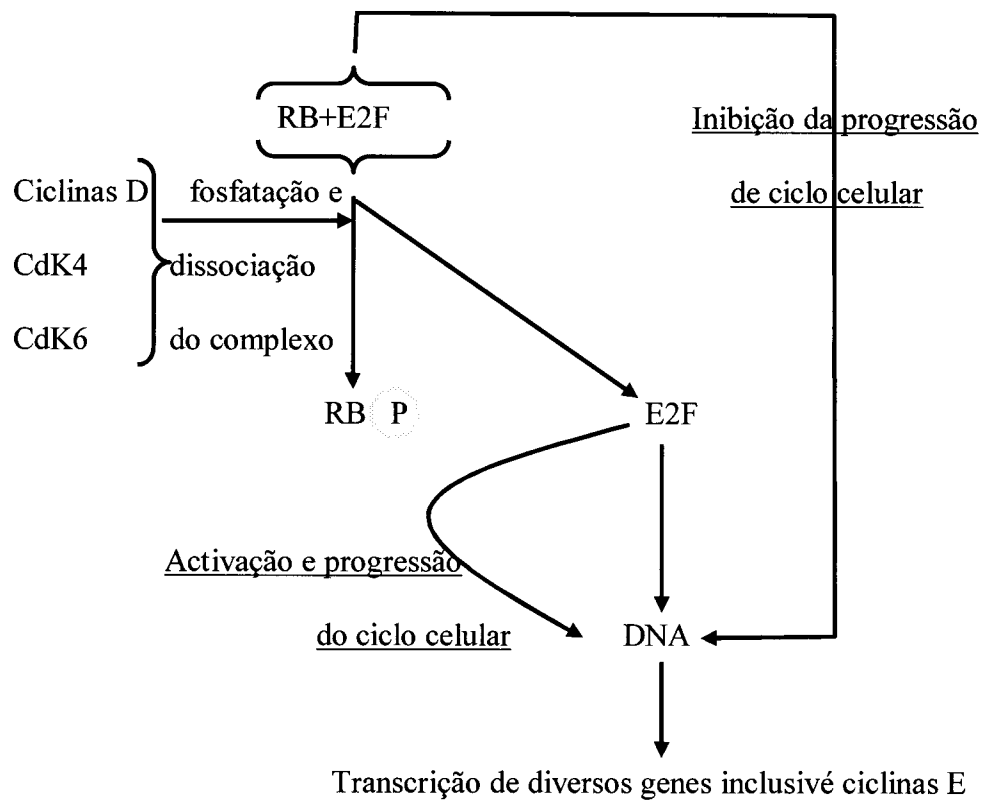
Uma célula que se encontra em quiescência, ou seja na fase G₀, necessita de estímulos externos para sair deste estado de quiescência e entrar no início da fase G1.

Na ausência de estímulos mitóticos as células sofrem diferenciação, apoptose ou entram em estado de quiescência (G₀).

O ciclo celular é impulsionado por uma série de complexos de proteínas cinases (CdKs), subunidades catalizadoras com as respectivas ciclinas (subunidades reguladoras).

Estes complexos fosfatam substratos proteicos específicos levando as células através do ciclo celular com activação da síntese de DNA (no fim da fase G1 e na fase S) e formação de componentes estruturais associados com a mitose (no fim da fase G2 e na fase M).

No ciclo celular, começando em G1, há um aumento das ciclinas D (D1, D2 e D3) como se pode ver em figura adiante, associando-se estas ciclinas com as CdK4 e CdK6 formando complexos que originam a fosfatação e activação das CdKs que por seu turno, fosfatam a proteína retinoblastoma (RB) que é um



RB = Retinoblastoma

RB P = Retinoblastoma fosfatado

RB+E2F = Complexo retinoblastoma + factor de transcrição E2F

E2F = Factor de transcrição

Ciclina D

CdK4 = Cinasas dependentes de ciclinas

CdK6 = Cinasas dependentes de ciclinas

DNA

Figura 1. Regulação da progressão da fase G1 do ciclo celular.

regulador fundamental de um ponto de controlo (R) para que possa ocorrer a progressão da fase G1.

No caso de ocorrerem alterações no genoma, o ciclo celular pode ser retardado ou abandonado.

As proteínas RB podem interagir com as proteínas de transcrição E2F (Fig. 1).

O papel destes factores E2F não ligados ao RB é interagirem com o DNA e promoverem a transcrição de uma série de genes, incluindo os das ciclinas E, necessários para se avançar para além do ponto de controlo R na fase G1.

As formas de RB não fosfatadas ou hipofosfatadas ligam-se firmemente com as E2F e inibem a transcrição que estas proteínas E2F desencadeiam, evitando que o ciclo celular progrida.

Mas se as RB forem hiperfosfatadas, ocorre a libertação das E2F das RB, progredindo o ciclo celular, mantendo-se o RB hiperfosfatado através das restantes fases do ciclo celular, não sendo desfosfatadas enquanto a mitose não estiver completada.

À medida que a fase G1 avança, aumenta a expressão da ciclina E, sendo necessário o complexo ciclina E / Cdk2 para a transição G1 para S, e nesta transição aumenta a expressão da ciclina A que persiste através da fase S.

Na última parte da fase S a ciclina A associa-se com a Cdk1.

Existe um outro ponto de controlo do ciclo celular na fase G2, que actua se houver alteração do DNA, inclusive a sua biossíntese incompleta. Se isto suceder, a progressão para a mitose é retardada para permitir a reparação do DNA, ou é abortado o ciclo celular.

Os destinos do ciclo celular são portanto a progressão e replicação celular ou a sua interrupção e paragem (quiescência, diferenciação, apoptose), ambas as situações sendo controladas pelos complexos Cdk e Cdk I, antes referidos.

