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

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DAS RAÇAS NELORE E ABERDEEN ANGUS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E A MACIEZ DA CARNE.

André Luiz Julien Ferraz
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2009

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

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DAS RAÇAS NELORE E ABERDEEN ANGUS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E A MACIEZ DA CARNE.

André Luiz Julien Ferraz

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan

Co-orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

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

Jaboticabal – SP

Julho de 2009

Ferraz, André Luiz Julien
F381a Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e a maciez da carne. / André Luiz Julien Ferraz. – – Jaboticabal, 2009
xv, 96 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Luiz Roberto Furlan
Banca examinadora: Leandro Marcio Moreira, Marcelo Luiz de Laia, Janete Apparecida Desidério Sena, Jesus Aparecido Ferro
Bibliografia

1. Expressão gênica. 2. Bovinos. 3. Tecido muscular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DAS RAÇAS NELORE E ABERDEEN ANGUS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E A MACIEZ DA CARNE.

AUTOR: **ANDRÉ LUIZ JULIEN FERRAZ**

ORIENTADOR: **Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN**

Co-Orientador(a): Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

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

Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN

Dr. LEANDRO MARCIO MOREIRA

Dr. MARCELO LUIZ DE LAIA

Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO SENA

Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Data da realização: 24 de julho de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

André Luiz Julien Ferraz – Natural de Araraquara-SP nascido aos 24 dias de Julho de 1975, formado no ensino médio no ano de 1993 na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau Francisco Pedro Monteiro da Silva localizado no município de Araraquara. Graduado em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP - Campus de Jaboticabal, tendo como data da primeira matricula o dia 14 de fevereiro de 1997 e colação de grau aos 21 dias de julho de 2001. Neste período exerceu dentre outros cargos o de representante discente do curso de zootecnia nos anos de 1999 e 2000; o de coordenador de zootecnia do diretório acadêmico da mesma unidade gestão 2000/2001; foi membro fundador do cursinho popular Ativo-UNESP no ano de 1999, no qual exerceu a função de coordenador e professor no período de 1999 a 2003. Defendeu o trabalho de graduação intitulado “Identificação de polimorfismos no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte” no ano de 2001 sob orientação do Prof. Dr Luiz Roberto Furlan. Ingressou no mestrado no ano de 2002 e defendeu a dissertação sob orientação do mesmo aos 19 de novembro de 2003 intitulada “Interações entre polimorfismos no gene do hormônio do crescimento, níveis plasmáticos de IGF1 e características de carcaça em bovinos de corte”. Nos anos de 2004 e 2005 foi contratado como professor bolsista doutorando pela FMVZ-UNESP Campus de Botucatu para ministrar a disciplina de nutrição animal. Iniciou o curso de doutorado em Jaboticabal no ano de 2005 sob orientação do Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan, em 2007 saiu para doutorado “sandwich” no exterior pela Universidade autônoma de Barcelona sob a orientação do Prof. Dr. Miguel Perez Enciso, defendeu a tese aos 24 de julho de 2009.

“Caminante, son tus huellas el camino y nada más;
Caminante, no hay camino, se hace camino al andar."
(A. Machado, 1973)

“Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei demais,
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou
Nada sei, conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs.
É preciso amor pra puder pulsar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida, seja simplesmente
Compreender a marcha, ir tocando em frente,
Como um velho boiadeiro, levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou,
Estrada eu sou, conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maças,
É preciso amor pra puder pussar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora,
Cada um de nos compõe a sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz,
conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maças,
É preciso amor pra puder pussar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir

Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei de mais,
Cada um de nos compõe a sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz”

Almir Sater e Renato Teixeira

Aos meus Pais:

JAIR FERRAZ COSTA e **MATILDE JULIEN FERRAZ**

Minha eterna gratidão pelo amor e carinho dispensado em todos os momentos por compreenderem a minha ausência na maior parte do tempo, por não medirem esforços para me dar tudo o que precisei e pelos exemplos de dignidade, sabedoria e humilde.

Por tudo isso e por muito mais aqui não citado com amor *DEDICO.*.....

As minhas irmãs:

Daniela Julien Ferraz e **Gabriela Julien Ferraz**, pelo amor, ajuda, amizade, incentivo, carinho e confiança que demonstram sempre.

.

Aos meus sobrinho

Danilo, **Leonardo e Ana Carolina,** que mesmo estando longe também os amo e são fonte de inspiração para mim.

OFEREÇO.....

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr.
Luiz Roberto Furlan (Cedral)

Sem o qual não seria possível concluir mais esta etapa, como sempre, foi além de orientador um verdadeiro amigo e conselheiro pelos conselhos, apoio moral, dedicação e amizade, seus exemplos de vida como professor, pesquisador e pessoa sempre serão lembrados, fica aqui registrado minha eterna gratidão, meu respeito e admiração.

Agradecimentos

A DEUS, por permitir que aqui chegasse me guiando pelo caminho correto, sendo ele fácil ou difícil.

