

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

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À QUALIDADE DA
CARNE DO MÚSCULO LONGISSIMUS DORSI EM NELORE
(Bos indicus) E CANCHIM (5/8 Bos taurus x 3/8 Bos indicus)**

Juliana Giusti
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
AGOSTO – 2011

|

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

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À QUALIDADE DA
CARNE DO MÚSCULO LONGISSIMUS DORSI EM NELORE
(Bos indicus) E CANCHIM (5/8 Bos taurus x 3/8 Bos indicus)**

Juliana Giusti

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes De Oliveira

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

AGOSTO – 2011

Juliana Giusti

Giusti, Juliana
G538a Expressão de genes relacionados à qualidade da carne do músculo longissimus dorsi em nelore (bos indicus) e canchim (5/8 bos taurus x 3/8 bos indicus) / Juliana Giusti. -- Jaboticabal, 2001 ix, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Henrique Nunes de Oliveira

Banca examinadora: Maeli Dal Pai Silva, Simone Cristina Méo Niciura, Luiz Arthur de Loyola Chardulo

Bibliografia

1. Enzimas proteolíticas. 2. Gordura. 3. RT-qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA GIUSTI - nasceu em 26 de agosto de 1985, na cidade de Jundiaí- SP, filha de José Roberto Giusti e Maristela de Souza Giusti. Em dezembro de 2009 obteve o título de zootecnista pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) e em março de 2010 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal - SP como bolsista CAPES, obtendo o grau de mestre em 22 de agosto de 2011, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Dedico este trabalho...

Ao meu pai Roberto que em tudo me ajudou,
a minha mãe Maristela que com seu amor me
fez a pessoa que sou
e ao meu irmão Eduardo que com seu carinho
me incentivou.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e me mantém firme e superando todos os obstáculos que surgem.

Aos meus avôs Roberto e Nilson por ensinar a gostar dos animais, pelo carinho com que sempre me trataram e pelo amor puro e incondicional.

A minha avó Miriam pelos ensinamentos, conselhos e amor que me foi dado desde o nascimento. Por ser a primeira a me levar a escola e me guiar sempre.

A minha avó Jadwiga pelo amor zeloso e muitas vezes mimado que sempre me ofereceu. Pelas guloseimas de domingos e férias inesquecíveis.

A minha família querida por me ajudar a ser quem sou: Pai, Mãe e Du.

Ao meu namorado Thiago, que sempre esteve comigo, me apoiando e confiando em mim.

A família Higuti Ruzza que me acolheu como uma filha durante toda a minha graduação e mestrado.

Aos meus amigos Leonardo, Victor, Vanessa e Daniely por serem companheiros nas horas fáceis e difíceis e por me impedirem de desistir dos meus sonhos.

Ao Professor Henrique pela confiança, amizade, preciosos ensinamentos e imensa paciência.

À Professora Maeli pela confiança, amizade e preciosos ensinamentos acadêmicos e pessoais, além de me deixar usar seu laboratório.

Ao Professor Robson pela ajuda nas análises de RT-qPCR e amizade.

Aos meus amigos do LBME, em especial as Fernandas, pela amizade e seus ensinamentos; Caroline e Ivan pela amizade sincera e confiança.

Às Repúblicas Rapidinha e Quinto dos infernos, por sempre me acolher como um membro nas passagens por Jaboticabal.

A toda equipe do confinamento por permitir que eu usasse seus animais e por fornecer parte de seus dados (parte fundamental do meu trabalho).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq / CAPES pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Influências do crescimento animal na qualidade da carne	2
2.2 Grupo Genético	6
2.3 Músculo estriado esquelético	8
2.3.1 Contração muscular	11
2.4 Transformação do músculo em carne	13
2.4.1 Estabelecimento do <i>rigor mortis</i>	13
2.4.2 Mecanismos Proteolíticos.....	15
2.5 Maturação da carne	19
2.6 Determinação da maciez da carne.....	20
2.7 Gordura da carne	20
2.8 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao melhoramento animal.....	23
2.8.1 Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR).....	24
2.9 Importância e aplicação.....	26
2.10 Objetivos	27
2.11 Hipóteses	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Manejo, arraçamento e cuidados com os animais	28
3.2 Coleta das amostras	31
3.3 Análise da Força de Cisalhamento.....	32
3.4 Análise do Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)	32
3.5 Extração de lipídeos totais	33
3.6 Análise da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	34
3.7 Análise estatística dos dados	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

4.1 Ganho de peso	42
4.2 Qualidade da carne	43
4.2.1 Maciez da Carne	43
4.2.3 Índices de lipídeos totais	47
4.3 Expressão gênica	48
4.3.1 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)	48
4.4 Correlações entre a qualidade de carne e expressão gênica.....	52
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À QUALIDADE DA CARNE DO MÚSCULO LONGISSIMUS DORSI EM NELORE (*Bos indicus*) E CANCHIM (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*)

Resumo - Todas as características de um organismo vivo são controladas pela expressão de genes específicos, e na qualidade da carne não é diferente. O presente estudo teve como objetivo correlacionar a expressão dos genes μ -Calpaína (*CALP 1*), *m*-Calpaína (*CALP 2*), *Calpastatina* (*CAST*), *Tireoglobulina* (*TG*), *Diacilglicerol aciltransferase 1* (*DGAT1*) e a *Leptina* (*LEP*) com a qualidade da carne do Longissimus dorsi em dois grupos genéticos: Nelore (*Bos indicus*) e Canchim (5/8 de *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) em dois períodos (carne não maturada e com sete dias de maturação), e utilizá-la como marcador genético. Foram analisados 30 touros jovens, 15 Nelore e 15 Canchim, todos mantidos nas instalações do confinamento experimental da FMVZ-UNESP Botucatu, recebendo a mesma dieta e mesmo manejo. Alcançando peso de 370 kg e espessura de gordura de cobertura de 4 mm, foram abatidos e amostras do músculo *Longissimus dorsi* foram coletadas para análises de: lipídeos totais (LT), força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e análise da expressão gênica por RT-qPCR. Entre as características de qualidade da carne, LT e MFI0 apresentaram diferença entre as raças ($P < 0,01$), sendo MFI0 superior no Canchim e LT no Nelore. Quanto à expressão gênica, as *CALPs* não mostraram expressão diferencial entre os grupos ($P > 0,05$), assim como *DGAT1*, *TG* e *LEP*. *CAST* foi mais expresso na raça Nelore ($P < 0,05$). Quanto às correlações, foi observada apenas uma positiva entre *DGAT1* e MFI0 ($r = 0,79$, $P < 0,01$) no Canchim. Diante dos resultados, sugere-se que a maior expressão de *CAST* no Nelore propiciou aos animais uma carne mais dura, quando comparados ao Canchim, e que a expressão gênica não pode ser usada como um marcador genético.

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas, Gordura, RT-qPCR

EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE QUALITY OF MEAT LONGISSIMUS DORSI MUSCLE IN NELLORE (*Bos indicus*) AND CANCHIM (5/8 *Bos taurus* X 3/8 *Bos indicus*)

Abstract - All the features of a living organism are controlled by the expression of specific genes, and the quality of the meat is no different. The present study was performed to correlate gene expression μ -calpain (CALP 1), m-calpain (CALP 2), calpastatin (CAST), thyroglobulin (TG), Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGTA1) and leptin (LEP) with the meat quality of *Longissimus dorsi* muscle in two genetic groups: Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) in two periods, and use it as a genetic marker. We analyzed 30 young bulls, 15 and 15 Canchim Nellore. The animals were kept on the installation of the experimental confinement FMVZ-UNESP-Botucatu, receiving the same diet and management. When reached a weight of approximately 370 kg and a subcutaneous fat thickness of 4 mm, they were slaughtered and samples of the *Longissimus dorsi* muscle were collected for analysis of the: total lipids (TL), shear force (SF), myofibrillar fragmentation index (MFI) and analysis of gene expression by RT-qPCR. Among the characteristics of meat quality, LT and MFI0 showed differences between breeds ($P < 0.01$), higher MFI0 in Canchim and LT higher in Nellore. Regarding gene expression, the CALPs showed no differential expression between groups ($P > 0.05$), as well as *DGAT1*, *TG*, and *LEP*. *CAST* was more expressed in Nellore ($P < 0.05$). Regarding the correlation was only observed a positive relationship between *DGAT1* and MFI0 ($r = 0.79$, $P < 0.01$) in Canchim. Considering the results, it is suggested that the increased expression of *CAST* in Nellore animals led to a tougher meat compared to Canchim, and that gene expression can not be used as a genetic marker.

Keywords: Proteolytic enzymes, Fat, RT-qPCR

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, assim como a maioria dos países do mundo, passa por um período de transformação tecnológica que afeta todos os setores da economia, inclusive o da pecuária. Com a finalidade de tornar sua atividade rentável e competitiva, os pecuaristas necessitam reduzir custos, agregar valores ao produto e se engajar em uma cadeia produtiva que priorize a qualidade da carne. Paralelo a essa transformação no campo, o consumidor passa a ser mais exigente quanto à qualidade dos produtos. Deste modo, visando melhorias na qualidade da carne e um consequente aumento no retorno econômico faz-se necessário a inovação e intensificação dos sistemas de produção.

A terminação de bovinos de corte em confinamento é uma forma eficaz de intensificação do sistema de produção, por isto é uma alternativa que tem ganhado grande destaque no cenário brasileiro (SILVEIRA et al., 2004). Segundo LUCHIARI FILHO (1998) e VITTORI et al., (2006) a utilização de bovinos jovens e não castrados é uma alternativa viável para a produção de carne nesse sistema. Animais nessas condições apresentam carcaças mais pesadas, com maior rendimento, maior proporção de tecido muscular, porém sem diferenças na espessura de gordura subcutânea, quando comparados a animais castrados. Estas características atendem à atual demanda de mercado por um produto mais magro e saudável. Entretanto, para a obtenção deste produto é necessário a escolha de raças e cruzamentos que respondam da melhor maneira ao manejo alimentar adotado, assegurando deposição de níveis de gordura de cobertura adequados e evitando que o resfriamento e o processamento da carne não prejudiquem sua qualidade final (CERVIERI et al., 2001).

Além das ferramentas tradicionais de manejo, o uso de técnicas moleculares tem sido de grande valia para a seleção de animais superiores, contribuindo para o avanço do melhoramento genético animal em tempos reduzidos. Na qualidade da carne, um ponto fundamental é o músculo estriado esquelético, principal componente da carcaça.

Depois do abate o músculo passa por uma série de transformações, influenciadas pela ação de enzimas proteolíticas. Muitos estudos têm sido realizados a fim de entender como ocorrem esses processos no músculo e qual a influência dos genes codificantes dessas enzimas na qualidade da carne. A partir desses estudos foram encontrados dois genes codificantes de enzimas ligadas aos processos proteolíticos da carne, as calpaínas codificadas pelo *CALP* e a calpastatina codificada pelo *CAST*.

Outro fator importante na qualidade da carne é a deposição de gordura, já que é ela quem protege as fibras musculares do encurtamento provocado pelo frio no resfriamento da carcaça. Estudos de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, tem apontado os genes *DGAT 1*, *TG* e *LEP* como possíveis influenciadores na deposição de gordura em bovinos.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo central correlacionar à expressão gênica da *μ-calpaína (CALP 1)*, *m-calpaína (CALP 2)*, *calpastatina (CAST)*, *diacilglicerol acyltransferase 1 (DGAT1)*, *leptina (LEP)* e *tireoglobulina (TG)* em dois grupos genéticos de bovinos: Nelore (*Bos indicus*) e Canchim ($\frac{5}{8}$ Charolês, $\frac{3}{8}$ Nelore).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Influências do crescimento animal na qualidade da carne

Para a obtenção de um produto final de qualidade, alguns fatores devem ser considerados, tais como as raças que serão usadas nos cruzamentos, a forma de criação e a idade de abate dos animais.

A idade de abate dos animais é um fator importante, já que animais abatidos mais jovens têm carne mais macia e com maior suculência em relação àqueles com mais idade. Entretanto, segundo RENAND et al., (2001) a maciez da carne tem uma maior relação com a fase de crescimento do que com a idade cronológica do animal.

Quanto maior a taxa de crescimento de um animal, maior a taxa de *turnover* protéico e maior, portanto, a taxa de degradação protéica, o que torna a carne mais macia.

Ferramentas importantes para o entendimento do crescimento dos animais e dos diferentes tecidos, que são os componentes mais importantes da carcaça (músculo, osso e gordura), são as curvas de crescimento. Estas possibilitam o planejamento estratégico de manejo e de prática de nutrição, produzindo animais de melhor qualidade de carne em menos tempo.

O crescimento de um indivíduo de qualquer espécie pode ser apresentado através de uma curva sigmóide (Figura 1). Essa curva é composta pelo período pré-puberal e pós-puberal. O primeiro envolve a fase de crescimento acelerado ocorrendo logo após a concepção até a puberdade (ponto de inflexão). Ao atingir o ponto de inflexão, a forma da curva é alterada de um crescimento acelerado, observado em animais jovens, para um crescimento desacelerado. Após a puberdade inicia-se a fase de crescimento desacelerado, onde são alcançadas taxas lentas de crescimento até finalmente atingir a fase de inibição ou maturidade fisiológica do animal, onde a curva atinge o platô, sendo o crescimento muito lento ou praticamente inexistente (OWENS et al., 1993).

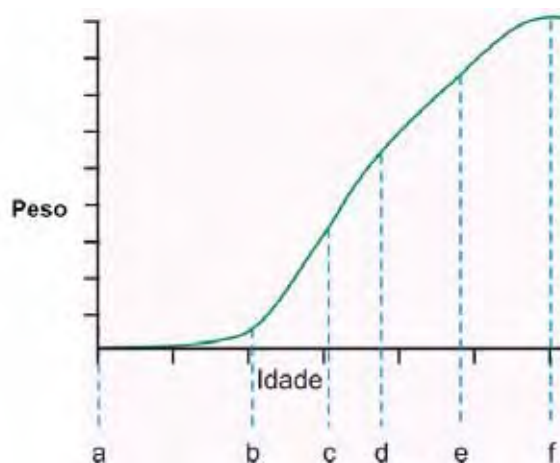


Figura 1. Curva de crescimento sigmóide (Adaptado de OWENS, 1993). a) Concepção, b) Nascimento, c) Fase de crescimento acelerado, d) Ponto de inflexão freqüentemente associado com a puberdade, e) Fase de crescimento retardado, f) Maturidade

O período de crescimento dos diversos tecidos é diferente do crescimento corpóreo considerado como um todo. O tecido nervoso e ósseo tem um desenvolvimento mais precoce, enquanto o muscular é intermediário e o adiposo geralmente desenvolve-se mais tardiamente (Figura 2). Conseqüentemente, o teor de gordura na carcaça aumenta com o avanço da idade animal. Entretanto, a curva de crescimento pode ser variável de acordo com o indivíduo ou raça.

