

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CALPAÍNA E  
CALPASTATINA E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE  
DA CARNE DE BOVINOS DA RAÇA NELORE (*Bos indicus*)**

**Victor Augusto Domingos Dias**

Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CALPAÍNA E  
CALPASTATINA E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE  
DA CARNE DE BOVINOS DA RAÇA NELORE (*Bos indicus*)**

**Victor Augusto Domingos Dias**

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira  
Coorientador: Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

**2016**

D541e Dias, Victor Augusto Domingos  
Expressão das proteínas calpaína e calpastatina e suas relações com a qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) / Victor Augusto Domingos Dias. -- Jaboticabal, 2016  
vi, 63 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Henrique Nunes de Oliveira

Coorientador: Luis Artur Loyola Chardulo

Banca examinadora: Saulo da Luz e Silva, Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva, Humberto Tonhati, Fernando Sebastian Baldi Rey

Bibliografia

1. *Western Blot*. 2. Proteólise. 3. Qualidade da carne. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:637.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CALPAÍNA E CALPASTATINA E SUAS  
RELAÇÕES COM A QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*)

AUTOR: VICTOR AUGUSTO DOMINGOS DIAS  
ORIENTADOR: HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA  
CO-ORIENTADOR: LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em ZOOTECNIA, pela  
Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO  
Departamento de Química e Bioquímica / UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. SAULO DA LUZ E SILVA  
Campus de Pirassununga/SP - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP

Prof. Dr. JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA  
Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu

Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI  
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. FERNANDO SEBASTIAN BALDI REY  
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de agosto de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

VICTOR AUGUSTO DOMINGOS DIAS - Nascido em 18 de setembro de 1986, na cidade de Itapetininga – SP, filho de Wilson Dias Junior e Sonia Maria Domingos Dias. Iniciou em março de 2005 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, campus de Botucatu – SP, obtendo o título de Zootecnista em dezembro de 2009. Em março de 2010 ingressou no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Unesp, campus de Jaboticabal – SP, obtendo o grau de Mestre em Genética e Melhoramento Animal em 28 de fevereiro de 2012, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira e sob a coorientação do Prof. Dr. Rogerio Abdallah Curi. Em março de 2012, ingressou no programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, campus de Jaboticabal – SP, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira e sob a coorientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo. Realizou estágio de doutorado sanduíche no exterior no período de fevereiro de 2015 a outubro de 2015 na Università Degli Studi di Padova, Itália, como bolsista CAPES do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), sob orientação do Dr. Paolo Carnier.

“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz”

Ayrton Senna

“Ninguém vai bater mais forte que a vida. Não importa como você vai bater e sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha. ”

Sylvester Stallone (Rocky Balboa, 2007)

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabalho aos meus pais WILSON DIAS JUNIOR e SONIA MARIA DOMINGOS DIAS, pelo amor e esforço dedicado para me dar educação de qualidade e pela formação do meu caráter. Os amos muito e tudo que sou e serei é graças aos pais maravilhosos que tive em minha vida.

Ao meu irmão Octavio Henrique Domingos Dias, pelo apoio e amizade em todos os momentos.

A toda minha família, tias, tios, primos e primas por todas as formas de carinho e incentivo sempre que os encontro e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

E a todos aqueles de alguma forma contribuíram para minha formação e para a finalização do doutorado

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida, pela família fantástica que me concedeu e, principalmente, por estar sempre comigo iluminando meu caminho.

À minha família por me oferecer condições para que eu pudesse estudar e me tornar mestre e doutor.

Ao Professor Henrique e Luis Artur pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional a mim oferecidas.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva, Prof. Dr. Humberto Tonhati, Prof. Dr. Fernando Sebastian Baldi Rey e Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, pelas valiosas sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos amigos de laboratório que ajudaram muito para a realização das análises deste trabalho, em especial Jessica Moraes Malheiros.

A Professora Maeli Dal Pai por abrir a porta de seu laboratório para serem realizadas algumas análises apresentadas neste trabalho, e aos amigos Ivan Vechetti Junior e Bruno Oliveira da Silva Duran, pela dedicação e paciência em auxiliar em tudo que foi necessário para realização das análises.

Gostaria de agradecer a professora Giuseppina Pace Pereira Lima, que ajudou com o primeiro contato para a realização do estágio, e ao Prof. Paolo Carnier por ter me aceito e possibilitado de desenvolver um trabalho juntamente com sua equipe.

A todos os meus amigos e companheiros que encontrei na cidade de Padova e na Università Degli Studi di Padova pela calorosa acolhida no período longe de casa. Em especial, deixo meu abraço de agradecimento à Roberta Rostellato e Valentina Bonfatti, que me ajudaram no desenvolvimento da pesquisa, aos companheiros de casa Vittoria Zangaro, Giorgia Fattori, Elena Tessari e Simone Battaglin. Aos amigos



brasileiros que encontrei em Padova, Junior, Fernanda, Henrique, Vanessa, Aline, Simone e Thaise.

Agradeço também a paciência e o companheirismo aos amigos Vitor Furtado e Gilmar Picoli que foram durante um curto período companheiros de casa em Botucatu.

Agradeço também aos irmãos da Republica Santa Cerva pelo apoio e sempre que necessário me acolheram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por me agraciar com a concessão da bolsa de estudos e tornar esse sonho possível. Também por tornar possível a realização dos trabalhos em Padova através do financiamento pelo programa PDSE (Processo: PDSE 99999.010090/2014-02).

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Situação da pecuária de corte no Brasil.....	2
2.2. Influências do crescimento animal na qualidade da carne.....	3
2.3. Qualidade da carne bovina.....	6
2.3.1. Maciez da carne e sua mensuração.....	7
2.4. Estrutura e composição do tecido muscular.....	8
2.5. Transformação do músculo em carne.....	12
2.5.1. Estabelecimento do <i>Rigor Mortis</i> .....	12
2.5.2. Proteólise muscular.....	14
2.5.3. Maturação.....	15
2.6. Sistema proteolítico calpaína e calpastatina.....	15
2.7. Utilização da biotecnologia no melhoramento animal.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais e local experimental.....	20
3.2. Manejo, Arraçamento e cuidado com os animais.....	20
3.3. Abate e coleta das amostras.....	22
3.4. Análises físico-químicas da carne.....	22
3.4.1. Área de olho de lombo.....	22
3.4.2. Coloração instrumental da carne.....	24
3.4.3. Perdas por cozimento.....	24
3.4.4. Força de Cisalhamento.....	24
3.4.5. Determinação do índice de fragmentação miofibrilar.....	25
3.4.6. Quantificação dos lipídios totais.....	25
3.5. Seleção dos grupos contrastantes.....	26

3.6. Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR).....	26
3.6.1. Extração de RNA total.....	26
3.6.2. Análise da integridade do RNA total.....	27
3.6.3. Tratamento do RNA com DNASE.....	27
3.6.4. Reação de transcrição reversa (RT).....	27
3.6.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real após a transcrição reversa (RqPCR).....	28
3.6.5.1. Escolha dos genes de referência.....	28
3.6.5.2. Determinação dos parâmetros da reação.....	30
3.7. Separação eletroforética das proteínas.....	30
3.7.1. Preparação das amostras.....	30
3.7.2. Eletroforese para detecção e quantificação das proteínas de baixo peso molecular.....	31
3.8. “ <i>Western Blotting</i> ”.....	31
3.8.1. Extração das proteínas.....	31
3.8.2. Electrotransferência das proteínas.....	31
3.8.3. Incubação com os anticorpos.....	32
3.8.4. Detecção das bandas.....	32
3.9. Análises estatísticas.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Características de carcaça, desempenho produtivo e de qualidade da carne.....	34
4.2. Expressão gênica dos genes do complexo enzimático das calpaínas.....	38
4.3. Detecção e quantificação das enzimas das calpaínas e calpastatina.....	41
4.4. Degradação das proteínas miofibrilares de baixo peso molecular.....	45
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	48

## EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CALPAÍNA E CALPASTATINA E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS DA RAÇA NELORE (*Bos indicus*).

**RESUMO** - A atuação das enzimas proteolíticas durante o *post-mortem* é um dos principais fatores que determinam a qualidade da carne, sendo as enzimas calpaína e calpastatina uma das principais atuantes neste processo. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a expressão gênica dos genes *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST*, a quantificação das enzimas  $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina, dentro de grupos contrastantes para maciez e crescimento animal. Foram utilizados dados de 90 animais machos não castrados da raça Nelore, com idade aproximada de 24 meses, permanecendo em confinamento por 95 dias. Após o abate foram colhidas amostras do músculo *Longissimus thoracis* entre a 9ª e 13ª costelas, da meia-carcaça esquerda. As amostras coletadas foram utilizadas para medir a área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização (IM), perdas por cozimento, coloração instrumental da carne e força de cisalhamento (FC). A partir do restante da carne, foram coletadas alíquotas para a realização das análises de índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e lipídeos totais (LT). Foram coletadas alíquotas para a análise da expressão gênica e quantificação das enzimas. Os dados de força de cisalhamento foram utilizados como critério para a separação em carne macia e dura. Também foram utilizadas o ganho de peso para a separação quanto ao crescimento animal. Os seguintes grupos (n=10) foram formados: Leve, Pesado, Duro e Macio. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM e MIXED do programa SAS. No presente trabalho não foi encontrada diferença nas expressões dos genes *CAPN1* e *CAPN2* entre os grupos. Para o grupo contrastante para maciez também não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a quantidade das enzimas  $\mu$  e m-calpaína, e da calpastatina. Não foi encontrada correlação da quantidade das enzimas  $\mu$  e m-calpaína, e calpastatina com as características PF e GP. Não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo contrastante para maciez da quantidade das enzimas  $\mu$  e m-calpaína. Porém foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a quantidade da enzima calpastatina, onde os animais do grupo de carne dura apresentaram maiores valores em relação aos de carne macia. Além de apresentarem uma alta correlação entre a quantidade de calpastatina e as características FC (0) e FC (7) ( $r = 0,81$  e  $0,74$ , respectivamente). A diferença entre os grupos contrastantes e a alta correlação entre os níveis de calpastatina com as características de maciez demonstra a importância do sistema das calpains na proteólise das miofibrilas, sendo os níveis de calpastatina um alvo potencial para a seleção de animais, com o objetivo de melhorar as características da qualidade da carne dos animais da raça Nelore

**Palavras-chave:** Western Blot, Proteólise, Qualidade da carne

## PROTEIN EXPRESSION OF CALPAIN AND CALPASTATIN AND ITS RELATIONS WITH QUALITY MEAT OF CATTLE BREED NELORE (*Bos Indicus*).

**ABSTRACT** - The role of proteolytic enzymes during the post-mortem is one of the main factors that determine the quality of the meat, and the enzymes calpain and calpastatin are one of the main factors in this process. The aim of this study was to evaluate the gene expression of the genes *CAPN1*, *CAPN2* and *CAST*, and quantify the enzymes  $\mu$ -calpain, m-calpain and calpastatin within contrasting groups animal growth, and toughness. 90 animals data were used uncastrated male Nelore, aged approximately 24 months remaining in confinement for 95 days. After slaughter were harvested Longissimus muscle samples *thoracis* between the 9th and 13th ribs, the left half-carcass. The samples were used to measure the ribeye area (REA), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling index (MI), cooking loss, instrumental color of the meat and shear force (SF). From the rest of the meat, aliquots were collected to perform the myofibrillar fragmentation index analysis (MFI) and total lipids (TL). Were collected aliquots for the analysis of gene expression and quantification of enzymes. The data of shear force were used as criteria for the separation of tender and tough meat. The characteristics of weight gain for the separation on the animal growth were also used. The following groups (n=10) were formed: lightweight, Heavy, tough meat and tender meat. Statistical analyzes were performed using the GLM and MIXED procedure of Statistical Analysis System program. In this study there was no difference in the expression of *CAPN1* and *CAPN2* genes between the groups. In this study there was no difference in the expressions of *CAPN1* and *CAPN2* genes between the groups. For the contrasting group for tenderness meat was also no significant difference ( $p < 0.05$ ) for the amount of enzymes  $\mu$  and m-calpain, and calpastatin. There was no correlation between the amount of  $\mu$  and m-calpain enzymes, and calpastatin with PF and GP. There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) for the contrasting group for meat tenderness of the amount of enzyme  $\mu$  and m-calpain. However, a significant difference ( $p < 0.05$ ) for the amount of enzyme calpastatin where animals of tough meat group had higher values on the tender meat. In addition to having a high correlation between the amount of characteristics calpastatin and SF (0) and SF (7) ( $r = 0.81$  and  $0.74$ , respectively). The difference between the contrasting groups and the high correlation between the calpastatin levels with tenderness characteristics demonstrates the importance of the system of calpains proteolysis of myofibrils, and the calpastatin levels of a potential target for the selection of animals for the purpose of improve the quality characteristics of the meat of Nelore.

**Keywords:** Western Blot, Proteolysis, meat quality

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva sigmóide de crescimento de bovinos de diferentes tamanhos a maturidade ( <i>frame-size</i> ).....	4
Figura 2. Curva de desenvolvimento dos tecidos corporais: tecido ósseo, muscular e adiposo.....	5
Figura 3. Desenho esquemático ilustrando a organização do músculo estriado esquelético.....	9
Figura 4. Organização da fibra muscular.....	10
Figura 5. Representação do filamento fino e do complexo das troponinas.....	11
Figura 6. Medição da área de olho de lombo (AOL) através do método dos quadrantes.....	23
Figura 7. Escala de graduação visual do índice de marmorização.....	23
Figura 8. Avaliação da qualidade do RNA total através da imagem do gel obtido pela eletroforese, mostrando as bandas 18S e 28S.....	27
Figura 9. Gráfico de estabilidade de expressão dos genes de referência gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> ), $\beta$ -actin ( <i>ACTB</i> ) e TATA binding box protein ( <i>TBP</i> ).....	29
Figura 10. Expressão dos genes <i>CAPN1</i> e <i>CAPN2</i> dos grupos contrastantes. (A) crescimento (animais pesados/animais leves) e (B) maciez (carne dura/carne macia).....	39
Figura 11. “Western blots” da $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina, preparados a partir dos géis a 8%.....	41
Figura 12. Quantificação das enzimas $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina. (A) crescimento (animais pesados/animais leves) e (B) maciez (carne dura/carne macia).....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e cálculo da composição nutricional das dietas experimentais.....	21
Tabela 2. Número de acesso dos ensaios customizados TaqMan® (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	28
Tabela 3. Valores médios e erro padrão das características de carcaça e crescimento dos grupos contrastantes.....	35
Tabela 4. Valores médios e erro padrão das características de qualidade da carne dos grupos contrastantes para 24 horas (0) e sete dias (7) após o abate.....	36
Tabela 5. Correlação da expressão dos genes <i>CAPN1</i> e <i>CAPN2</i> com a força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI) nos dias 0 e 7, peso final (PF) e ganho de peso (GP).....	40
Tabela 6. Correlação entre as medidas da maciez da carne e de crescimento e a quantidade das enzimas proteolíticas.....	44
Tabela 7. Valores médios e erro padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas desmina, troponina T, troponina I, $\alpha$ -tropomiosina e $\beta$ -tropomiosina.....	45
Tabela 8. Correlação dos índices de densidade óptica (IOD) das proteínas miofibrilares com a força de cisalhamento (FC) e o índice de fragmentação miofibrilar (MFI) 24 horas (0) e sete dias (7) após o abate.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem ocupado posição de destaque mundial no setor de bovinocultura de corte, sendo o segundo maior produtor de carne bovina, atrás somente dos EUA, mas é líder mundial nas exportações (ABIEC, 2015). Estes números colocam a cadeia produtiva da carne como um dos principais setores da economia brasileira.

Esta posição de destaque da cadeia produtiva da carne se deve ao baixo custo de produção, a vasta extensão territorial e ao fato do Brasil possuir rebanhos formados por animais adaptados as condições climáticas do país (USDA, 2013). Apesar disto a carne brasileira é conhecida como de baixa qualidade, o que torna a sua melhoria oportunidade para o setor em agregar valor ao produto, possibilitando aumento na rentabilidade e oportunidade de exportação para mercados mais exigentes.

O conceito de carne de qualidade é complexo e com muitas variáveis, sendo influenciada principalmente pela genética, e outros fatores como sexo, idade, nutrição, manejo pré e pós abate (ANDERSON et al., 2012). Dentre as características de qualidade da carne a maciez é a principal. É avaliada no momento do consumo, sendo o atributo que faz com que o consumidor compre novamente o produto e se disponha a pagar mais por ele (KOOHMARAIE et al., 2002). Entretanto, a viabilização de estratégia segura para a implementação de programa de melhoramento para a maciez da carne não é simples (KOOHMARAIE et al., 2006). A busca pela compreensão dos processos que interferem na transformação de músculo em carne, em âmbito molecular pode nortear o estabelecimento de novas estratégias para encontrar indicadores da maciez da carne bovina a serem utilizados como ferramenta para selecionar de forma eficiente os animais superiores para a característica (KIRINUS et al., 2014).

As variações encontradas em animais zebuínos em relação à maciez da carne têm sido atribuídas a diferentes níveis de enzimas proteolíticas encontradas nos músculos durante o *post-mortem* (SHACKELFORD et al., 1995; RUBENSAM et al., 1998; FERGUSON et al., 2001). Está bem estabelecido que a melhora da maciez da carne durante o *post-mortem* resulta principalmente do enfraquecimento e alterações da estrutura miofibrilar por enzimas proteolíticas (HUANG et al., 2011; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Evidências sugerem que as principais enzimas envolvidas neste



processo são as calpaínas e seu inibidor, a calpastatina (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; HUFF-LONERGAN et al., 2010). Alguns autores sugerem que diferenças neste complexo enzimático são responsáveis pela menor maciez da carne dos zebuínos quando comparados aos taurinos.

Apesar de alguns estudos terem sido realizados, a compreensão da relação entre o complexo enzimático da calpaína/calpastatina com a qualidade da carne possui algumas lacunas nos zebuínos. O estudo da expressão gênica e a quantificação das enzimas podem trazer algumas repostas, ajudando na compreensão de como este complexo funciona e quais as formas de mensurar e prever os seus efeitos nas características de qualidade da carne.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. SITUAÇÃO DA BOVINOCULTURA DE CORTE NO BRASIL**

Incontestavelmente os números da pecuária de corte são impactantes em relação às atividades que conduzem a economia do país, apesar da crise econômica e o recuo do PIB brasileiro. A Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) estima que em 2015 o faturamento da pecuária cresceu 5%, motivado pelo aumento do preço da arroba em 15%, consequência da menor oferta de animais devido ao abate de matrizes em anos anteriores. Além disso o crescimento do faturamento também se deve ao aumento do preço do dólar e das exportações (CNA, 2015).