A Profa. Drª Janete Desidério Sena, pelas correções e sugestões fornecidas para este trabalho, bem como pelos anos de amizade carinho e ensinamentos a mim dedicados, ao Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira, pelas correções e sugestões fornecidas para este trabalho, ao Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia pela ajuda amizade e sugestões fornecidas para o trabalho e ao Prof. Jesus Aparecido Ferro pelas correções sugeridas e pela confiança em mim depositada.

A Profª Maria Inês T. Ferro por confiar e abrir as portas do laboratório para mim permitindo e contribuindo assim para minha formação e para o desenvolvimento da tese.

A todas as pessoas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular que aqui se encontram ou que já passaram (Poliana, Ana Karina, Tita, Toninho, Renata Lataro, Carminha, Miretti, Dionello, Mariza, Roberta, Raquel, Sônia, Angela, Ana Luiza, Daniele, Nely, Julinho, Julio Cezar, Agda, Karina Dabbas, Daniela Lemos, Tatiana Leite, Tati, Vanessa Morgan, Debora Garrido, Vanessa Parpinelli, Ana Cristina, Taiza, Fabiana Rodrigues, José Franscico (Frank), Renata Hernandes, Roseli Izildinha, Elaine, Rafael Marini, Flávia, Flavinha, Rafael Heck, Gustavo Costa, Juliana de Antonio, Juliana Desajacomo, Haroldo, Juliana Vantini, Joice, Lilian, Camila, Rafael Homem, Thiago Greggio, João (Crone), Cristian Greggio, Priscila, Diego, Paula Fernandes, Erika, Tiago Jacob, João Susuki, Renata Tezza, Arthur, Cristiano, Gisele.

A todos os professores que fizeram parte do meu processo de aprendizado e que colaboraram com a minha formação acadêmica.

Aos funcionários desta Faculdade e do Departamento de Tecnologia pelo apóio e dedicação destinados a nossa formação.

Ao Prof. Dr. Miguel Perez Enciso por me acolher na Faculdade Autonoma de Barcelona, pela orientação, amizade e apoio em minha passagem por Barcelona.

Aos amigos que ajudaram de forma direta na condução do trabalho Leonardo Bernardes da Rocha e Thais Rodrigues de Oliveira.

Aos meus irmãos de república (Pau da Goiaba) que muito me ajudaram e sempre me incentivaram a seguir em frente, com vocês muito aprendi e sempre serei grato, levando-os na lembrança por toda a minha vida. Edsinho, Fabinho, Thiago (Mula), Edsão, Roberto (Japonês), Thiago (Fiofó), Aritana (VU-DÚ), Haroldo (Mecônio) Carlos (Muralha), Carlos (Carlinho), Terceiro, Raxixe, Bigode, Rodrigo (Traveco), Pablo (J-lhão), Caio (yosh), Rodolpho (Atchim), Wagner (Burro), Fabricio (B-Gay), Eduardo (Duendi), Jorge (Showpeta), João Paulo (Pogobol), Rafael (Teta), Michel, Victor (Tampax), Ivan, Leonardo (Patchola), Guilherme (Muzambinho), Bruno (51), meu muito obrigado.

Aos meus amigos BELES, Fernando, Batata, Junior, Fernanda, Bila, Carla por estarem sempre comigo mesmo estando longe.

A todos os meus amigos de Faculdade e da XL TURMA de Zootecnia que sempre me apoiaram e me ajudaram muito.

Aos meus anjos da guarda em Barcelona, Lana Teixeira Fernandes, Monica Ledur e Anna Tomas pelos bons momentos vividos aos amigos de casa Rafael, Jose (Boliviano), Walquiria, Felipi e Mauro (Japones).

Aos amigos de Barcelona Marta, Jordi, David, Cecília, Ali, Ana Ojeda, Nicolas, Ana Castello, Ana Mercader, Maria Salinas, Elisenda, Ainhoa, Natalia, Maribel, Oscar, Ana Codina, Maria Del MAr e aos professores Josep Maria Folch, Jesus Piedrafita, Marcel Amilis, Armand Sanchez e Manel Lopez Bejar.

A Izildinha do Xerox pelas longas conversas e por toda ajuda, e para sua Irmã gêmea Cidinha pelos muitos puxões de orelhas me dado, a Quitéria (Quiqui) pelas brigas e carinhos.

Aos amigos que fiz em Jaboticabal ao longo desses anos Tia Teça, Tia Rô, Nuria, Paloma, Nina, Veridiana, Marquinho, Romulo, KLB, Fernando (Presuntinho), Caio (Gatuno), Guilherme (Brasilia), João, Fernanda Guigue, Renata Forcinetti, Vanessa, Ana, Valéria.

Aos meus amigos de Botucatu que me recebem de braços abertos, Vanessa, Thalita, Gaúcho, Miriane, Rafael e Pati, Biluca, Maurício, Tati, Mirina.