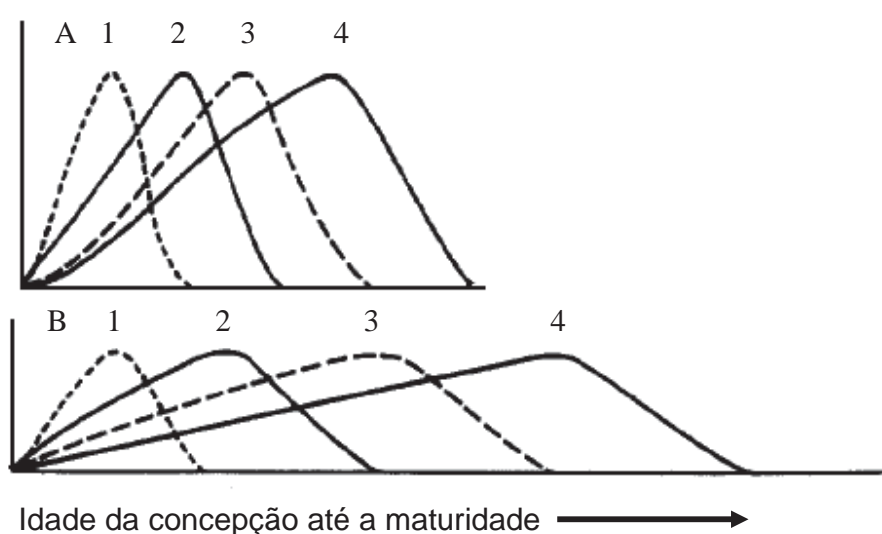


Figura 2. Taxas de crescimento de vários tecidos em animais com altas (A) e baixas (B) taxas de crescimento (Adaptado de OWENS et al., 1993). 1: Tecido nervoso; 2: Tecido ósseo; 3: Tecido muscular; 4: Tecido adiposo.

Na maturidade, a massa muscular atinge a quantidade máxima, o crescimento corporal e o ganho de peso envolvem apenas o acúmulo de gordura (OWENS et al., 1995). Portanto, a distribuição do tecido adiposo é outro aspecto do desenvolvimento e do crescimento do animal com importância direta na qualidade da carcaça, já que protege o músculo do encurtamento pelo frio (*cold shortening*) que caracteriza o encurtamento drástico do sarcômero muscular antes do *rigor mortis*.

Da mesma forma que o esqueleto se desenvolve antes da formação dos músculos e o acúmulo de gordura ocorrem mais tardiamente, os depósitos de gordura

também apresentam algumas variações temporais. Assim, os depósitos adiposos desenvolvem-se na seguinte ordem: 1º) perirrenal e interna, 2º) subcutânea e 3º) gordura intramuscular (BERG e BUTTERFIELD, 1976). Esta última representa a gordura de marmorização, ponto importante, na determinação de qualidade em alguns sistemas de classificação internacionais. Além disso, altos níveis de gordura intramuscular levam a um alto conteúdo de gordura em toda a carcaça.

Animais com maturidade mais precoce possuem menor tamanho, em consequência depositam gordura (engorda) com menor peso, ou seja, raças precoces depositam mais gordura que as raças tardias. Essa variação de velocidade de crescimento e de deposição acontece entre as raças e até mesmo dentre elas. Sendo assim, as diferenças encontradas entre as espécies e nas diferentes raças, possibilitam a seleção de animais mais precoces, que atingem um acabamento de gordura desejado com idades menores (BERG e BUTTERFIELD, 1976). Para que esse objetivo seja alcançado é necessária a escolha do grupo genético adequado para o sistema de criação de interesse.

Dentro desses sistemas de criação, o crescimento do animal é um fator de suma importância, porque influi decisivamente sobre as demais funções exploradas pelo homem nas espécies domésticas (BERG e BUTTERFIELD, 1976). Estando diretamente associado à eficiência econômica de um sistema de produção e à qualidade do produto final, através da maciez (*turnover* protéico) e da deposição de gordura (marmoreio e subcutânea). Segundo DRANSFIELD (1993) animais jovens com adequada cobertura de carcaça, tendem a sofrer menor impacto na maciez da carne com resfriamento rápido da carcaça, após o abate. Isso evita o encurtamento das fibras musculares e a consequente diminuição na maciez.

2.2 Grupo Genético

Diversos estudos têm demonstrado variações quanto às características de maciez e deposição de gordura da carne em diferentes grupos genéticos bovinos. O principal efeito da raça na maciez tem sido observado quando se comparam subespécies diferentes (*Bos indicus* e *Bos taurus*) (O'CONNERS et al., 1997).

À medida que a porcentagem de *B. indicus* aumenta, a maciez tende a diminuir e sua variabilidade a aumentar. Alguns trabalhos apontam como fator responsável, as diferenças nos níveis de enzimas proteolíticas presentes na musculatura dessas subespécies (WHIPPLE et al., 1990). WHEELER et al., (1994) encontraram níveis mais baixos da proteína μ -calpaína e mais elevados de calpastatina em *B. indicus*, o que resultou na menor da maciez da carne dessa subespécie.

O genótipo zebuíno introduz grande variação na maciez da carne (SHERBECK et al., 1995), sendo que a maior proporção desse genótipo resulta em aumento na força de cisalhamento de cortes cárneos e diminuição nos escores de avaliação sensorial da maciez (PRINGLE et al., 1997). Segundo RUBENSAM et al., (1998), à medida que a participação do germoplasma *Bos indicus*, em cruzamentos com bovinos *Bos taurus*, ultrapassa 25%, a atividade da calpastatina e a força de cisalhamento do músculo *Longissimus dorsi* aumentam, levando a uma carne de pior textura, sendo assim, é conveniente que a porcentagem de sangue zebuíno não seja superior a essa porcentagem (DIKEMAN, 1995). No entanto, animais compostos de 3/8 zebu apresentam padrões de maciez aceitáveis, desde que os outros 5/8 sejam compostos por raça com alto potencial genético para maciez e marmoreio (DIKEMAN, 1995).

Em relação às características de qualidade da carne, tem-se na gordura uma diferença significativa entre os dois grupos genéticos. Nos padrões de deposição de gordura, os zebuínos possuem uma desvantagem quando comparados aos taurinos. Por serem animais de crescimento tardio os zebuínos deveriam receber dietas que favorecessem o rápido crescimento e a deposição de gordura, equiparando-os aos taurinos, que biologicamente possuem maior velocidade de crescimento. Com a

mudança no manejo alimentar, zebuínos seriam abatidos no mesmo tempo que taurinos, e favorecidos pelo alto *turnover* protéico, recorrente aos animais jovens, apresentariam carne macia.

Quanto à deposição de gordura nas raças taurinas, existem algumas particularidades. Esses animais possuem origens semelhantes, mas diferenças evolutivas que resultaram em duas vertentes, as raças taurinas continentais e as britânicas.

As raças britânicas tiveram origem nas Ilhas Britânicas e foram criadas com a finalidade de produção de carne para o consumo humano. Sendo assim, a seleção dos animais foi voltada para velocidade de crescimento, precocidade sexual, fertilidade e qualidade de carne, resultando em raças de tamanho intermediário e boa deposição de gordura na carcaça (ZADRA, 2005).

Já as raças continentais de carne, foram selecionadas originalmente para tração na Europa continental. Essa seleção de ênfase menor nas características de produção de carne provocou o aumento da massa muscular e do peso adulto. As raças continentais são conhecidas pelo elevado peso ao nascimento, grande potencial de crescimento (ganho de peso), alto rendimento de carcaça, porém menor porcentagem de gordura (ZADRA, 2005).

O Charolês, raça continental com baixa deposição de gordura de marmoreio, foi utilizado na criação de uma raça sintética (Canchim), que tem sido usada em várias regiões do Brasil, tanto como raça pura como em cruzamentos para produção de carne.

O Canchim é composto por bimestiços 5/8 Charolês (*Bos taurus*) + 3/8 Zebu (*Bos indicus*), e foi desenvolvido na Fazenda de Criação de São Carlos, SP, a partir de 1940 (VIANNA et al., 1978). Os animais da raça possuem precocidade no ganho de peso, maturidade sexual e no acabamento da carcaça, além de possuírem rápido crescimento, fatores que o torna interessante na produção animal.

Segundo ALENCAR (1994) o sangue zebuíno conferiu um ganho na adaptação a diferentes tipos de ambiente aos animais da raça Canchim, enquanto a raça charolesa

conferiu, entre outras características, maior velocidade de crescimento e porte mais avantajado, com conseqüente deposição de gordura mais tardia.

Sendo assim, quando os animais Canchim são utilizados em cruzamentos, a composição genética diferente possibilita o aproveitamento de níveis consideráveis de heterose (vigor híbrido) e de complementaridade tornando a raça indicada na produção de carne de qualidade (BARBOSA, 2004).

2.3 Músculo estriado esquelético

O principal componente da carne é o músculo estriado esquelético, sendo importante economicamente em razão de sua quantidade na carcaça e seu valor econômico (LUCHIARI FILHO, 2000).

A fibra muscular estriada esquelética apresenta num corte transversal, formato poligonal ou arredondado, é multinucleada e os núcleos estão localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (Figura 3). O diâmetro das fibras varia de acordo com a espécie animal, em média de 10 a 100 μm , e o comprimento pode chegar a 10 cm.

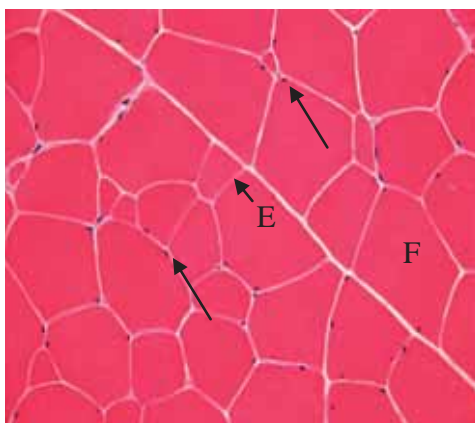


Figura 3. Corte transversal das fibras do músculo semitendinoso de bovino em coloração hematoxilina-eosina (HE). Fibras musculares (F). Endomísio (E). Núcleos das fibras (setas). Adaptado de CARANI, (2006).

O citoplasma, denominado sarcoplasma, possui um citoesqueleto altamente desenvolvido, constituído, sobretudo por elementos contráteis, denominados miofibrilas.

As miofibrilas apresentam estriações transversais decorrentes da organização das proteínas contráteis em uma série de unidades idênticas da fibra muscular, os sarcômeros. O arranjo ordenado das miofibrilas é responsável pelas estriações transversais (faixas claras e escuras que se repetem a cada 2 a 3 μm , observadas na microscopia de luz (Figura 4).

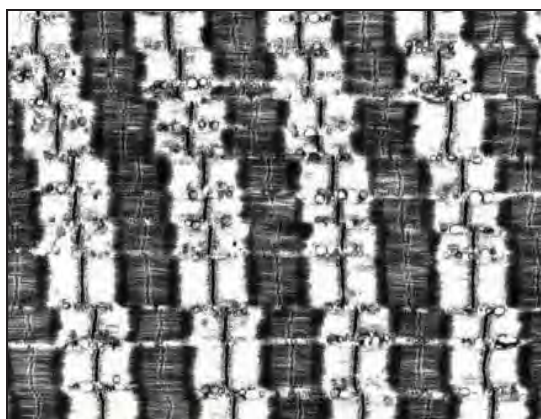


Figura 4. Micrografia eletrônica de uma fibra muscular estriada de coelho. As miofibrilas se estendem diagonalmente do canto superior esquerdo ao inferior direito. Cada miofibrila é composta de numerosas unidades que se repetem, chamadas sarcômeros, os quais são constituídos por um arranjo paralelo de filamentos finos e grossos. Os filamentos finos e grossos do sarcômero formam o padrão de bandas claras e escuras alternadas (RAWN, 1989).

As faixas escuras são denominadas bandas A (anisotrópicas à luz polarizada) e as faixas claras, bandas I (isotrópicas à luz polarizada). No centro da banda A, pode-se observar uma fina faixa mais clara, a banda H, formada apenas pelos filamentos espessos (Figura 5). Na região central da banda H, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal das proteínas miomesina, proteína M e creatina quinase, que ligam filamentos espessos adjacentes. A banda I é dividida por uma linha escura, o disco Z. A região da miofibrila, localizada entre dois discos Z, forma um sarcômero. A banda I constituída apenas pelos filamentos finos, que se estendem da linha Z até o início da banda H.

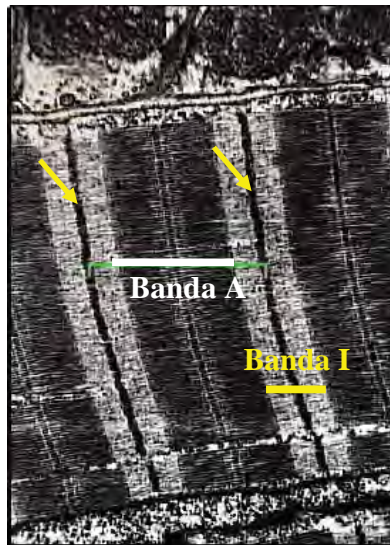


Figura 5. Ultra-estrutura da fibra estriada. Miofibrila organizada em sarcômero com bandas A (branco) e I (amarelo) e as linha Z (apontada pelas setas). Adaptado de DAL PAI SILVA, (2007).

Cada sarcômero é formado por várias proteínas: as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero. O filamento fino é formado pela actina e duas proteínas reguladoras, a troponina e tropomiosina (MCOMAS, 1996). O filamento grosso é formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II (Figura 6) (RAWN, 1989).