A replicação celular é controlada pela regulação de dois acontecimentos críticos no ciclo celular, a iniciação da síntese nuclear do DNA(S) e a iniciação da mitose(M) (Lodish *et al.*, 1995).

Um pequeno número de proteínas cinases são as controladoras chave destes acontecimentos. Elas regulam a actividade de várias proteínas implicadas neste processo, fosfatando-as em locais específicos, activando umas, inibindo outras e coordenando assim as suas actividades. Estas cinases são proteínas heterodiméricas, sendo as suas subunidades reguladoras chamadas ciclinas porque as suas concentrações ciclam (ou oscilam) em fase ou consonância com o ciclo celular.

As subunidades catalíticas são chamadas cinases dependentes de ciclinas (CdKs) porque não têm actividade cinásica, a não ser quando associados a uma ciclina.

Cada subunidade CdK pode associar-se com diferentes ciclinas e é esta que determina quais as proteínas que vão ser fosfatadas pelo complexo CdK-ciclina.

A maioria dos mecanismos moleculares regulam o início da fase S ou iniciação da mitose.

A actividade das subunidades catalíticas CdK é regulada por outras proteínas cinases e por fosfatases que regulam também e coordenam a divisão celular, e ainda por inibidores. Tudo isto nas células mamíferas é controlado por regulação dos genes e da sua transcrição.

As células mamíferas contêm algumas ciclinas diferentes que funcionam no período G1 promovendo a entrada na fase S. A maioria delas não se exprime em células não proliferantes que saíram do ciclo celular na fase G1 entrando numa fase de paragem chamada Go. Quando são adicionados a estas populações na fase Go factores de crescimento, são induzidos uma série de genes chamados genes de resposta-precoce, e as proteínas por eles induzidas são factores de transcrição que induzem a expressão de um segundo conjunto de genes, os genes de resposta retardada, onde se incluem as proteínas por eles produzidas, as G1 ciclinas e as CdKs.

As células mamíferas possuem 3 CdKs principais, cujas concentrações sobem e descem durante o decurso de cada ciclo celular.

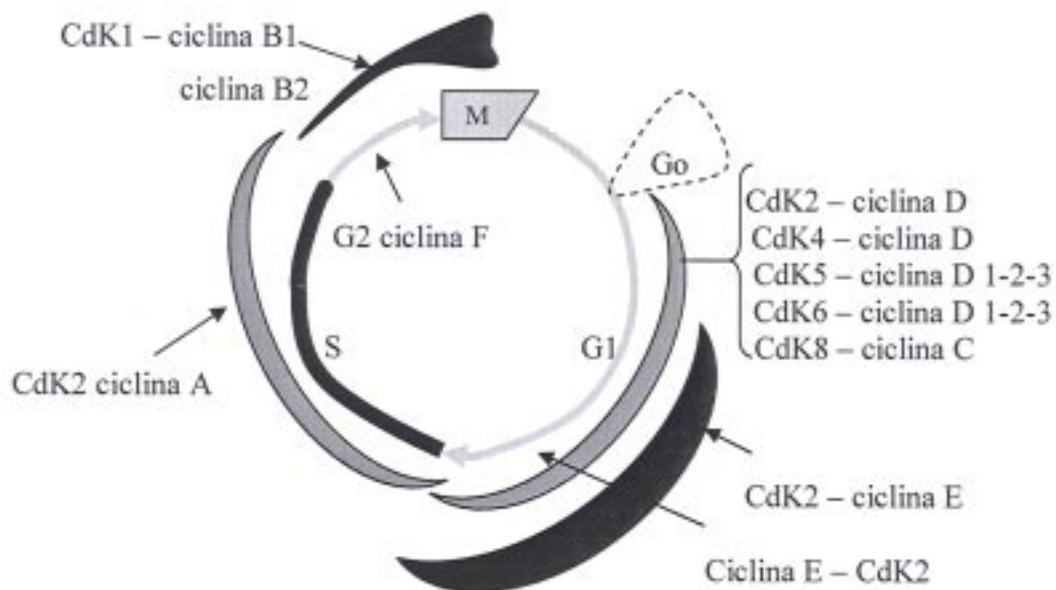


Figura 2. Acção de vários complexos CdK- ciclinas durante o ciclo celular.

Os complexos G1 CdK-ciclinas activam factores de transcrição sempre presentes na célula, que estimulam a transcrição de genes codificadores de enzimas da replicação de DNA e síntese dos desoxirribonucleótidos.

Na figura 2 esquematiza-se a acção de vários complexos CdK – ciclinas durante o ciclo celular de células mamíferas.

REGULAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA DA MIOGÉNESE

O crescimento das massas musculares dos animais, quer se trate dos músculos do esqueleto quer se trate de músculos cardíacos ou de outros, é regulado por controlo positivo (por exemplo pela expressão de genes da família Myo D, cujas proteínas expressas são factores de transcrição, portanto intracelulares) ou por controlo negativo (por exemplo pela expressão de genes da miostatina, cuja proteína expressa tem um péptido sinal que lhe permite ser segregada para o espaço extracelular e entrar na circulação sanguínea) (<http://www.synxpharma.com/news-2000-10-html>).

REGULAÇÃO POSITIVA DA MIOGÉNESE

O desenvolvimento dos músculos do esqueleto nos mamíferos é um bom sistema para se estudar o papel dos factores de transcrição e outros factores no controlo específico de cada tipo de célula (Dias Correia e Dias Correia, 2002).

As células musculares esqueléticas são fibras alongadas multinucleadas, podendo a miogénese nos animais ser dividida em três etapas: a determinação mioblástica, a migração e a diferenciação em tecido muscular, sendo os mioblastos provenientes dos somitos embrionários.