A todos que de uma maneira ou de outra, deram sua parcela de contribuição para a minha formação e realização deste trabalho.

A todos vocês meus amigos meu muito obrigado!!!!

Sumário

Lista de abreviaturas xiii

RESUMO - xiv

SUMMARY xv

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS 1

1. Introdução 1
2. Revisão de Literatura 3
   2.1 Desenvolvimento muscular em bovinos 3
   2.2 Qualidade e maciez da carne 5
   2.3 Estudo da expressão gênica diferencial 7
Referências 11

CAPÍTULO 2 – Estudo da associação entre a expressão de genes pertencentes ao complexo calpaína/calpastatina e ao eixo somatotrófico com as características de maciez da carne, desempenho e qualidade da carcaça em bovinos das raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*). 16

RESUMO – 16
Introdução 17
Materiais e métodos 18
Resultados e discussões 22
Conclusões 34
Referências 35

CAPÍTULO 3 – Efeitos da raça e da idade ao abate sobre o perfil transcricional do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos das raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*). 40

RESUMO - 40
Introdução 41
Materiais e Métodos 43
Resultados 47

Discussão 59
Conclusões 73
Referências 74
CAPÍTULO 4 82

Apéndices 82

1) Tabela suplementar 1 82
2) TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO SANDWICH 85
3) MATERIAL E MÉTODOS DETALHADO 85
Animais 85
Coleta e armazenamento das amostras de músculo 86
Extração de RNA total das amostras de músculo 86
Quantificação e verificação da qualidade dos RNAs extraídos 88
Síntese e marcação do cDNA para as Hibridações 88
Hibridação das lâminas de microarranjos de oligonucleotídeos com cDNAs marcados com fluoróforos 90
Normalização e análise estatística dos dados de microarranjos 92
Síntese de cDNA para técnica de PCR quantitativo em tempo real 93
Reação de PCR quantitativo em tempo real 94
Análises de maciez da carne 95

Lista de abreviaturas

AOL – Área do músculo *Longissimus dorsi*
CAPN1 – Calpaína 1 (μ-calpaína)
CAPN2 – Calpaína 2 (m-calpaína)
CAST – Calpastatina
cDNA – DNA complementar
CT – Ciclo de "threshold"
DE – Diferencialmente expresso
EGS – Espessura de gordura subcutânea
FC – Força de cisalhamento
FDR – Taxa de falsos positivos
GAPDH – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GD – Ganho de peso diário
GH – Hormônio do crescimento
GHR – Receptor do hormônio do crescimento
GO – Gene ontology
IFM – Índice de fragmentação miofibrilar
IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF1R – Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
LD – *Longissimus dorsi*
PA – Peso de abate
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real
QTL – Locus de característica quantitativa
USDA – Departamento de agricultura dos Estados Unidos
WMSF – "Warner Blaster Shear Force" (Aparelho que mede a força de cisalhamento)

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DAS RAÇAS NELORE E ABERDEEN ANGUS E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E A MACIEZ DA CARNE.

RESUMO - A divergência genética entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* é estimada em ~ 250.000 anos mas, apesar dessa proximidade filogenética, estes dois grupos de bovinos apresentam diferenças marcantes em relação à taxa de crescimento muscular e a maciez da carne. De maneira que este estudo foi delineado para avaliar perfil da expressão gênica diferencial no musculo *Longissimus dorsi* das raças Nelore e Aberdeen Angus com o objetivo de identificar conjuntos de genes cuja expressão está associada à manifestação das características acima mencionadas. Vinte bezerros machos de cada raça foram criados e terminados em regime de confinamento, metade dos quais foi abatida aos 15 e a metade restante aos 19 meses de idade. Nossos resultados sugerem fortemente que a ação autócrina e/ou parácrina do IGF-1 produzido no tecido muscular deve exercer um papel crucial na modulação da taxa de crescimento muscular e na maciez da carne de bovinos. Por outro lado, nossa análise das redes de interação gênica mostrou um grande número de genes que codificam proteínas que agem na proteólise muscular, pequeno número de inibidores e reguladores de proteases, assim como diversos genes relacionados com a morte celular programada nos animais que apresentaram maior maciez da carne, reforçando a hipótese do envolvimento de um complexo multi-enzimático (incluindo as calpaínas e outras proteases) no processo de amaciamento da carne, o qual seria semelhante ao processo de apoptose.

Palavras-Chave: bovinos, transcrissoma, desenvolvimento muscular, maciez da carne, PCR em tempo real, microarranjos.

TITLE – GENE EXPRESSION ANALYSIS IN THE SKELETAL MUSCLE OF NELLORE AND ABERDEEN ANGUS BREEDS AND ITS RELATIONSHIP WITH MUSCLE GROWTH AND MEAT TENDERNESS.