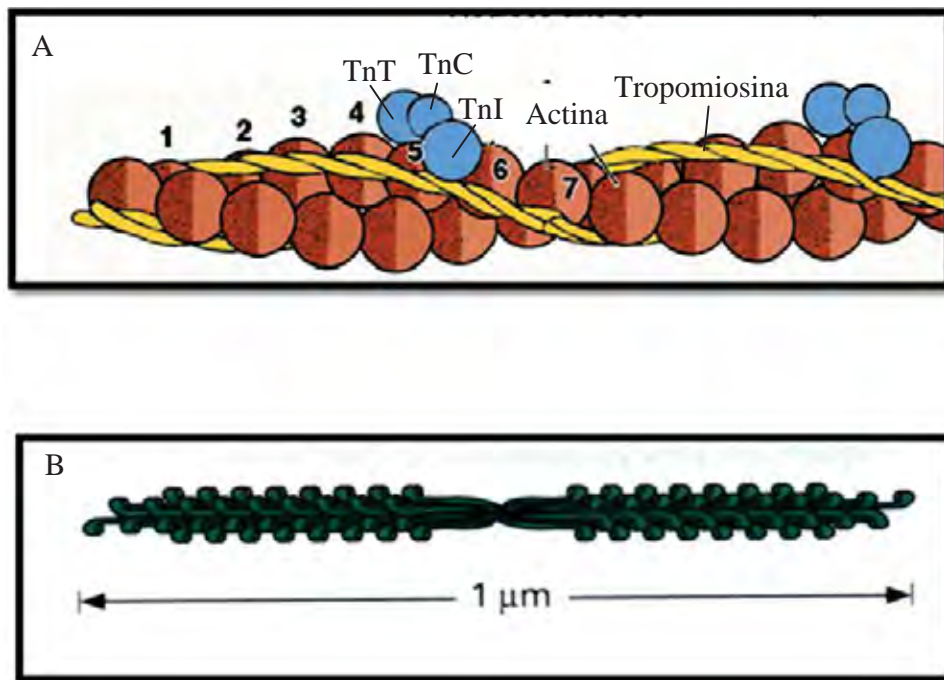
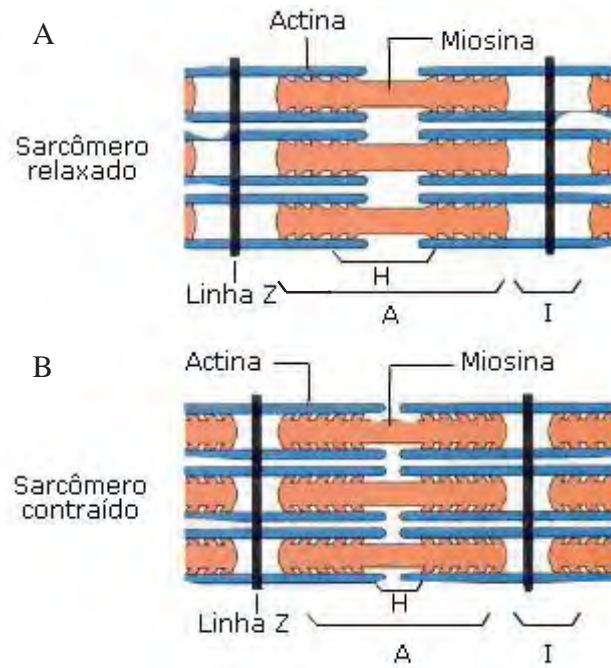


Figura 6. (A) esquema dos principais componentes do filamento fino do sarcômero. Proteína contrátil actina associada às proteínas regulatórias: Troponina T, Troponina C, Troponina I e Tropomiosina. (B) esquema dos principais componentes do filamento grosso do sarcômero (miosina) (RAWN, 1989).

2.3.1 Contração muscular

A base do processo de contração muscular reside na interação entre os filamentos espessos e finos e na ligação de ATP à ATPase da porção globular da miosina, a qual produz uma força que permite o deslizamento dos filamentos entre si. A força necessária para a contração muscular é gerada pelas porções globulares da miosina do filamento espesso que formam pontes transversais com os filamentos finos, na região de sobreposição dos filamentos finos e espessos (Figura 7 A). As alterações na conformação das pontes transversais permitem que as cabeças de miosina deslizem ao longo do filamento fino em direção ao disco Z. Como o filamento espesso é bipolar, a ação das cabeças da miosina em extremidades opostas do filamento espesso arrasta

os filamentos finos em direção ao centro do sarcômero, de modo que as extremidades dos filamentos espessos entrem em contato com o disco Z (Figura 7 B).



(A) No sarcômero relaxado os filamentos finos estão ancorados no disco Z. A região que contém tanto filamentos espessos quanto finos constitui a banda A. A região formada apenas por filamentos finos forma a banda I. O centro da banda A, formada apenas por filamentos espessos, constitui a banda H. (B) Durante a contração do sarcômero, ocorre o deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos espessos.

Figura 7. Diagrama esquemático de um sarcômero

O processo de contração inicia-se com o aumento do íon Ca^{+2} no sarcoplasma da fibra muscular. No músculo em repouso, o nível de Ca^{+2} no sarcoplasma é abaixo pela ação da Ca^{+2} -ATPase que bombeia íons Ca^{+2} do sarcoplasma para o retículo sarcoplasmático.

Com a chegada do estímulo nervoso, ocorre uma alteração no potencial elétrico da membrana plasmática, transmitido para o interior da fibra pelos túbulos T. Quando proteínas sensíveis à voltagem são ativadas na membrana do túbulo T, ocorre à

abertura de canais de liberação de Ca^{+2} , permitindo a saída do Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático para o interior do sarcoplasma. Os íons de Ca^{+2} ligam-se à subunidade Tnc da troponina, possibilitando o contato das moléculas de actina com as de miosina. As moléculas de miosina inclinam-se e movimentam o filamento de actina para o centro do sarcômero. No músculo em repouso, o sítio de interação entre as moléculas de actina e miosina encontra-se inibido pelo complexo tropomiosina-troponina (subunidade Tni), acoplado ao filamento de actina F. Após a ativação do complexo actina-miosina, o ATP presente na porção globular da miosina é convertido em ADP, fosfato inorgânico e energia, levando ao encurtamento do sarcômero. Ao cessar o impulso, por ação de Ca^{+2} -ATPases na membrana do retículo sarcoplasmático, esse retorna ativamente para o interior das cisternas do retículo. As moléculas de troponina e tropomiosina voltam a formar o complexo inibitório que impede a ligação da actina com a miosina.

A energia liberada da quebra do ATP participa do processo de contração e também é responsável pelo relaxamento. A falta de ATP é responsável pela manutenção e estabilidade do complexo actina-miosina, caracterizando a rigidez muscular que ocorre após a morte, denominado *rigor mortis* (ROÇA, 2001)

2.4 Transformação do músculo em carne

2.4.1 Estabelecimento do *rigor mortis*

A seqüência de eventos bioquímicos no músculo *postmortem*, deve ser entendida a fundo, pois é o cerne do desenvolvimento das práticas pós-abate, designadas a aperfeiçoar a qualidade da carne.

O processo de *rigor mortis*, também conhecido como rigidez cadavérica, pode ser considerado como uma contração muscular irreversível e ocorre logo após a morte do animal, sendo caracterizado pela inextensibilidade e rigidez do músculo (ALVES et al., 2005). A rigidez observada é causada pela formação de pontes entre a actina e a

miosina (actomiosina), como na contração muscular, porém com duas diferenças básicas: o primeiro é número de pontes actomiosinas formadas durante o rigor é maior que na contração muscular (CANHOS e DIAS, 1985); e segundo, o relaxamento no caso do rigor não é possível, já que não existe energia (ATP) suficiente para quebrar as ligações actomiosinas (NAUSS e DAVIES, 1966).

Para que o músculo entre em repouso ou relaxe é necessário que haja um complexo formado por ATP-Mg⁺². Quando o ATP no músculo acaba, são formadas pontes permanentes entre actina e miosina (Figura 8), tornando o músculo inelástico e promovendo sua entrada em *rigor mortis*, e dando início à transformação do músculo em carne (CANHOS e DIAS, 1985).

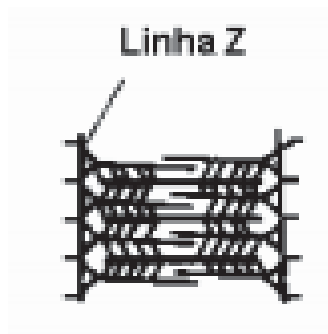


Figura 8. Representação esquemática do sarcômero zona contraído. Formação de pontes cruzadas: Complexo actomiosina.

O processo continua através da degradação enzimática e desnaturação protéica, causando uma pseudo-resolução do *rigor mortis*, que tornará a carcaça menos rígida. Quando acontece o total esgotamento da energia muscular inicia-se a atuação das enzimas proteolíticas dependentes de cálcio (ALVES et al., 2005).

Com ausência de energia, o transporte de cálcio é cessado, sendo assim o cálcio presente no citoplasma da célula muscular (sarcoplasma) não retorna ao retículo sarcoplasmático, possibilitando a sua utilização pelas proteases dependentes, ali presentes (SGARBIERI, 1996).

Algumas mudanças são observadas no rigor, como a perda de elasticidade, extensibilidade e aumento de tensão no músculo. O método mais utilizado para

acompanhar o fenômeno do rigor é a extensibilidade (ROÇA, 2001). Logo após a sangria, o músculo é extensível e elástico. Neste período existem poucas pontes actomiosinas formadas, sendo esta fase denominada fase *lag* de *rigor mortis*. Com a ausência de fluxo sanguíneo, o aporte de oxigênio e o controle nervoso não chegam mais à musculatura e o músculo passa a usar a via anaeróbica, na obtenção de energia para um processo contrátil desorganizado. Nesse processo ocorre a transformação de glicogênio em glicose, e como a glicólise é anaeróbica, gera lactato levando à queda do pH (BENDALL, 1973).

No início do *postmortem*, o nível de ATP é mantido por conversão do ADP a ATP (fosfocreatina + ADP \Leftrightarrow creatina + ATP), mas quando a fosfocreatina acaba, inicia-se uma redução no nível de ATP. Sendo assim, as reservas energéticas acabam mais rápidas no metabolismo anaeróbio. Primeiramente são degradadas as reservas de fosfocreatina, posteriormente as reservas de glicogênio e outros carboidratos e finalmente o ATP, rico em energia. Assim, os prótons produzidos durante a glicólise e durante a hidrólise de ATP a ADP aumentam a queda do pH intracelular (BATE-SMITH e BENDALL, 1949 *apud* ALVES, 2005).

Assim que o *rigor mortis* é concluído, tem-se início a ação dos mecanismos proteolíticos que resultam na degradação dos componentes miofibrilares.

2.4.2 Mecanismos Proteolíticos

Atualmente, três sistemas enzimáticos têm sido responsabilizados pela degradação dos componentes do músculo no processo de *postmortem*, levando a maciez da carne. São eles: o complexo multicatalítico de proteases (MCP) o sistema lisossomal das catepsinas e o sistema enzimático das calpaínas.

- Complexo multicatalítico de proteases (MCP)

Também conhecido como sistema ubiquitina/proteossoma, o sistema multicatalítico atua preferencialmente na degradação de peptídeos, através da marcação de proteínas a serem degradadas por moléculas de ubiquitina. Essas proteínas marcadas são reconhecidas por proteínas de carreamento, presentes no citoplasma celular, e carregadas até o proteossoma, onde são degradadas. Atuam preferencialmente em pH neutro ou alcalino, e em temperaturas de 45°C, portanto apresentam pouca importância no processo de degradação das miofibrilas e conseqüentemente processo de amaciamento da carne (JIANG, 1998).

- Sistema lisossomal das catepsinas

Proteases ácidas, as catepsinas estão localizadas dentro das estruturas lisossomais, sendo ativadas a um pH ótimo variante de 3,5 até 6,5. Devido ao seu baixo pH, as catepsinas não estão ativas no pH do citoplasma da célula (neutro).

O principal papel de catepsinas lisossomais é a degradação de proteínas extracelulares que foram obtidas através de pinocitose e em seguida, transportadas por uma série de vesículas ao lisossomo, onde são degradadas em pH ácido. As catepsinas não agem sobre proteínas íntegras, ou seja, não degradam proteínas que se encontram organizadas no sarcômero. Sendo assim, as proteínas degradadas pelo sistema lisossomal das catepsinas, são provenientes da desorganização protéica do sarcômero, causada pela ação das calpaínas. Essa ligação entre os processos pode indicar um sinergismo entre os dois sistemas enzimáticos (KOOHMARAIE, 1994).

- Sistema enzimático das calpaínas

Considerado o principal mecanismo envolvido com a proteólise que conduz ao amaciamento da carne (ALVES et al., 2005), é composto por três moléculas: μ -calpaína

(calpaína 1) e m-calpaína (calpaína 2) proteases cálcio dependentes e a calpastatina, polipeptídeo cuja função é a inibição das duas calpaínas.

Ambas as calpaínas são heterodímeros formados por duas subunidades com 28 e 80 kDa, possuindo de 55-65% de similaridade em suas seqüências nucleotídicas (GOLL e LI, 2003). As calpaínas são ativadas pelo cálcio intracelular, na concentração de 5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ para μ -calpaína e 300 a 1000 $\mu\text{mol/L}$ para m-calpaína (GOLL et al., 1995). No *rigor mortis*, o nível de cálcio livre é suficiente para ativar somente a μ -calpaína (DRANSFIELD, 1999).

As duas moléculas da calpaína não atuam diretamente sobre a miosina e actina, porém degradam à linha Z e as proteínas desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponina e proteína C (Figura 9).

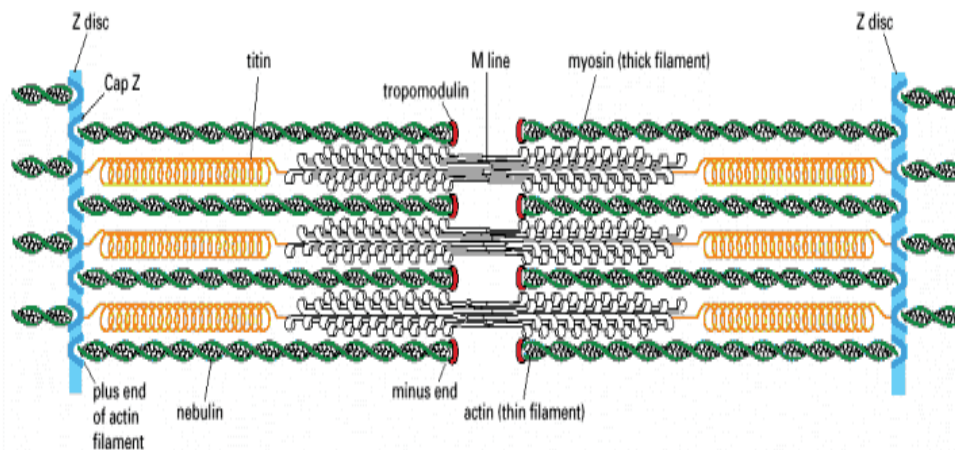


Figura 9. Esquema da estrutura do sarcômero muscular composto por filamentos finos (actina), filamentos espessos (miosina), proteínas estruturais: titina, desmina e nebulina, linha Z e proteínas regulatórias: troponina e tropomiosina. Adaptado de ROÇA (2001).

A hidrólise da tropomiosina e troponina facilita a desestruturação e a liberação dos filamentos finos, resultando nos monômeros da actina, e a hidrólise da Proteína C, em monômeros da miosina. A degradação da titina, nebulina, desmina e outras proteínas da linha Z, também contribuem para enfraquecer a estrutura miofibrilar.

FERGUSON et. al., (2001) demonstraram que 65% da variação na maciez da carne das diferentes raças bovinas, poderia ser explicada pela variação na quantidade e na atividade da enzima calpaína 1 (FERNANDEZ et al., 2005 *apud* OUALI et al., 2006).

A calpastatina, por sua vez, é um dos componentes de uma família de proteínas com no mínimo quatro isoformas distintas (RAYNAUD et al., 2005 *apud* OUALI et al., 2006), sendo diferencialmente expressas em músculos esqueléticos de contração lenta e rápida (OUALI et al., 2006). Essa enzima possui ação inibitória/moduladora das calpaínas, impedindo ou reduzindo a proteólise degradativa da fibra, realizada por elas.

A ação antagônica entre os componentes do sistema proteolítico sugere que quanto maior a quantidade de calpastatina no músculo, menor a ação da calpaína e menor a maciez da carne.