Os somitos são blocos de células mesodérmicas localizadas, no embrião, ao lado do tubo neural. Os mioblastos não estão, portanto, ainda diferenciados e migram dos somitos, diferenciando-se depois. A diferenciação é um processo em que estão implicadas mudanças na expressão dos genes que levam a que uma célula precursora origine ou se transforme numa célula especializada distinta.

As fibras musculares diferenciadas, portanto após a mitose, não são mais condicionáveis e apenas as células estaminais “stem cells” não diferenciadas são fonte de possíveis acréscimos ou recuperações musculares, sendo bem

verdade que a utilização mecânica dos músculos e a sua localização à superfície dos organismos dos animais, torna a recuperação muscular muitas vezes necessária.

O gene myo D (myogenic determination gene D) está implicado no desenvolvimento muscular onde desempenha um papel chave, estando identificados ainda três outros genes, o miogenina, o myf 5, e o mrf 4, que também funcionam no desenvolvimento muscular. As quatro proteínas miogénicas expressas por estes genes, são todas membros da família dos factores de transcrição que se ligam ao DNA através de domínios proteicos do tipo HLH (hélice-loop-hélice). Estas proteínas de arquitectura HLH formam homo e heterodímeros (estes com maior afinidade) que se ligam ao DNA numa determinada sequência CANNTG (sendo N conjuntos específicos de nucleótidos) chamada caixa E e que se encontra em múltiplas cópias (calcula-se que de 256 em 256 nucleótidos) na maioria dos “enhancers” (favorecedores) específicos dos genes dos músculos.

A expressão de qualquer uma das proteínas miogénicas pode induzir a diferenciação e desenvolvimento de células em fibras musculares.

A estrutura proteica e conformação dos factores de transcrição miogénicos pode condicionar fortemente a sua afinidade para os elementos de resposta no DNA, o que pode ser decisivo na quantidade e na qualidade da expressão dos genes produtores de proteínas musculares.

Nos adultos, como temos vindo a referir, persistem ainda alguns mioblastos em contacto com as células musculares maduras, e essas células satélites quiescentes, e em reserva digamos assim, podem ser activadas para proliferação e a sua descendência fundir-se e formar novas células musculares.

A regulação da miogénese passa pois por ter sede a diversos níveis, consoante as espécies animais e raças, destacando-se:

- a) Nas características da interacção dos factores de transcrição com os elementos do DNA que lhes respondem.
- b) Nas características e no número de somitos que originam mioblastos.
- c) Nas características e número de células satélites quiescentes e a fase da idade dos animais em que eles ainda são diferenciáveis.
- d) Na possibilidade de condicionar toda esta diferenciação através da utilização de factores de transcrição ou outros factores adequados e de células substrato que lhes respondam.

Salienta-se que o Myo D é expresso apenas nos músculos do esqueleto ou seus precursores, pois nas células não musculares o gene está reprimido por genes específicos (OMiM 159970).

Genes específicos dos músculos como os da creatina cinase, cadeias leves de miosina e miogenina possuem diversas caixas E nos seus “enhancers” ou promotores (Spiller *et al.*, 2002).

Estas caixas E (CANNTG) são portanto locais de interacção com factores de transcrição MRF contendo bHLH. Como já referimos os Myo D e Myf 5 são