SUMMARY - The genetic divergence between *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* is estimated to be ~ 250.000 years but, in despite of their phylogenetic proximity, this two bovine groups show remarkable differences in regard to the muscle growth rate and meat tenderness. Thus, this study was aimed to evaluate the differential gene expression profile in *Longissimus dorsi* muscle of Nellore and Aberdeen Angus breeds in order to identify set of genes whose expression is associated with the manifestation of the above-mentioned traits. Twenty male calves of each breed were grown and finished in the feedlot system, half of which was slaughtered at 15 and the remaining half at 19 months of age. Our results strongly suggest that the autocrine and/or paracrine action of the IGF-1 produced in the muscle might play a crucial role in the modulation of muscle growth rate and meat tenderness in beef cattle. On the other hand, our gene interaction network analysis revealed a large number of genes encoding proteins acting in the skeletal muscle proteolysis, a small number of inhibitors and regulators of proteases, as well as several genes related to the programmed cell death in animals that had greater tenderness of meat, reinforcing the hypothesis of the involvement of a multi-enzymatic complex (including calpains and other proteases) in the meat tenderization process, which resembles the apoptosis process.

Keywords: bovines, transcriptome, muscle development, tenderness, real-time PCR, microarrays.

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O rebanho de corte brasileiro é composto majoritariamente (aproximadamente 80%) por animais da subespécie *Bos taurus indicus* (zebuínos) de origem indiana e por produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus taurus* (taurinos) de origem européia. Apesar da proximidade filogenética, estas duas subespécies apresentam características fenotípicas bastante distintas com reflexos marcantes na eficiência produtiva, reprodutiva e na qualidade da carne produzida (ANUALPEC 2003).

De maneira geral os zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como algumas doenças infecto-contagiosas. Os taurinos, por sua vez, são menos adaptados ao clima tropical e apresentam maior suscetibilidade às doenças e infestações parasitárias, porém, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos. Duas características contrastantes que têm sido bem documentadas na literatura científica são a velocidade de crescimento e a maciez da carne produzida por essas subespécies bovinas (Rubensam et al. 1998 ; Silveira, 2003).

Segundo Burrow e colaboradores (2001) nenhuma das raças bovinas, taurinas ou zebuínas, possui todos os atributos necessários para produzir carne eficientemente em todos os ambientes e atingir a todos os requerimentos do mercado, uma vez que existe uma grande variabilidade nas características produtivas e adaptativas entre esses subgrupos de bovinos.

Diferenças na velocidade de crescimento e na maciez da carne das diferentes raças vêm sendo avaliadas há algum tempo e já foram revisadas por Marshall (1994) e Franke (1997). Frisch e colaboradores (1997) e MRC (1997) já demonstraram que animais taurinos apresentam uma maior taxa de crescimento e

melhor qualidade de carne do que animais zebuínos. Posteriormente, Cundiff e Gregory (1999) estudaram animais de raças puras e verificaram que raças taurinas (Angus, Hereford, Piemontese, Belgian Blue) com peso de abate próximos a 580 Kg apresentavam valores de Força de Cisalhamento (FC) de 5,13 Kg, enquanto que os animais de raças zebuínas (Brahman, Boran) apresentaram valores bem superiores (7,30 Kg e 6,58 Kg, respectivamente). Contudo, Brondani e colaboradores (2006), trabalhando com animais mais jovens e, portanto, mais leves, verificaram valores de FC inferiores (3,0 Kg) para animais da raça Angus e Hereford, resultados que sugerem fortemente a existência de uma interação entre idade e a FC.

De acordo com Brown e Feder (2005) a variação na expressão gênica entre membros da mesma espécie é a matéria prima da evolução. Neste sentido, diversos trabalhos consideraram que a principal fonte de variação genética entre indivíduos pode ser atribuída às diferenças de expressão gênica, motivadas por alterações em regiões regulatórias, e não às diferenças localizadas nas regiões codificantes (Kohn et al. 2004; Wittkopp et al. 2004; Stamatoyannopoulos, 2004).

Segundo Tautz (2000) a taxa de divergência em genomas de vertebrados que evoluem de forma independente é de apenas 0,1 – 0,5% por milhão de anos. No caso das duas subespécies bovinas a similaridade genética deve ser ainda maior, tendo em vista que estudos com o DNA mitocondrial estimaram que a divergência genética entre zebuínos e taurinos é aproximadamente de apenas 250 mil anos (Bradley et al. 1996; Miretti et al. 2002,) fato que permite inferir que estes dois genomas devam ser altamente semelhantes. Assim sendo, estas duas subespécies bovinas constituem-se num modelo biológico ideal para o desenvolvimento de estudos comparativos de genômica funcional, visando à identificação de genes diferencialmente expressos relacionados com a velocidade de crescimento e qualidade da carne.