O Brasil tem ocupado posição de destaque no cenário mundial de exportação de carne bovina, devido ao grande número de animais e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), entre os meses de janeiro a setembro de 2015 foram abatidas 22.920 mil cabeças, sendo produzidos 5,5 milhões de toneladas de carne, onde o volume exportado foi de 767 mil toneladas, atingido a marca de US\$ 3,3 bilhões em exportações. O Brasil exportou neste período para 168 países, sendo que os principais importadores foram Arábia Saudita, Hong Kong, Rússia, Japão e China.

Apesar de ser líder em exportações a carne brasileira ainda tem como seus principais destinos países com menores exigências, o que faz com que o valor da carne seja menor (FLORINDO et al., 2015). A busca por mercados que paguem mais

pela carne, como União Europeia e os EUA, tem encontrado resistência devido a estes serem mais exigentes para qualidade da carne, condições sanitárias e rastreabilidade, as quais são deficitárias na pecuária brasileira (ALMEIDA; MICHELS, 2012; MAIA FILHO et al., 2015). A melhoria destes aspectos por meio do aprimoramento dos sistemas de produção e da genética do rebanho brasileiro é oportunidade para cadeia produtiva de carne expandir suas exportações e aumentar sua rentabilidade.

Segundo dados do IBGE (2015), o Brasil possui aproximadamente 208,3 milhões de cabeças, o que equivale a 14,3% do rebanho mundial, sendo o maior rebanho comercial do mundo, apesar de ter apresentado redução de 2,12% quando comparado ao ano de 2014. A Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) estima que cerca de 80% dos animais do rebanho de bovinos de corte é formado por animais da subespécie *Bos indicus* e animais provenientes dos cruzamentos de animais *Bos indicus* com animais da subespécie *Bos taurus*, sendo a raça Nelore a mais utilizada, representando 90% dos animais zebuínos utilizados no rebanho brasileiro.

A grande utilização dos animais *Bos indicus* no Brasil se deve a características favoráveis para a sua criação no país. Dentre estas podemos destacar sua adaptabilidade ao clima tropical e sua resistência a endo e ecto parasitas. Porém, a utilização de animais zebuínos no rebanho traz grande variação na qualidade da carne produzida, comprometendo a competitividade deste setor no mercado globalizado. Sendo assim, há necessidade de identificar os mecanismos que interferem na qualidade da carne de animais zebuínos.

## **2.2. INFLUÊNCIA DO CRESCIMENTO ANIMAL NA QUALIDADE DA CARNE**

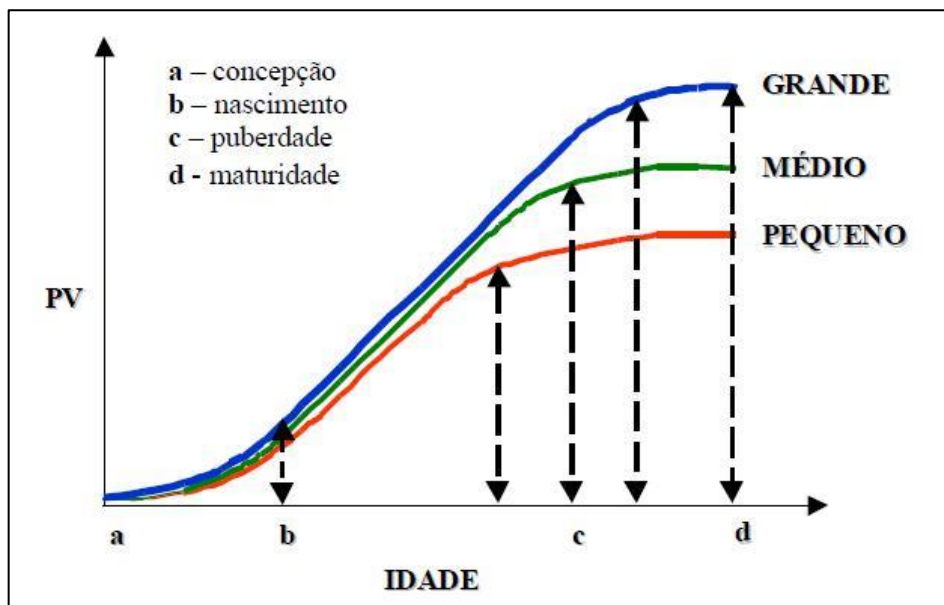
No setor da Bovinocultura de corte, há conscientização por parte dos produtores da relevância da avaliação do crescimento dos bovinos visando melhoria da rentabilidade do setor. Além de estar diretamente relacionado com a quantidade do produto, o crescimento apresenta correlação favorável com a a qualidade da carne, atingindo assim dois objetivos finais da cadeia produtiva (SILVA et al., 2004).

O crescimento dos tecidos dos animais é interação entre os fatores genéticos, hormonais, nutricionais e de metabolismo (BULTOT et al., 2002). Owens et al. (1993) define o crescimento como o aumento da massa tecidual, podendo se dar pela

proliferação de novas células (Hiperplasia), ou pelo aumento do volume das células existente (hipertrofia).

Para o crescimento do animal, deve haver balanço positivo entre as taxas de síntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) dos tecidos (SILVA, 1993), cujas vias metabólicas envolvidas são as que estão envolvidas na transformação do músculo em carne, onde quanto maior a taxa de crescimento, maior será a taxa de *turnover* proteico e conseqüentemente a superioridade da taxa de degradação proteica no *post-mortem*, gerando carnes mais macias (HUANG; FORSBERG, 1998).

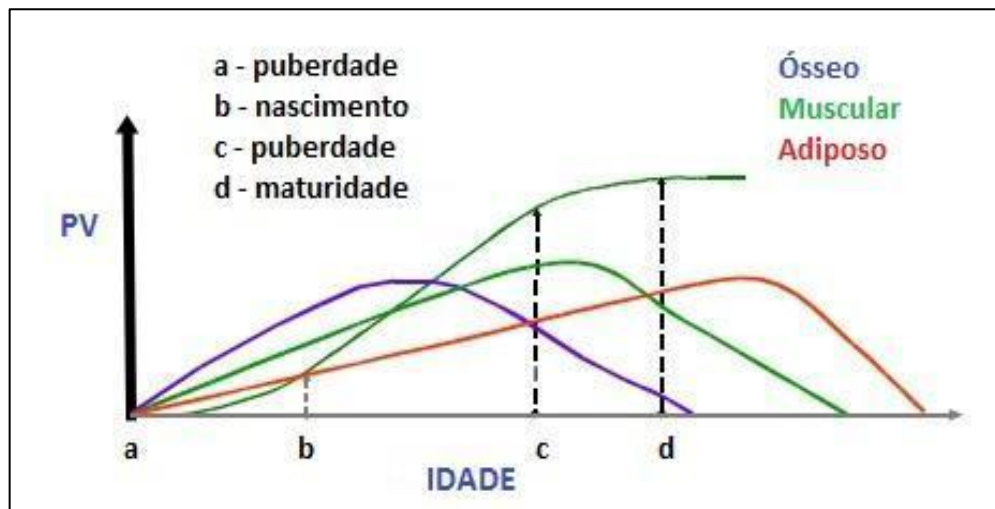
A curva de crescimento dos animais (Figura 1) de diferentes biótipos em função da idade foi descrita por Owens et al. (1993), como curva sigmoide. Após o nascimento tem início crescimento lento, que aumenta sucessivamente, desacelerando-se a partir da puberdade até atingir patamar em estágios mais avançados. Para obter maior retorno econômico, o mercado tem buscado animais com maior velocidade de crescimento, que permanecem menos tempo no sistema de produção, diminuindo assim o ciclo produtivo (ROCHA et al., 2003).



**Figura 1.** Curva sigmoide de crescimento de bovinos de diferentes tamanhos a maturidade (*frame-size*).

Fonte: Adaptado de Owens (1993).

A composição dos tecidos dos bovinos é alterada ao longo do tempo, devido as diferenças na velocidade de crescimento e maturação tecidual (Figura 2), descrito por Owens (1993), onde os tecidos têm momentos específicos e distintos no seu crescimento, se iniciando pelo tecido nervoso, em seguida, o tecido ósseo, o tecido muscular e para finalizar, o tecido adiposo. O tecido nervoso e ósseo tem desenvolvimento mais precoce, enquanto o muscular é intermediário e o adiposo geralmente desenvolve-se mais tardiamente.



**Figura 2.** Curva de desenvolvimento dos tecidos corporais: tecido ósseo, muscular e adiposo.

Fonte: Adaptado de OWENS (1993).

Um dos indicadores da composição corporal de bovinos é área de olho de lombo (AOL), que tem correlação positiva com a musculabilidade do animal, o rendimento de cortes cárneos (LUCHIARI FILHO, 2000), características de interesse de frigoríficos na avaliação do valor do produto e custos operacionais (COSTA et al., 2002). Além do tecido muscular a deposição do tecido adiposo tem importância na cadeia produtiva, devido a proteção do músculo durante o processo de resfriamento da carcaça, evitando o efeito de encurtamento pelo frio (*cold shortening*), que acarreta a diminuição do comprimento do sarcômero, afetando a maciez da carne (GIUSTI, 2013).

O conhecimento dos fatores que afetam o crescimento dos bovinos de corte é importante pois permite a escolha de manejo nutricional adequado permitindo maximizar a eficiência do animal, possibilitando o melhoramento do desempenho, além da possibilidade de definir a melhor idade para o abate do animal para a produção de carne de maior qualidade.

### **2.3. QUALIDADE DA CARNE BOVINA**

O termo qualidade da carne pode ser definido como o conjunto de propriedades e percepções deste alimento que agradam ou desagradam ao consumidor (HOCQUETTE et al., 2012). A cadeia produtiva e a ciência da carne têm avaliado de forma objetiva as propriedades da carne, mensuradas por meio de instrumentos e técnicas laboratoriais (LIMA JR et al., 2011), permitindo assim a seleção dos animais que produzam carnes com as características desejáveis pelo mercado consumidor.

As características de qualidade da carne podem ser divididas em intrínsecas, que são os aspectos visuais e sensoriais, e extrínsecas, que são as informações, como preço, condições de bem-estar animal, as preocupações ambientais, e de rastreabilidade (PICARD et al., 2015). O conjunto destas características influencia o consumidor na hora da compra.

Dentre as características visuais e sensoriais da carne temos aquelas que são avaliadas no momento da compra como a cor, quantidade e cor da gordura, marmoreio, e aquelas avaliadas no momento do consumo, como maciez, sabor e suculência (JOO et al., 2013). Estas podem ser influenciadas por diversos fatores, como genética, idade, sexo, nutrição, condições de pré e pós-abate e bioquímica *post-mortem* do músculo (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; MULLEN et al., 2006), sendo que a interação dos fatores genéticos e ambientais determinam a qualidade final da carne.

A cor da carne é a característica visual mais importante, pois transmite ao consumidor a ideia de frescor e salubridade (MANCINI; HUNT, 2005). Pode-se destacar a maciez da carne, como a principal característica sensorial avaliada no momento do consumo (GERELT et al., 2005). São características importantes na hora da compra e satisfação do consumidor após consumo.

Devido à um aumento na procura do consumidor por produto de melhor qualidade e a sua disposição em pagar mais por isso, cria-se desafio para a ciência da carne e a cadeia produtiva da carne, em fornecer um produto com qualidade estável, sendo isto possível por meio da detecção de indivíduos com características desejáveis e o controle dos fatores que afetam a qualidade da carne.

### **2.3.1. MACIEZ DA CARNE E SUA MENSURAÇÃO**

Dentre as características de qualidade da carne bovina, a maciez se destaca como o principal fator de palatabilidade avaliado pelos consumidores no momento do consumo (OUALI et al., 2006; MOELLER et al, 2010). A maciez tem papel decisivo na sua satisfação e no retorno a compra, sendo a sua variação a causa mais comum da não aceitação pelos consumidores (SENTANDREU et al., 2002; MYERS et al., 2009). Estes fatos provocam, na indústria da carne, a preocupação de oferecer um produto com maciez garantida (WARNER et al., 2005; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

A maciez da carne é percebida pelo consumidor ao longo da mastigação como um conjunto de impressões organolépticas, entre as quais a resistência à pressão do dente e da língua, a aderência, a capacidade de fragmentação da carne e a quantidade de resíduos após a mastigação, podem ser destacadas (BELCHER et al. 2007; MUCHENJE et al. 2009; FEIJÓ, 2011).

A maciez da carne é definida em dois períodos. Antes do abate é definida, a dureza intrínseca da carne, que não será modificada no período *post mortem*. A variação nesta “dureza intrínseca”, é devida a variação no tecido conjuntivo. O período pós abate pode ser dividido em duas fases, a fase de enrijecimento, que é causada pelo encurtamento do sarcômero durante o desenvolvimento do *rigor mortis*, e a fase de amaciamento, quando ocorre a proteólise das miofibrilas (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). O conjunto destes momentos define a maciez final da carne.

Alguns fatores que podem afetar a maciez da carne, são característicos do animal, como a genética, a idade ao abate, a quantidade e solubilidade do tecido conjuntivo, a espessura e o comprimento do sarcômero (KEMP; PARR, 2012; MARINO et al., 2013). Também afetada pelo sistema de produção, nutrição e o uso de agentes hormonais ( $\beta$ -adrenérgicos) (GRUBER et al., 2007). Alguns fatores

decorrentes das condições de abate e do estabelecimento do *rigor-mortis* (GEAY et al., 2001; MALTIN et al., 2003).

Ao longo dos últimos anos a cadeia produtiva da carne tem utilizado métodos para predizer e determinar as diferenças da maciez da carne, de forma subjetiva, desenvolvendo testes sensoriais com avaliadores treinados, e de forma objetiva, com a utilização de instrumentos (PAULINO et al., 2013). Uma das formas objetivas de medição da maciez é por meio da mensuração da força necessária para o rompimento de uma seção transversal de carne, sendo que o aparelho mais comumente utilizado para isso é o Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) (ALVES; MANCIO, 2007). Trata-se de aparelho mecânico que mede a textura da carne cozida padronizada (72°C), tendo a capacidade de 25 kg e velocidade do seccionador de 20 cm.min<sup>-1</sup> (WARRISS, 2000). Os valores são expressos em quilograma-força (kgF) e quanto menor for o valor expresso menor a força necessária para cortar a carne e maior a sua maciez.

A maciez da carne é correlacionada com a taxa de degradação das miofibrilas e das proteínas miofibrilares, sendo a degradação das miofibrilas mensurada pelo método do Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e a degradação das proteínas miofibrilares mensuradas por meio da eletroforese (KOOHMARAIE et al., 2002; LAMETSCH et al., 2003; SAWDY et al., 2004). Ambas utilizadas como medidas indicadoras da maciez.

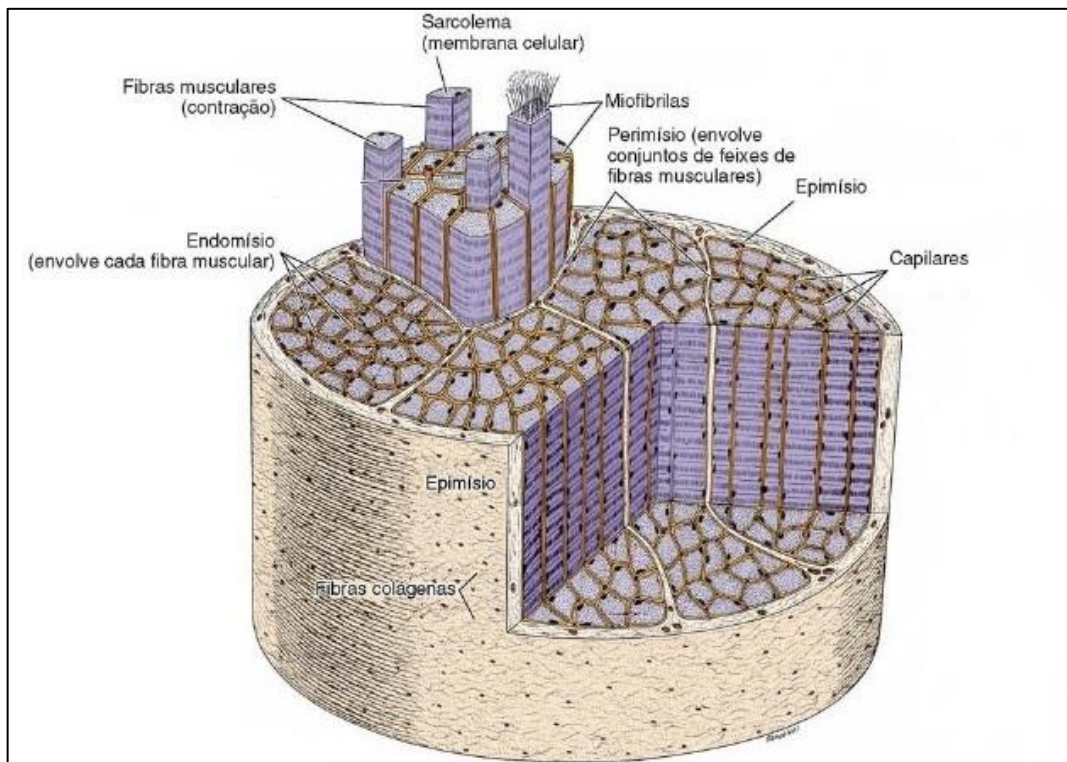
Considerando que a maciez é a característica mais importante avaliada no momento do consumo e que o consumidor está disposto a pagar mais por produto com maciez certificada, o conhecimento da estrutura da carne e seus constituintes básicos, bem como da bioquímica da transformação do músculo em carne é fundamental.

## **2.4. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO TECIDO MUSCULAR**

Os bovinos têm como maior parte da sua musculatura, o músculo estriado esquelético, que é o principal elemento formador da carne, presente em grande quantidade na carcaça, que faz com que tenha grande importância econômica (LUCIARI FILHO, 2000). O estudo da sua estrutura e de seus componentes visa o

entendimento das alterações na sua transformação em carne, bem como os efeitos sobre a maciez.

O músculo estriado esquelético é conjunto de fascículos envolvido por um tecido conjuntivo, o epimísio, que tem a função de unir o músculo aos pontos de origem e inserção, formando, em muitos casos, os tendões dos músculos. O fascículo é formado por conjuntos de fibras musculares envoltas pelo perimísio, sendo a estrutura básica do músculo e tem como outros constituintes o tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, fibras nervosas e fluidos extracelulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 3).