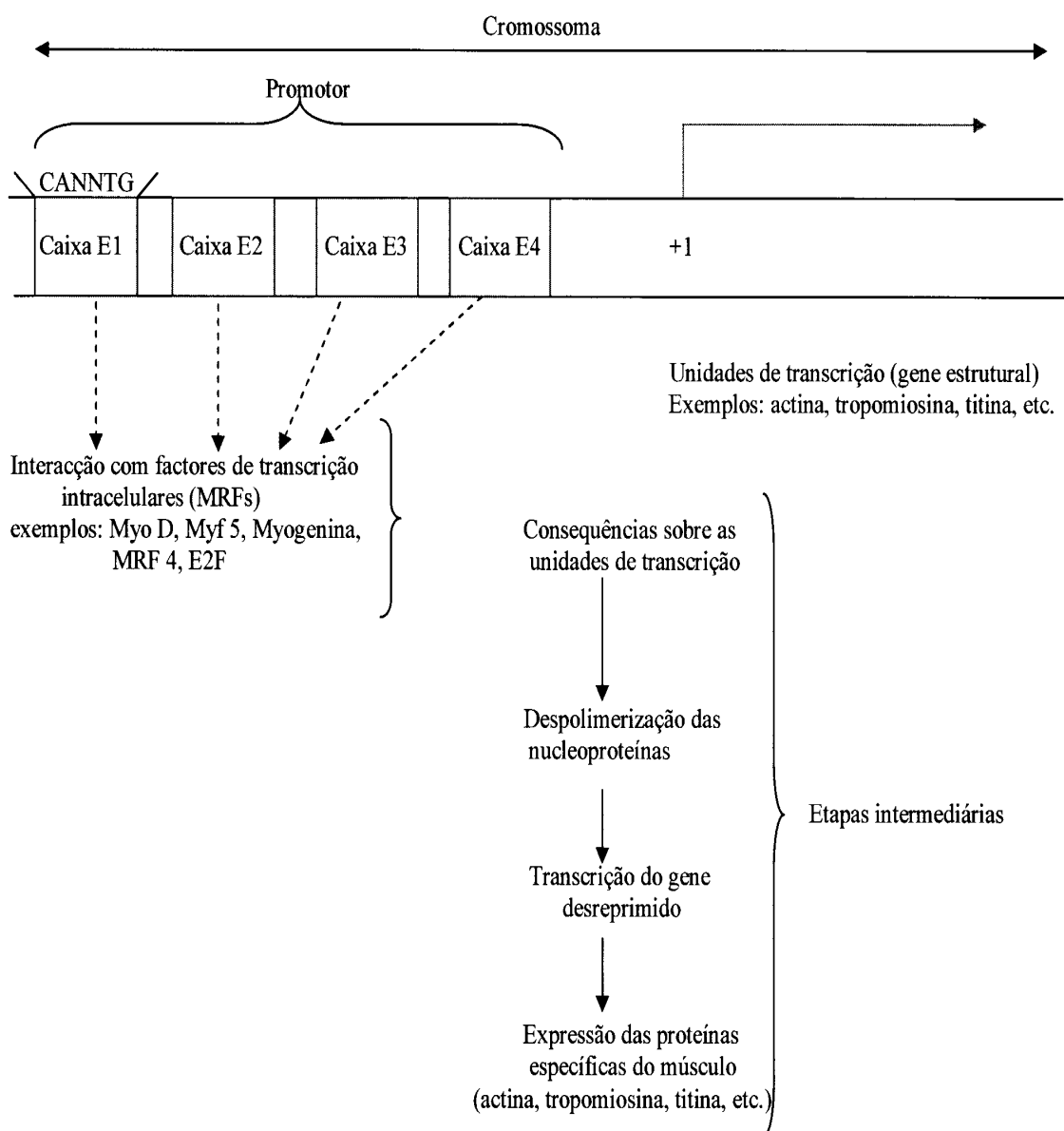


Figura 3. Exemplo de regulação positiva.

expressos nos mioblastos e nos miotubos, a miogenina parece influenciar a diferenciação dos mioblastos sendo necessária para a formação de miotubos, enquanto a MRF 4 parece influenciar as fases da diferenciação terminal (Spiller *et al.*, 2002).

A expressão da miostatina (um regulador negativo) está em parte dependente das MRFs (reguladores positivos) (Spiller *et al.*, 2002).

No esquema seguinte (Fig. 3) esboçamos a regulação positiva desencadeada por diversos factores MRFs no favorecimento da miogénese expressa por algumas unidades de transcrição e etapas intermediárias entre a interacção das MRFs com as caixas E e a consequente desrepressão dos genes estruturais e sua expressão.

As proteínas miogénicas reguladoras da miogénese podem estar interligadas com enzimas modificadoras da cromatina, sendo necessário modificar esta estrutura cromatínica para a partir de células embrionárias obter células musculares.

Por outro lado, há interacção entre os reguladores miogénicos contendo na sua estrutura bHLH e a “maquinaria” implicada no ciclo celular.

Dentro deste âmbito referimos seguidamente (Fig. 4) a estrutura funcional da Myo D e a sua possível regulação e papel regulador (Rupp *et al.*, 2002).

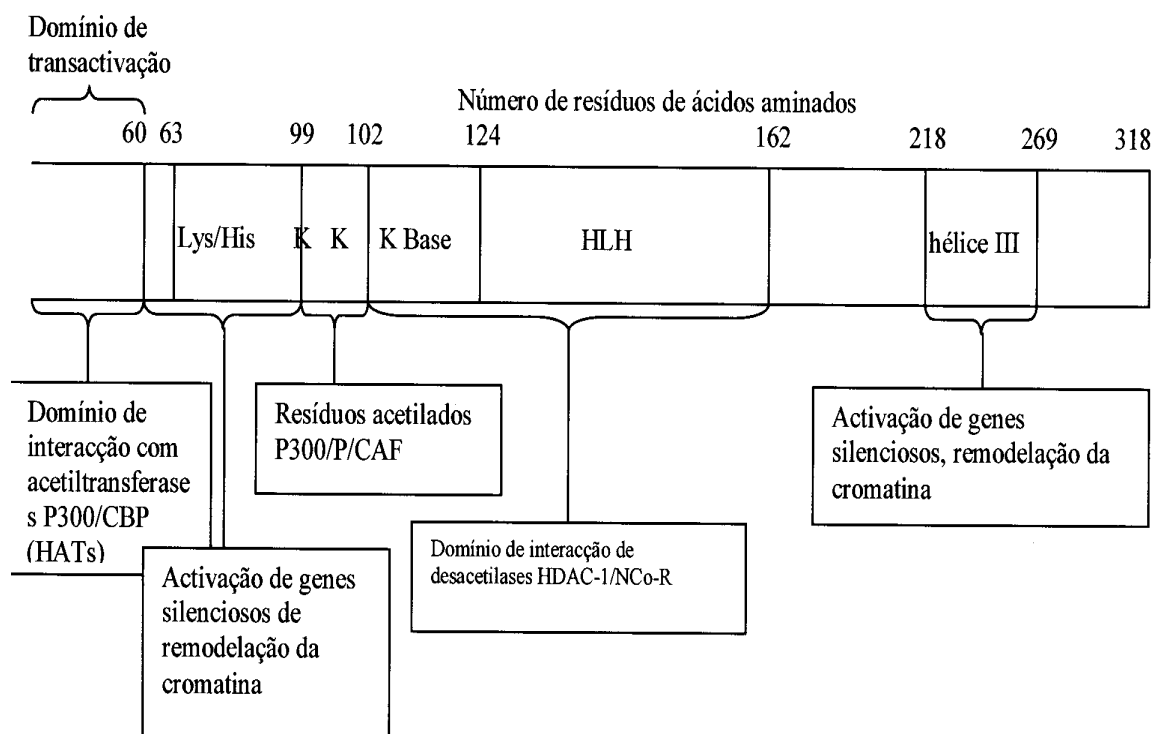


Figura 4. Exemplo da estrutura funcional da proteína Myo D (de rato) e sua regulação.