Assim, considerando estes fatos, este presente estudo teve por objetivo comparar o transcrissoma de animais das raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*) em diferentes idades, visando caracterizar os

padrões de expressão gênica dessas duas subespécies e identificar conjuntos de genes envolvidos na determinação da velocidade de crescimento e da qualidade de carne, mediante uso das técnicas de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e microarranjos.

A expectativa é que os resultados deste estudo venham contribuir de forma significativa para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos, bioquímicos e fisiológicos envolvidos no desenvolvimento muscular e na determinação da maciez da carne, permitindo o desenvolvimento de tecnologias auxiliares que possam ser utilizadas nos programas de melhoramento genético (seleção assistida por marcadores moleculares, introgressão gênica ou mesmo a produção de animais geneticamente modificados) e no desenvolvimento de produtos biotecnológicos (marcadores moleculares, drogas controladoras de expressão gênica, etc.) que poderão ser de grande valia para o incremento da produtividade da pecuária de corte nacional.

2. Revisão de Literatura

2.1 Desenvolvimento muscular em bovinos

Os bovinos pertencem ao Gênero Bos, Família Bovidae, Ordem Artiodactyla e são encontrados em praticamente todos os países do mundo. São divididos em dois grandes grupos, zebuínos (com cupim, como animais da raça Nelore) e taurinos (sem cupim, como animais da raça Angus), mas que, devido à sua completa inter-fertilidade, são mais freqüentemente considerados subespécies, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, respectivamente (Loftus et al. 1994).

De maneira geral os zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como a algumas doenças infecto-contagiosas. Os taurinos, por sua vez, são menos adaptados ao clima tropical e apresentam maior suscetibilidade às doenças e infestações parasitárias,

porém, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos.

Sabe-se que a eficiência alimentar, a síntese e degradação de proteínas, as taxas de crescimento dos tecidos (Ferrel e Jenkins, 1998) e a deposição de gordura na carcaça de bovinos (Owens et al. 1993) dependem em grande parte do genótipo animal.

Quando alimentados com volumosos de alta qualidade (Moran, 1976) ou dietas mistas com volumoso e concentrado (Ledger et al. 1970; O'Donovan et al. 1978) os taurinos consomem mais em relação aos seus requerimentos de manutenção, ganham peso mais rápido e são mais eficientes do que os zebuínos. Beaver et al. (1989) relataram que novilhos da raça Angus consumiram mais alimento e ganharam peso mais rápido do que novilhos da raça Brangus.

Ferrel e Jenkins (1998) encontraram diferenças de ganhos de peso entre animais da raça Angus (taurinos) e Bramahn (zebuínos) e Sañudo e colaboradores (2004) trabalhando com animais de raças de crescimento rápido e animais de raças consideradas rústicas também encontraram um maior peso de abate para os animais do primeiro grupo.

De fato diferenças fenotípicas entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* podem ser encontradas na literatura, e já foram revisadas por Marshall (1994) e Franke (1997). Neste mesmo sentido, Frisch e colaboradores (1997) e MRC (1997) demonstraram que animais taurinos apresentam uma maior taxa de crescimento quando comparados com animais zebuínos.

O músculo é um tecido altamente plástico e capaz de se adaptar a mudanças da demanda funcional (Velloso et al. 2008). Dessa maneira a hipertrofia e atrofia muscular são mecanicamente ligadas e é a atividade e inatividade de um conjunto comum de moléculas que controlam as poucas vias metabólicas que determinam se o tecido muscular responderá a estímulos com o aumento da síntese protéica e crescimento celular (hipertrofia) ou com o aumento da degradação protéica e redução da proliferação celular (atrofia) (Sartorelli e Fulco, 2004). Neste sentido o crescimento muscular é determinado pelo balanço entre a

síntese e a degradação protéica (Sandri, 2007) processo conhecido como taxa de renovação protéica.

Desta forma, parece bastante claro que, tanto os genótipos do animal, quanto as características nutricionais da dieta, desempenham um importante papel na utilização dos nutrientes e, conseqüentemente, no crescimento do animal. Contudo, o desconhecimento de todos os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo dificulta a manipulação dessas características, seja através de ajuda no melhoramento genético animal, ou pelo uso da biotecnologia.

2.2 Qualidade e maciez da carne.

De forma geral, os fatores que afetam a maciez da carne podem ser divididos em dois grandes grupos: os fatores *ante-mortem*, tais como genótipo (raça), idade, sexo, nutrição, exercício, estresse antes do abate, presença de tecido conjuntivo, espessura e comprimento do sarcômero, uso de promotores de crescimento, e outros; e os fatores *post-mortem* como estimulação elétrica, *rigor-mortis*, esfriamento da carcaça, maturação, método e temperatura de cozimento, pH final e aplicação de substâncias químicas (Sirol, 2007).