Sendo assim, seguindo o dogma central da biologia molecular (CRICK, 1958), onde o gene é transcrito em RNA mensageiro e este traduzido em proteína, a maior quantidade de proteína (enzima) será proveniente de uma maior expressão de seu gene codificador. Porém, a quantidade das enzimas proteolíticas não pode ser atribuída somente à variabilidade na expressão de seus genes.

Vários fatores influenciam a atuação proteolítica, o encurtamento das fibras musculares pelo frio (*cold shortening*), por exemplo. Mesmo que haja grande quantidade de enzima proteolítica (alta expressão gênica), pelo encurtamento das fibras musculares, os sítios de reconhecimento das enzimas são encobertos, e o acesso aos seus substratos é reduzido. Essa dificuldade de acesso aos sítios de reconhecimento compromete a atuação da enzima, que não realizará a proteólise ideal dos componentes da fibra muscular.

Outro fator com grande influência na atuação enzimática é a redução do pH, durante o processo de *rigor mortis*. Fator que leva a uma diminuição na atividade proteolítica das enzimas.

Sendo assim, o processo de transformação de músculo em carne de qualidade, só se dará pela combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos bem realizados (DEVINE et al., 1999).

2.5 Maturação da carne

A maturação da carne é um dos métodos mais antigos (KOOHMARAIE, 1994), conhecida desde o início do século XIX (DRANSFIELD, 1993), para diminuir, mas não eliminar, a variabilidade na maciez da carne bovina (KOOHMARAIE, 1996). A maturação pode ser definida como, processo controlado de atuação das enzimas responsáveis pela proteólise das proteínas miofibrilares. Segundo TAYLOR (2003), a maturação é um período de estocagem prolongada da carne *in natura*, em temperaturas de refrigeração de 0 a 4°C, com um tempo máximo de maturação de 14 dias para carne bovina, o processo de maturação será efetivo em 80% da carne. Uma forma de acelerar o processo de maturação é através da aplicação de cloreto de cálcio na carne imediatamente após o abate e mantê-la embalada a vácuo. De acordo com WHEELER et al., (1991), se existir mais de 33% de *Bos indicus* no cruzamento animal, o processo de maturação não será capaz de levar a maciez dos cortes a níveis aceitáveis de qualidade.

Durante a maturação, as estruturas miofibrilares das proteínas sofrem degradação pelos processos enzimáticos (proteolíticos), levando a uma desorganização na cadeia miofibrilar e, em menor extensão, o colágeno (DRANSFIELD, 1993), resultando em maior maciez do produto final.

MONSÓN et al., (2004), ao comparar quatro raças, *Spanish Holstein (leiteira)*, *Brown Swiss* (dupla aptidão), *Limousin* (crescimento rápido) e *Blonde d'Aquitaine* (musculatura dupla), demonstraram que raças especializadas em carnes (*Blonde d'Aquitaine* e *Limousin*) tiveram menores valores de compressão e força de

cisalhamento para carne crua e assada, e exigiram menor tempo de maturação (menos de uma semana). Além disso, a maturação da carne tende a eliminar as diferenças de textura da carne entre as raças e entre indivíduos dentro da mesma raça, reduzindo as diferenças entre a qualidade da carne, produzindo um produto mais homogêneo para o consumidor (WHEELER et al., 2005).

2.6 Determinação da maciez da carne

Grande parte dos estudos que utilizam técnicas de medição da maciez da carne utilizam o índice de fragmentação miofibrilar (MFI), descrito por CULLER et al., (1978). A técnica de MFI indica maior fragmentação miofibrilar, quanto maiores forem os valores de fragmentação. Essa técnica destaca-se entre as medidas de degradação protéica muscular, no *postmortem*, predizendo mais de 50% da maciez da carne (HOPKINS et al., 2000). Além de ser um índice preciso, sensível e barato (HADLICH, 2004). O aumento do MFI foi correlacionado com menor força de cisalhamento (Shear-force) (OLSON et al., 1976), outra técnica usual na mensuração da maciez da carne.

A técnica de força de cisalhamento é objetiva e determina a força (Kg) exercida pelo equipamento Warner-Bratzler necessária para cortar amostras de carne, sendo assim, quanto maior a força realizada pelo aparelho no corte das amostras, mais dura será a carne.

2.7 Gordura da carne

A gordura possui grande influência na qualidade da carne no *postmortem*. Na cobertura da carcaça é importante como isolante térmico, preservando as fibras do

encurtamento causado pelo frio (*cold shortening*). Na porção intramuscular (marmoreio) confere maciez, sabor e suculência a carne (PARDI, 2001).

Os lipídeos da carne encontram-se basicamente armazenados no organismo animal nas formas: intracelular, intermuscular e intramuscular.

As gorduras inter e intramusculares caracterizam o marmoreio da carne, variando com a espécie e mesmo com as raças e os diferentes músculos. A composição centesimal das gorduras no músculo de bovinos de corte pode variar em largos limites, dependendo do músculo de 50 a 86%. Carnes magras, por sua vez, contêm uma porção de gordura de 0,5 a 10% (PARDI, 2001).

Existe grande variação no teor de lipídios na composição centesimal da carne bovina, sendo influenciada por vários fatores, como sexo, raça e alimentação do animal, assim como do corte cárneos (BARBOSA, 2004). Ainda que em pequenas proporções, as gorduras são constituídas por conjuntos de moléculas como fosfolipídios, esteróis e ácidos graxos livres.

Muitos estudos têm sido realizados a fim de entender a influência dos genes nos fenótipos de interesse na produção animal. Alguns genes têm sido relacionados com fenótipos de deposição de gorduras de marmoreio e de cobertura, visto que as proteínas codificadas por eles têm apresentado relação com o metabolismo de gordura em mamíferos.

Estudos tem apontado o gene (*DGAT1*), codificador da enzima diacilglicerol aciltransferase 1, como importante fator de influência na produção de leite e na quantidade de gordura em bovinos (GRISART et al., 2001). Entretanto, resultados conflitantes em relação a sua atuação na deposição de gordura na carcaça de bovinos de corte têm sido relatados (MOORE et al., 2003 e THALLER et al., 2003).

A expressão do *DGAT1* leva à produção de uma enzima catalisadora da etapa final da síntese de triglicerídeos, realizadas em adipócitos e foi associada à homeostase energética (HAVEL, 2001). A reação catalítica envolve a acetilação da acil-Coenzima A redutase, dependente do diacilglicerol fornecido pela esterificação de 2-monocilglicerol ou por hidrólise de fosfato (via sn-glicerol-3-fosfato) (LEHNER e KUKSIS,

1996). Alguns estudos têm sugerido que esta enzima seja a única etapa comprometida com a biosíntese de triglicerídeos pela via sn-glicerol-3-fosfato, além de estar diretamente relacionada à limitação da síntese de triglicerídeos, formados pela via do 2-bromooctanoato (MAYOREK et al., 1989).

Estudos de associação, em diversas raças bovinas apóiam a eleição do gene do *DGAT1* como candidato a conter marcadores para características ligadas à deposição de gordura (KÜHN et al., 2004, TANTIA et al., 2006, THALLER et al., 2003). O *DGAT1* foi mapeado no cromossomo 14 em bovinos, mesmo cromossomo onde está localizado o gene que codifica a tireoglobulina, relacionado ao escore de marmorização.

O gene *TG* codifica a tireoglobulina, uma glicoproteína sintetizada em células foliculares da tireóide, que atua como transportadora para dois hormônios, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), e é armazenada na glândula tireóide (AILHAUD et al., 1992 *apud* GAN et al., 2008). Os hormônios tireoidianos desempenham um papel importante na regulação do metabolismo e podem afetar o crescimento, diferenciação e a homeostase dos depósitos de gordura (AILHAUD et al 1992.; CASAS et al., 2005 *apud* GAN et al., 2008), possuindo ação comprovada no metabolismo de lipídeos.

Estudos com associação de marcadores de *TG* e marmorização foram realizados, mas os resultados foram contraditórios quanto ao local de atuação do produto codificado pelo gene (BARENDSE, 2004; CASAS, et al., 2005; RINKER, et al. 2006; VAN EENENAAM, 2007).

Recentemente, THALLER, et al., (2003), encontraram associação entre um polimorfismo que leva a substituição da lisina pela alanina no gene *DGAT1* e um dos polimorfismos na região 5' UTR do gene *TG*, ambos influenciando o conteúdo de gordura na carcaça de bovinos *Bos taurus* das raça Holandesa e Charolesa.

Não só em bovinos, mas nos mamíferos em geral, postulava-se a existência de um mecanismo lipostático de controle do apetite, modulado pelas reservas energéticas do organismo sob a forma de tecido adiposo (HARVEY, 1969). Apesar das evidências experimentais da existência de um mecanismo endócrino de sinalização para este controle, a identificação do agente sinalizador só veio a ocorrer quando ZHANG et al.

(1994), noticiaram a clonagem do gene da *leptina* (*LEP*), também conhecido como gene da obesidade.

O gene *LEP* codifica a leptina, uma citocina secretada predominantemente a partir de tecido adiposo, que desempenha um papel importante na regulação do balanço energético do organismo. O produto do gene da *LEP* é uma proteína de 16 kDa secretada pelo tecido adiposo e que age como regulador da adiposidade (TANIGUCHI et al., 2002), controle da ingestão de alimentos, balanço energético, eficiência reprodutiva e deposição de gordura (HOUSEKNECHT et al., 1998)

Os adipócitos produzem a leptina que atua (feed-back) através de receptores no hipotálamo, criando uma retroalimentação de regulação do peso corporal. Por estar envolvido na regulação do consumo de alimento e metabolismo energético, foi proposto como potencial gene candidato do controle de algumas proporções do tecido adiposo em bovinos e, portanto, pode ser referido como um dos fatores genéticos determinantes no controle da qualidade de carne (marmoreio) (TANIGUCHI et al., 2002).

Segundo HIROYUKI et al., (2007) existe uma baixa expressão do gene da leptina no músculo esquelético bovino e uma alta expressão no tecido adiposo intermuscular. Alguns estudos com roedores sugerem que a leptina expressa no tecido intermuscular tem ação antagônica ao acúmulo de triacilglicerol (MUIOIO et al., 1997; SJIMABUKURO et al., 1997 *apud* HIROYUKI et al., 2007).

Em resumo, os genes *DGTA 1*, *TG* e a *LEP* tem sido os mais apontados como fatores de influência da deposição de gordura em bovinos.

2.8 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao melhoramento animal

Embora o melhoramento genético clássico, baseado na análise do fenótipo dos animais tenha produzido mudanças consideráveis na produtividade dos diferentes

sistemas de produção dos bovinos, a análise molecular do genoma dos animais domésticos começa a contribuir para solucionar algumas de suas limitações

A acurácia das predições e a intensidade da seleção aplicada ao rebanho podem ser incrementadas, diminuindo o intervalo entre gerações e economizando esforços em testes de progênes de touros.

Uma das mais significativas contribuições aos estudos moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*). Desenvolvida por MULLIS em meados da década de oitenta (MULLIS e FALOONA, 1987), a técnica consiste na multiplicação de um fragmento de DNA de interesse em milhões de cópias *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase termoestável, a fim de que se tenha material genético em quantidade suficiente para se proceder determinadas análises. A quantidade de DNA molde necessária para que se tenha a detecção pela técnica de PCR é mínima, tornando possível a análise do DNA obtido de uma única célula.

2.8.1 Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)

Com o avanço das pesquisas na área da biologia molecular, a técnica desenvolvida por Mullis foi aprimorada e deu origem a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (*Reverse Transcriptase Chain Reaction* ou *RT-PCR*) ou PCR quantitativa. Essa técnica permite que o RNA mensageiro seja quantificado, possibilitando a análise da expressão dos genes (HEID et al., 1996), a partir de uma quantificação relativa (RQ). A quantificação da expressão gênica facilitará a seleção de indivíduos que possuam pré-disposição genética, a fenótipos de interesse econômico, já que o RNA mensageiro a ser quantificado, é quem dará origem a proteína, responsável pelo fenótipo desejado.

O primeiro passo da técnica consiste na síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA), utilizando como molde uma fita do RNA mensageiro de interesse, pela enzima catalisadora transcriptase reversa. São utilizados *primers* inespecíficos, sendo oligonucleotídeos compostos por várias timinas consecutivas (6 a 35), que são hibridizados às regiões Poly-A ou *A-Rich* do RNA (ricas em adeninas). Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR quantitativa.

Na reação de PCR quantitativa a amplificação do cDNA de interesse é dividida em 3 fases: a linha basal (*baseline*) na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência; a fase log em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos. A fluorescência captada pelo aparelho pode ser obtida por dois métodos, detecção não-específica e a específica. O Syber Green é o corante mais utilizado de detecção não-específica, no qual fluoróforos fluorescentes se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência. Ou por sondas de hidrólise, altamente específicas a seqüência alvo, que liberam fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse.

A detecção do produto amplificado é mostrada em um gráfico onde se tem no eixo x o ciclo *Threshold* ou ciclo de quantificação (Cq) e no eixo y, o número de ciclos da reação. O Cq é o número do ciclo em que a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de limite. O ciclo de quantificação é um nível de sinal repórter normalizado, que é usado para a determinação do Cq em ensaios em tempo real. O nível é definido para ser acima da linha de base, (*baseline*), mas suficientemente baixo para estar dentro da região de crescimento exponencial de uma curva de amplificação (fase log). O número do ciclo em que o sinal de fluorescência associada a um acúmulo de amplicon particular cruza o limiar é referido como a Cq (Protocolo Real Time, LIFE TECHNOLOGIES).

Após a realização das amplificações são utilizados métodos de análise da expressão gênica por qPCR. Os valores de Cq gerados (valores logarítmicos) são utilizados diretamente (método Cq comparativo) ou indiretamente (interpolação de curvas padrão para criar valores lineares) para análises quantitativas.

O método recomendado nas análises de expressão gênica em bovinos é o desenvolvido por VANDESOMPELE et al., (2002), onde a normalização dos valores da expressão dos genes-alvo é feita em relação aos valores obtidos por um fator de normalização, gerado através da expressão de no mínimo três genes de referências.

Os genes de referência ou genes endógenos são aqueles cuja seqüência contida em uma amostra, é usada para normalizar as quantidades dos genes alvo nas demais. A escolha de genes apropriados é crucial para confiabilidade dos resultados, porém o nível de expressão desses genes deve permanecer inalterado entre todas as amostras, durante diferentes condições experimentais (VANDESOMPELE et al., 2002).

2.9 Importância e aplicação

Lançando mão de técnicas precisas e de alta acurácia é estudada a expressão de genes relacionados à qualidade da carne em bovinos de corte, como possíveis marcadores genéticos para seleção de animais geneticamente superiores para carne macia. A variação na expressão de genes ligados à qualidade da carne pode estar mais diretamente ligada a esta qualidade do que os polimorfismos genéticos observados, e desta forma pode levar a uma seleção mais acurada.