As actividades das proteínas miogénicas em particular a da Myo D são reguladas por dois tipos de actividades enzimáticas, pelas histonas acetiltransferases (HATs) tais como as p300/CBP, P/CAF e GCN 5/2 e pelas desacetilases (HDAC₂) das histonas (Khochbin *et al.*, 2001).

As primeiras (HATs) funcionam como coactivadores da Myo D (Eckner *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 1997), acetilando directamente a Myo D, o que aumenta a actividade desta proteína sendo portanto miogénicas, parecendo esta acetilação só ocorrer após a mitose. Nas células que já proliferaram, a Myo D está associada com a histona desacetilase (HDAC-1) que silenciaria os genes alvo da Myo D.

“In vivo”, a Myf 5 e a Myo D iniciam a transcrição de genes em diversos loci silenciosos, vendo-se na figura anterior que o Myo D utiliza dois domínios para remodelar a estrutura reprimida da cromatina actuando sobre regiões reguladoras de genes alvo como a miogenina ou a creatina cinase dos músculos.

A capacidade para remodelar a cromatina é um aspecto muito importante da função da Myo D o qual pode ser regulado por sinais extracelulares.

Também a hélice III da Myo D contribui para a remodelação da cromatina.

REGULAÇÃO NEGATIVA DA MIOGÉNESE

A miostatina (MSTN ou GDF 8) é um poderoso regulador negativo da massa de músculos do esqueleto, parecendo que a função da miostatina se encontra conservada entre as diversas espécies animais (Graham, 2001).

Investigações de diversa natureza têm demonstrado que o “switching off” do gene da MSTN em diversos mamíferos desencadeia o aparecimento nesses animais de hiperplasia muscular, ou seja aquilo que na gíria pecuária se designa por acréscimo muscular, musculatura dupla ou garupa dupla.

Também em animais experimentais em que foram desencadeados enfartes de miocárdio se verificou que nas células musculares lesadas destes corações existem altas concentrações de miostatina, ao contrário do que sucede em células de miocárdio normais.

A identificação de diversos inibidores da miostatina, proteína segregada e em circulação hemática nos animais, pode assim ter grande interesse quer na promoção do crescimento das massas musculares, quer no tratamento de situações patológicas, como por exemplo miopatias primárias ou secundárias.

A proteína miostatina das células mamíferas consiste num complexo de um pró-péptido N-terminal ligado não covalentemente com fragmentos de um dímero C-terminal ligado por pontes dissulfureto (Lee e McPherron, 2001).

Este dímero C-terminal da miostatina tem capacidade para interagir com receptores de activina do tipo II (Act R II B e numa extensão menor também com o Act R II A) (Lee e McPherron, 2001).

A interacção da miostatina com o Act R II B desencadeia cascatas de transdução de sinal, e pode ser inibida pela folistatina (F.S.) que é uma proteína que se liga à activina, e em mais elevadas concentrações pelo pró-péptido da miostatina.

Parece que este pró-péptido, bem como a folistatina e outras moléculas, podem bloquear a via de transdução de sinal desencadeada pela miostatina e favorecer assim o crescimento muscular.

A proteína folistatina produzida em quantidades excessivas (por engenharia adequada) no rato, provoca nestes o aparecimento de massas musculares muito mais desenvolvidas do que no rato normal, tal como sucede se os ratos produzirem um excesso de mutantes de receptores para a activina II, o mesmo sucedendo com o pró-péptido da miostatina (Guo *et al.*, 1998).

No entanto, a administração directa das proteínas referidas em cima (folistatina, receptor para a activina II, pró-péptido da miostatina e outros bloqueadores da MSTN) quer para produção de animais mais corpulentos, quer para tratamento de doenças que desgastem o tecido muscular, ou ainda a alteração do genoma animal desencadeando mutações ao nível do gene do MSTN que vão neste sentido, necessitam ser encaradas com cuidado devido às características por elas desencadeadas nos animais em causa.

A miostatina é expressa inicialmente nos somitos em desenvolvimento e depois continua a ser expressa nas linhagens miogénicas através do seu desenvolvimento e nos animais adultos (Lee e McPherron, 2001).

O perfil de expressão da MSTN corresponde a uma elevada expressão nos estados embrionários e fetais e a uma expressão em menor grau no tecido muscular adulto (Thomas *et al.*, 2000).

A MSTN é expressa no tecido muscular após o nascimento dos animais e influencia também o tecido muscular adulto, variando os seus perfis de expressão consoante os estádios fisiológicos (Thomas *et al.*, 2000).

A miostatina é um factor de crescimento segregado para o sangue, factor que é processado através de proteólise que origina uma miostatina madura C-terminal e um péptido N-terminal associado com o estado latente nos mioblastos.

Todas as proteínas da família de factores α de transformação do crescimento (TGF- α) como a miostatina são processadas proteoliticamente no local da

sua síntese e os péptidos maduros activos segregados para o sangue (McPheron e Lee, 1996).

A expressão da miostatina pode ser retro-inibida por miostatina não funcional, constituindo um factor de diferenciação essencial para a regulação da massa dos músculos do esqueleto.

A miostatina encontra-se altamente conservada nas diversas espécies animais, sendo-o a 100% nos ratos, humanos, porcos, frangos e perus, na região C-terminal, enquanto nos mônos (baboon), bovinos e ovinos apenas existem 1 a 5 ácidos aminados diferentes na miostatina madura (McPherron e Lee, 1997).

As sequências dos promotores do gene da MSTN também se encontram altamente conservadas entre as espécies animais. No caso deste gene promotor nos bovinos, verificou-se que ele contém 10 caixas E (E1 a E10) organizadas em três “clusters” e um só local MEF 2 (família de proteínas reguladoras envolvidas na miogénese com as proteínas miogénicas com domínios bHLH) (Langley *et al.*, 2002).