A maciez da carne pode ser avaliada de duas maneiras distintas: 1) subjetivamente realizada por degustadores treinados que pontuam a carne pela maciez experimentada. 2) objetivamente através da medida de força de cisalhamento (FC) a qual indica que quanto maior a força necessária para cortar a carne, maior será a dureza da mesma, ou pelo índice de fragmentação das miofibrilas (IFM), que indica que quanto maior o índice, maior foi a fragmentação das miofibrilas musculares e, portanto, mais macia é a carne. Cabe ressaltar que todos estes métodos de analise são altamente correlacionados.

Segundo Rubensam e colaboradores (1998), as proteases neutras ativadas pelo íon cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *post-mortem*, que conduz a um aumento progressivo da maciez da carne. Entretanto, apesar do importante papel das calpaínas na maturação, é o

efeito inibidor de proteólise da calpastatina, igualmente ativada pelo íon cálcio livre no sarcoplasma, determinado 24 horas *post-mortem*, que apresenta maior correlação com a maciez da carne conservada sob refrigeração.

O sistema calpaína–calpastatina é considerado um dos principais responsáveis pela maciez da carne. Este sistema Ca^{2+} dependente é composto pelas proteases μ-calpaína (CAPN1) e m-calpaína (CAPN2) que diferem pela quantidade de Ca^{2+} necessária para a sua ativação e um inibidor de ambas, a Calpastatina – CAST.

As calpaínas não tem ação sobre a actina e miosina muscular (Penny, 1974). De acordo com Hughes e colaboradores (2001), a ação dessas enzimas ocorre em proteínas musculares que apresentam sítios de ligação e clivagem específicos. Dentre as proteínas identificadas como substrato para as calpaínas encontram-se a tropomiosina, a desmina, a titina, a nebulina, a filamina, e a troponina T.

A importância da calpaína durante o processo de amaciamento da carne foi verificado em alguns estudos (Koohmaraie, 1992, 1994 e 1996; Geesink e Koohmaraie, 1999) bem como a inibição da calpastatina no sistema (Whipple et al. 1990; Morgan et al. 1993; Koohmaraie, 1994; Geesink e Koohmaraie, 1999; Soria e Corva et al. 2004; Geesink et al. 2006).

A literatura tem demonstrado que a textura da carne de *Bos taurus indicus* (zebuíno, origem indiana) é relativamente pior quando comparada à de *Bos taurus taurus* (taurina, origem européia) (Norman, 1982; Shackelford et al. 1991; Crouse et al. 1993; Shackelford et al. 1994). De fato, Koohmaraie (2003), descreve que 46% das variações na maciez da carne se devem a genética animal e 54% a variações ambientais quando se compara raças distintas.

No Brasil, a menor maciez da carne bovina é devida à grande proporção de genes *Bos taurus indicus* nos animais cruzados que forma o rebanho nacional. Tais cruzamentos e a utilização de genética inferior para produção de carne de qualidade tornam-se as principais causas da menor aceitabilidade desse produto no mercado externo (Hadlich, 2004).

Neste sentido, existe uma relação positiva entre a maior porcentagem de genes de *Bos taurus indicus* no animal e menor maciez da carne maturada (Cundiff et al. 1993; Wheeler et al. 1994). Estes autores mostraram que animais com menos de 25% de genes de *Bos taurus indicus* são similares aos animais *Bos taurus taurus* no que diz respeito a maciez da carne. Entretanto, a diferença de maciez dentro de raças (incluindo *Bos taurus indicus*) é tão grande quanto aquela entre raças.

De fato, em trabalho publicado por Rubensam e colaboradores (1998), o aumento da proporções de genes de *Bos taurus indicus* mostrou considerável diminuição da maciez da carne, resultados estes que já haviam sido observados por Crouse e colaboradores (1993), Shackelford e colaboradores (1994) e por Sherbeck e colaboradores (1995).

O aperfeiçoamento no controle da qualidade da carne é de grande importância para produtores, indústria e rede varejista, pois somente desta maneira serão correspondidas às expectativas dos consumidores em relação ao produto (Hadlich, 2004).

2.3 Estudo da expressão gênica diferencial

2.3.1 Técnica de Microarranjos

Com o grande avanço que a ciência vem obtendo por meio do progresso do estudo do Projeto Genoma Humano e de outras espécies, abriu-se uma nova possibilidade para estudar a expressão gênica em larga escala (transcrissoma). Dentre as metodologias utilizadas nos estudos de transcrissoma a mais abrangente é a técnica de microarranjos, que tem como objetivo determinar quais são os genes diferentemente expressos entre duas ou mais classes, espécimes ou condições biológicas distintas.

Esta abordagem tem sido largamente empregada na determinação de genes ou conjunto de genes diferencialmente expressos em amostras procedentes de uma mesma condição experimental e/ou condições contrastantes (Robinson et al. 2000), bem como na monitoração dos genomas de uma forma abrangente, permitindo deste modo a melhor compreensão das possíveis interações que ocorrem entre milhares de genes simultaneamente (Shi, 2000).