Entretanto é sabido que a qualidade final da carne não é apenas responsabilidade da genética dos animais, mas resultado de tudo o que aconteceu com o mesmo durante a cadeia produtiva (criação, transporte, armazenamento, manipulação, exposição e preparo da carne), sendo assim, a seleção baseada na expressão gênica deve ser associado a formas de criação adequadas, gerando um produto final de características desejadas.

2.10 Objetivos

O objetivo do estudo foi relacionar a qualidade da carne proveniente do músculo *longissimus dorsi* em dois períodos (abate e com sete dias de maturação), à expressão gênica da μ -calpaína (CALP 1), *m*-calpaína (CALP 2), calpastatina (CAST), diacilglicerol acyltransferase 1 (DGAT1), leptina (LEP) e tireoglobulina (TG) em dois grupos genéticos: Nelore (*Bos indicus*) e Canchim ($\frac{5}{8}$ Charolês, $\frac{3}{8}$ Nelore), e verificar a possibilidade de utilizar essa expressão como marcador genético na seleção de animais de genótipos superiores para a qualidade de carne.

2.11 Hipóteses

A carne menos macia na raça Nelore, resultado de uma maior atividade da calpastatina relatada em vários trabalhos, será evidenciada pela força de cisalhamento maior e índice de fragmentação miofibrilar menor nos animais da raça, que deverá também, apresentar maior expressão do gene da calpastatina (CAST) e maior porcentagem de lipídeos totais (marmoreio da carne). Quanto aos genes relacionados à deposição de gordura (TG, DGAT1 e LEP), todos apresentam expressão superior nos animais da raça Nelore.

A variação na expressão dos genes da calpastatina e calpaína dentro de cada raça deverá ser acompanhada por variações na maciez da carne, enquanto variações na expressão dos genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, também dentro das raças, deverão ser acompanhadas por variações na quantidade de lipídeos totais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 30 bovinos machos inteiros, criados em sistema *creep feeding* e desmamados aos sete meses de idade, com peso vivo médio de 209,4 kg ($\pm 23,3$ kg). Do total de animais utilizado, foram 15 bovinos do grupo genético Nelore e 15 bovinos do grupo genético Canchim.

3.1 Manejo, arraçamento e cuidados com os animais

Após o desmame os animais foram mantidos nas instalações de confinamento experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Unesp-Botucatu.

Todos os animais foram submetidos à mesma dieta (*ad libitum*), alojamento e manejo.

As baias eram de chão batido, a céu aberto, com lotação de sete a oito animais por baia (50 m² por animal e 1,6 m linear de cocho por animal). A separação dos animais nas baias foi feita por raça, sendo duas baias com animais Canchim e duas baias com animais Nelore.

Todos os animais foram desverminados, pesados e submetidos a um período de 21 dias de adaptação à dieta proposta. A adaptação adotada foi a “*step up*”, dividida em três períodos de sete dias cada, caracterizada por um aumento gradual na quantidade de concentrado até a dieta experimental inicial (dieta de crescimento).

As pesagens foram realizadas no início do experimento e a cada 28 dias aproximadamente, após um período de jejum alimentar de 16 horas, para monitoramento do ganho diário de peso vivo e ajustes nas porcentagens dos ingredientes da dieta.

O crescimento e a deposição do tecido adiposo foram monitorados por ultrassonografia em cada período de pesagem, através de uma amostragem de 10% dos animais.

A dieta foi formulada com alta relação concentrado:volumoso (75:25) e fornecida duas vezes ao dia (manhã e tarde), de forma a garantir uma sobra de 5 a 10% do total de alimentos fornecidos. A disponibilidade de água era constante nos bebedouros australianos com capacidade para 1500 litros.

A dieta foi composta por bagaço de cana cru, feno de capim, silagem de grãos úmidos de milho, polpa cítrica, farelo de soja e núcleo mineral com monensina (Rumensin - Elanco®). As dietas utilizadas foram de alta qualidade nutricional, formuladas segundo o sistema *Cornell Net Carbohydrate and Protein System 5.0. 26*, cuja composição bromatológica está apresentada na Tabela 1. A dieta foi submetida a ajustes de quantidade diariamente, com base no escore de cocho antes da primeira refeição (8h). Eram esperados ganhos de peso diários de 1,3 a 1,6 kg/animal. Ao longo do período experimental foram feitas amostragens periódicas da dieta para a análise bromatológica de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), de acordo com a *ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS* (AOAC, 1990) e fibra em detergente neutro (FDN) (GOERING e VAN SOEST, 1970).

Tabela 1. Composição bromatológica da ração

Porcentagem de Inclusão (%MS)					
Ingredientes	Adaptação I (7 dias)	Adaptação II (7 dias)	Adaptação III (7 dias)	Inicial (66 dias)	Final (41 dias)
Bagaço de cana cru	26,94	23,48	20,71	21,77	13,61
Feno	15,37	14,02	12,58	5,12	4,54
SGUM	23,14	27,74	32,21	36,20	47,52
Polpa Cítrica	12,33	12,96	13,34	15,25	19,98
Farelo de Soja	20,70	20,27	19,63	20,14	12,85
Uréia	0,46	0,46	0,46	0,47	0,43
Sal Mineral	1,07	1,07	1,07	1,05	1,08
Composição Nutricional (%MS)					
MS	74	75	75	74	75
PB	15,6	15,7	15,8	16,0	13,8
FDN	37,1	33,6	30,3	25,9	19,2
peFDN	32	28	25	21	15
NDT	71	73	75	76	80
Cálcio	0,54	0,54	0,54	0,55	0,62

SGUM: silagem de grão úmido de milho; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; peFDN: fibra em detergente neutro fisicamente efetiva; NDT: nutrientes digestíveis totais.

Quando os animais alcançaram o peso de abate pré-estabelecido de aproximadamente 370 Kg (12,5 @) e cobertura de gordura de acabamento de mínimo 4 mm, foram abatidos em frigorífico comercial. A espessura da camada de gordura subcutânea foi monitorada via ultra-som nas mesmas ocasiões das pesagens e no abate utilizando-se um paquímetro, seguindo-se a metodologia usada pelo *UNITED STATES DEPARTMENT AGRICULTURE (USDA)* (1989).

3.2 Coleta das amostras

As amostras utilizadas nas análises de expressão gênica foram coletadas imediatamente após o abate, sendo retiradas do músculo *Longissimus dorsi* na altura das 11^a e 13^a costelas de cada animal, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras para as análises de força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e lipídeos totais (LT) foram coletadas 24 horas após o resfriamento da carcaça, da mesma região do músculo *Longissimus dorsi*, entre 11^a e 13^a costelas dos animais.

As amostras foram coletadas, inicialmente, para o projeto de pesquisa desenvolvido e concluído: “Relação entre a qualidade da carne e a expressão gênica e protéica de isoformas de Miosinas de Cadeia Pesada no músculo *longissimus dorsi* em dois diferentes grupos genéticos de bovinos, Nelore e Canchim”, (FAPESP Proc: 2009/03650-0), coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira com a colaboração do mestrando Eduardo Paulino Castan (FAPESP Proc. 2007/06768-70) e da Prof a. Dra. Maeli Dal Pai Silva, e gentilmente cedidos para a realização do presente trabalho.

3.2.1 Processamento das amostras de qualidade de carne

As amostras coletadas da carcaça resfriada para a análise de qualidade de carne foram mantidas a 4^o C. Metade das amostras coletadas 24 horas após o resfriamento da carcaça, foram utilizadas para a análise de força de cisalhamento (FC0), índice de fragmentação miofibrilar (MF10) e extração de lipídeos totais sem influência da maturação.

O restante das amostras coletadas foi embalado a vácuo e mantidas a 4^o C por sete dias (período de maturação), sendo submetidas as análises de força de cisalhamento (FC7) e índice de fragmentação miofibrilar (MF17).

3.2.2 Processamento das amostras de expressão gênica

As amostras coletadas para a análise da expressão gênica, imediatamente após o abate, após o congelamento em nitrogênio líquido foram mantidas a -80°C nos freezers do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP Botucatu.

3.3 Análise da Força de Cisalhamento

As amostras do músculo *Longissimus dorsi*, com aproximadamente 2,54 cm de espessura, não maturadas e maturadas por sete dias, foram submetidas à análise de força de cisalhamento, seguindo a metodologia descrita por WHEELER et. al., (1995). As amostras de carne foram pesadas e assadas em forno elétrico até atingirem a temperatura interna de 71°C . As amostras foram pesadas novamente e resfriadas por 24 horas. A medição da maciez foi realizada utilizando-se o aparelho texturômetro com sonda *Warner-Bratzle Shear Force* com capacidade de 25 kg e velocidade de seccionador de 20 cm/minuto. O valor de FC (kg) de cada amostra foi obtido pela média aritmética de seis sub-amostras, retiradas de diferentes pontos da mesma amostra, para melhor precisão.

3.4 Análise do Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

A determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) foi baseada na metodologia proposta por CULLER et al., (1978) e adaptada no Laboratório de Bioquímica da Carne (LBC) do Departamento de Química do IBB, Unesp, Botucatu/SP.

Das amostras coletadas 24 horas após o resfriamento da carcaça, sem maturação e com sete dias de maturação (ainda congeladas), destinadas a esta análise, foram retirados fragmentos musculares de três gramas, desprovidos de tecido

conjuntivo e gordura aparentes. Esses fragmentos musculares foram homogeneizados em 30 mL de solução de extração (KCl 100 mM, fosfato de potássio 20 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM e NaN₃ 1 mM, pH 7,0) em Ultra-turrax com haste de cisalhamento (Marconi - MA 102/E) a 18000 rpm. Em seguida, a solução homogeneizada foi centrifugada, a 1000 x g por 15 minutos, a 2°C. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 30 mL de solução de extração e o precipitado foi agitado vigorosamente até que o pellet tenha sido desfeito, e o mesmo foi centrifugado novamente por 15 minutos a 1000 x g a 2°C. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados ao precipitado 7,5mL da solução de extração e a suspensão obtida foi filtrada em peneira de polietileno para remoção do tecido conjuntivo. Para lavagem do tubo de modo a facilitar a passagem das miofibrilas através da peneira foram adicionados mais 7,5 mL da solução de extração ao tubo onde foi realizada a extração.

Foi determinada na suspensão de miofibrilas a concentração de proteínas pelo método do biureto, descrito por GORNALL et al., (1949). Uma alíquota da suspensão de miofibrilas foi então diluída com a solução de extração até uma concentração protéica de $0,5 \pm 0,05$ mg/mL. A suspensão diluída de miofibrilas foi agitada e colocada em cubeta para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para obtenção do índice de fragmentação miofibrilar, o valor de densidade ótica obtido foi multiplicado por 200.

3.5 Extração de lipídeos totais

A determinação dos lipídeos totais nas amostras livres de gordura subcutânea foi realizada de acordo com o protocolo descrito por BLIGH e DYER (1959), onde amostras musculares de aproximadamente três gramas foram homogeneizadas e acrescidos 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol P.A. e 8 mL de água destilada, sendo o material totalmente dissolvido. A mistura foi colocada em mesa agitadora por 30 minutos.

Após agitação foram adicionadas de 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%, agitando-se vigorosamente por dois minutos. As amostras foram divididas em dois tubos plásticos (50 mL) para centrifugação por dois minutos a 3300 rpm (1000 g) a 25°C e o sobrenadante foi descartado e filtrado em provetas. Foram coletados 5 mL do filtrado e transferidos para um béquer e mantidos em estufa a 37° C, para evaporação do clorofórmio.

O peso dos béquers secos em estufa, resfriados em dissecador e numerados foi medido antes de ser transferido o filtrado para os mesmos. Os béquers foram pesados depois que o clorofórmio das amostras evaporou. Os dados foram colocados em uma planilha e a porcentagem de lipídeos foi calculada.

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

A extração do RNA total do músculo estriado esquelético foi realizada utilizando o protocolo de TRizol (LIFE TECHNOLOGIES, EUA). O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma[®] - DEPC, a 0,01%), e armazenado a - 80°C.

Para a verificação da qualidade e quantificação do RNA total extraído foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, EUA). Com base na densidade óptica (OD) 260 nm (específica para ácidos nucleicos), foi verificada a quantidade do RNA. Além disso, as razões das absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm, superiores a 2,0 e 1,7 respectivamente, forneceram uma estimativa da qualidade da extração.

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 capilar (2100 BIOANALYZER, AGILENT TECHNOLOGIES, EUA). A integridade do RNA foi verificada pelo cálculo do número de integridade de RNA (RIN), encontrando-se uma média dos valores de todas as amostras (Nelore e Canchim) igual a $8,0 \pm 0,3$ (escala 1–10), indicando um RNA de alta qualidade e com mínimo de degradação.

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 DNase I - Amplification Grade (LIFE TECHNOLOGIES, EUA). O RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foram acrescentados 2 μ L de tampão DNase, 2 μ L de DNase I (1 unidade/mL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 20 μ L de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2 μ L de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos.

3.6.4 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (LIFE TECHNOLOGIES, EUA), com 2 μ g de RNA total obtido do músculo esquelético, ao qual foi adicionado 10 μ l de tampão de transcriptase reversa (10x RT buffer), 4 μ L de dNTP (25x), 10 μ L de *Random Primers* (10x), 2,5 μ L de enzima de transcriptase reversa (50 unidades/ μ l), 2,5 μ L de inibidor de ribonuclease

recombinante RNaseOUT (40 unidades/ μL) (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 μL com H_2O livre de RNases. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos e em seguida, a 42 °C por duas horas, tendo seu volume final ajustado para 200 μL . As amostras permaneceram estocadas em freezer a -20 °C.

3.6.5 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)

- Escolha dos genes de referência

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

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 (Tabelas 2 e 4), apontando três como mais estáveis (*GAPDH*, *HPRT* e *TBP*) (Figura 10). Todos os procedimentos laboratoriais da RT-qPCR foram realizados segundo MIQE guide lines (BUSTIN et al., 2009).

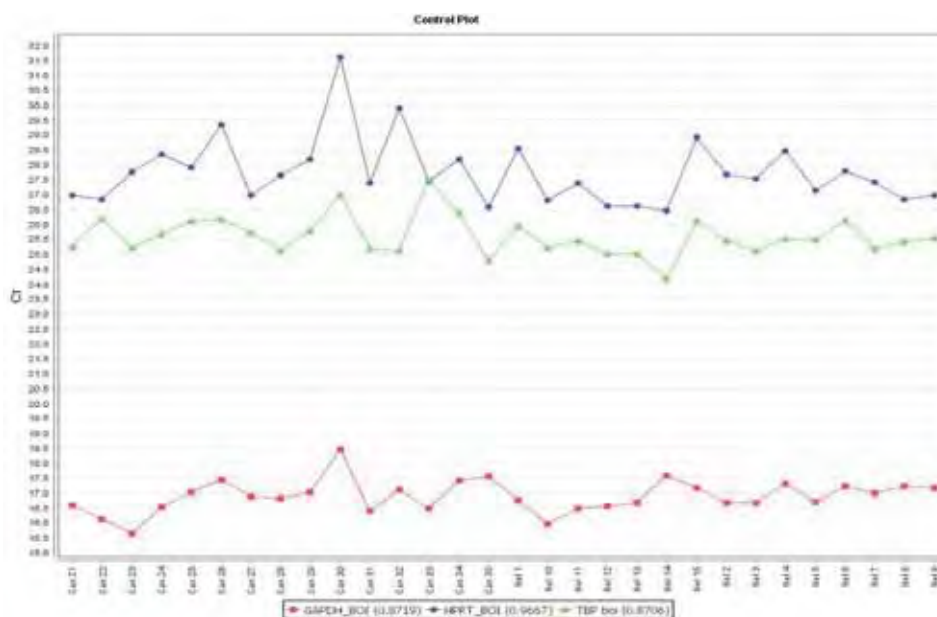


Figura 10. Gráfico de estabilidade de expressão dos genes de referência (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH), *hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase* (HPRT) e *TATA binding box protein* (TBP). Cq: ciclo de quantificação.