Os factores reguladores da miogénese MRFs, como a Myo D, regulam de preferência positivamente (up-regulate) a actividade de promotor da miostatina.

A expressão da Myo D varia ao longo do ciclo celular dos mioblastos e a actividade do promotor da miostatina é mais alta durante a fase G1 do ciclo celular, quando a expressão da Myo D é máxima.

Nas células em reserva, ou seja quiescentes, sem exprimirem Myo D, há uma significativa redução da actividade do promotor da miostatina (Langley *et al.*, 2002).

O gene da miostatina é pois um alvo da Myo D. Como a miostatina regula a progressão G1 para S nos mioblastos, a Myo D pode desencadear a interrupção do ciclo celular nos mioblastos ao regular a expressão dos genes da miostatina.

A miostatina encontra-se em diversos tecidos dos músculos do esqueleto, bem como no coração, glândula mamária, etc (Ji *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1999).

A miostatina é uma proteína sintetizada nos músculos do esqueleto na forma de um pró-péptido de 375 ácidos aminados que depois é processado proteoliticamente, como já referimos, dando lugar a um péptido activo de 26 KDa, o qual constitui o péptido maduro que se liga ao receptor e desencadeia acções biológicas (McPheron e Lee, 1996; Thomas *et al.*, 2000).

No gene promotor da miostatina bovina que contém as dez caixas E (E1 a E10) é a caixa E6 que interacciona com a Myo D “in vitro” e “in vivo” regulando assim positivamente a actividade do promotor da miostatina (Spiller *et al.*, 2002).

Passemos seguidamente a considerar de forma esquemática a regulação negativa da miogénese pela miostatina actuando através das cascatas de transdução de sinal.

Assim, abordaremos:

- Em A, a regulação pela MSTN com a intervenção dos complexos CdK (cinases dependentes de ciclinas) e CdK I ou sejam inibidores de cinases dependentes de ciclinas (com quantidades aumentadas ou diminuídas de MSTN) na replicação celular (Fig. 5).
- Em B, a intervenção do retinoblastoma como um dos transdutores do sinal desencadeado pela MSTN (em B1 na presença de MSTN, Fig. 6 , e em B2, Fig. 7, na ausência de MSTN) na replicação celular.
- Em C, a intervenção do Smad3 como transdutor do sinal regulado pela MSTN na replicação e diferenciação celular (Fig. 8).

REGULAÇÃO NEGATIVA NO FAVORECIMENTO DA MIOGÉNESE

Regulação pela miostatina de diversos genes implicados na activação ou inactivação do ciclo celular e conseqüente proliferação e diferenciação.

A – Intervenção de complexos CdK/CdK I (p21).

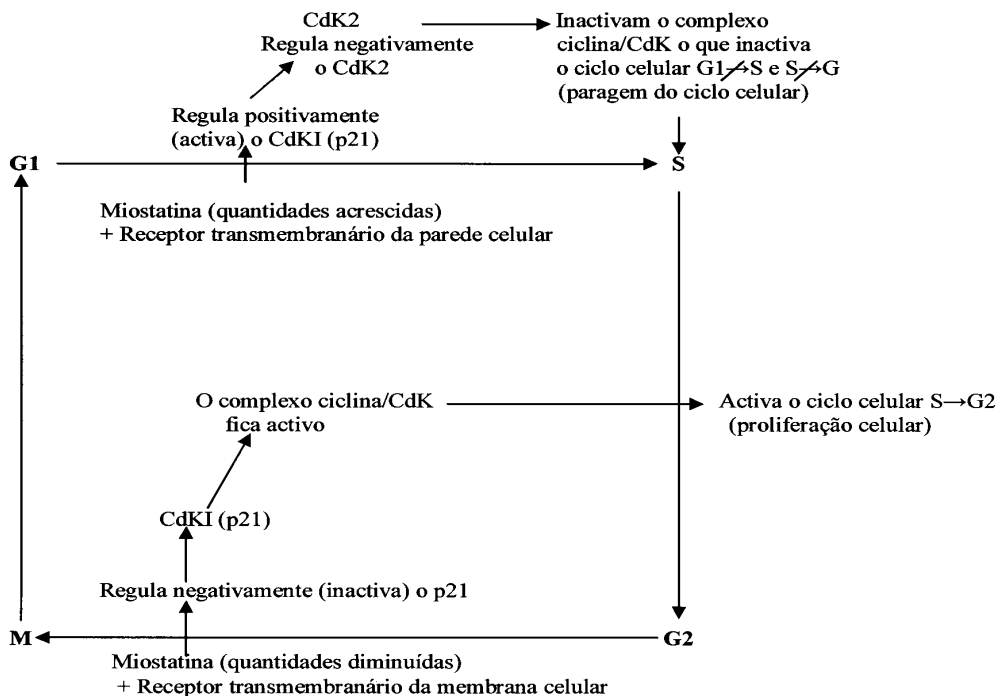


Figura 5. Miostatina e intervenção de complexos CdK/CdKI (p21).

No exemplo anterior a miostatina controla a progressão do ciclo celular dos mioblastos (Arnold *et al.*, 2001).

B – Intervenção do retinoblastoma (Rb) transdutor de sinais ligando o ciclo celular com a “maquinaria” de transcrição. (Modelo proposto) (Thomas *et al.*, 2000).

B1 – Na presença de miostatina funcional.