Devido à complexidade dos fatores envolvidos nas respostas aos estados patológicos e na determinação das características produtivas nos animais domésticos, a utilização da tecnologia de microarranjos tem despertado um grande interesse por parte dos setores ligados à produção animal. Entretanto, a disponibilidade de arranjos de DNA para os estudos de expressão gênica em animais domésticos ainda é muito restrita, inclusive no caso da espécie bovina (Suchita et al. 2003). Dentre as plataformas que temos disponíveis comercialmente estão: MEM array, NBFGC Microarray, Bovi Analyzer, Beef CRC muscle and fat array e lâminas de oligosnucleotídeos (OpArray-Operon, Gene Chip-Afymetrix, Agylent (Furlan et al. 2007).

Embora o volume de publicações sobre o assunto ainda não seja expressivo para bovinos, como é para outros organismos (humanos, camundondos, organismos procariontes, etc.), já existem diversos estudos de transcrissomas na área de saúde animal, fisiologia ou patologia em bovinos (Hocquette et al. 2007). A tecnologia de microarranjos também já esta sendo utilizada nos estudos de nutrição dos ruminantes, desenvolvimento muscular embrionário e acúmulo de gordura intramuscular (Sudre et al. 2003; Wang et al. 2008; Wang et al. 2005; Lehnert et al. 2007; Loor et al. 2007; Birne et al. 2005; Reverte et al. 2003).

Contudo, estudos que abordam as variações do transcrissoma de animais que apresentam taxa de crescimento muscular contrastante (Sudre et al. 2005), assim como no de animais cuja análise sensorial evidenciou diferenças significativas na qualidade da carne (Bernard et al. 2007), começam a se tornar mais freqüentes na literatura.

2.3.2 PCR quantitativo em tempo real

Uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos.

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, determinando valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de “Cycle Threshold” (CT).

A reação é medida através da emissão dos compostos fluorescentes que geram sinais que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado formando, um gráfico de amplificação.

Dois diferentes métodos de análise são utilizados para análises de PCR em tempo real: quantificação absoluta e quantificação relativa. A primeira determina o numero de cópias do transcrito de interesse baseado numa curva padrão, enquanto que o segundo descreve a diferença de expressão entre dois grupos, no qual, geralmente se usa um grupo controle ou referência (Livak e Schimittgen, 2001).

No caso de quantificação relativa, a escolha correta dos genes de referência para normalizar a expressão do gene alvo em PCR em tempo real é essencial para refletir verdadeiramente o processo biológico (Robinson, et al. 2006). Estes autores avaliaram 4 genes candidatos a genes normalizadores em bovinos (18S rRNA, gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), RPLP0 e β-

actina) e verificaram que o GAPDH e β-actina se comportaram melhor como genes constitutivos. Em outro trabalho de validação de genes de referencia especificamente em músculos Perez e colaboradores (2008) testaram 10 genes (18S, GAPDH, ACTB, B2M, RPII, UBC, CASC3, HMBS, SF3A1, EEF1A2) no qual verificaram que os três últimos se apresentaram mais consistentes para uso como genes normalizadores.

A PCR quantitativa em tempo real é uma dos mais sensíveis e confiáveis métodos para análise de expressão gênica e tem sido largamente utilizado como validação de experimentos de microarranjos, quantificação de patógenos, quantificação de expressão de genes cancerigenos, determinação do numero de copias transgênicas e estudos de terapia com drogas (Yuan et al. 2006).

A PCR quantitativa em tempo real é usada em experimentos de validação de microarranjos uma vez que, apesar de possuir uma grande capacidade de análises com muitos genes, a qualidade dos dados de expressão gênica nesse tipo de método pode variar muito dependendo da plataforma e do procedimento utilizado. Sendo assim, a qRT-PCR é comumente utilizado como ferramenta de validação para confirmar os resultados de expressão obtidos pela técnica de microarranjos (Morey et al. 2006).

Estes mesmos autores, ressaltam que apesar de serem largamente utilizados, tanto os microarranjos como a qRT-PCR freqüentemente apresentam resultados discordantes, e que isto é possivelmente devido à falhas inerentes de cada um dos métodos. Neste mesmo trabalho, os autores demonstram que existe uma correlação de aproximadamente 70% entre estes dois métodos, podendo variar para mais ou para menos em função do “Fold Change”, p-valor, e de genes estimulados ou deprimidos.

Referências

ANUALPEC (2003): Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP, 2003. 400p.

BEAVER, E.E.; WILLIAMS, J.E.; MILLER, S.J. et al. Influence of breed and diet on growth, nutrient digestibility, body composition and plasma hormones of Brangus and Angus steers. J. Anim. Sci., v.67, p.2415-2425, 1989.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; CUNFF, M. L.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **J. Agric. Food Chem.** 55, 5229-5237.

BRADLEY, D.G., MacHUGH, D.E., CUNNINGHAN, P., LOFTUS, R.T. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 93:5131-35.