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

Foram utilizados conjuntos de *primers* e sondas de hidrólise customizados (ensaios TaqMan®) para os genes *μ-calpaína*, *m-calpaína*, *calpastatina*, *tireoglobulina*, *leptina* e *TBP* (Tabela 2), expressos em *Bos taurus* (LIFE TECHNOLOGIES, EUA).

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
<i>CAPN 1</i>	BSF03223357_m1	
<i>CAPN 2</i>	BSF03817738_m1	
<i>CAST</i>	BSF03252008_m1	FAM
<i>TG</i>	BSF03211731_m1	
<i>LEP</i>	BSF03211909_m1	
<i>TBP</i>	BSF03241947_m1	

CAPN 1: μ -calpaína, *CAPN 2*: m-calpaína, *CAST*: calpastatina, *TG*: tireoglobulina, *LEP*: leptina e *TBP*: *TATA binding box protein*

Para os genes *DGAT1*, *GAPDH* e *HPRT*, foram desenhados *primers* e sondas de hidrólise, baseados nas seqüências disponíveis no banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (Tabela 3), utilizando-se o software *Primer Express*[®] 3.0 (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) (Tabela 4).

Tabela 3. Número de acesso das seqüências dos genes *DGAT1*, *GAPDH* e *HPRT*

Gene	Número de acesso
<i>DGAT1</i>	EE_00668544.1
<i>GAPDH</i>	NM_001034034.1
<i>HPRT</i>	NM_001034035.1

DGAT1: diacilglicerol aciltransferase 1, *GAPDH*: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, *HPRT*: hipoxantina-guanina fospforribosiltransferase

Tabela 4. Seqüência dos *primers* e sondas de hidrólise sintetizadas para análise da expressão gênica na reação de RT-qPCR.

Gene	Seqüência	Fluorescência
<i>DGAT1</i>	<i>Primer F:</i> CATGCTCTGGAAACCCTACAGAT <i>Primer R:</i> TGCACAGCACTTTATTGACACATT Sonda: TCGCCCAAGGGTC	FAM
<i>GAPDH</i>	<i>Primer F:</i> TCCACCCACGGCAAGTTC <i>Primer R:</i> TGACGAGCTTCCCGTTCTCT Sonda: CGGCACAGTCAAGG	FAM
<i>HPRT</i>	<i>Primer F:</i> TGGCGTCCCAGTGAAATCA <i>Primer R:</i> CAGCTGGCCACAGAACAAGA Sonda: CAGTGACATGATCCAATG	FAM

DGAT1: diacilglicerol aciltransferase 1, *GAPDH:* gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, *HPRT:* hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

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 triplicata a serem feitas por dia.

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

- Validação dos *primers* e sondas

Foram realizados testes de concentração de *primers* e de sondas para os ensaios sintetizados, a fim de obter o menor Cq com maior valor de ΔRn e ausência de dímeros. Como recomendado pelo fabricante, foram testadas concentrações de 50 a 900 nM de *primer forward* e *reverse*, sendo de 300 nM a concentração ideal determinada para ambos os *primers*. Estabelecido a concentração ideal dos *primers*, foi realizado o teste de concentração das sondas, de 50 a 250 nM, recomendadas pelo fabricante, chegando-se a 50 nM como concentração ideal. Os testes de *primers* e sondas foram realizados utilizando-se o mesmo protocolo das reações com as amostras, descrito abaixo.

Estabelecida a concentração ótima dos reagentes, foi realizado um teste de validação utilizando curvas padrão a partir de uma diluição seriada para os 3 genes (*DGAT1*, *GAPDH* e *HPRT*), a fim de confirmar a eficiência de 100% de amplificação dos *primers* a cada ciclo da reação de qPCR.

Com a confirmação da eficiência das reações passou-se a montagem das placas com o seguinte protocolo: 12,5 μ L de TaqMan® Universal Master Mix II (2x), 2,5 μ L *Primer Forward*, 2,5 μ L *Primer Reverse*, 2,5 μ L sonda, 2,5 μ L cDNA e 2,5 μ L de água RNase-free, totalizando 25 μ L. Em seguida, as placas (96-well) foram lacradas com os adesivos e centrifugadas brevemente.

Em cada placa de qPCR foram colocados um único gene (alvo ou de referência) com todos os animais (n=30), procedimento igualmente realizado para ambos os tipos de ensaios (customizados ou sintetizados).

- Determinação dos parâmetros da reação

Para a realização das reações foi utilizado o sistema *Real Time PCR 7300* (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. Após a corrida, foi analisada a curva de dissociação para confirmar a amplificação específica dos produtos de qPCR de cada gene. A curva de dissociação permite identificar o produto específico, pela presença de um único pico, e fazer a distinção entre o DNA alvo (amplicon) e a formação de dímeros de *primers*. Um único pico na curva de dissociação indica que todos os amplicons presentes na reação apresentam o mesmo tamanho e, portanto, denaturam a uma mesma temperatura, de acordo com a queda brusca de fluorescência da sonda de hidrólise observada nessa curva (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*, APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

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*, foi utilizado para a verificação da eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers* de sondas de 100% ± 5%, com os valores de inclinação das retas (*slope*) inclusos no intervalo de -3.32 a -3.4, de acordo com o *User Bulletin #2* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001). 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 triplicatas, e é gerado matematicamente pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 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 E SCHMITTGEN et al., (2001). Todo procedimento matemático foi realizado pelo programa *Data Assist v2.0* (LIFE TECHNOLOGIES, EUA).

3.7 Análise estatística dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional *Statistical Analysis System v.9.1 (SAS)*. Os dados de qualidade de carne e gordura foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM, utilizando-se método de análise de variância tipo I e tipo III (ANOVA) para verificação da significância. Para comparação dos dados de expressão gênica entre os grupos genéticos foi utilizado o mesmo método de análise de variância, a partir da média dos Cqs das triplicatas de cada animal. Para as análises da associação entre os dados de expressão gênica e qualidade de carne dentro de raça, foi utilizada a correlação de Pearson. Para todos os testes estatísticos foi aplicado o método de Bonferroni para controle do nível de significância no experimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ganho de peso

O peso médio a desmama (209,36 kg \pm 23,32) foi abaixo do preconizado por SILVEIRA et al., (2004), sendo assim os animais demoraram mais que o esperado para atingirem o peso de abate. Em aproximadamente 140 dias de confinamento os animais ganharam em média 168,36 Kg. O ganho de peso médio diário dos animais variou de 0,55 a 1,68 kg/dia/animal (Tabela 5), porém as médias de ganhos de peso das duas raças foi equivalente.

Tabela 5. Média de peso dos animais Nelore (NE) e Canchim (CH) desde a entrada no confinamento até o abate

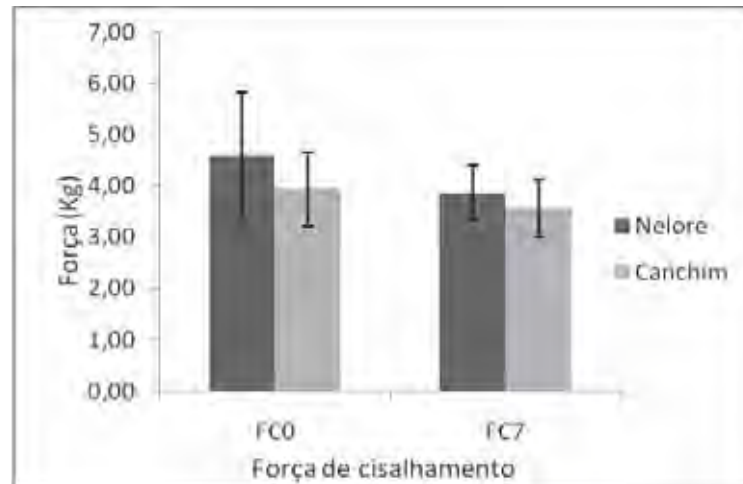
Grupo	P1	P2	GPD 1	P3	GPD 2	P4	GPD 3	P5	GPD 4
Média NE	203,72	228,50	0,55	278,22	1,51	335,44	1,68	371,33	0,72
Média CH	215,00	242,61	0,61	288,11	1,38	341,81	1,62	384,11	0,79

P: média de peso em cada período (28 dias); GPD: média do ganho de peso diário; NE: Nelore; CH: Canchim. P1: entrada dos animais no confinamento; P5: abate

4.2 Qualidade da carne

4.2.1 Maciez da Carne

Duas medidas indicadoras da maciez da carne foram avaliadas neste trabalho, a Força de Cisalhamento e o Índice de Fragmentação Miofibrilar. Os resultados das análises estatísticas destas duas medidas não foram iguais, embora os valores encontrados tenham indicado tendências semelhantes para as duas medidas. Conforme pode ser observado na Figura 11, os valores da força de cisalhamento foram menores para os animais da raça Canchim do que para o Nelore tanto no dia zero, como após sete dias de maturação. Entretanto, as análises estatísticas não apontaram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

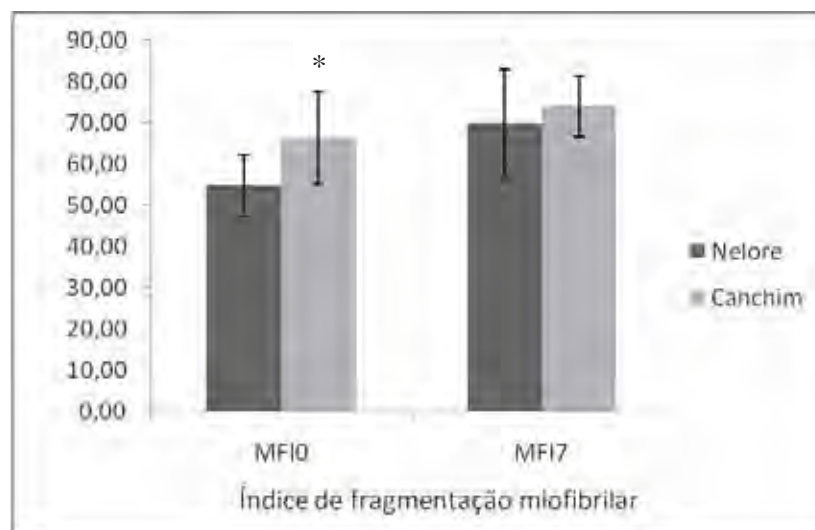


FC0: Força de Cisalhamento no dia zero (24 horas após o abate, carne sem maturação); FC7: Força de Cisalhamento sete dias após o abate (carne maturada)

Figura 11. Média da força de cisalhamento (Shear Force) nos diferentes grupos Nelore e Canchim

Por outro lado, as análises do índice de fragmentação miofibrilar mostraram valores superiores nos indivíduos da raça Canchim ($P < 0,05$), na carne sem maturação (MFI0), indicando uma carne mais macia nos animais dessa raça (Figura 12). Nos valores de MFI7 não foram encontradas diferenças entre as raças ($P > 0,05$), porém MFI7 mostrou-se superior a MFI0 em ambas os grupos. Esses resultados corroboram com OLSON et al., (1976), que estabeleceram que com o aumento dos dias *postmortem* houve também um crescente aumento nos valores de MFI. Sendo assim, a diferença na maciez da carne encontrada entre os períodos é dada pela ausência de degradação das fibras musculares em MFI0. Nesse período, o músculo ainda não concluiu o processo de *rigormortis*, processo iniciado somente 24 horas após o abate. Desta forma, as enzimas proteolíticas ainda não iniciaram o processo de degradação das proteínas miofibrilares (HADLICH et al., 2006). Além disto, antes do abate, a taxa de síntese protéica é superior a degradação, resultando em taxas de degradação miofibrilares menores. Já nas amostras onde foi mensurado MFI7, o músculo havia concluído o processo de *rigor* e as enzimas proteolíticas já haviam realizado o processo de degradação protéica, tornando a carne mais macia em ambos os grupos.

O processo de maturação da carne bovina tem início logo após a entrada do músculo em *rigor mortis*, porém esse início varia de acordo com a idade do animal. Em animais velhos o rigor pode começar em até 150 horas após o abate, sendo assim a carne só terá resultado efetivo da maturação, em períodos longos de tempo. Alguns estudos propõem períodos de até 14 dias de maturação (STOLOWSKI et al., 2006).



MFI 0: Índice de fragmentação miofibrilar dia 0 (24 horas após o abate, carne sem maturação); MFI 7: Índice de fragmentação miofibrilar sete dias após o abate (carne maturada). * diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). MFI: unidade arbitrária.

Figura 12. Média do índice de fragmentação miofibrilar nos diferentes grupos Nelore e Canchim

Em termos de maciez os valores das duas medidas (FC e MFI) apresentadas nas Figuras 11 e 12, indicam uma mesma tendência, a maior maciez no Canchim na carne sem maturação e uma aproximação dos valores após os sete dias de maturação. Estes resultados aliados aos da análise estatística, parecem indicar que antes do período de maturação a carne dos animais da raça Nelore era um pouco menos macia do que a carne dos Canchim, e que o período de sete dias de maturação diminuiu esta diferença. A discrepância nos resultados das análises estatísticas das duas medidas

pode refletir maior variabilidade do FC em relação ao MFI, bem como, pode ser consequência dos diferentes processos fisiológicos que afetam as duas medidas.

Os resultados encontrados contradizem aos resultados descritos em vários trabalhos onde animais *Bos taurus* ou seus cruzamentos apresentam carne mais macia que animais puros *Bos indicus*, mesmo após o processo de maturação. CROUSE et al. (1989) realizaram experimento com animais jovens que possuíam percentagens de 0, 25, 75 e 100% de sangue zebuíno. Os autores demonstraram que, na medida em que se aumentavam os graus de sangue zebuíno nos cruzamentos, diminuía o MFI. Deste modo, esses autores concluíram que a variação da maciez da carne foi independente do meio ambiente, responsabilizando o aumento do genótipo zebuíno pela redução da maciez da carne. Posteriormente, resultados semelhantes também foram encontrados por WHEELER et al. (1996). Tendo em vista estes resultados, era esperado que animais Nelores puro apresentassem MFI inferiores e FC superiores aos animais cruzados (Canchim) tanto na carne sem maturação, como na carne maturada, já que esses possuem apenas 3/8 de genes de Zebuínos em sua composição teórica. Os valores de MFI (MFI0 e MFI7) mostraram-se superiores a 60, e os de FC inferiores a 4,5 kg, indicando uma carne macia (CULLER et al., 1978; MCKEITH et al. 1985 e SHACKELFORD et al., 1991), antes mesmo do processo de maturação. Esses resultados, entretanto, estão de acordo com os encontrados por HADLICH et al., (2006) que no estudo da maciez da carne de *Bos indicus* e *Bos taurus* puros criados no sistema superprecoce, não encontraram diferença na maciez da carne entre os grupos.