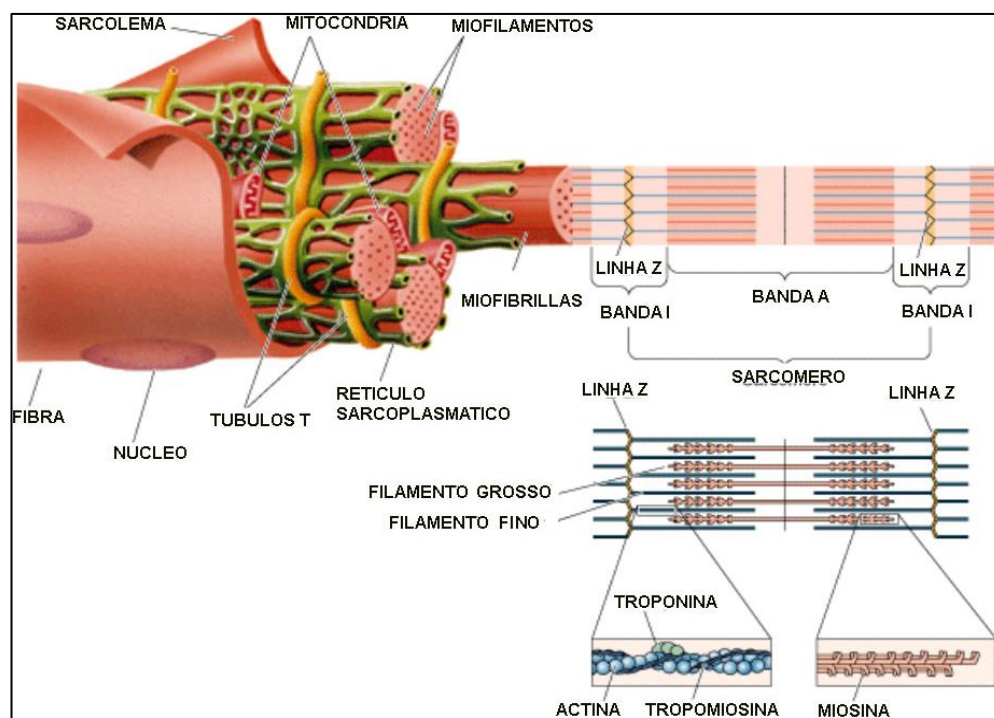
**Figura 3.** Desenho esquemático ilustrando a organização do músculo estriado esquelético.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004.

As fibras musculares são formadas por células longas, cilíndricas e multinucleadas, que podem estender-se de uma extremidade a outra do músculo (MCARDLE et al., 2003), atingindo o diâmetro de 10 a 100  $\mu\text{m}$  (WALLS, 1960). Com diversos filamentos, as miofibrilas, que são estruturas cilíndricas, compridas e delgadas, são muito bem organizadas e repetidas ao longo das fibras musculares.



Essas repetições são conhecidas como sarcômero, que dão a fibra aparência estriada (HOPKINS; THOMPSON, 2002). As estrias surgem a partir da alternância entre as bandas I (regiões claras) e A (regiões escuras). As regiões escuras são conhecidas como filamento grosso e a região clara como filamento fino, sendo, que a interação entre estes dois feixes de proteínas a responsável pela contração muscular (CLARK et al. 2002; WIDMAIER et al., 2003). No centro da banda A existe zona mais clara denominada banda H; e no centro de cada banda I nota-se uma linha transversal escura, a linha ou disco Z. A estrutura entre duas linhas Z é um sarcômero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 4). Os filamentos finos são compostos principalmente pela proteína actina, enquanto que o maior componente do filamento grosso é a proteína miosina. Actina e miosina constituem de 75 a 80% das proteínas miofibrilares. A porção restante é constituída pelas proteínas reguladoras da função muscular (FLORES; BERMELL, 1995).

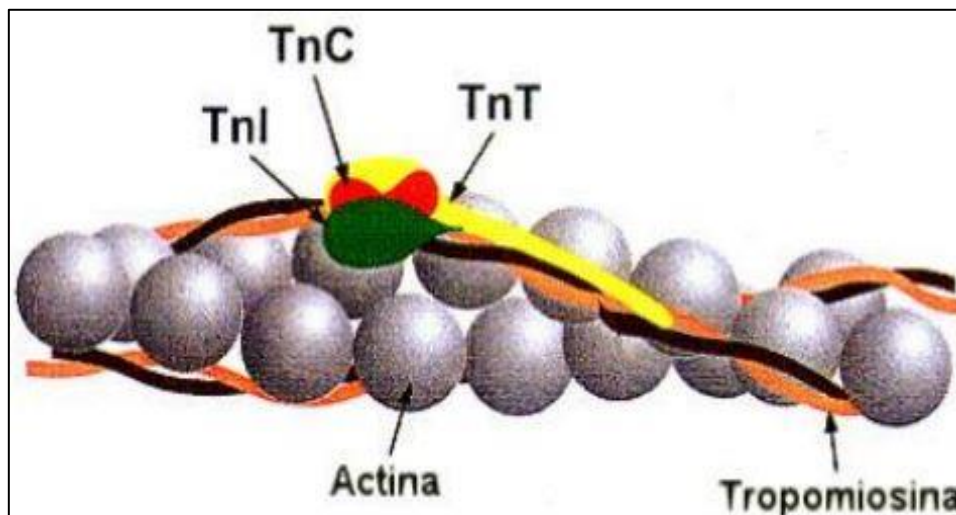


**Figura 4.** Organização da fibra muscular.

Fonte: Adaptado de <http://magisnef.wordpress.com> (2007).

Além da actina e miosina, o músculo esquelético é formado por outras proteínas que podem ser divididas em proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. Dentre estes grupos destacam-se as proteínas miofibrilares, que tem papel importante na contração muscular e nas propriedades da carne (GOLL et al., 2008). Evidenciam-se as proteínas desmina e troponina, proteínas de baixo peso molecular, as quais correlacionam-se com a maciez da carne (KOLCZAK et al., 2003; HUFF-LONERGAN et al., 2010).

As troponinas também denominada proteína reguladora, é complexo composto por três proteínas, a troponina C (TnC), troponina T (TnT), troponina I (TnI). Estas proteínas estão distribuídas em intervalos regulares em sítios específicos da tropomiosina (LUCHIARI FILHO, 2000) (Figura 5). A troponina C (TnC) tem a sua função ligada a contração muscular. É local de ligação de íons cálcio. A alteração na sua forma espacial acarreta o afastamento da tropomiosina, possibilitando a ligação entre a actina e a miosina. Sua ligação a tropomiosina é realizada pela troponina T (TnT), sendo sua principal função. A troponina I por sua vez tem a função de fazer a ligação entre os filamentos de actina e tropomiosina.



**Figura 5.** Representação do filamento fino e do complexo das troponinas.

Fonte: Adaptado Gordon et al., 2000.

Outra proteína miofibrilar que é correlacionada com a qualidade da carne é a desmina (ROBSON,1995). Foi descrito como um filamento intermediário localizado na linha Z, sendo que seu papel é de ligação entre as miofibrilas vizinhas e a outras estruturas celulares, desempenhando a função de manutenção da integridade e organização da fibra muscular. Devido à sua função de estruturação das miofibrilas, tem sido descrito na literatura que a sua degradação durante o *post-mortem* é de grande importância para o amaciamento da carne (KOOHMARAIE, 1994).

A degradação das proteínas miofibrilares na qualidade da carne, alguns autores têm utilizado técnicas para identifica-las e quantifica-las (KOOHMARAIE et al., 2002; KOLCZACK et al.,2003; SAWDY et al., 2004; MIZUNOYA et al., 2008). Uma dessas técnicas que pode ser destacada é a eletroforese com a presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que permite a separação das proteínas conforme seu peso molecular, sendo utilizado na ciência da carne para relacionar seus resultados com a maciez da carne.

## **2.5. TRANSFORMAÇÃO DO MÚSCULO EM CARNE**

### **2.5.1. ESTABELECIMENTO DO *RIGOR MORTIS***

O entendimento do fenômeno conhecido como *rigor mortis* ou rigidez cadavérica é importante para a compreensão dos processos que determinam a maciez da carne no *post-mortem*. No *rigor mortis* ocorre uma série de transformações bioquímicas e estruturais no tecido muscular (PAULINO et al., 2013). Neste período vários fatores podem afetar o processo, refletindo na qualidade final da carne (ABERLE et al., 2001; PARDI et al., 2001).

A rigidez cadavérica, é a contração muscular irreversível que ocorre logo após a morte do animal, sendo caracterizada pela inextensibilidade e rigidez do músculo (LUCHIARI FILHO, 2000; ALVES et al., 2005).

O processo de *rigor mortis* tem o início com o do abate do animal. Com a sangria ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo, o que cessa o aporte de oxigênio e nutrientes às células do tecido muscular (ORDÓÑEZ et al., 2005). Mesmo com a falta de oxigênio as células do tecido muscular continuam suas atividades, tentando se adaptar à

redução de oxigênio e das reservas energéticas (ORDÓÑEZ et al., 2005). Como forma de se adaptar, as células do tecido muscular passam a utilizar como fonte de energia o glicogênio, por meio da glicólise anaeróbica, formando ácido lático (ROÇA, 2005). Este processo de transformação de glicogênio em ácido lático para a geração de energia se estende até findar os estoques de glicogênio do músculo, fazendo com que ocorra o decréscimo progressivo do pH durante o decorrer do processo de *rigor mortis* (SILVA et al., 1999). Desta forma, é encontrado na carcaça de animais recém abatidos pH próximo de 6,9 (ABERLE et al., 2001). O tempo necessário para o estabelecimento do *rigor mortis* pode variar de 12 a 24 horas em bovinos, tempo onde se constata a maior contração do músculo, esgotamento das reservas de ATP, queda do pH e diminuição das reservas de glicogênio (LUCHIARI FILHO, 2000; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Alguns problemas podem ocorrer durante o estabelecimento do *rigor mortis*, dentre eles estão a velocidade da queda do pH e da temperatura da carcaça, fatores que podem influenciar na qualidade final da carne (ROÇA, 2005).

A velocidade da queda do pH é dependente das reservas de glicogênio existentes e alguns fatores podem contribuir para uma diminuição destas reservas, levando assim a não haver o suficiente para a sustentação do metabolismo anaeróbio e conseqüentemente a produção de ácido lático, fazendo com que o músculo não atinja a faixa ótima de pH final, que resulta em uma carne com alta capacidade de retenção de água, mas com uma cor escura e uma vida de prateleira mais curta, conhecido como “*Dark-cutting beef*” (carne bovina de corte escuro) ou DFD (“*dark , firm and dried*”, ou escura, firme e seca) (SCANGA et al., 1998).

Uma das formas encontradas pela indústria da carne para evitar problemas devido a velocidade de queda do pH é a estimulação elétrica da carcaça. Isso acelera a glicólise, gerando lactato mais rapidamente, o que por sua vez faz com que o pH final ótimo seja atingindo mais rapidamente (FELÍCIO, 1997), com efeito benéfico na qualidade da carne.

Outro problema que pode ocorrer durante o estabelecimento do *rigor mortis* é a velocidade da queda da temperatura. Se a carcaça é resfriada rapidamente, a ponto de atingir o valor abaixo de 10°C antes do pH final chegar abaixo de 6, ocorre o maior encurtamento das fibras musculares, prejudicando assim a maciez e a capacidade da

retenção de água (GEESINK et al., 2001). Para evitar problemas de resfriamento rápido da carcaça tem se preconizado um mínimo de 3 mm de espessura de gordura subcutânea (EGS) na indústria frigorífica, o que protegerá a carcaça do frio, diminuindo assim os problemas de encurtamento das fibras musculares.

### 2.5.2. PROTEÓLISE MUSCULAR

Após o estabelecimento do *rigor mortis*, o processo de transformação do músculo em carne continua com o início da proteólise e desnaturação proteica, causando uma pseudo-resolução do *rigor mortis*, tornando a carcaça menos rígida (FELÍCIO, 1997). Esse processo apresenta grande influência na maciez final da carne.

A proteólise é realizada por enzimas que fazem modificações na estrutura do tecido muscular, como a diminuição de forma gradativa da linha Z, com a dissipação da troponina T e a deterioração das proteínas desmina, nebulina e titina. As alterações nas estruturas das miofibrilas fazem com que haja diminuição da rigidez do músculo. Como consequência ocorre um aumento gradativo da maciez da carne (KOOHMARAIE, 1994; GAYA; FERRAZ, 2006).

Diferenças na maciez da carne entre bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* estão relacionadas a uma taxa reduzida de proteólise *post-mortem* encontrada nos animais *Bos indicus* (WHIPPLE et al, 1990; SHACKELFORD et al, 1991; CURT et al., 2010). Desta forma, animais *Bos indicus* apresentam carnes menos macias quando comparados aos animais *Bos taurus*.

Dentre as enzimas envolvidas na proteólise temos as do complexo multi-catalítico de proteases (MCP), o sistema lisossomal das catepsinas, e em posição de destaque o complexo enzimático calpaína/calpastatina, que é considerado o principal mecanismo neste processo, que leva ao amaciamento da carne (KOOHMARAIE, 1992; ALVES et al., 2005; HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

Sabe-se que a diferença de maciez da carne entre os animais *Bos indicus* e *Bos taurus* é devido principalmente ao complexo enzimático calpaína/calpastatina. O aprofundamento do estudo deste complexo nos animais do rebanho brasileiro é fundamental para melhoria da maciez da carne.

### **2.5.3. MATURAÇÃO**

Na cadeia produtiva da carne tem sido utilizado técnica para o prolongamento da ação das enzimas proteolíticas, conhecida como maturação, com o objetivo da melhoria das características organolépticas, como maciez e suculência (MANÇO e ROÇA, 2002; SAÑUDO, 2004; GRUBER et al., 2006).

A maturação da carne é método antigo (KOOHMARAIE, 1994), que compreende manter carnes *in natura* desossadas embaladas a vácuo sob refrigeração entre 0 e 2°C, por um período de tempo variável, geralmente de 7 a 21 dias após o abate (MORAES, 2004; LAWRENCE et al., 2006). A necessidade de embalar a carne a vácuo é devido à necessidade de controle do crescimento bacteriano. Carnes embaladas a vácuo tem o retardamento do crescimento de bactérias aeróbicas putrefativas e o favorecimento do crescimento de bactérias lácticas, que produzem substâncias antimicrobianas (PUGA et al., 1999), assegurando assim a salubridade da carne e a sua qualidade.

A utilização da maturação na cadeia produtiva da carne é alternativa para o melhoramento da maciez da carne dos animais zebuínos. Ela elimina as diferenças de textura da carne entre as raças e entre indivíduos dentro da mesma raça, e reduz as diferenças entre a qualidade da carne, produzindo produto mais homogêneo para o consumidor (WHEELER et al., 2005). Isso possibilita que o mercado de carne brasileira possa oferecer produto com maciez garantida e uniforme, atendo assim de maneira satisfatória o consumidor que busca produto de qualidade e com constância.

### **2.6. SISTEMA PROTEOLÍTICO CALPAÍNA E CALPASTATINA**

O sistema das calpaínas pertence a família das proteases de cisteína não lisossomais, e pode ser encontrado em diferentes tecidos. A sua ativação depende do íon cálcio, e sua atividade é controlada por meio do seu inibidor específico a calpastatina (CROALL; DEMARTINO, 1991; SENTANDREU et al., 2002; GOLL et al., 2003).

No contexto molecular, os genes codificadores da  $\mu$ -calpaína (*CAPN1*), m-calpaína (*CAPN2*) e da calpastatina (*CAST*) estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 29 (SMITH et al., 2000), 16 e 7 (BISHOP et al., 1993) de bovinos. O gene *CAPN1* bovino foi mapeado em posição de QTL do BTA29, região onde estudos tem resultados positivos para a características correlacionadas com maciez da carne (SMITH et al., 2000; CASAS et al., 2005). Devido à fisiologia proteolítica e sua atuação nas vias metabólicas, os produtos da transcrição destes genes são considerados candidatos funcionais para características de qualidade de carne em animais de produção.

As calpaínas e calpastatina tem importante papel nos principais processos intracelulares. Com destaque para a reestruturação do citoesqueleto, a regulação do ciclo celular, a apoptose e a formação de tecido muscular (GOLL et al., 2003; DEDIEU et al., 2004; LEBART; BENYAMIN, 2006). Dessa forma, é importante a compreensão do seu funcionamento e sua relação com as características de qualidade da carne e de crescimento.

Antes do *post-mortem* as calpaínas encontram-se localizadas em organelas subcelulares no interior do sarcoplasma (GOLL et al., 2003). Durante a transformação do músculo em carne ocorre a migração das calpaínas para as regiões do disco Z e da banda I das miofibrilas (RAYNAUD et al. 2005). Devido à sua localização na fibra muscular durante a transformação do músculo em carne, tem sido relatado que a sua atuação está ligada a degradação das proteínas do citoesqueleto (titina e nebulina), dos filamentos intermediários (desmina) e das proteínas que contribuem para estabilidade da fibra muscular (troponinas e tropomiosina) (GOLL et al, 2003; NETI et al., 2009). Neste sentido, a medição da degradação destas proteínas tem sido relacionada com a maciez da carne decorrente da atuação das calpaínas.

Em bovinos já foram encontradas 10 isoformas da calpaína, sendo duas bem caracterizadas, a  $\mu$ -calpaína ou calpaína 1 e a m-calpaína ou calpaína 2, que são nomeados em referência à quantidade necessária de cálcio para serem ativadas. Em média a  $\mu$ -calpaína requer entre 5 e 65  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que a m-calpaína requer entre 300 e 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  (LI et al., 2009; VARRICCHIO et al., 2013). Dentre as calpaínas, estudos tem demonstrado que a  $\mu$ -calpaína tem seu papel na proteólise no *post-mortem* mais acentuada que a m-calpaína, sendo mais importante

no processo de amaciamento da carne (HOPKINS; THOMPSON, 2002; GEESINK, et al., 2006; KEMP et al, 2010). Este fato decorre da concentração de cálcio livre no período de *rigor mortis* ser somente suficiente para a ativação da  $\mu$ -calpaína (DRANSFIELD, 1999). Assim, a m-calpaína tem um papel menos importante em bovinos (VEISETH et al., 2001; CAMOU et al., 2007).

Além da necessidade de níveis de cálcio para serem ativados, as enzimas calpaínas precisam estar em uma faixa de pH ótimo para realizarem a proteólise, sendo que alguns estudos mostraram que as  $\mu$ -calpaínas são ativadas quando o pH decai de 6,8 para aproximadamente 5,7; enquanto que as m-calpaínas são ativadas em pH em torno de 5,7 (LONERGAN et. al., 2010). Há evidências que em pH entre 5,5 e 5,8 a  $\mu$ -calpaína encontra-se inativada (KANAWA; TAKAHASHI, 2002). Outra importância do pH na atividade das calpaínas é que devido a alterações nos seus níveis, o substrato alvo das calpaínas tenham alterações em sua estrutura, tornando os mais acessíveis para a sua atuação, aumentando assim a proteólise (LONERGAN et. al., 2010), gerando carnes mais macias.

Alguns estudos têm demonstrado que a atividade da calpastatina na inibição das calpaínas geram carnes com maior força de cisalhamento, decorrente da diminuição da proteólise das proteínas miofibrilares no *post-mortem* (GOLL et al., 2003; KENT et al., 2004; CASAS et al., 2006; KEMP et al., 2010; CHUNG; DAVIS, 2012). Foi relatado que a diferença da maciez entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus* é devido a quantidade de calpastatina, sendo que o aumento da proporção de *Bos indicus* na composição genética leva a uma diminuição na maciez (SHACKELFORD et al., 1995; RUBENSAM et al., 1998; FERGUSON et al., 2001). Além disso foi descrito por Wheeler, Cundiff e Koch (1994) que em animais *Bos indicus* é encontrado níveis menores de  $\mu$ -calpaína. Devido ao rebanho brasileiro ser constituído em sua maioria por animais *Bos indicus*, o conhecimento de animais que possuam menor quantidade de calpastatina e maior de calpaína no *post-mortem* pode ser utilizada como ferramenta de seleção para a melhoria da maciez.