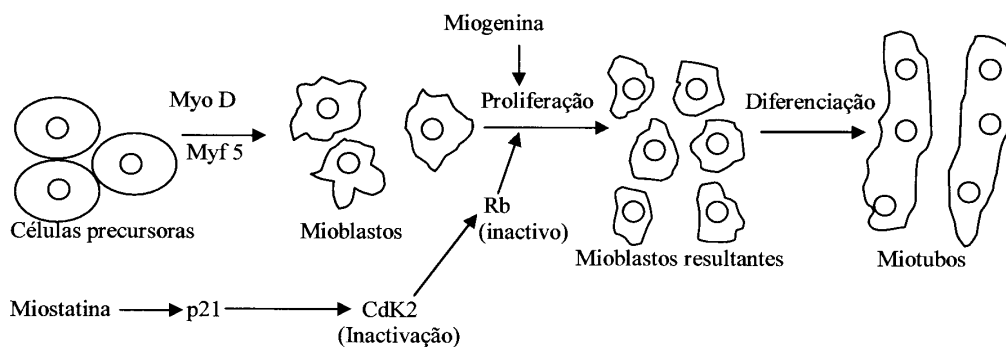


Figura 6. Retinoblastoma na presença de miostatina funcional.

Em B1 descreve-se a miogénese durante a embriogénese em que o Myf 5 e o Myo D determinam as células a seguirem para a formação de mioblastos, migrando estes depois e proliferando. Na presença de miostatina funcional o p21 (CDK I) é regulado positivamente, o que leva à inibição da actividade da ciclina E – CdK 2, o que origina a inativação do transdutor de sinal Rb que fica hipofosfatado levando à paragem do ciclo celular na etapa G1, o que tem como consequência que o número de mioblastos e fibras musculares resultantes da diferenciação (miotubos) é limitado.

B2 – Na ausência de miostatina funcional.

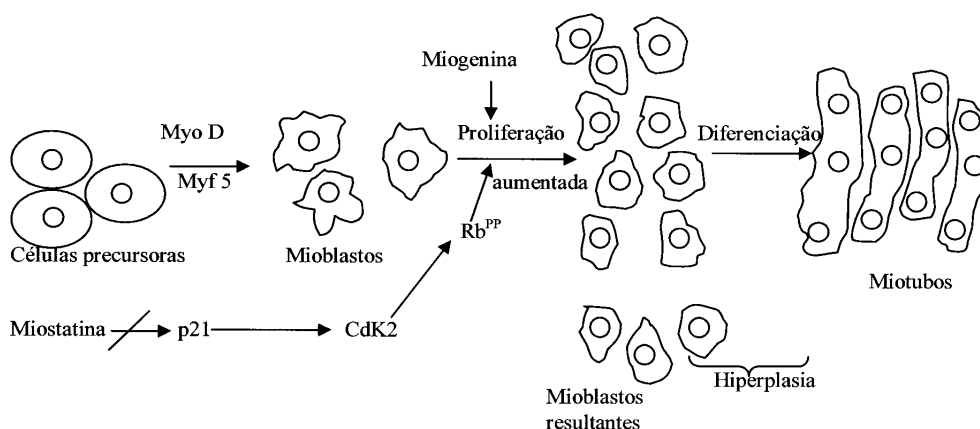


Figura 7. Retinoblastoma na ausência de miostatina funcional.

Neste caso, dado a ausência de miostatina funcional, o sinal desencadeado pelo inibidor p21 perde-se e o Rb permanece numa forma hiperfosfatada o que origina um aumento da proliferação dos mioblastos e que leva a um aumento do número de fibras musculares (miotubos).

C – Intervenção do Smad 3 transdutor de sinal intracelular na diferenciação dos mioblastos em miotubos (Langley *et al.*, 2002).

A miostatina é um inibidor da diferenciação dos mioblastos, sendo neste exemplo esta acção mediada pelo Smad 3.

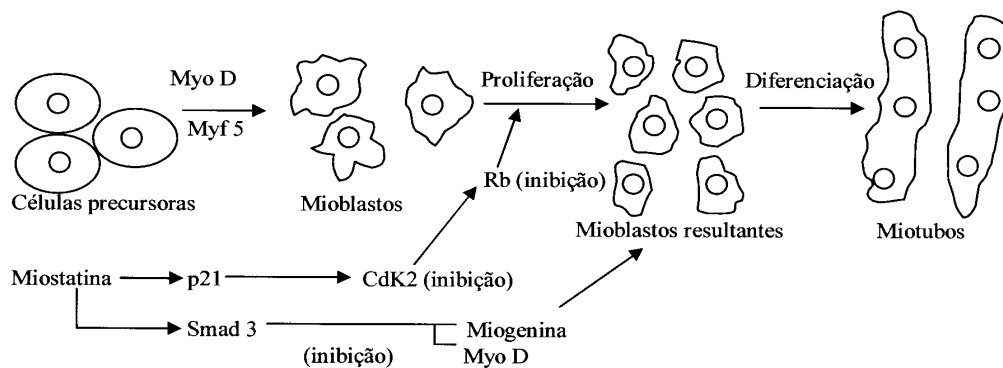


Figura 8. Acção mediada pelo Smad 3.

Na parte de cima desta figura mostra-se que em resposta ao destino diferenciação a Myo D torna-se plenamente funcional activando a expressão de genes miogénicos, como é o caso da miogenina e p21, o que leva a que os mioblastos resultantes se fundam em miotubos multinucleados.

Em baixo mostra-se que a miostatina regula este processo inibindo a expressão de Myo D, através do Smad3, após o destino diferenciação, o que leva a uma perda da expressão dos genes miogénicos bem como da diferenciação.

Os sinais desencadeados especificamente pela miostatina induzem a fosfatação do Smad 3 e aumenta a associação deste com a Myo D (Smad 3-Myo D complexo), o que leva a admitir que a miostatina, através do Smad 3, interfere na actividade do Myo D e sua expressão, o que origina uma falha dos mioblastos que não se diferenciam para miotubos.