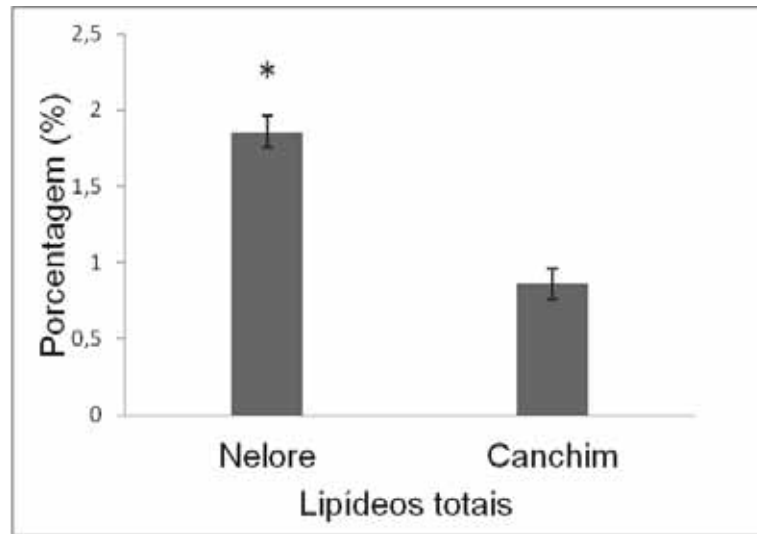
A pouca diferença na maciez da carne de duas raças de diferentes padrões de crescimento pode ser explicada pelo sistema de produção onde os animais foram produzidos. Segundo HADLICH et al., (2006) animais diferentes quanto ao crescimento, podem apresentar similar desenvolvimento e carne de qualidade semelhante se produzidos, desde o nascimento, dentro de condições pré-estabelecidas, de manejo e alimentação.

Em animais jovens o alto *turnover* protéico do músculo torna a carne suscetível ao processo de maturação em curtos períodos de tempo, como encontrado por

HADLICH et al., (2006), que utilizando dois grupos genéticos (*Bos taurus* e *Bos indicus*), demonstraram que animais criados em sistema superprecoce (abatidos jovens) necessitam de apenas sete dias de maturação para obterem resultados satisfatórios, quanto à maciez da carne. Demonstraram ainda que, neste sistema de criação, o processo de maturação age de maneira mais incisiva na carne dos zebuínos, uma vez que após sete dias de maturação as diferenças encontradas na maciez da carne de animais zebuínos e taurinos haviam desaparecido. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os resultados destes autores, já que os animais das diferentes raças mostraram pouca diferença quanto à maciez da carne antes da maturação e que esta diferença diminuiu na carne maturada. Além da ação eficaz do processo de maturação em apenas sete dias, visto que os valores da FC e da MFI mensurados na carne maturada mostraram-se inferiores aos da carne não maturada, em ambos os grupos.

4.2.3 Índices de lipídeos totais

Com relação aos lipídeos totais foi encontrada diferença entre as raças ($P < 0,05$) (Figura 13). Os animais da raça Nelore obtiveram deposição de gordura de marmoreio superior em relação aos animais da raça Canchim, confirmando as hipóteses desse estudo.



* diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

Figura 13. Lipídeos totais (LT) nos animais Nelore e Canchim

A maior taxa de lipídeos no músculo *Longissimus dorsi* do Nelore indica uma maior deposição de gordura de marmoreio, como observado na literatura. Indivíduos Nelore possuem características de deposição de gordura de marmoreio superiores as raças Charolês (taurino continental) e Canchim, que possuem maior deposição muscular (ZADRA, 2005).

4.3 Expressão gênica

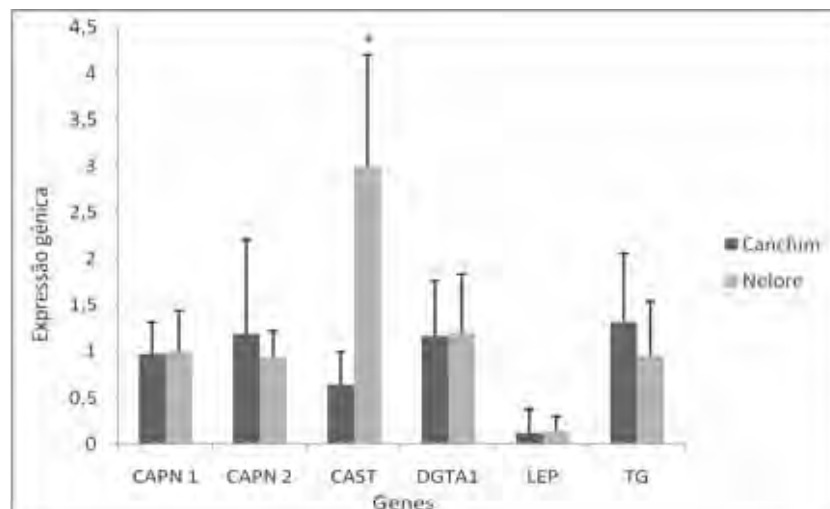
4.3.1 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)

Os padrões adotados para a realização das reações de qPCR deduziram a linearidade e a eficiência da reação a partir da inclinação da curva-padrão gerada pelo software 7300 System SDS (LIFE TECHNOLOGIES, EUA) para cada um dos genes analisados. A análise das curvas-padrão dos genes que tiveram ensaios desenhados (Tabela 4) demonstrou uma alta linearidade ($r^2 = 0,99$). A eficiência da PCR (E_x) foi

calculada a partir da equação $E_x = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$. Uma inclinação de -3,32 implica em uma eficiência de reação de 100%. Todos os genes desenhados apresentaram valores de inclinação próximos de -3,32 e as estimativas de eficiência ficaram em $100\% \pm 5\%$.

Foi necessário também realizar a correção da variabilidade experimental entre as diferentes amostras, por exemplo, quantidade de RNA e eficiência da reação de transcrição reversa, antes da realização das análises finais. A normalização pelo fator de correção (gerado pela expressão dos três genes de referência) é o método mais aceito para evitar essas disparidades (VANDESOMPELE et al., 2002).

A partir da normalização dos genes-alvo pelos genes de referência, foram obtidos os dados de expressão para cada grupo genético. A expressão do gene da *CALP 1* não mostrou diferença entre os grupos ($P < 0,92$) (Figura 14). O gene da *CALP 2*, assim como a *CALP 1*, também não apresentou diferença entre os animais Nelore e Canchim ($P < 0,36$). Os resultados encontrados corroboram com FERRAZ (2009) que comparou a expressão da *CALP2* em Nelore (*Bos indicus*) e Angus (*Bos taurus*), sem encontrar diferença.



CAPN1: μ -calpaína; CAPN2: *m*-calpaína; CAST: calpastatina; DGAT1: diacilglicerol aciltransferase 1; LEP: Leptina; TG: tireoglobulina. Teste de Tukey. * diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Expressão gênica: unidade arbitrária.

Figura 14. Expressão gênica nos diferentes grupos genéticos Nelore e Canchim

Diante dos resultados encontrados a diferença na maciez da carne dos animais zebuínos, provavelmente não é resultante da menor expressão dos genes codificantes das proteases (*CAPN1* e *CAPN2*), mas sim da maior expressão do seu inibidor (*CAST*). Esta premissa é reforçada pelos resultados obtidos por WHIPPLE et al., (1990), que ao analisar a atividade das enzimas codificadas por esses genes, em taurinos e zebuínos, detectaram maior atividade enzimática do inibidor calpastatina nos animais zebuínos, porém não observaram diferenças na atividade enzimática das calpaínas, em nenhum dos grupos genéticos. De acordo com GEESINK e KOOHMARAIE (1999) e GEESINK et al., (2006), o aumento do nível de atividade da calpastatina resulta na redução da taxa de proteólise mediada pelas calpaínas e, conseqüentemente, uma diminuição da maciez da carne, sugerindo que este fato comprovaria a inibição do processo de proteólise pela enzima. O aumento da atividade das enzimas ligadas ao processo se dá pela quantidade de enzima que é sintetizada. Sendo assim, quanto maior for a expressão do gene codificante da enzima, maior será a atividade da mesma. Outros fatores intracelulares também estão envolvidos no controle da atividade enzimática, porém não foram abordados neste trabalho.

Diversos autores têm relacionado à maior atividade enzimática da calpastatina a maiores valores de FC no músculo de animais zebuínos, quando comparados com os taurinos (WHEELER et al. 1990; WHIPPLE et al. 1990; SHACKELFORD et al. 1991; CUNDIFF, 1993; MORGAN et al. 1993; PRINGLE et al. 1997; O'CONNOR et al. 1997; IBRAHIM et al. 2008). Todavia, a quantificação dos RNAs mensageiros (RNAm) envolvidos no processo é pouco estudada, sendo este trabalho fonte de informação fundamental no processo de entendimento do sistema proteolítico calpaína-calpastatina.

A relação entre menores índices de MFI e a expressão do *CAST* encontrados na literatura são compatíveis com os resultados observados nesse trabalho, onde o parâmetro MFI foi menor nos animais Nelore, e a expressão do gene *CAST* maior. Entretanto apenas a expressão do gene não justifica a pequena diferença de MFI entre as raças, sugerindo que essa influência possa ser reduzida em animais jovens, que por

possuírem alto *turnover* protéico não necessitam de grandes quantidades das enzimas proteolíticas para produzirem uma carne macia.

Tendo em vista os resultados de expressão gênica, força de cisalhamento e MFI a carne dos animais Nelore foi mais dura do que a dos animais Canchim, porém dentro dos padrões de maciez aceitáveis. Esses animais por serem jovens, foram beneficiados pelo ambiente celular favoráveis, onde há alto turnover protéico, altas concentrações de glicogênio muscular e conseqüentes valores de pH reduzidos, o que tornam a carne mais macia.

A análise da expressão dos genes relacionados à deposição de gordura, não mostrou expressão diferencial entre as raças ($P>0,05$). A igualdade da expressão gênica pode ser dada pelo desenvolvimento semelhante das raças no período de confinamento, que teria promovido a deposição de tecidos corpóreos no mesmo período, nas duas raças. Sendo assim, os animais Canchim, que naturalmente possuem pouca deposição de gordura de marmoreio, influenciada pela composição genética (5/8 Charolês - taurino continental) (NARDON et al., 2001), apresentou expressão esperada dos genes relacionados a deposição de gordura. Contrapondo-se aos animais Nelore, que deveriam apresentar expressão superior, já que apresentaram maiores quantidades de lipídeos totais (gordura de marmoreio). Esses resultados apontam para outros fatores intermediando o processo de transcrição do gene até sua tradução em proteína efetiva, e possivelmente haja outros genes envolvidos no processo de formação da gordura. Os resultados poderiam ser mais elucidativos, se a expressão dos genes de deposição de gordura fosse mensurada em adipócitos, além do tecido muscular, porém essas análises não foram realizadas neste trabalho.

4.4 Correlações entre a qualidade de carne e expressão gênica

Nenhuma das correlações entre as características medidas nos animais e a expressão gênica na raça Nelore foi significativa após aplicação da correção pelo método de bonferroni, que assegura a manutenção da taxa de erro dos testes estatísticos (Tabela 6). A ausência de correlação entre as medidas de maciez e a expressão dos genes da calpaína e calpastatina não era esperada, uma vez que a maior quantidade de calpastatina tem sido associada à menor maciez da carne após o período de maturação (GEESINK et al., 2006). Por outro lado, as calpaínas atuam no sentido de aumentar a maciez, razão pela qual poder-se-ia esperar que os animais com maior expressão das calpaínas apresentassem também carne mais macia, muito embora a ação a calpaína 1 seja significativa somente 150 horas após o estabelecimento do *rigor mortis*. As possíveis explicações para os resultados encontrados neste trabalho passam pelo fato de os animais serem jovens e, portanto apresentarem maior expressão das enzimas envolvidas no processo de turnover protéico, entre elas as calpaínas e a calpastatina. A correlação entre a expressão das calpaínas e calpastatina nesta raça é superior a 0,63 (resultados não apresentados), o que parece indicar que quanto mais calpastatina, mais calpaína também estará disponível no músculo. Desta forma, algum confundimento entre a expressão destes genes “antagônicos” pode estar interferindo nos resultados. Além disto, outros fatores, inerentes ao fato dos animais serem muito jovens, podem estar atuando no sentido de diminuir a variabilidade na maciez da carne. FERRAZ (2009) estudando a expressão do gene da calpastatina em bovinos jovens das raças Nelore e Angus encontrou correlação negativa com a força de cisalhamento.

SCHENKEL et al., 2005, estudando polimorfismos nos genes *DGAT 1*, *LEP* e *TG* em taurinos e zebuínos não encontraram associação com a força de cisalhamento ou o MFI, resultados, que embora não diretamente comparáveis, indicam o mesmo sentido dos encontrados nesse trabalho.

Tabela 6. Correlação entre os parâmetros de qualidade de carne e a expressão gênica nos animais da raça Nelore

	<i>CALP 1</i>	<i>CALP 2</i>	<i>CAST</i>	<i>DGAT1</i>	<i>LEP</i>	<i>TG</i>
FC0	-0,38	-0,35	0,32	0,02	-0,09	0,17
FC 7	-0,29	-0,18	-0,54	0,29	0,07	-0,48
MFI 0	0,42	0,13	0,32	0,39	-0,08	0,25
MFI 7	0,45	0,45	0,26	0,13	0,52	0,17
LT	0,042	-0,19	0,003	0,22	0,04	0,21

CALP1: μ -calpaína; *CALP2*: *m*-calpaína; *CAST*: calpastatina; *DGAT1*: diacilglicerol aciltransferase 1; *LEP*: Leptina; *TG*: tireoglobulina.

Na raça Canchim foi observada uma correlação positiva de MFI0 ($r= 0,79$ $P<0,05$) com a expressão do gene *DGAT1* (Tabela 7) sugerindo uma possível influência da gordura na maciez da carne, entretanto, não foram encontrados outros resultados, (p.e. uma correlação significativa entre a expressão do *DGAT1* e os LT) que pudessem dar suporte a esta teoria. Também não foram encontrados resultados na literatura que permitissem comparação dos resultados.