As calpaínas e calpastatina, como todas as proteínas, são resultado da sua expressão em uma célula, onde o gene é transcrito em RNA mensageiro e este traduzido em proteína (BAN et al., 1999). A maior ou menor quantidade de calpaína ou calpastatina poderá ser proveniente da diferença na expressão de seu gene



codificador. Porém a quantidade de RNAm pode não corresponder a quantidade de proteína expressa devido a regulações pós-traducionais (ANDERSON; SEILHAMER, 1997), o que pode levar às diferenças na quantidade das calpaínas e calpastatina presentes no *post-mortem*.

Diante do exposto sobre o sistema proteolítico calpaína/calpastatina, podemos supor que os problemas de maciez da carne em animais *Bos indicus* é devido, em grande parte, a menor expressão da calpaína e maior da calpastatina. Isto torna o estudo da expressão gênica e a quantificação das proteínas importante para o entendimento da influência deste complexo na qualidade final da carne dos animais da subespécie, entre os quais os da raça Nelore.

## **2.7. UTILIZAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO ANIMAL**

Embora o melhoramento genético clássico, baseado na análise do fenótipo dos animais tenha gerado mudanças consideráveis em algumas características, a estimativa do potencial genético baseado unicamente no fenótipo do animal apresenta algumas limitações (COUTINHO et al., 2010). A utilização de novas técnicas de análise e manipulação das moléculas de DNA, RNA e de proteínas permitem avanços no conhecimento dos processos biológicos (ÉTIENNE, 2003), permitindo a escolha dos animais que apresentem superioridade para características almejadas de maneira mais eficiente e com maior acurácia, diminuindo o intervalo entre gerações e economizando esforços em testes de progênes de touros.

A ciência da carne tem dado importância à análise da expressão gênica como ferramenta. O conhecimento dos padrões de expressão dos genes pode fornecer melhor entendimento dos mecanismos que estão a influenciar as características de qualidade da carne, e provavelmente, levar a identificação de genes relevantes nesses processos biológicos.

Alguns métodos têm sido utilizados para a quantificação da transcrição, dentre os quais a transcrição reversa da reação de cadeia da polimerase (RT-PCR) (WEIS et al., 1992). A RT-PCR em tempo real (qPCR) atualmente é a técnica mais precisa para se quantificar os níveis de expressão de um determinado gene específico,

oferecendo dados de forma rápida e reprodutível (HAYWARD-LESTER et al., 1995; GINZINGER, 2002).

A detecção e mensuração de proteínas específicas que estão ligadas a vias metabólicas que influenciam as características de qualidade da carne tem sido um dos principais objetivos da ciência da carne. Um dos mais importantes métodos da biologia molecular para a detecção e mensuração de proteínas é o *Western Blotting* (WB), que também é chamado de immunoblotting ou protein blotting. Este método é usado para a imunodetecção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel poliacrilamida e da transferência para membrana de nitrocelulose (KURIEN; SCOFIELD, 2006).

Foi demonstrado que a atividade das enzimas do complexo da calpaína atuam na quebra das proteínas do citoesqueleto e dos filamentos intermediários (GOLL et al, 2003; NETI et al., 2009). A degradação das proteínas do citoesqueleto durante a maturação da carne é importante na qualidade da carne, especialmente no amaciamento da carne (THERKILDSEN et al. 2002; WOJTYSIAK et al. 2008). É reportado que carnes macias tem rápido e extensa degradação de proteínas miofibrilares quando comparados com carnes duras (PULFORD et al., 2009; MUROYA et al., 2009). Alguns métodos têm sido empregados no intuito de se identificar diferenças no grau de degradação das proteínas miofibrilares. Nesse sentido, a eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*) tem se mostrado ferramenta valiosa na identificação e caracterização destas mudanças (KOLCZACK et al.,2003; SAWDY et al., 2004).

Devido às divergências encontradas na literatura quanto ao papel das calpaínas e calpastatina na proteólise muscular na raça Nelore, a utilização da técnica de qPCR, *Western Blot* e *SDS-PAGE* podem ser ferramentas importantes para elucidar a relação desse mecanismo com a maciez carne. Além disso os resultados de expressão desta pesquisa poderão servir de base ou ponto de partida para novos estudos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS E LOCAL EXPERIMENTAL**

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu no confinamento experimental de bovinos de corte. Os animais foram mantidos no confinamento experimental distribuído em baias com cocho de cimento e bebedouros automáticos. Foram mantidos em dezoito baias de chão batido, a céu aberto, com lotação de 5 animais por baia, sendo distribuídos conforme seu peso inicial.

Foram utilizados dados de 90 animais machos não-castrados da raça Nelore, provenientes de diversas fazendas parceiras, provenientes de recria em sistema de pastejo contínuo, os quais não se tinha informação sobre seus pais. Os animais apresentaram peso médio inicial de  $390 \pm 37$  kg, com idade aproximada de 24 meses. Permaneceram no confinamento por 95 dias. Antes do início do experimento, os animais receberam vermífugo e foram pesados e distribuídos nas baias de acordo com o peso.

#### **3.2. MANEJO, ARRAÇAMENTO E CUIDADOS COM OS ANIMAIS**

Para estabelecimento das exigências e características nutricionais da dieta, utilizou-se o programa NRC (2000) nível 2, que se baseia em simulação ruminal para animais não-castrados em crescimento e com ganho esperado em torno de 1,6 kg/animal/dia.

As dietas foram compostas por ração básica, sendo constituída de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de girassol, milho triturado, ureia e núcleo mineral (Tabela 1). Foram adicionados à ração básica o aditivo específico referente ao tratamento e a quantidade de água necessária para corrigir o teor de matéria seca para valores em torno de 55%.

**Tabela 1.** Formulação e cálculo da composição nutricional das dietas experimentais

	Fase 1		Fase 2	
	T1-4	T5	T1-4	T5
<b>Ingredientes, % da MS</b>				
Bagaço de cana-de-açúcar	9,37	9,40	9,40	9,41
Milho moído	64,29	57,49	69,24	62,31
Farelo de girassol	22,73	29,98	17,93	25,15
Ureia	0,82	0,93	0,64	0,93
Mineral <sup>1</sup>	2,17	2,17	2,17	2,18
Optigen	0,60	0,00	0,60	0,00
Aditivos	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Composição Nutricional 2</b>				
Matéria Seca, %	55,00	55,00	55,00	55,00
Proteína bruta, %	16,10	16,00	14,80	15,20
Nutrientes Digestíveis Totais, %	85,00	80,00	84,00	82,00
Proteína metabolizável, %	10,63	10,45	10,88	10,56
Energia metabolizável, Kcal/kg	2650	2570	2710	2630
FDN efetivo, %	14,00	14,00	14,00	14,00
Cálcio, %	0,66	0,66	0,66	0,66
Fósforo, %	0,44	0,44	0,44	0,44

<sup>1</sup> Composição do Mineral (kg do produto) 200g Ca, 80g P, 50g Mg, 10mg S, 24mg Se, 3.060mg Zn, 1.000mg Mn, 2500mg I, 20mg Co; <sup>2</sup> Valores calculados pelo programa computacional Larger Ruminant Nutrition System (LRNS).

O sistema de adaptação à dieta foi pelo método de restrição, utilizou-se a dieta da fase 1 limitada inicialmente a 1,5% do PV em matéria seca e aumentou-se o oferecimento diário gradativamente até atingir o consumo *ad libitum*. Foi utilizado planejamento e controle sistemático do fornecimento da dieta aos animais por meio do monitoramento das sobras, adotando o sistema de escore de cocho SDSU (South Dakota State University) desenvolvido por Pritchard (1998).

No início do período experimental e aproximadamente a cada 28 dias (até ao final período experimental), os animais foram pesados, sem jejum nas pesagens intermediárias sendo descontados 4% do peso observado para assim se obter o peso vivo em jejum e com jejum de 16 horas de alimento na pesagem inicial e na pesagem final.

### 3.3. ABATE E COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram abatidos em frigorífico comercial (Frigorífico Angelelli – Piracicaba - SP) segundo normas de abate humanitário (LUDTKE et al., 2012).

O abate e desossa das carcaças foram acompanhados por técnico especializado indicado pelo Laboratório de Ciência da Carne - LCC do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal - FMVZ - Unesp - Botucatu. As carcaças foram resfriadas por 24 horas em câmara frigorífica com temperatura de 0 – 1 °C. Após o resfriamento e estabelecimento pleno do *rigor mortis* foram colhidas amostras do músculo *Longissimus thoracis* com osso (espessura aproximada de 2,54 cm) entre a 9ª e 13ª costelas, da meia-carcaça esquerda de cada animal. As amostras coletadas entre a 12ª e 13ª costelas foram congeladas e posteriormente utilizadas para medir a área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização (IM), perdas por cozimento, coloração instrumental da carne e força de cisalhamento (FC). A partir do restante da carne, foram coletadas alíquotas para a realização das análises de índice de fragmentação miofibrilar (MFI), lipídeos totais (LT), eletroforese e “western blot”. Metade das amostras foram conservadas a -20°C (dia 0) e a outra metade foi maturada a 2°C durante 7 dias (dia 7), ao qual foram refeitas as análises de FC, MFI, coloração instrumental e PT.

Durante o abate foi coletado amostras do musculo *Longissimus thoracis* para a extração de RNA para a análise da expressão gênica.

### 3.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA CARNE

#### 3.4.1. ÁREA DE OLHO DE LOMBO (AOL), ESPESSURA DE GORDURA SUBCUTÂNEA (EGS) E ÍNDICE DE MARMORIZAÇÃO (IM)

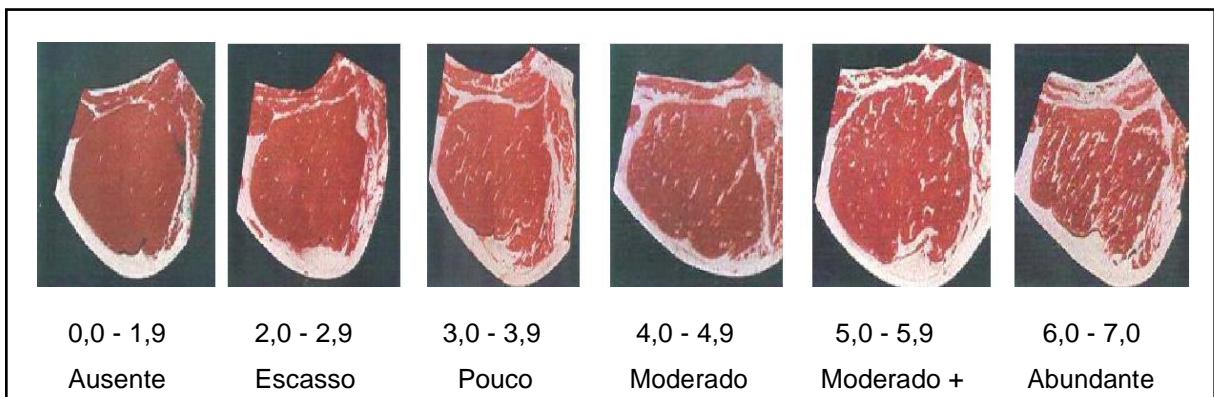
Para a determinação da Área de Olho de Lombo (AOL) e Espessura de Gordura Subcutânea (EGS) foram utilizadas as amostras destinadas também à realização da força de cisalhamento.

A AOL foi determinada pelo método do quadrante de pontos (*USDA - Quality and Yield Grade, 2000*) e expressa em cm<sup>2</sup> (Figura 6), bem como a EGS, medida com paquímetro e expressa em milímetros (mm).



**Figura 6.** Medição da área de olho de lombo (AOL) através do método dos quadrantes.

A análise do índice de marmorização (IM) foi realizada utilizando a escala de graduação visual adaptada de *USDA - Quality and Yield Grade (2000)*, aos padrões de marmorização comumente encontrados no rebanho nacional (Figura 7).



**Figura 7.** Escala de graduação visual do índice de marmorização.

Adaptado de *USDA - Quality and Yield Grade, (2000)*.

### 3.4.2. COLORAÇÃO INSTRUMENTAL DA CARNE

A determinação da coloração da carne foi aferida utilizando o colorímetro KONICA MINOLTA - CR 400 (*Minolta Co. Ltd.*), segundo a metodologia proposta por RENERRE (1982), onde o equipamento foi calibrado para um padrão branco no sistema CIE  $L^* a^* b^*$  onde foram tomadas as medidas absolutas das coordenadas de luminosidade ( $L^*$ ), coloração vermelha ( $a^*$ ) e coloração amarela ( $b^*$ ). Foram coletadas amostras de coloração para as amostras não maturada (n=90) e maturadas (n=89).

### 3.4.3. PERDAS POR COZIMENTO

Durante o cozimento das amostras para análise da força de cisalhamento foram coletados os dados necessários para os cálculos dos valores de perdas por evaporação, gotejamento e totais, para as amostras não maturadas (n=90) e maturadas (n=89). As perdas foram obtidas pela pesagem das bandejas de cozimento, com e sem as amostras, sendo realizadas antes e após o cozimento.

### 3.4.4. FORÇA DE CISALHAMENTO

Para a análise de força de cisalhamento (FC) foram utilizadas amostras com espessura de 2,54 cm do músculo *Longissimus thoracis*, obtidas entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas. Foi adotado o procedimento padronizado e proposto por Wheeler et al. (1995), onde as amostras foram assadas até atingirem temperatura interna de 71°C, temperatura medida através do termômetro DIGITAL THERMOMETER – DM6802B (*DIGITAL THERMOMETER Co. Ltd*). Para a determinação da força de cisalhamento foi utilizado o equipamento Salter *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico com capacidade de 25 kg e velocidade de seccionamento de 20 cm/minuto. O *shearing* foi realizado em cilindros de ½ polegada retirada da região central da amostra em sentido longitudinal as fibras musculares. Foram realizadas oito medidas por amostra a fim de se obter maior precisão nos resultados obtidos expressos em quilogramas (kg).

### 3.4.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILAR

Na determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) foram utilizados 3,0 g de músculo livres de gordura e de tecido conjuntivo, conforme metodologia descrita por Culler et al. (1978) e adaptada no Laboratório de Ciência da Carne - LCC do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal - FMVZ -UNESP - Botucatu. As amostras foram homogeneizadas em Ultra-turrax (Marconi - MA102/E) a 18000 rpm em 30 mL de tampão de índice de fragmentação miofibrilar (TMFI) à 2°C. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1000Xg por 15 minutos à 2°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi novamente suspenso em 30 mL de TMFI e homogeneizado com bastão de vidro.

As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi então re-suspenso em 7,5 mL de TMFI, submetido ao vortex e filtrado, ao qual foi adicionado mais 7,5 mL de TMFI. Foi realizada a quantificação de proteínas pelo método do Macro Biureto (GORNALL et al., 1949). Para a determinação do MFI através da leitura em espectrofotômetro a 540 nm, as amostras foram preparadas com o TMFI para um volume final de 4,0 mL e concentração de proteína 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. O valor de MFI foi obtido pelo cálculo:  $MFI = \text{Absorbância} \times 200$ .

### 3.4.6. QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

A quantificação de lipídeos totais seguiu a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Foram utilizadas alíquotas em duplicata com pesos conhecidos aproximados a 3,0 g. A estas amostras foram adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol, 8 mL de água destilada e colocadas em mesa agitadora por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio 1,5% e agitadas novamente por mais dois minutos e transferidas para tubos *falcon* e centrifugados a 1000Xg por dois minutos. Após a centrifugação foi descartada o sobrenadante e o restante foi filtrado em papel filtro utilizando provetas graduadas de 25 mL. O valor do filtrado foi anotado e 5 mL transferido para becker de 50 mL previamente pesado em balança analítica (BEL Mark 210-A, *BEL Engineering*).

O becker contendo amostra foi colocado em estufa até evaporação total do



solvente, resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. As diferenças do peso inicial e final do becker determinaram a quantidade percentual de lipídeos nas amostras.

### **3.5. SELEÇÕES DOS GRUPOS CONTRASTANTES**

Foram utilizados dados de produtividade e de qualidade da carne dos 90 animais, os selecionando para formação de quatro grupos contrastantes (10 animais/grupo), sendo os critérios de seleção as características de crescimento e maciez. A separação para o crescimento utilizou como critério o GP, selecionando animais leves e pesados. Os animais do grupo leve tiveram GP entre 52,0 – 127,0 kg, e os animais do grupo pesado tiveram GP entre 183,0 – 277,0 kg. Para maciez os grupos contrastantes foram formados utilizando informações de FC, selecionando animais de carne dura e macia. Os animais considerados carne dura tiveram valores de FC (0) entre 6,0 – 8,8 kgF e os animais de carne tiveram valores entre 2,3 – 4,4 kgF.

### **3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-QPCR)**

#### **3.6.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL**

As amostras de músculo foram previamente estocadas em RNAlater® Tissue Collection (Ambion, Life Technologies, EUA), sendo lavadas usando água UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

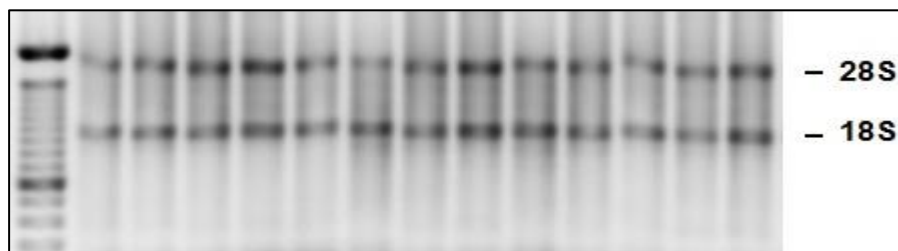
A extração do RNA total da alíquota do músculo *Longissimus thoracis* foi realizada utilizando 1 mL de TRIzol® reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) conforme as especificações do fabricante. O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), e armazenado a -80°C.

A concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas usando NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA, 2007). Com base

na densidade óptica (OD) 260 nm (específica para ácidos nucleicos), foi verificada a quantidade do RNA.

### 3.6.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL

Após a quantificação do RNA extraído, foi realizada a avaliação da integridade do material. O processo é realizado através da presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S, após eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8).



**Figura 8.** Avaliação da qualidade do RNA total através da imagem do gel obtido pela eletroforese, mostrando as bandas 18S e 28S.

### 3.6.3. TRATAMENTO DO RNA COM DNASE

O RNA total obtido foi tratado com a enzima DNase para remoção de possível DNA genômico contaminante, conforme as instruções do protocolo TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, Life Technologies, EUA). A confirmação da ausência de contaminação por DNA genômico foi realizada com o aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010), e o kit de quantificação de DNA, Qubit dsDNA Assay Kit (Invitrogen, EUA).