O Smad 3 interactua com o domínio bHLH da Myo D interferindo portanto na formação do complexo proteico Myo D – E.

A miostatina reprime pois as concentrações de Myo D, Myf 5, miogenina e p21 originando uma inibição da diferenciação miogénica.

Em resumo, a miostatina (MSTN) controla a progressão do ciclo celular dos mioblastos, inibindo a progressão destes da fase G1 para a fase S (Spiller *et al.*, 2002).

A miostatina regula negativamente as taxas proteicas de CdK 2 e regula positivamente os níveis do inibidor deste, ou seja o p21 (CdK I), inactivando portanto as CdK 2, do que resulta a hipofosfatação do pRb o que leva ao sequestro dos factores de transcrição E2F (uma família de proteínas essenciais para a progressão G1/S) (Spiller *et al.*, 2002).

. A hiperplasia consequente à ausência de miostatina deve-se a um aumento da proliferação dos mioblastos em virtude da “desregulação” do ponto crítico G1/S (Kretser *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O crescimento do tecido muscular é regulado por factores positivos (MRFs) e factores negativos (miostatina MSTN e elementos das cascatas de transdução de sinal por ela desencadeadas).

As etapas de activação e proliferação celular, diferenciação celular e interrupção do ciclo celular, com todos os sistemas enzimáticos envolvidos nestes processos, estão subjacentes à regulação por aqueles factores.

Numa perspectiva de produção animal (creatopieise) ou de acréscimo de performance (animais de desporto, touros de lide, etc.) ou de terapêutica de situação patológica com sede no tecido muscular, os conhecimentos das diversas etapas da biologia molecular reguladora da miogénese são fundamentais.

BIBLIOGRAFIA

- Arnold, H., Della-Fera, M.A.e Baile, C.A., 2001. Review of myostatin history,physiology and applications.Int. Arch. Biosci.,1014-1022.
- Assoian, R.K., 1997. Anchorage-dependent cell cycle progression. J. Cell Biol., 136(1): 1-4.
- Dias Correia, J.H.R.e Dias Correia, A.A., 2002. Regulação da miogenese nos mamíferos. Proc. do Congresso de Ciências Veterinárias,Tagus Park,Oeira, pp.533-534.
- Diffley, J.F.X. e Labib, K., 2002. The chromosome replication cycle. J. Cell Sci.,115: 869-872.
- Eckner, R.,Yao, T.R., Oldread, E. e Livingston, D.M., 1996 .Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation.Genes Dev.,10: 2478-2490.

- Graham, S., 2001. Genetically engineered "mighty mice" may shed light on muscle-wasting diseases. In *Scientific American* com. News July 18 <http://www.sciam.com/article.cfm?articleID=000C7A79-3BE7-1C60-B882809EC588ED9F>.
- Guo, Q., Kumor, T.R., Woodruff, T., Hadsell, L.A., D. e Mayo, F.J. e Matzuk, M.M., 1998. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 12 (1): 96-106.
- Hawke, T.J. e Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Applied Physiol.*, 91: 534-551.
- http://www.synxpharma.com/news_2000_10_html. (SYN X Pharma Inc.)
- Hunter, J.G., Van Delft, M.F., Rachubinski, R.A. e Capone, J.P., 2001. Peroxisome proliferator-activated α ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent and-independent pathways. *J. Biol. Chem.*, 276: 38297-38306
- Israels, E.D. e Israels, L.G., 2001. The cell cycle. *Stem cells*, 19(1): 88-91.
- Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F. e Shurlock, M.F., 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol.*, 275: R1265-R1273.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. e Celgneurin-Berry, D., 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 11: 162-166.
- Kretser, de D.M., Hedger, M.P. e Philips, D.J., 1999. Activin A and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation. *J. Endocrinology*, 161: 195-198.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. e Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.*, 277(51): 49831-49840.
- Lee, S.J. e McPherron, A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98(6): 9306-9311.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. e Darnel, J., 1995. *Molecular Cell Biology*. 3ed. Scientific American Books.
- McPherron, A.C. e Lee, S., 1996. The transforming growth factor- β super family. *Growth Factors Cytokines Health Dis.*, 1: 357-393.
- McPherron, A.C. e Lee, S.J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12457-12461.
- Odelberg, S.J., Kollhoff, A. e Keating, M.T., 2000. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell*, 103: 1099-1109.
- Puri, P.L., Avaggiati, M.L., Balsano, C., Sang, N., Graessmann, A., Giordano, A. e Levrero, M., 1997. 300 is required for MyoD dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.*, 16: 369-383.
- Rupp, R.A., Singhal, N. e Veenstra, G.J.C., 2002. When the embryonic genome flexes its muscles. Chromatin and myogenic transcription regulation. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2294-2299.

- Sharma, M.R., Kambadur, R., Mathews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Foake, P.J. e Bass, J.J., 1999 .Myostatin,a transforming growth factor-beta superfamily member,is expressed in heart muscle and its upregulated in cardio myocytes after infarct. *J. Cell Physiol.*, 180: 1-9.
- Sherr, C.J. e Roberts, J.M., 1999 .CDK inhibitors:positive and negative regulators of G1-phase progression.*Genes & Development*, 13(12): 1501-1512.
- Spiller, M.P., Kambadur, R., Jeanplong, F.,Thomas, M., Martyn, J.K., Bass, J.J. e Sharma, M., 2002 .The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol. Cellular Biology*, 22(20): 7066-7082.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. e Kambadur,R., 2000 . Myostatin,a negative regulator of muscle growth,functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.*, 275(51): 40235-40243.