Tabela 7. Correlação entre os parâmetros de qualidade de carne e a expressão gênica nos animais da raça Canchim

	<i>CALP 1</i>	<i>CALP 2</i>	<i>CAST</i>	<i>DGAT1</i>	<i>LEP</i>	<i>TG</i>
FC0	0,08	0,07	-0,26	-0,35	0,27	0,14
FC 7	-0,19	-0,17	-0,08	-0,19	0,24	-0,04
MFI 0	0,06	0,32	0,34	0,79 ⁺	-0,24	-0,48
MFI 7	-0,19	0,19	0,03	0,31	-0,07	-0,04
LT	0,04	0,01	-0,47	-0,25	0,11	0,27

CALP1: μ -calpaína; *CALP2*: *m*-calpaína; *CAST*: calpastatina; *DGAT1*: diacilglicerol aciltransferase 1; *LEP*: Leptina; *TG*: tireoglobulina. Valores superiores: correlação (r); Valores inferiores: significância (p), ⁺correlação significativa (p<0,05)

5. CONCLUSÕES

A expressão do gene *CAST* não pode ser utilizada como marcador genético na seleção de indivíduos com fenótipo carne macia neste sistema de criação, uma vez que não foram encontrados indícios que permitissem indicar que animais com maior expressão do gene tivessem também carne menos macia dentro das raças, muito embora tenha havido, conforme o esperado, uma maior expressão do gene codificante da enzima calpastatina nos animais Nelore (*Bos indicus*), do que nos animais Canchim (5/8 *Bos taurus* X 3/8 *Bos indicus*). Os animais da raça Nelore apresentaram maior porcentagem de gordura de marmoreio, conforme o esperado, quando comparados aos animais Canchim, entretanto não foi possível encontrar diferenças entre raças com relação à expressão dos genes estudados nem estabelecer uma relação de causa e efeito entre a expressão destes genes e a proporção de lipídeos no músculo.

6. REFERÊNCIAS

- AILHAUD, G.; GRIMALD, P.; NEGREL, R. Annual Review of nutrition, v 12, p. 207-233, 1992.
- ALENCAR, M. M; OLIVEIRA, J. A. L; LIMA, R.; BARBOSA, P. F. Peso ao nascimento à desmama e ao sobreano de animais Nelores e cruzados Canchim x Nelore. Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. Maringá - PR,1994.
- ALVES, D. D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A. B., Maciez da carne bovina. Ciência Animal Brasileira, Vol. 6, p. 135-149, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis, 15th ed, Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, 1990.
- BARBOSA, P. F.; Circular tecnica Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos-SP, 2004.
- BARENDSE, W.J.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E. The leptin C73T missense mutation is not associated with marbling and fatness traits in a large gene mapping experiment In Australian cattle. Animal genetics, v. 36, p. 71-93, 2005.
- BENDALL, J. R. Post mortem changes in muscle. In: The structure and functions of muscle. Academic Press. New York. v. 11, 243p, 1973.
- BERG, R. T.; BUTTERFIELD, R.M. New Concepts of Cattle Growth. Sydney University Press. Sydney - Australia, 1976.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Biochemistry and Physiology, 1959.
- BUSTIN, R.; BENES, V.; JEREMY, A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; MIKAEL, K.; REINHOLD, M.; NOLAN, T.; MICHAEL, W.; GREGORY, L, VANDESOMPELE, J.; CARL, T. The MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, v. 55, p. 611-622, 2009.
- CASAS, E.; WINTE, S. N.; RILEY, D. O.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETR, G. L.; CHASE J.R. Assessment of single nucleotide poiymorphisms in genes residing on chromosomes

- 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 13-19, 2005.
- CANHOS, D. A. L.; DIAS, E.L. *Tecnologia de carne bovina e produtos derivados*, ITAL, Campinas: 440p, 1985.
- CERVIERI, R. C.; ARRIGONI, M. D. B.; OLIVEIRA, H. N. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, Viçosa, 2001.
- CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, v. 227, p. 561-563, 1970.
- DAL PAI SILVA, M; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista brasileira de zootecnia*, v. 36, Viçosa, 2007.
- CROUSE, J. D.; CUNDIFF, L. V., KOCH, R. M., KOOHMARAIE, M., SEIDEMAN, C. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. *Journal of Animal Science*, v. 67. p.2661-2668. 1989.
- DELGADO, E. F.; GEESUNK, G. H.; MARCHELLO, J. A.; GOL, D.E.; KOOHMARAIE, M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callpyge and normal sheep. *Journal of animal science, Nebraska*, v. 79, p. 2097-2107, 2001.
- DIKEMAN, M.E. Carcass composition and quality of finished crossbred Brahman cattle. *Proc. of the King Workshop, Arkansas. Agricultural Experiment Station Journa*, v.167, p.77-88, 1995.
- DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization, IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. *Meat Science*, v. 34, p. 217-234, 1993.
- DRANSFIELD, E. Meat tenderness- The calpain hipotesis. *Proc. 45thInternational Congress of Meat Science and Technology, Yokohama, Japan*, p.220, 1999.
- DEVINE, C. E.; WAHLGREN, M. N.; TORNBERG, E. Effect of rigor temperature on muscle shortening and tenderisation of restrained and unrestrained beef m, longissimus thoracicus et lumborum. *Meat Science*, v. 51, p. 61-72, 1999.

- FERGUSON, D. M.; BRUCE, H. L.; THOMPSON, J. M.; EGAN, A.F.; PERRY, D.; SHORTHOSE, W. R. Factors affecting beef palatability – farmgate to chilled carcass, *Australian Journal of experimental Agriculture*, v. 41, 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 e a carne maciez da carne. Tese de doutorado, apresentada na FCAV, UNESP Jaboticabal, 2009.
- GAN, Q. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Journal of Applied Genetics*, vol. 49, p.251-255, 2008.
- GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *Journal of animal science*, Nebraska, v. 77, p. 2685 – 2692, 1999.
- GEESINK, G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H. AND KOOHMARAIE, M. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.*, 84:2834-2840, 2006.
- GOERING, H. G.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), *Agriculture Research Service (Agriculture Handbook) Washington*, 1970.
- GOLL, et al. Proceedings 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology, San Antonio, Texas 537-544, 1995.
- Higgins et al (1988) *British Journal of Nutrition* 60: 645-652.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, .J. The calpain system, *Muscle Biology Group, University of Arizona*, 2003.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J.: DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GRISART B., FARNIR F., KARIM L., CAMBISANO N., KIM J.-J., KVASZ A., MNI M., SIMON P., FRERE J.-M., COPPIETERS W., GEORGES M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in

- affecting milk yield and composition. *National Academy of Sciences*, v. 101, p. 2398-2403, 2004.
- HADLICH, J.C. Metodologias de análises de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idade. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2004.
- HADLICH, J. C. Características do crescimento animal, do tecido muscular esquelético e da maciez da carne bovinos Nelore e mestiços no modelo biológico superprecoce. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.
- HARVEY, G. R. Regulation of energy balance. *Nature*, v. 222, p. 629, 1969.
- HAVEL, P. J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*. v. 226, p. 963–977, 2001.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, v. 6, p. 986–994, 1996.
- HIROYUKI, S.; KINJI, I.; MASATOMO, M. The leptin-dependent and leptin-independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *Journal of Endocrinology* v. 193, p. 1-9, 2007.
- HOPKINS, D.L.; LITTLEFIELD, P. J.; THOMPSON, J. M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. *Meat Science, Nebraska*. v. 56, p. 19–22, 2000.
- HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. The biology of leptin: A review. *Journal of Animal Science, Nebraska*. v. 76, p. 1405-1420, 1998.
- JIANG, S.T. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. *Proceedings of the National Science Council, ROC Part B: Life Sciences*, v. 22, p. 97-107, 1998.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, v. 36, p. 93-104, 1994.

- KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43, p. 193–201, 1996.
- KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and prediction. Disponível em: <http://meats.marc.usda.gov>. Acesso em: 2002.
- KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; KAUP, P.; EHRARDT, G.; BENNEWITZ, J.; SCHWERIN, M.; FRIES, R. Evidences of multiple alleles at the DGTA 1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, v. 167, p. 1873-1881, 2004.
- IBRAHIM, R. M.; GOLL, D. E.; MARCHELLO, J. A.; DUFF, G. C.; THOMPSON, V. F.; MARES, S. W.; AHMAD, H. A. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. *Journal of Animal Science*, v. 86, p. 1426-1433, 2008.
- LEHNER, R.; KUKSIS, A. Biosynthesis of triacylglycerols. *lipid Research Program*, v. 35, p. 169-201, 1996.
- LIVAK, K.; J. SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LUCHIARI FILHO, A. Perspectivas da bovinocultura de corte no Brasil. Simpósio sobre produção intensiva de gado de corte. CBNA, p. 1-10, 1998.
- LUCHIARI FILHO, A. Pecuária da carne bovina. São Paulo: LinBife, 2000. 134p.
- MAYOREK, N.; GRINSTEIN, I.; BAR-TANA, J. Triacylglycerol synthesis in cultured rat hepatocytes: The rate-limiting role of diacylglycerol acyltransferase, *European Journal of Biochemistry*, v. 182, p. 395-400, 1989.
- MCKEITH, F.K. Chemical and sensory properties of thirthee major beef muscle. *Journal of Food Science*, v.50, p. 869-872, 1985.
- MONSÓN, F.; SAÑUDO, C.; SIERRA, I. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Science*, v. 68, p. 595-602, 2004.
- MOORE, S. S.; LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; KNEELAND, J.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; BENKEL, B. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment

- of positional candidate gene of backfat on bovine chromosome in a commercial line of *Bos Taurus*. *Journal of Animal Science*, v. 81, p. 1919-1925, 2003.
- MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 1471–1476, 1993.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific syntheses of DNA in vitro via a polymerase-cathalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 155, p. 335-350, 1987.
- NARDON, R. F.; RAZOOK, A. G.; SAMPAIO, A. A. M. Efeito da raça e seleção para peso pós-desmama no desempenho de bovinos em confinamento. *Boletim da indústria Animal*, v. 58, p. 21-34, 2001.
- NAUSS, K.; DAVIES, R. E. Changes in phosphate compounds during the development and maintenance of rigor mortis. *Journal of Biology and Chemists*, v. 241, p. 2918-2922, 1966.
- O'CONNERS, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetics effects on beef tendeness in in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* cattle. *Jouenal of Animal Science*, v. 75, p. 1822-1830, 1997.
- OLSSON, D. G.; PARRISH, J. R. F. C.; STROMER, M. H. Myofibrillar fragmentation and shear resistance on three bovine muscles during *postmortem* storage. *Journal of Food Science*, v. 41, p. 1036-1041, 1976.
- OLSSON, U. et al. The influence of low temperature, type of muscle and electrical stimulation on the course of rigor mortis, ageing and tenderness of beef muscles. *Meat Science*, v.37, n.1, p.115-131, 1994.
- OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULINS, 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, p. 44-58, 2006.
- OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factor that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 3138- 3150, 1993.
- OWENS, F. N.; GILL, D. R.; SECRIST, D. S. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 3152-3157, 1995.

- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R. Ciência, higiene e tecnologia da carne, Goiânia, GO: Editora da UFG, p. 586, 2001.
- PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers, *Journal Animal Science*, v. 75, p. 2955–2961, 1997.
- RAWN, J. D. *Biochemistry* Burlington, Neil Patterson Publishers, v. 105 p. 1989.
- RENAND, G. Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science*, v. 59, p. 49- 60, 2001.
- RINKER, C. B., PYATT, N. A., BERGER, L. L. Relationship among GeneStar Marbling marker, instrumental fat deposition and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 686-693, 2006.
- ROÇA, R.O, Modificações pós-morte da carne. Disponível em: <[http://www, fca.unesp.br](http://www.fca.unesp.br)> Acesso em: 12 dezembro de 2001.
- RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMINGONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 9, 1998,
- SAS - Statistical Analysis System Institute. *The SAS System*, Cary (NC), 2004.
- SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; JIANG, Z.; MANDELL, I. B. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatina gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, v.84, p. 291-299, 2006.
- SGARBIERI, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos*. São Paulo, SP: Varela, 1996. p. 517.
- 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, p. 171-177, 1991.
- SHERBECK, J. A.; TATUM, J. D.; FIELD, T. G. Feedlot performance, carcass traits, and palatability traits of Hereford x Brahman steers. *Journal of Animal Science*, v, 73, p, 1534-1537, 1995.

- SILVEIRA, A. C.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. D. B. Produção do novilho superprecoce, *In*: 5º Simpósio sobre bovinocultura de corte, Piracicaba, Anais Piracicaba: FEALQ, p. 227-241, 2004.
- STOLOWSKI, G. D.; BAIRD, B. E.; MILLER, R. K.; SAVELL, J. W.; SAMS, A.R.; TAYLOR, J. F.; SANDERS, J. O.; SMITH, B. Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. *Meat science*, v. 73, p. 475-483, 2006.
- TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T.; SASAKI, Y. Research Communication: Genomic Structure and Promoter Analysis of the Bovine Leptin Gene. *Life*, v. 53, p. 131–135, 2002.
- TANTIA, M. S.; VIJH, R. K.; MISHRA, B.; BHARANI, KUMAR, S. T.; SHODI, M. *DGAT1* and *ABCG2* polymorphism in a indian cattle (*Bos indicus*) and Buffalo (*Buballus bubalis*) breeds. *Bio-med Central Veterinary Research*, v. 2, p. 32, 2006.
- 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* 73: 1351-1367, 1995.
- TAYLOR, R.G. Meat tenderness: theory and practice. *Brazilian Journal of Food Technology.*, Brasil, v. 6, p.56-66, 2003.
- THALLER, G.; KUHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G.; BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZUHLKE, H.; FRIES, R. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, v. 34, p. 354-357, 2003.
- USDA: United States Department Agriculture. Washington: Official United States Standards for Grades of Carcass Beef, 1989.
- USER BULLETIN #2. Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., ROY, N. V., 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. 18, 2002.

- VAN EENENNAM, A. L.; LI, J. THALLAMAM, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, N. E.; GILL, C. A.; FRANKE, D. E.; THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 891-900, 2007.
- VIANNA, A, T.; JONDET, R. La raza Canchim del Brasil. *Revista Mundial de Zootecnia*, v. 26, p. 34-40, 1978.
- VITTORI, A.; QUEIROZ, A. C.; RESENDE, F. D.; GESUALDI JÚNIOR, A.; GESUALDI, A. C. L. S. Características de carcaça de bovinos de diferentes grupos genéticos, castrados e não-castrados, em fase de terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 2085-2092, 2006
- WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. A modified procedure for simultaneous extraction and subsequent assay of calcium-dependent and lysosomal protease systems from a skeletal muscle biopsy. *Journal Animal Science*, v. 69, p. 1559-1565, 1991.
- 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, 1995.
- WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; CROUSE, J. D. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and Longissimus palatability *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 1023-1035, 1996.
- 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, p.196-207, 2005.
- 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, p. 2716–2728, 1990.

WHIPPLE, G. M.; KOOHMARAIE, M. E.; DIKEMAN; CROUSE, J. D. Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits, *Journal of animal science*, v. 68, p. 4193– 4199, 1990.

ZADRA, A. Cruzamento industrial: processo chave para obtenção de novilhos precoces. *Boletim técnico Lagoa da Serra*, 2005.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v. 372, p. 425-432, 1994.