### 3.6.4. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o High Capacity RNA-to- cDNA Kit (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante. Foram utilizados 1 µg de RNA total obtido do músculo *Longissimus thoracis*, para uma reação de 20 µL.

### 3.6.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-QPCR)

#### 3.6.5.1. ESCOLHA DOS GENES DE REFERÊNCIA

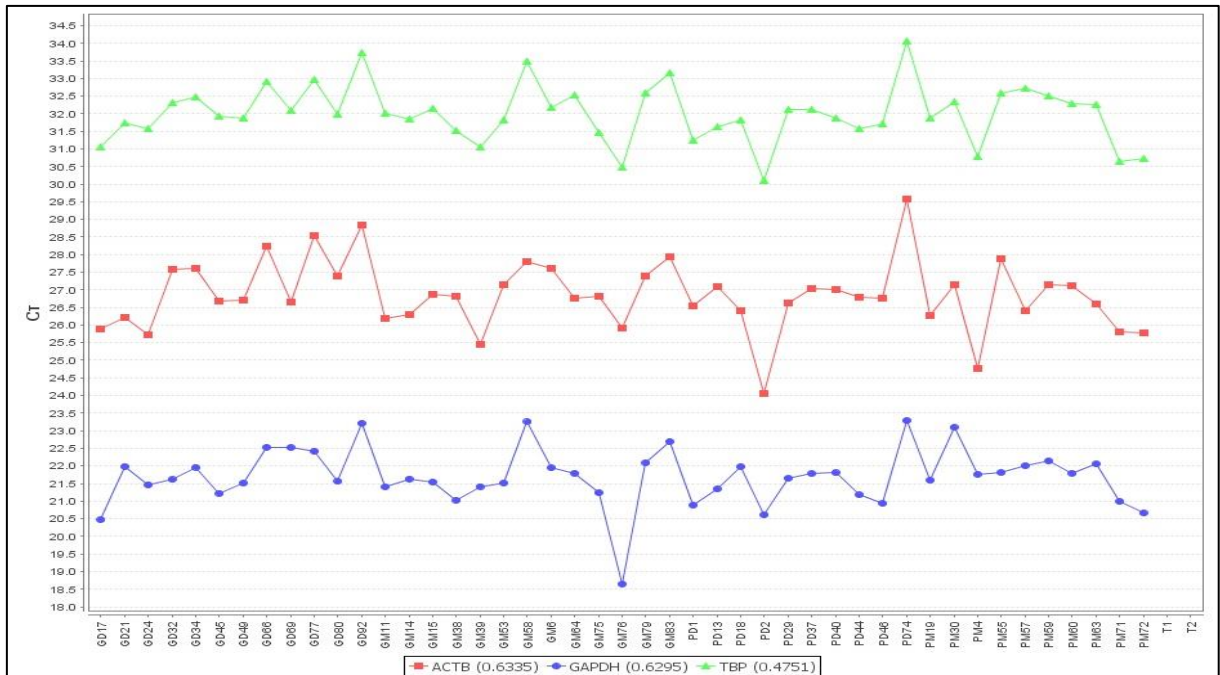
Foram testados quatro genes de referência usualmente utilizados em bovinos segundo a literatura: Beta actina (*ACTB*), gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e TATA box binding protein (*TBP*) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de acesso dos ensaios customizados TaqMan® (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene	Identificação do ensaio	Fluorescência
<b><i>CAPN1</i></b>	Bt03223357_m1	FAM
<b><i>CAPN2</i></b>	Bt03817738_m1	
<b><i>CAST</i></b>	Bt03252008_m1	
<b><i>ACTB</i></b>	Bt03279175_g1	
<b><i>GAPDH</i></b>	Bt03210915_g1	
<b><i>TBP</i></b>	Bt03241947_m1	

*CAPN1*:  $\mu$ -calpaína, *CAPN2*: m-calpaína, *CAST*: calpastatina, *ACTB*: Beta actina, *GAPDH*: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase e *TBP*: TATA binding box protein.

Foi utilizado o software Data Assist v2.0 (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) para a realização das análises de expressão e escolha dos genes de referência. O programa analisou a estabilidade dos genes propostos (Tabela 2), apontando como mais estável o gene TBP (Figura 9). Todos os procedimentos laboratoriais da RT-qPCR foram realizados segundo MIQE guide lines (BUSTIN et al., 2009).



**Figura 9.** Gráfico de estabilidade de expressão dos genes de referência *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*,  *$\beta$ -actin (ACTB)* e *TATA binding box protein (TBP)*. Cq: ciclo de quantificação.

As reações de RT-qPCR foram realizadas na plataforma ABI 7300 de acordo com o protocolo da LIFE TECHNOLOGIES.

Foram utilizados conjuntos de sondas de hidrólise customizados (ensaios TaqMan®) para os genes *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST* (Tabela 2), expressos em bovinos (LIFE TECHNOLOGIES, EUA).

Para os ensaios Taqman Gene Expression customizados (diluídos 20x) foram realizados os seguintes procedimentos:

a) Descongelamento das amostras de cDNA e dos ensaios no gelo, seguindo-se de agitação, ressuspensão e breve centrifugação.

b) O reagente master mix foi misturado suavemente, evitando dano ao material. Foi calculada a quantidade de cada reagente de acordo com o número de reações em duplicata a serem feitas por dia.

As reações eram compostas por 1,25  $\mu$ L de TaqMan® Gene Expression Assays (20x), 12,5  $\mu$ L de TaqMan® Universal Master Mix II (2x), 5  $\mu$ L de cDNA (20 ng/ $\mu$ L) e 6,25  $\mu$ L água RNase-free, totalizando 25  $\mu$ L de solução. As placas foram lacradas com os adesivos e centrifugadas brevemente.

### 3.6.5.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA REAÇÃO

Para a realização das reações foi utilizado o sistema Quantstudio 12k flex (LIFE TECHNOLOGIES, CA, EUA), utilizando-se as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para cada reação de qPCR, foram determinados, automaticamente, os parâmetros baseline e threshold, gerando para cada amostra um ciclo de quantificação (ciclo threshold). O Cq que corresponde ao ciclo da qPCR no qual a fluorescência gerada cruza o limiar threshold. A determinação do valor de Cq é importante ainda, porque é ele que será usado na quantificação da expressão dos genes. O Cq é o valor da expressão gênica de cada animal feita em reações duplicatas, e é gerado matematicamente pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que gera uma relação entre o Cq do gene-alvo e o fator normalizador (média dos Cqs dos genes de referência de uma amostra calibradora ou controle interno) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## 3.7. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS

### 3.7.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os ensaios e análises de separação, identificação e quantificação das proteínas miofibrilares foram realizados no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Instituto de Biociências de Botucatu (LBME).

Foram utilizados doze cortes transversais do músculo *Longissimus thoracis* (12 µm de espessura) em micrótomo criostato de cada amostra. Os cortes foram homogeneizados em 0,5mL de uma solução contendo glicerol 10 % (w/vol), 2-mercaptoetanol 5 % (vol/vol), SDS 2,3 % (w/vol) e Tris HCl 0.9 % (pH 6,8) (w/vol). Em seguida o homogeneizado foi colocado em banho-maria a 60 °C durante 10 minutos, após a retirada do banho, foram acrescentadas três gotas de glicerol. Após a homogeneização do glicerol as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 20°C.

### **3.7.2. ELETROFORESE PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE BAIXO PESO MOLECULAR**

A eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (25µl) foi realizada em gel de poliacríamida 15% (VESCOVO et al., 1998), com um gel de empacotamento a 4%, com 2 horas e 20 minutos de corrida a 120 V. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Blue, posteriormente as proteínas miofibrilares foram identificadas de acordo com seus pesos moleculares. Os géis foram inseridos no sistema de foto documentação, onde as imagens foram capturadas por VDS Software (Pharmacia Biotech) e a porcentagem relativa quantificada por densitometria (densidade óptica integrada - ODI) utilizando o Image Master VDS Software (version 3.5).

## **3.8. “WESTERN BLOTTING”**

### **3.8.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

As amostras musculares congeladas a -80°C foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) com 0,5 mL de tampão de lise (1% Triton X-100, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, aprotinina 10 µg/mL, PMSF 1 mM, ortovanadato de sódio -Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,25 mM, NaCl 150 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7.5). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 50 µL do homogenato foi tratada com 25 µL do tampão de amostra de Laemmli (SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,04 mg/mL, Tris-HCl 0,12M pH 6.8 e β-mercaptoetanol 0,28M). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 min e armazenadas em freezer -80°C.

### **3.8.2. ELECTROTRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS**

A electrotransferência foi efetuada pelo método de transferência húmida (TOWBIN et al.,1979) num aparelho Hoefer Transphor TE42 para membrana de PVDF Hybond-ECL de 0,45 µm de poro (GE Healthcare). Para a transferência foi utilizado

um tampão constituído por: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 15% metanol (v/v), pH 7,5, otimizada nos géis de 15% com a adição de 0,01% SDS e tempo de transferência de 2 h a 200 mA/gel. A transferência ocorreu em câmara de refrigeração a 4°C, com suave agitação do tampão de transferência num agitador magnético.

A transferência das proteínas do gel para a membrana foi confirmada pela coloração do gel após transferência, verificando-se nestas condições a transferência completa das proteínas nos géis de 15% T.

Nos géis de 15% T, após transferência para as membranas de PVDF, a linha com os marcadores moleculares foi cortada da membrana e corada com o reagente GelCode Blue Stain (Pierce).

### **3.8.3. INCUBAÇÃO COM OS ANTICORPOS**

Após transferência, as membranas de PVDF foram lavadas em tampão fosfato salino (TFS, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,5) com 0,1% de Tween-20 (TFS-T, v/v). Os locais não específicos foram bloqueados em TFS-T com 5% de leite em pó magro (m/v) durante 1,5 h a 25°C, seguindo-se 2 lavagens breves no mesmo tampão.

As membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico durante 1 h a 25°C, após optimização da diluição de cada anticorpo e da constituição do tampão. Os anticorpos utilizados foram: (1) monoclonal anti-calpaína 1, clone 9A4H8D3 (ABCAM AB3589), diluído 1:2500 em TFS-T (v/v) sem leite em pó; (2) monoclonal anti-calpaína 2, clone 9A4H8D3 (ABCAM AB3589), diluído 1:2500 em TFS-T (v/v) sem leite em pó; (3) monoclonal anti-calpastatina, Clone 1F7E3D10 (Sigma N9891), diluído 1:1000 em TFS-T (v/v) sem leite em pó.

Após incubação seguiram-se duas lavagens breves mais 4 lavagens em TFST durante 10 min cada a 25°C. As membranas foram incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário “Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate” (Santa Cruz SC2005).

### 3.8.4. DETECÇÃO DAS BANDAS

Os anticorpos ligados foram detectados por quimiluminescências com os reagentes de detecção ECL Select (GE Healthcare) incubando as membranas durante 5 min conforme as indicações do fabricante.

Os sinais gerados pelas bandas foram captados em filme fotográfico e a quantificação feita por densitometria, utilizando-se o software Image J software for Windows (versão 1.71, 2006, Áustria). Os valores de expressão proteica foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína GPDH, usada como referência. Os valores de quantificação relativa gerados foram apresentados como unidades arbitrárias.

### 3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No estudo da expressão gênica foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2011). Para análise da expressão gênica, utilizou-se os dados do ciclo de limiar (Ct) de cada amostra, ajustados pelo gene de referência como sugerido por Vandensompele et al. (2002). Posteriormente a expressão foi estimada aplicando a estrutura de modelo linear misto para a quantificação relativa de dados de RT-PCR como proposto por Steibel et al. (2009).  $Y_{gik} = \mu_g + \alpha_i + \beta_{gk} + \gamma_{gk} + \delta_{ik} + \epsilon_{gik}$  Onde  $Y_{gik}$  = Ct obtido pelo software do termociclador para o gene g (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), no rt poço da placa (referente à replica técnica) proveniente da amostra do animal k pertencente ao grupo i.  $\mu_g$  = efeito do grupo i na expressão do gene g.  $\alpha_i$  = efeito específico do gene g na maciez da carne do animal k.  $\beta_{gk}$  = efeito específico do gene g no crescimento do animal k.  $\gamma_{gk}$  = efeito específico da amostra (captura as diferenças entre as amostras que são comuns a ambos os genes, particularmente os que afetam a concentração de RNA, tal como extração diferencial ou eficiências de amplificação entre amostras).  $\delta_{ik}$  = refere-se ao resíduo.

Na análise de expressão proteica da  $\mu$ -calpaína, m-calpaína entre os diferentes grupos foi utilizado o procedimento do PROC GLM do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2011). O modelo incluiu além do efeito de maciez da carne e o



efeito de crescimento do animal, como segue:  $Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + T^*C + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  = característica de interesse,  $\mu$  = média geral,  $T_i$  = efeito da maciez da carne,  $C_j$  = efeito do crescimento animal,  $T^*C_{ij}$  = efeito da interação maciez da carne e crescimento e  $e_{ijk}$  = erro aleatório. As médias dos quadrados mínimos foram comparadas pelo teste Tukey. Considerou-se como nível de significância estatística o valor de 5%.

Os coeficientes de correlação de Pearson foram estimados utilizando-se o procedimento CORR, também do programa SAS. As correlações entre as características estudadas foram obtidas para os dados observados e para os resíduos das análises descritas acima.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, DESEMPENHO PRODUTIVO E DE QUALIDADE DA CARNE**

Os resultados do efeito dos grupos contrastantes sobre as características de crescimento e qualidade da carne são apresentados de forma separada, devido a não ter sido verificada a interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles.

Para os grupos contrastantes para crescimento foi verificada a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para GP, resultado esperado pois tal características foram utilizadas como critério para a separação dos grupos. Os animais Leves tiveram menor GP em relação aos animais do grupo Pesado (Tabela 3). Também foi possível verificar diferença significativa para o PF, sendo os animais pesados tendo maiores medias do que os animais leves. Porém não foi verificada a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a AOL, característica que esta relacionada com a musculosidade, o que nos leva a crer que a diferença no PF entre os grupos não foi devida maior crescimento muscular e sim da deposição de outros tecidos, como o tecido adiposo, que podemos verificar que a EGS dos animais do grupo Pesado foi maior que a dos animais grupo Leve (Tabela 3). Para os grupos Duro e Macio não foi encontrada diferença significativa para as características PF, GP, RC e AOL (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios e erro padrão das características de carcaça e crescimento dos grupos contrastantes

	Grupo			
	Leve	Pesado	Duro	Macio
<b>PF (Kg)</b>	507,1 ± 15,48 <sup>a</sup>	605,6 ± 15,25 <sup>b</sup>	544,9 ± 17,33	536,5 ± 23,88
<b>GP (Kg)</b>	109,1 ± 6,98 <sup>a</sup>	205,5 ± 9,00 <sup>b</sup>	159,10 ± 9,63	156,3 ± 17,57
<b>AOL (cm<sup>2</sup>)</b>	73,3 ± 3,65	77,9 ± 2,21	74,8 ± 1,54	82,8 ± 3,59
<b>EGS (mm)</b>	3,6 ± 0,25	6,6 ± 1,53	3,7 ± 0,44	6,9 ± 1,51
<b>IM</b>	2,4 ± 0,17	2,5 ± 0,17	2,3 ± 0,16	2,2 ± 0,10
<b>LT (%)</b>	0,79 ± 0,10	0,75 ± 0,11	0,76 ± 0,11	0,60 ± 0,07

+ Médias dentro do grupo contrastante para crescimento ou maciez seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste *Tukey*.

Não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os grupos de crescimento e maciez nas características de deposição de gordura (EGS, IM e LT). Os valores médios de espessura de gordura subcutânea (EGS) dos animais leves e duro estão dentro do preconizado pela indústria da carne e os animais pesados e macio estão acima do que se busca (Tabela 3). Segundo Costa et al. (2002), os frigoríficos têm preconizados que as carcaças devem apresentar no mínimo 3 mm de EGS para não sofrerem com os problemas do rápido resfriamento da carcaça, mas o excesso de EGS também tem seu lado negativo, sendo as carcaças com EGS maior de 6 mm acarretar em maiores custos operacionais ao frigorífico e diminuição do rendimento aos produtores, devido a eliminação do excesso de gordura durante o “*toilette*”.

Os valores de LT (Tabela 3) para os grupos deste trabalho são considerados baixos. Segundo Savell e Smith (2009) valores inferiores a 2,5 % são considerados baixos, sendo que para não ocorrer perda na suculência e maciez os valores devem estar entre 2,8 a 3,0 %. Também podemos considerar baixos os valores de IM, que foram classificados na categoria ESCASSO para todos grupos. Foi observado por Chardulo et al. (2013) que bovinos da raça Nelore possuem menor eficiência na deposição da gordura intramuscular, tendo sido observado o aparecimento de traços de marmorização somente após grande acúmulo de gordura no tecido subcutâneo,

fato que pode ter influenciado nas características IM e LT deste trabalho, não sendo possível verificar diferenças entre os grupos.

Dentre as características de qualidade da carne foi verificado apenas o efeito significativo de crescimento para as características  $b^*$  (0 e 7), sendo que os animais pesados tiveram maiores medias (Tabela 4). A diferença na coloração devido ao peso do animal pode ser justificada pelo aumento da quantidade de mioglobina na carne, podendo ser verificada a alteração de classificação da cor da carne com o aumento do peso de abate, passando de “vermelho cereja” para “vermelho escura” (RESTLE et al., 1996).

**Tabela 4.** Valores médios e erro padrão das características de qualidade da carne dos grupos contrastantes para 24 horas (0) e sete dias (7) após o abate

		Grupos			
		Leve	Pesado	Duro	Macio
<b>FC (kg)</b>	0	6,6 ± 0,59 <sup>A</sup>	6,1 ± 0,49 <sup>A</sup>	6,6 ± 0,28 <sup>aA</sup>	3,8 ± 0,19 <sup>b</sup>
	7	4,7 ± 0,31 <sup>B</sup>	4,7 ± 0,32 <sup>B</sup>	5,4 ± 0,29 <sup>aB</sup>	3,5 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>MFI</b>	0	48,11 ± 0,34	55,73 ± 4,80	45,15 ± 3,73 <sup>a</sup>	58,26 ± 3,26 <sup>b</sup>
	7	54,56 ± 3,36	58,40 ± 3,77	52,27 ± 3,64 <sup>a</sup>	64,30 ± 2,59 <sup>b</sup>
<b>L*</b>	0	30,51 ± 0,62 <sup>A</sup>	32,00 ± 0,87	30,09 ± 0,79 <sup>aA</sup>	32,77 ± 0,63 <sup>b</sup>
	7	32,42 ± 0,49 <sup>B</sup>	33,46 ± 0,58	32,70 ± 0,60 <sup>B</sup>	31,99 ± 0,51
<b>a*</b>	0	13,51 ± 0,38 <sup>A</sup>	13,56 ± 0,39 <sup>A</sup>	12,73 ± 0,51 <sup>A</sup>	12,79 ± 0,47 <sup>A</sup>
	7	9,32 ± 0,64 <sup>B</sup>	10,64 ± 0,65 <sup>B</sup>	9,07 ± 0,68 <sup>B</sup>	10,24 ± 0,46 <sup>B</sup>
<b>b*</b>	0	3,80 ± 0,32 <sup>aA</sup>	4,98 ± 0,44 <sup>bA</sup>	3,80 ± 0,49 <sup>A</sup>	3,81 ± 0,48 <sup>A</sup>
	7	5,53 ± 0,18 <sup>aB</sup>	6,44 ± 0,19 <sup>bB</sup>	5,35 ± 0,30 <sup>B</sup>	5,58 ± 0,23 <sup>B</sup>
<b>PT (%)</b>	0	20,80 ± 0,84	21,78 ± 1,06	20,78 ± 0,50 <sup>a</sup>	17,81 ± 1,03 <sup>b</sup>
	7	25,72 ± 2,99	20,80 ± 1,33	24,55 ± 2,89 <sup>a</sup>	17,88 ± 1,26 <sup>b</sup>

+ Médias da mesma característica dentro do grupo contrastante para crescimento ou maciez seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Dentre os grupos contrastante para maciez foi observada diferença significativa para a FC (0 e 7) (Tabela 4). Este resultado era esperado, dado que os mesmos foram utilizados como critério para separação dos grupos. O limite entre carne macia e dura pode ser considerado como valores de FC igual a 5 kg (FELÍCIO, 1999; DIKEMAN et al., 2005; BIANCHINI et al., 2007). Outra medida correlacionada com a maciez é o MFI, que também é significativamente diferente entre os grupos, tendo os grupos dos animais de carne macia apresentando maiores valores, ou seja, carnes mais macias. Para o MFI, os valores abaixo de 50 são consideradas dura e acima de 60 como macia (CULLER et al., 1978), sendo que as diferenças nestas características podem ser devido a taxas menores de proteólise durante a transformação do musculo em carne.

A variação da maciez da carne é um dos problemas encontrados na bovinocultura de corte brasileira. Uma das ferramentas utilizadas pela cadeia produtiva da carne para a melhoria e diminuição da variação da maciez da carne é a maturação (WHEELER et al., 2005). A maturação durante 7 dias apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para FC para o grupo das carnes classificadas como duras, demonstrando que a utilização da maturação é uma ferramenta viável para a melhoria da maciez da carne em bovinos Nelore.

As características de coloração da carne têm sido correlacionadas com a maciez da carne (ANDRADE, 2014), sendo que neste trabalho o efeito de grupo de maciez só foi significativo para  $L^*$  no dia 0 (Tabela 4). Segundo Oliete et al. (2005), o aumento da luminosidade pode ser consequência da desintegração da linha Z das células musculares, que provoca maior difusão da luz incidente, tornando-a mais luminosa. Isto pode ser observado no presente trabalho, onde o grupo dos animais com carne macia apresentou média de  $L^*$  maior e também foi aquele que apresentou maior MFI, o inverso ocorre para os animais de carne, que apresentou valores mais baixos tanto para  $L^*$  quanto para MFI.

Durante o cozimento da carne a perda de água altera o rendimento do produto, afetando a palatabilidade e influenciando a sua aceitabilidade (KONDJOYAN, 2013; MODZELEWSKA-KAPITULA, 2012). As perdas por cocção são atribuídas principalmente à perda de água, gordura fundida, componentes nitrogenados e minerais (LAWRIE, 2005). Segundo Oliveira et al. (1998) as perdas por cocção podem estar relacionadas com o grau de gelatinização do colágeno e a exposição do músculo

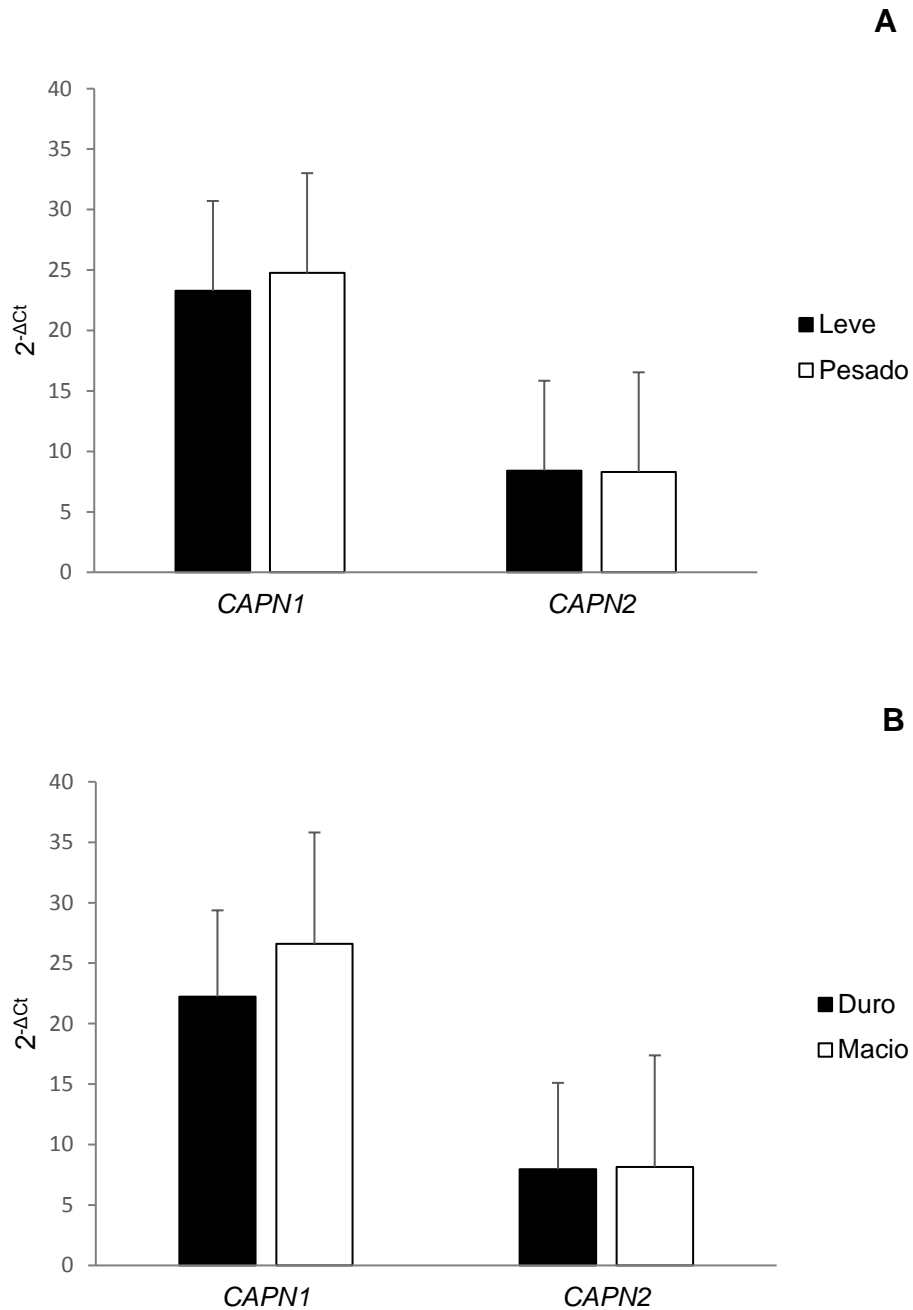
a enzimas proteolíticas. Foi encontrada diferença significativa para as perdas por cocção entre os animais de carne macia e dura. Segundo Bezerra (2009) carnes duras apresentam maiores perdas por cocção, fato que foi observado neste trabalho. Isto pode decorrer da degradação limitada das proteínas miofibrilares por parte das enzimas proteolíticas, afetando assim tanto a retenção da água dentro do músculo como a maciez da carne (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2005).

#### **4.2. EXPRESSÃO GÊNICA DAS CALPAÍNAS E CALPASTATINA**

Foi realizada qPCR para os genes alvos (*CAPN1*, *CAPN2* e *CAST*) para verificar o efeito dos grupos contrastantes para crescimento e maciez. Devido a problemas nas análises do gene *CAST* por qPCR, não foi possível verificar sua expressão dentro dos grupos contrastantes.

Em bovinos, o gene da calpastatina (*CAST*) é formado por 35 éxons, os quais abrangem pelo menos 130 kb de DNA genômico. A sua expressão é controlada por quatro promotores, os quais geram quatro tipos de transcrições, que divergem em suas extremidades 5' (RAYNAUD et al., 2005). Assim, a não observação do trabalho para a expressão do gene da calpastatina (*CAST*) pode ser devido ao ensaio TaqMan® escolhido, a sequência de reconhecimento da sonda pode não ter anelado com as amostras.

Não foi possível verificar o efeito significativo do grupo de crescimento sobre a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* neste trabalho (Figura 10a). Alguns trabalhos têm indicado a relação entre enzimas calpaina e calpastatina com o aumento da taxa de crescimento (THOMSON et al., 1999; SAZILI et al., 2004). Porém Thirkildsen et al. (2002) não encontraram relação entre a taxa de crescimento com as calpainas e calpastatina. Apesar das calpainas terem papel importante no *turn-over* proteico o processo de crescimento envolve outras vias metabólicas, os quais são mais influentes no crescimento do que as calpainas. Outro fator que corrobora esta hipótese e que não foi encontrada correlação significativa entre as características de crescimento (PF e GP) com a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* (Tabela 5).



**Figura 10.** Expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* dos grupos contrastantes. (A) crescimento (animais pesados/animais leves) e (B) maciez (carne dura/carne macia). As barras indicam o desvio padrão das médias. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre grupos.

**Tabela 5.** Correlação da expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* com a força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI) nos dias 0 e 7, peso final (PF) e ganho de peso (GP)

	<b>FC (0)</b>	<b>FC (7)</b>	<b>MFI (0)</b>	<b>MFI (7)</b>	<b>PF</b>	<b>GP</b>
<b><i>CAPN1</i></b>	-0,23	-0,16	-0,07	0,04	0,01	-0,01
<b><i>CAPN2</i></b>	0,01	0,11	-0,30	-0,09	-0,06	-0,09

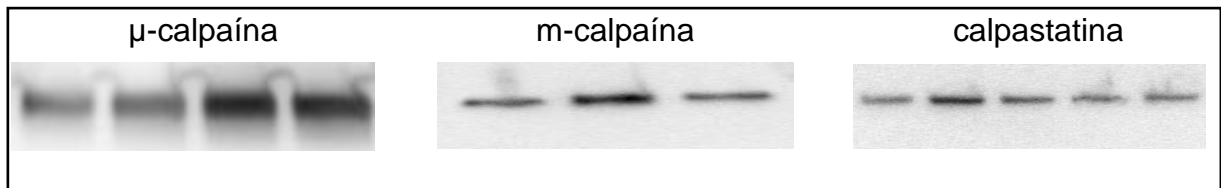
\*correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

Tem sido relatado que a menor maciez da carne nos animais Nelore é devida a menores níveis de expressão dos genes da calpaína (WHEELER; CUNDIFF; KOCH, 1994) e maior expressão do gene da calpastatina (SHACKELFORD et al., 1995; RUBENSAM et al., 1998; FERGUSON et al., 2001). Neste trabalho a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* não foram diferentes entre os grupos de maciez (Figura 10b). Os resultados encontrados corroboram resultados encontrados por outros trabalhos que avaliaram a expressão gênica em bovinos Nelore, os quais não encontraram diferenças na expressão destes genes e a maciez da carne (TIZIOTO et al., 2013; GONÇALVES, 2015; FONSECA, 2016). Diante dos resultados obtidos, supõem-se que a diferença na maciez da carne nos bovinos Nelore, provavelmente não é resultante da diferença de expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2*.

Koohmaraie e Geesink (2006) e Guillemin et al. (2011) relatam que a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* está positivamente correlacionada com as medidas de FC e negativamente correlacionada com as medidas de MFI, indicando que maior expressão das calpaínas levam a maior maciez da carne. No presente trabalho não foi encontrada correlação entre a força de cisalhamento e a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* (Tabela 5). Este resultado, está de acordo com o que foi relatado por Giusti (2013), que trabalhando com bovinos Nelore, não encontrou correlação entre a expressão dos genes *CAPN1* e *CAPN2* e as medidas de força de cisalhamento.

### 4.3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS CALPAÍNAS E CALPASTATINA

Foram realizadas as análises de “*Western blot*” para as proteínas alvos ( $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina), ao qual os padrões das bandas são apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** “*Western blots*” da  $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina, preparados a partir dos géis a 8%.

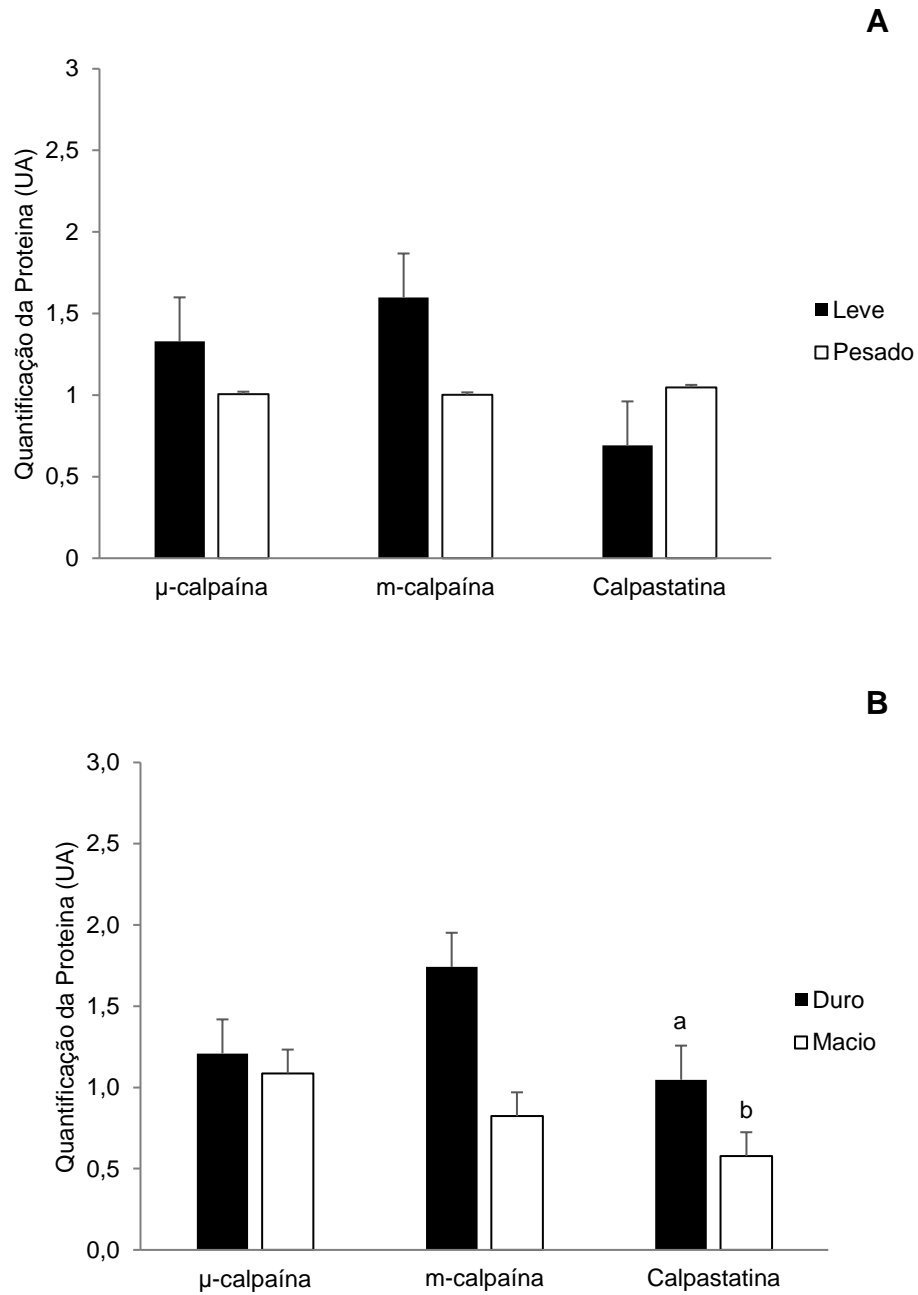
Ambos  $\mu$  e m-calpaína são heterodímeros compostos por subunidade de 80 kDa (catalítica) e 28 kDa (reguladora) (SUZUKI, 1990). Foi demonstrado para a  $\mu$ -calpaína, que durante a transformação do músculo em carne, com a presença de íons cálcio a subunidade de 80 kDa é gradualmente convertida para subunidade de 78 kDa e, em seguida, para 76 kDa, ao qual não apresenta atividade proteolítica (BOEHM et al., 1998; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; DELGADO et al, 2001). Para a m-calpaína foi somente verificada a conversão da subunidade de 80 kDa para 78 kDa (BROWN; CRAWFORD, 1993). Neste trabalho não foi mensurado as subunidades de 78 e 76 kDa, somente foi verificada a presença da subunidade de 80 kDa, ao qual mantém sua capacidade proteolítica.

Foi demonstrado por Boehm et al. (1998), que para a calpastatina ocorre quatro polipeptídios ativos, sendo 125, 91, 68 e 42 kDa no músculo durante o *post-mortem*. Segundo Doumit e Koochmaraie (1999) durante a maturação a degradação das formas ativas da calpastatina produzem seis produtos, sendo aproximadamente de 100, 80, 65, 54, 32 e 29 kDa. Neste trabalho, por meio do anticorpo utilizado houve a possibilidade da detecção das formas ativas da calpastatina (125, 91 e 68 kDa).

A partir da normalização das proteínas-alvo ( $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina) pela proteína de controle escolhido (*GAPDH*), foram obtidos para os grupos os dados da quantificação das proteínas pela técnica de “*Western blot*”. Para



os grupos contrastantes para o crescimento não foi possível verificar diferenças significativas na quantificação das calpainas assim como na expressão gênica (Figura 12A). Da mesma forma Sazili et al. (2004) não encontrou diferenças para a quantificação das calpainas em grupos contrastantes para crescimento na raça Friesan. Também não foi verificado a diferença entre os grupos para a quantificação da calpastatina. Os resultados são confirmados pela análise de correlação, onde não foi encontrada correlação significativa entre as calpainas e calpastatina com as características de crescimento (Tabela 6).



**Figura 12.** Quantificação das enzimas  $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina. (A) crescimento (animais pesados/animais leves) e (B) maciez (carne dura/carne macia). As barras indicam o desvio padrão das médias. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre grupos.

**Tabela 6.** Correlação entre as medidas da maciez da carne e de crescimento e a quantidade das enzimas proteolíticas

	$\mu$ -calpaína	m-calpaína	Calpastatina
<b>FC (0)</b>	0,41	0,34	0,81*
<b>FC (7)</b>	0,29	0,32	0,74*
<b>MFI (0)</b>	0,01	-0,23	-0,16
<b>MFI (7)</b>	-0,15	-0,30	-0,58*
<b>PF</b>	0,36	0,10	0,20
<b>GP</b>	0,32	-0,10	0,16

\*correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

Não foi encontrado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para os grupos contrastantes para maciez na quantificação das proteínas  $\mu$ -calpaína e m-calpaína, assim como ocorreu nas análises de expressão gênica (Figura 13b). Apesar de muitos trabalhos já terem demonstrado a relação entre as calpains com a maciez da carne, neste trabalho não foi possível verificar a correlação entre as calpains com as características de maciez (FC e MFI) (Tabela 6). Porém Magolski et al. (2013) demonstrou que após 36 horas *pós-mortem* a uma grande queda nos níveis da  $\mu$ -calpaína intacta (80 Kda), fato que pode ter sido responsável por uma subestimação da quantidade de  $\mu$ -calpaína neste trabalho, já que as amostras de “western-blot” foram coletadas após 36 horas do abate dos animais.

Alguns autores propõem que a principal causa na variação da maciez da carne em animais *Bos indicus* poderia ser atribuída ao efeito da calpastatina (SHACKELFORD et al., 1995; RUBENSAM et al., 1998; FERGUSON et al., 2001). Os resultados deste trabalho vêm corroborar estes achados, onde os animais de carne dura apresentaram maiores quantidades de calpastatina (Figura 3B), indicando ser o responsável pelas diferenças na maciez da carne nos animais deste trabalho. Esta diferença decorre do fato da calpastatina inibir as calpains, que fazem com que ocorra a diminuição da quebra das miofibrilas, isto pode ser observado neste trabalho, onde os animais de carne dura tiveram menores medias de MFI (Tabela 4). Também foi possível verificar uma alta correlação entre as quantidades de calpastatina com a FC (0) ( $r = 0,81$ ) e FC (7) ( $r = 0,74$ ), sendo que quanto maior as quantidades de

calpastatina maior será a FC, conseqüentemente carnes com menor maciez (Tabela 6). Os resultados são semelhantes encontrados por Morton et al. (1999) que encontrou correlações significativas entre os níveis de calpastatina com maciez da carne aos 4 e 14 dias após abate ( $r= 0,85$  e  $0,83$  respectivamente). Estes resultados vem confirmar que a calpastatina tem papel importante nas variações da maciez da carne em bovinos Nelore.

#### 4.4. DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE BAIXO PESO MOLECULAR

A análise de variância das medidas de quantificação da degradação das proteínas miofibrilares indicou que houve efeito significativo ( $p<0,05$ ) dos grupos contrastantes para crescimento e maciez, também foi possível verificar o efeito da maturação (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios e erro padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas desmina, troponina T, troponina I,  $\alpha$ -tropomiosina e  $\beta$ -tropomiosina

		Grupos			
		Leve	Pesado	Duro	Macio
<b>Desmina</b>	0	29,52 $\pm$ 7,03	37,99 $\pm$ 18,80	31,98 $\pm$ 19,31	33,81 $\pm$ 15,19
	7	23,88 $\pm$ 8,37	28,26 $\pm$ 7,14	28,14 $\pm$ 7,95	24,42 $\pm$ 9,90
<b>Troponina T</b>	0	87,26 $\pm$ 31,17 <sup>a</sup>	131,28 $\pm$ 39,58 <sup>bA</sup>	98,41 $\pm$ 41,70	108,20 $\pm$ 34,54
	7	68,62 $\pm$ 12,59	74,95 $\pm$ 28,61 <sup>B</sup>	98,51 $\pm$ 16,19	78,75 $\pm$ 31,52
<b>Troponina I</b>	0	43,77 $\pm$ 19,21 <sup>A</sup>	47,33 $\pm$ 31,34 <sup>A</sup>	48,55 $\pm$ 21,32	43,86 $\pm$ 14,38
	7	29,09 $\pm$ 11,76 <sup>B</sup>	28,31 $\pm$ 9,85 <sup>B</sup>	30,43 $\pm$ 9,25	27,43 $\pm$ 11,64
<b><math>\alpha</math>-tropomiosina</b>	0	62,99 $\pm$ 22,69	85,47 $\pm$ 32,35 <sup>A</sup>	69,03 $\pm$ 23,93	76,84 $\pm$ 24,21 <sup>A</sup>
	7	34,42 $\pm$ 14,59	36,98 $\pm$ 17,52 <sup>B</sup>	56,27 $\pm$ 18,57	52,85 $\pm$ 20,98 <sup>B</sup>
<b><math>\beta</math>-tropomiosina</b>	0	42,07 $\pm$ 17,25	66,04 $\pm$ 12,37	55,80 $\pm$ 19,82	60,26 $\pm$ 15,15
	7	38,50 $\pm$ 16,93	40,73 $\pm$ 6,78	53,00 $\pm$ 20,93	55,09 $\pm$ 10,50

+ Médias da mesma proteína dentro dos grupos para crescimento ou maciez seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de *Tukey* ( $p<0,05$ ).

A degradação da troponina T durante a maturação dos músculos tem sido associada com o aumento da maciez da carne ao longo do tempo (IWANOWSKA et al., 2010). Apenas para o grupo Pesado houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o dia 0 e dia 7. Foi encontrada também diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a troponina T no dia 0 entre os grupos para o crescimento. Os grupos dos animais pesados foram os únicos em que se possível verificar o efeito da maturação sobre as características de maciez, podendo ser a observação da degradação da troponina T como um sinal de uma maior degradação.

Assim como a troponina T, a troponina I participa da regulação da interação cálcio-dependente da miosina com a actina na contração dos músculos estriado (LUCHIARI FILHO, 2000). Alguns autores têm relacionado a degradação da troponina I durante a maturação com o amaciamento da carne (HO et al., 1994; KOLCZAK et al., 2003). Assim como em Silva (2006) foi observado neste trabalho uma diminuição da intensidade da banda correspondente à troponina I (banda a 22 kDa) ao longo do armazenamento da carne. Não foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos para a troponina I nos dias 0 ou 7. Foi verificado o efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da maturação nos grupos contrastantes para maciez, com maior queda para o grupo dos animais pesados.

A tropomiosina é uma proteína reguladora e responsável pela sensibilidade do sistema actomiosina ao cálcio (LUCHIARI FILHO, 2000). A hidrólise da tropomiosina facilitaria a desestruturação e a liberação dos filamentos finos, resultando nos monômeros de actina (TAYLOR et al., 1995). Foi observado neste trabalho a diminuição da intensidade das bandas para as proteínas tropomiosina ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Da mesma forma Abrahão (2007), trabalhando com 30 animais Nelore verificou a diminuição da intensidade das bandas destas proteínas ao longo dos 14 dias de maturação. Para a proteína  $\alpha$ -tropomiosina foi encontrado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) apenas para o efeito da maturação nos grupos dos animais pesado e nos de carne macia. Não foi encontrado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para os efeitos de grupo e da maturação para a proteína  $\beta$ -tropomiosina.

Conforme relatado na literatura, podem ser encontradas correlações entre a degradação das proteínas miofibrilares e a maciez da carne (KOOHMARAIE, 2002;

LAMETSCH et al., 2003; SAWDY et al., 2004), entretanto, no presente trabalho não foi encontrada qualquer correlação significativa entre a degradação das proteínas com FC e MFI (Tabela 7). No mesmo sentido Therkildsen et al. (2002) não encontrou correlação significativa entre a degradação da desmina e diferenças na maciez da carne em animais Holstein. Abrahão (2007) trabalhando com animais Nelore e cruzados ( $\frac{1}{2}$  Nelore x  $\frac{1}{2}$  Aberdeen Angus) também não encontrou correlação da degradação das proteínas  $\alpha$ -tropomiosina e  $\beta$ -tropomiosina ao longo da maturação com FC e MFI. Da mesma forma, em estudo conduzido por Silva (2007), não foi encontrada correlação significativa entre a degradação das troponinas T e I e FC ao longo da maturação em animais da raça Maronesa (*Bos taurus*). Segundo Wojtysiak e Poltowicz (2015) é provável que a correlação entre o amaciamento da carne e a taxa de degradação de proteínas miofibrilares depende, não somente da degradação das proteínas, mas também outros fatores como, gordura intramuscular, conteúdo de colágeno ou tamanho de sarcômero.

**Tabela 8.** Correlação dos índices de densidade óptica (IOD) das proteínas miofibrilares com a força de cisalhamento (FC) e o índice de fragmentação miofibrilar (MFI) 24 horas (0) e sete dias (7) após o abate.

	Desmina	Troponina T	Troponina I	$\alpha$ -tropomiosina	$\beta$ -tropomiosina
<b>FC (0)</b>	-0,26	0,06	-0,18	-0,01	-0,06
<b>FC (7)</b>	-0,17	0,14	0,02	0,21	0,10
<b>MFI (0)</b>	0,08	-0,06	-0,02	0,01	-0,01
<b>MFI (7)</b>	0,04	-0,24	-0,06	-0,20	-0,09

\*correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSÕES

As expressões dos genes *CAPN1* e *CAPN2* e a quantificação das enzimas  $\mu$ -calpaína, m-calpaína não podem ser utilizados como marcador genético na seleção de indivíduos para crescimento e maciez em animais da raça Nelore, uma vez que não foram encontrados indícios neste trabalho que permitissem indicar que a expressão destes genes e as quantidades das enzimas tivessem correlação com as características de crescimento e de maciez da carne.

A diferença entre os grupos contrastantes e a alta correlação entre os níveis de calpastatina com as características de maciez demonstra a importância do sistema das calpains na proteólise das miofibrilas, sendo os níveis de calpastatina um alvo potencial para a seleção de animais, com o objetivo de melhorar as características da qualidade da carne dos animais da raça Nelore.

## 6. REFERÊNCIAS

ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; GERRARD, D. E.; MILLS, E. W. **Principles of meat science**. Dubuque: Kendall Hunt, 2001. p. 354.

ABRAHÃO, A. R. **Análise de algumas proteínas miofibrilares envolvidas na maciez da carne em bovinos de corte**. 2007. 54 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

ALMEIDA, A. K. de; MICHELS, I. L. O Brasil e a economia-mundo: o caso da carne bovina. **Ensaio FEE**, v. 33, n. 1, p. 207-230, 2012.

ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MACEDO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.

ALVES, D. D.; MANCIO, A. B. Maciez da Carne bovina - uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 193-216, 2007.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 533-537, 1997.

ANDERSON, M. J.; LONERGAN, S. M.; FEDLER, C. A.; PRUSA, K. J.; BINNING, J. M.; HUFF-LONERGAN, E. Profile of biochemical traits influencing tenderness of muscles from the beef round. **Meat Science**, v. 91, n. 3, p. 247-254, 2012.

ANDRADE, P. L. **Maturação da carne de bovinos Red Norte e Nelore**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Rebanho Bovino Brasileiro, 2015. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/3\\_rebanho.asp](http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp)>. Acesso em: 26 de dez. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRADOS CRIADORES DE ZEBU – ABCZ. **Manual do serviço de registro genealógico das raças zebuínas**. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/Content/arquivos/AreaTecnica/SRGRZ/manual-do-reg-genealogico-e-pmgz.pdf>>. Acesso em: 12 de dezembro 2015.

BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; CAPEL, M.; MOORE, P. B.; STEITZ, T. A. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. **Nature**, v. 400, n. 6747, p. 841-847, 1999.

BELCHER, K. W.; GERMANN, A. E.; SCHMUTZ, J. K. Beef with environmental and quality attributes: Preferences of environmental group and general population consumers in Saskatchewan, Canada. **Agriculture and Human Values**, v. 24, n. 3, p. 333-342, 2007.

BEZERRA, R. T. R. **Espectroscopia de infravermelho próximo na determinação da composição, perdas por cocção e força de cisalhamento de carne bovina congelada a-20 e a-40° C**. 2009. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

BIANCHINI, W.; SILVEIRA, A. C.; JORGE, A. M.; ARRIGONI, M. de B.; MARTINS, C. L.; RODRIGUES, E.; HADLICH, J. C.; ANDRIGHETTO, C. Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos superprecoces. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2109-2117, 2007.

BISHOP, M. D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 8, p. 2277, 1993.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOEHM, M. L.; KENDALL, T. L.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 9, p. 2415-2434, 1998.

BROWN, N.; CRAWFORD, C. Structural modifications associated with the change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity on activation of m-calpain. **FEBS letters**, v. 322, n. 1, p. 65-68, 1993.

BULTOT, D.; DUFRASNE, I.; CLINQUART, A.; HOCQUETTE, J.; ISTASSE, L. Performances and meat quality of Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus bulls fattened with two types of diet. In: RENCONTRE DES RECHERCHES SUR RUMINANTS, 2002, Paris. **Proceedings**...Paris, 2002. p. 271.

CAMOU, J. P.; MARCHELLO, J. A.; THOMPSON, V. F.; MARES, S. W.; GOLL, D. E. Effect of postmortem storage on activity of  $\mu$ - and m-calpain in five bovine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 10, p. 2670-2681, 2007.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE JR, C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 520-525, 2006.



CASAS, E.; WINTE, S. N.; RILEY, D. O.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n.1, p. 13-19, 2005.

CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, A. C.; VIANELLO, F. Analytical Aspects for Tropical Meat Quality Assessment. In: GIUSSEPPINA, P. P. L.; VIANELLO, F. **Food Quality, Safety and Technology**. Vienna: Springer Vienna, 2013. cap. 4, p. 53-62.

CHUNG, H.; DAVIS, M. PCR-RFLP of the ovine calpastatin gene and its association with growth. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 8, p. 641-652, 2012.

CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 637-706, 2002.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Indicadores econômicos da produção da bovinocultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnabrasil.org.br/central-comunicacao/artigos-tecnicos>>. Acesso em: 12 de janeiro 2016.

CONG, M.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E.; ANTIN, P. B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 660-666, 1998.

COSTA, E. C. da; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L.; PEROTTONI, J.; FATURI, C.; MENEZES, L. F. G. de. Composição física da carcaça, qualidade da carne e conteúdo de colesterol no músculo *Longissimus dorsi* de novilhos Red Angus superprecoces, terminados em confinamento e abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 417-428, 2002.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. do; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

CROALL, D. E.; DEMARTINO, G. N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 3, p. 813-847, 1991.

CULLER, R. D.; PARRISH JR, F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine *longissimus* muscle. **Journal Food Science**, v.43, n. 4, p. 1177-1180, 1978.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A.; GIUSTI, J.; SILVEIRA, A. C.; MARTINS, C. L.; DE OLIVEIRA, H. N. Assessment of *GH1*, *CAPN1* and *CAST* polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*–*Bos indicus* cross beef cattle. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 915-920, 2010.

DEDIEU, S.; POUSSARD, S.; MAZÈRES, G.; GRISE, F.; DARGELOS, E.; COTTIN, P.; BRUSTIS, J. J. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. **Experimental Cell Research**, v. 292, n. 1, p. 187-200, 2004.

DELGADO, E. F.; GEESINK, G. H.; MARCHELLO, J. A.; GOLL, D. E.; KOOHMARAIE, M. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 2, p. 398-412, 2001.

DIKEMAN, M. E.; POLLAK, E. J.; ZHANG, Z.; MOSER, D. W.; GILL, C. A.; DRESSLER, E. A. Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 10, p. 2461-2467, 2005.

DOUMIT, M. E.; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: Evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 6, p. 1467-1473, 1999.

DRANSFIELD, E. Meat tenderness - The mu-calpain hypothesis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 45., 1999, Yokohama. **Proceedings...** Yokohama, 1999. p. 220-228.

ÉTIENNE, J. Bioquímica Genética e Biologia Molecular. 6ª. 2003.

FEIJÓ, G. L. D. Curso conhecendo a carne que você consome, 1., 1999, Campo Grande. **Qualidade da carne bovina**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1999. 25p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 77).

FELÍCIO, P. E. de. Fatores ante et post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C. de; FARIA, V. P. de. **Produção do novilho de corte**. Piracicaba: FEALQ-USP, 1997. p. 79-97.

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

FERGUSON, D. M.; BRUCE, H. L.; THOMPSON, J. M.; EGAN, A. F.; PERRY, D.; SHORTHORSE, W. R. Factors affecting beef palatability - farmgate to chilled carcass. **Animal Production Science**, v. 41, n. 7, p. 879-891, 2001.

FERRAZ, A. L. J. **Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e a maciez da carne**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

FLORES, J.; SALVADOR, B. Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 15-24, 1995.

FLORINDO, T. J.; MEDEIROS, G. I. B. de; MAUAD, J. R. C. Análise das barreiras não tarifárias à exportação de carne bovina. **Revista de Política Agrícola**, v. 24, n. 2, p. 52-63, 2015.

FONSECA, L. F. S. **Expressão gênica diferencial em tecido muscular de bovinos Nelore divergentes para qualidade de carne**. 2016. 107 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2016.

GAYA, L. de G.; FERRAZ, J. B. S. Aspectos genético-quantitativos da qualidade da carne em frangos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 349-356, 2006.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.1, p.1-26, 2001.

GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A. H.; KOOHMARAIE, M. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2834-2840, 2006.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 6, p. 1490-1501, 1999.

GEESINK, G. H.; MAREKO, M. H.; MORTON, J. D.; BICKERSTAFFE, R. Effect of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb m. *longissimus*. **Meat Science**, v. 57, n. 3, p. 265-271, 2001.

GERELT, B.; RUSMAN, H.; NISHIUMI, T.; SUZUKI, A. Changes in calpain and calpastatin activities of osmotically dehydrated bovine muscle during storage after treatment with calcium. **Meat Science**, v. 70, n. 1, p. 55-61, 2005.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GIUSTI, J.; CASTAN, E.; DAL PAI, M.; ARRIGONI, M. de B.; RODRIGUES BALDIN, S.; de OLIVEIRA H. N. Expression of genes related to quality of *Longissimus dorsi* muscle meat in Nelore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. **Meat science**, v. 94, n. 2, p. 247-252, 2013.

GOLL, D. E.; NETI, G.; MARES, S. W.; THOMPSON, V. F. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. **Journal Animal Science**, v.86, p. 19-35, 2008.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003.

GONÇALVES, T. M. **Differential expression of genes related with meat tenderness in Nelore Cattle**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência – Área: Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 853-924, 2000.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; MAXIMA, M. D. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v.177, p. 751-766, 1949.

GRUBER, S. L.; TATUM, J. D.; ENGLE, T. E.; PRUSA, K. J.; LAUDERT, S. B.; SCHROEDER, A. L.; PLATTER, W. J. Effects of ractopamine supplementation and postmortem aging on longissimus muscle palatability of beef steers differing in biological type. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 205-210, 2007.

GRUBER, S. L.; TATUM, J. D.; SCANGA, J. A.; CHAPMAN, P. L.; SMITH, G. C.; BELK, K. E. Effects of postmortem aging and USDA quality grade on Warner-Bratzler shear force values of seventeen individual beef muscles. **Journal Animal Science**, v. 84, n. 12, p. 3387-3396, 2006.

GUILLEMIN, N.; JURIE, C.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; RENAND, G.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, v. 5, n. 6, p. 885-894, 2011.

HAYWARD-LESTER, A.; OEFNER, P. J.; SABATINI, S.; DORIS, P. A. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. **Genome Research**, v. 5, n. 5, p. 494-499, 1995.

HO, C. Y.; STROMER, M. H.; ROBSON, R. M. Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. **Biochimie**, v. 76, n. 5, p. 369-375, 1994.

HOCQUETTE, J.; BOTREAU, R.; PICARD, B.; JACQUET, A.; PETHICK, D. W.; SCOLLAN, N. D. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 197-209, 2012.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, J. M. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderisation in beef and sheep meat. **Crop and Pasture Science**, v. 53, n. 2, p. 149-166, 2002.

HUANG, F.; HUANG, M.; ZHANG, H.; GUO, B.; ZHANG, D.; ZHOU, G. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during postmortem ageing of beef skeletal muscle. **Food Chemistry**, v. 148, p. 1-6, 2014.

HUANG, J.; FORSBERG, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12100-12105, 1998.

HUANG, M.; HUANG, F.; XU, X.; ZHOU, G. Influence of caspase3 selective inhibitor on proteolysis of chicken skeletal muscle proteins during post mortem aging. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 181-186, 2009.

HUANG, Z.; CHEN, X.; CHEN, D. Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 9, p.1441-1446, 2011.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v. 71, n. 1, p. 194-204, 2005.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. New frontiers in understanding drip loss in pork: recent insights on the role of postmortem muscle biochemistry. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 1, p. 19-26, 2007.

HUFF-LONERGAN, E.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D. D.; PARRISH JR, F. C.; OLSON, D. G.; ROBSON, R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 5, p. 993-1008, 1996.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 184-195, 2010.

INDICADORES PECUÁRIOS. São Paulo: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário: pecuária municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em: 15 outubro, 2015.

IWANOWSKA, A.; IWAŃSKA, E.; GRZEŚ, B.; MIKOŁAJCZAK, B.; POSPIECH, E.; ROSOCHACKI, S.; JUSZCZUK-KUBIAK, E.; ŁYCZYŃSKI, A. Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. **Animal Science Papers and Reports**, v. 28, n. 1, p. 13-25, 2010.

JOO, S. T.; KIM, G. D.; HWANG, Y. H.; RYU, Y. C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 828-836, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 184-205.

KANAWA, R.; JI, J. R.; TAKAHASHI, K. Inactivity of  $\mu$ -calpain throughout postmortem aging of meat. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 635-638, 2002.

KEMP, C. M.; PARR, T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. **Meat science**, v. 92, n. 3, p. 252-259, 2012.

KEMP, C. M.; SENSKY, P. L.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J.; PARR, T. Tenderness - An enzymatic view. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 248-256, 2010.

KENT, M. P.; SPENCER, M. J.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 3, p. 794-801, 2004.

KIRINUS, J. K.; FRUET, A. P. B.; TEIXEIRA, C.; DÖRR, A. C.; NÖRNBERG, J. L. Aplicação da genética molecular para a melhoria da qualidade da carne bovina. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 165-174, 2014.

KOŁCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K.; ŁCKI, J. Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. **Meat Science**, v. 64, n. 1, p. 69-75, 2003.

KONDOYAN, A.; OILLIC, S.; PORTANGUEN, S.; GROS, J. B. Combined heat transfer and kinetic models to predict cooking loss during heat treatment of beef meat. **Meat science**, v. 95, n. 2, p. 336-344, 2013.

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

KOOHMARAIE, M. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v. 74, n. 3, p. 239-245, 1992.

KOOHMARAIE, M.; CHISHTI, A. H.; GEESINK, G. H.; KUCHA, S.  $\mu$ -calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2834-2840, 2006.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 34-43, 2006.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M. P.; SHACKELFORD, S. D.; VEISETH, E.; WHEELER, T. L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 345-352, 2002.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, v.38, n. 4, p.283-293, 2006.

LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROERSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6992-6997, 2003.

LAWRENCE, R. W.; DOYLE, J.; ELLIOTT, R. ; LOXTON, I. ; MCMENIMAN, J. P.; NORTON, B. W.; REID, D. J.; TUME, R. W. The efficacy of a vitamin D3 metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from *Bos indicus* cattle. **Meat Science**, v. 72, n. 1, p. 69-78, 2006.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**. Porto Alegre: ARTMED S.A., 2005, p. 384.

LEBART, M.; BENYAMIN, Y. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. **FEBS Journal**, v. 273, n. 15, p. 3415-3426, 2006.

LI, Y.; ARNOLD, J. M.; PAMPILLO, M.; BABWAH, A. V.; PENG, T. Taurine prevents cardiomyocyte death by inhibiting NADPH oxidase-mediated calpain activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 1, p. 51-61, 2009.

LIMA JR, D. M. de; RANGEL, A. H. do N.; URBANO, S. A.; MACIEL, M. do V.; AMARO, L. P. de A. Alguns aspectos qualitativos da carne bovina: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 4, p.351-358, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta CT$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONERGAN, E. H.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 184-195, 2010.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. p.134.

LUCIANO, F. B.; ANTON, A. A.; ROSA, C. F. Biochemical aspects of meat tenderness: a brief review. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, p. 1-8, 2007.

LUDTKE, C.; CIOCCA, J. R. P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P. C.; VILELA, J. A.; FERRARINI, C. Abate humanitário de bovinos. 2012. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/Manual%20Bovinos.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manual%20Bovinos.pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2015.

MAGOLSKI, J. D.; BERG, E. P.; HALL, N. L.; ANDERSON, V. L.; KELLER, W. L.; JESKE, T. M.; CARLIN, K. R. Evaluation of feedlot cattle working chute behavior relative to temperament, tenderness, and postmortem proteolysis. **Meat Science**, v. 95, n. 1, p. 92-97, 2013.

MAIA FILHO, G. H. B.; BARBOSA, F. A.; ANDRADE JR, J. M. de C.; MACIEL, I. C. de F.; COSTA, P. M.; SALLES, A. de P. Mercado consumidor e a qualidade de carne bovina no Brasil. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 1, p. 191-204, 2015.

MALHEIROS, J. M. **Identificação e quantificação das proteínas miofibrilares, isoformas da cadeia pesada de miosina (*MyHC*) e o amaciamento da carne de bovinos Nelore (*Bos indicus*)**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAY, M. Determinants of meat quality: Tenderness. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, n. 2, p.337-347, 2003.

MANCINI, R. A.; HUNT, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, n. 1, p. 100-121, 2005.

MANÇO, M. C. W.; ROÇA, R. O. Efeito da idade de abate em parâmetros qualitativos da carne de bovinos da raça Nelore. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 361-364, 2002.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Bovinos e Bubalinos**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 26 de dez. 2015.

MARINO, R.; ALBENZIO, M.; DELLA, M. A.; SANTILLO, A.; LOIZZO, P.; SEVI, A. Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 281-287, 2013.

McARDLE, W. D.; KATCH, V. L.; KATCH, F. I. **Fisiologia do Exercício – Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MELODY, J.; LONERGAN, S. M.; ROWE, L.J.; HUIATT, T.W.; MAYES, M.S.; HUFF-LONERGAN, E. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 4, p. 1195-1205, 2004.

MIZUNOYA, W.; WAKAMATSU, J.; TATSUMI, R.; IKEUCHI, Y. Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. **Analytical Biochemistry**, v. 377, n. 1, p. 111-113, 2008.



MODZELEWSKA-KAPITULA, M.; DĄBROWSKA, E.; JANKOWSKA, B.; KWIATKOWSKA, A.; CIERACH, M. The effect of muscle, cooking method and final internal temperature on quality parameters of beef roast. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 195-202, 2012.

MOELLER, S. J.; MILLER, R. K.; EDWARDS, K. K.; ZERBY, H. N.; LOGAN, K. E.; ALDREDGE, T. L.; STAHL, C. A.; BOGGESS, M.; BOX-STEFFENSMEIER, J. M. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. **Meat Science**, v. 84, n. 1, p. 14-22, 2010.

MORAES, M. S. **Maturação da carne bovina**. 2004. 31 f. Monografia (Especialização em Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

MUCHENJE, V.; DZAMAC, K.; CHIMONYOA, M.; STRYDOMD, P. E.; HUGOE, A.; RAATSA, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279-289, 2009.

MULLEN, A.; STAPLETON, M. P. C.; CORCORAN, D.; HAMILL, R. M.; WHITE, A. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 3-16, 2006.

MUROYA, S.; OE, M.; NAKAJIMA, I.; SHIBATA, M.; CHIKUNI, K. A non-destructive method to monitor changes in a troponin T peptide in beef drip with a monoclonal antibody. **Meat Science**, v. 83, n. 1, p. 155-160, 2009.

MYERS, A. J.; SCRAMLIN, S. M.; DILGER, A. C.; SOUZA, C. M.; MCKEITH, F. K.; KILLEFER, J. Contribution of lean, fat, muscle color and degree of doneness to pork and beef species flavor. **Meat science**, v. 82, n. 1, p. 59-63, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 8.ed. Washington, D. C.: National Academies Press, 2000. p. 248.

NETI, G. NOVAK, S. M.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover?. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 296, n. 6, p. 1383-1390, 2009.

OLIETE, B.; MORENO, T.; CARBALLO, J. A.; VARELA, A.; MONSERRAT, L.; SÁNCHEZ, L. Influence of ageing time on the quality of yearling calf meat under vacuum. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 5, p. 489-493, 2005.

OLIVEIRA, L. B.; SOARES, G.; ANTUNES, P. Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 166-171, 1998.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 205-279.

OUALI, A.; GAGAOUA, M.; BOUDIDA, Y.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; SENTANDREU, M. A. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 854-870, 2013.

OUALI, A.; GAGAOUA, M.; BOUDIDAB, Y.; BECILAB, S.; BOUDJELLALB, A.; HERRERA-MENDEZA, C. H.; SENTANDREUC, M. A. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 854-870, 2013.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 44-58, 2006.

OWENS, F.; DUBESKI, F.; HANSON, C. F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 3138-3150, 1993.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001. p. 623.

PAULINO, P. V. R.; DUARTE, M. S.; OLIVEIRA, I. M. Aspectos zootécnicos determinantes da qualidade de carne. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO, 2., 2013, Itapetinga. **Anais...** Itapetinga: Programa de pós-graduação em Zootecnia, 2013, p. 8-37.

PEREIRA, P. M. R. C.; PINTO, M. F.; ABREU, U. G. P. de; LARA, J. A. F. de. Carcass characteristics and beef quality of young bulls from three genetic groups. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1520-1527, 2009.

PICARD, B. LEBRET, B.; CASSAR-MALEK, I.; LIAUBET, L.; BERRI, C.; Le BIHANDUVAL, E.; HOCQUETTE, J.F.; RENAND, G. Recent advances in omic technologies for meat quality management. **Meat Science**, v. 109, p. 18-26, 2015.

PRITCHARD, R. H. Bunk management: observations from research. In: PLAINS NUTRITION COUNCIL SPRING CONFERENCE, 1998, San Antonio. **Proceedings...** San Antonio: Texas A&M Research and Extension Center, 1998. p. 68-75.

PUGA, D. M. U.; CONTRERAS, C. J. C., TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps brachii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p. 1-10, 1999.

PULFORD, D. J.; DOBBIE, P.; FRAGA, V. S.; FRASER-SMITH, E.; FROST, D. A.; MORRIS, C. A. Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. **Meat Science**, v. 83, n. 1, p. 1-9, 2009.

RAYNAUD, F.; FERNANDEZ, E.; COULIS, G.; AUBRY, L.; VIGNON, X.; BLEIMLING, N.; GAUTEL, M.; BENYAMIN, Y.; OUALI, A. Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. **Febs Journal**, v. 272, n. 10, p. 2578-2590, 2005.

RESTLE, J.; FLORES, J. L. C.; VAZ, F. N.; LISBOA, R. A. Desempenho em confinamento, do desmame ao abate aos quatorze meses, de bovinos inteiros ou castrados, produzidos por vacas de dois anos. **Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 651-655, 1997.

ROBSON, R. M. Myofibrillar and cytoskeletal structures and proteins in mature skeletal muscle cells. In: Ouali, A.; Demeyer, D. I.; Smulders, F. J. M. **Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality**. 1995, p. 267-288.

ROÇA, R. O. 2005. **Modificações pós-morte da carne**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br>> Acesso em: 12 dezembro de 2015.

ROCHA, J. C. M. C.; NEVES, M. F.; LOBO, R. B. Experiências com alianças verticais na coordenação da cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ECONOMIA E GESTÃO DE REDES AGROALIMENTARES, 4., 2003, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos...** Ribeirão Preto: FEA-RP/USP, 2003. Disponível em: <<http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/Rocha.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2015.

RUBENSAM, J. M.; FELICIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Effects of the *Bos indicus* genotype on calpastatin activity and texture of beef from steers slaughtered in the south of Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 405-409, 1998.

SAÑUDO, C. Análisis Sensorial Calidad organoléptica de la carne. In: CURSO INTERNACIONAL DE ANALISE SENSORIAL DE CARNE E PRODUTOS CÁRNEOS, 1., 2004, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2004. p.45-68. SAVELL, J. W., SMITH, G. C. **Meat science Laboratory manual**. Boston: American Press, 2009. p. 143-144.

SAWDY, J. C.; KAISER, S. A.; ST-PIERRE, N. R.; WICK, M. P. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Science**, v. 67, n. 3, p. 421-426, 2004.

SCANGA, J. A.; BELK, K. E.; TATUM, J. D.; GRANDIN, T.; SMITH, G. C. Factors contributing to the incidence of dark cutting beef. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2040-2047, 1998.

SENTANDREU, M. A.; COULIS, G.; OUALI, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n.12, p. 400–421, 2002.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 1, p. 171-177, 1991.

SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3333-3340, 1995.

SILVA, J. A. de O. **Processos proteolíticos e características sensoriais em carne de bovino da raça Maronesa - Influência do pH final e tempo de maturação**. 2007. 331 f. Tese (Doutorado em Ciência Alimentar) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2007.

SILVA, J. A.; PATARATA, L.; MARTINS, C. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. **Meat Science**, v. 52, n. 4, p. 453-459, 1999.

SILVA, N. A. M. da; AQUINO, L. H. de; SILVA, F. F. e; OLIVEIRA, A. I. G. de. Curvas de crescimento e influência de fatores não-genéticos sobre as taxas de crescimento de bovinos da raça Nelore. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 647-654, 2004.

SIQUEIRA, J. B.; OBA, E.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; NETO, T. M.; GUIMARÃES, J. D. Testicular shape and andrological aspects of young Nellore bulls under extensive farming. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 612-617, 2012.

SMITH, T. P.; CASAS, E.; REXROAD, C. E. III; Kappes, S. M.; KEELE, J. W. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.

STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146-152, 2009.

SUZUKI, K. The structure of calpains and the calpain gene. In: Mellgren, R. L.; Murachi, T. **Intracellular calcium-dependent proteolysis**. Boston: CRC Press, 1990. p. 25-35.

TAYLOR, R. G.; GEESINK, G. H.; THOMPSON, V. F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D. E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1351-1367, 1995.

THERKILDSEN, M.; LARSEN, L. M.; VESTERGAARD, M. Influence of growth rate and muscle type on muscle fibre type characteristics, protein synthesis capacity and activity of the calpain system in Friesian calves. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 253-264, 2002.

THOMSON, B. C.; DOBBIE, P. M.; COX, N. R.; SIMMONS, N. J. Differences in the post-mortem kinetics of the calpain system in meat from bulls and steers. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 42, n. 1, p. 47-54, 1999.

TIZIOTO, P. C.; DECKER, J. E.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; MUDADU, M. A.; SILVA, F. L.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T. S.; ROSA, A. N.; ALENCAR, M. M.; TULLIO, R. R.; MEDEIROS, S. R.; NASSU, R. T.; FEIJÓ, G. L.; SILVA, L. O.; TORRES, R. A.; SIQUEIRA, F.; HIGA, R. H.; REGITANO, L. C. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 21, p. 1012-1020, 2013.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.  
UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Production, Supply and Distribution Online**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 15 de Agosto 2015.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

VARRICCHIO, E.; RUSSOLILLO, M. G.; MARUCCIO, L.; VELOTTO, S.; CAMPANILE, G.; PAOLUCCI, M.; RUSSO, F. Immunological detection of m- and  $\mu$ -calpains in the skeletal muscle of Marchigiana cattle. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 1, p. 10-15, 2013.

VEISETH, E.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Effect of postmortem storage on  $\mu$ -calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 6, p. 1502-1508, 2001.

VESCOVO, G.; SERAFINI, F.; DALLA LIBERA, L.; LEPROTTI, C.; FACCHIN, L.; TENDERINI, P.; AMBROSIO, G. B. Skeletal muscle myosin heavy chains in heart failure: correlation between magnitude of the isozyme shift, exercise capacity, and gas exchange measurements. **American Heart Journal**, v. 135, n.1, p. 130-137, 1998.

WALLS, E. W. **Structure and function of muscle**. New York: Academic Press, 1960.

WARNER, R. D.; DUNSHEA, F. R.; PONNAMPALAM, E. N.; COTTRELL, J. J. Effects of nitric oxide and oxidation in vivo and postmortem on meat tenderness. **Meat Science**, v. 71, p. 205-217, 2005.

WARRISS, P. D. et al. Animal welfare. In: \_\_\_\_\_ **Meat science: An introductory text**, Cambridge: CABI, 2000. p. 209-228.

WEIS, J. H.; TAN, S. S.; MARTIN, B. K.; WITTEWER, C. T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, v. 8, n. 8, p. 263-264, 1992.

WEISS, A.; SCHIAFFINO, S.; LEINWAND, L. A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: Implications for functional diversity. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, n. 1, p. 61-75, 1999.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; HACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Carcass, yield, and *longissimus* palatability traits. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p.196-207, 2005.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3145-3151, 1994.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. Clay Center: Roman L. Hruska U.S. MARC. USDA. 1995. 7p.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM, R. D. Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, n. 9, p.2716-2728, 1990.

WIDMAIER, E. P.; HERSHEL, R.; STRANG, K. T. **Vander, Sherman and Luciano's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function**. New York: McGraw-Hill, 2003.

WOJTYSIAK, D.; POŁTOWICZ, K. Effect of ageing time on microstructure, rate of desmin degradation and meat quality of pig *longissimus lumborum* and *adductor* muscles. **Folia Biologica**, v. 63, n. 2, p. 151-158, 2015.

WOJTYSIAK, D.; POLTOWICZ, K.; KARASINSKI, J. Relationship between post mortem desmin degradation and meat quality of poultry breast muscle. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 64, n. 8, p. 1003-1006, 2008.