BROWN, R.T.; FEDER, M. E. 2005 Reverse transcriptional profiling: non-correspondence of transcript level variation and proximal promoter polymorphism. **BMC Genomics**, 6:110.

BURROW, H. M;. MOORE, S. S.; JOHNSTON, D. J.; BARENDSE W.; BINDON, B. M. (2001) Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 41, 893–919.

BYRNE, K. A.; WANG, Y. H.; LEHNERT, S. A.; HARPER, G. S.; McWILLIAM, S. M.; BRUCE, H. L.; REVERTER, A. (2005) Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction **Journal of animal science** 83, 1-12.

CROUSE, J.D.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M.; KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S.C. (1993) Comparisons of Bos indicus and Bos taurus inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Beef Research, Progress Report** 4:125-127.

CUNDIFF L.V., GREGORY K.E. (1999) What is systematic crossbreeding? In 'Proceedings of Cattlemen's College, National Cattlemen's Beef Association'. Charlotte, North Carolina, 11th February 1999. pp. 1–27. (National Cattlemen's Beef Association)

CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M.; GREGORY, K.E.; CROUSE, J.D.; DIKEMAN, M.E. (1993) Characterístics of diverse breeds in Cycle IV of the cattle germoplasm evaluation program. **Beef Research-Progress Report** 4 71:63.

FERRELL, C.; JENKINS T.G. Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high-concentrate diet during the finishing period: II. Angus, Boran, Brahman, Hereford, and Tuli sires. J. Anim. Sci., v.76, p.647-657, 1998.

FRANKE D.E. (1997) Postweaning performance and carcass merit of F1 steers sired by Brahman and alternative subtropically adapted breeds. **Journal of Animal Science** 75, 2604–2608.

FRISCH J.E. (1997) Breeding productive, adapted beef cattle for tropical regions. In 'Proceedings CEA '97 V Congreso Internacional De Transferencia Tecnologica Agropecuaria: Cria y Mejoramiento Genetico'. 24–25 November 1997, Paraguay, Associacion Rural Del Paraguay. pp. 137–162.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J. E BORTOLOSSI, J. C. (2007) A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas **R. Bras. Zootec**., v.36, suplemento especial, p.331-341.

GEESINK, G.H. AND KOOHMARAIE, M. (1999) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by l-calpain under postmortem conditions. **J. Anim. Sci.**, 77: 2685-2692.

GEESINK, G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H. AND KOOHMARAIE, M. (2006) Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **J. Anim. Sci.**, 84:2834-2840.

HADLICH, J.C. **Metodologias de análises de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genáticos e idade.** 2004. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. (2007) Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **The International Journal of Animal Biosciences**, v.1, p.159-173.

HUGUES, M. C.; GEARY, S.; DRANSFIELD, E.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'NEILL, E. E. (2001) Characterization of peptideos released from rabbit skeletal muscle troponin-t by m-calpain under conditions of low temperature and high ionic strength **Meat Science** 59:61-69.

KOHN, M.H., FANG, S., WU, C.I. (2004) Inference of positive and negative selection on the 5' regulatory regions of Drosophila genes. **Mol Biol Evol**, 21(2):374-383.

KOOMARAIE, M (1992) The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. Biochimie 74:239-245.

KOOMARAIE, M (1994) Muscle proteinases and meat ageing. Meat science 36:93-104.

KOOMARAIE, M (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. Meat science suppl. 43:193-201.

KOOMARAIE, M (2003) Understanding and managing variation in meat tenderness. In Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40 Santa Maria Anais CD-ROOM.

LEDGER, H.P.; ROGERSON, A.; FREEMAN, G.H. Further studies on the voluntary food intake of Bos indicus and Bos taurus and crossbred cattle. Anim. Prod., v.12, p.426–431, 1970.

LEHNERT, S. A.; REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; WANG, Y-H.; NATTRASS, G. S.; HUDSON, N. J.; GREENWOOD, P. I.; (2007) Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. **BMC Development biology.** 7:95.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2-δδct method**. METHODS** V.25, P. 402-408.

LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M. AND CUNNINGHAM, P. 1994 Evidence for two independent domestications of cattle **Proc. Nadl. Acad. Sci.** 91, 2757-2761.

LOOR, J.J.; DANN, H.M.; GURETZKY, N.A.J. ET AL. (2007) Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. **Physiol. Genomics**, v.27, p.29-41.

MARSHALL DM (1994) Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 72, 2745–2755.

MIRETTI, M. M.; PEREIRA JR., H. A.; POLI, M. A.; CONTEL, E. P. B. AND FERRO, J. A. (2002) African-Derived Mitochondria in South American Native Cattle Breeds (Bos taurus): Evidence of a New Taurine Mitochondrial Lineage **The American Genetic Association** 93:323–330.

MORAN, J.B. The grazing feed intake of Hereford and Brahman cross cattle in a cool temperate environment. J. Agric. Sci., v.86, p.131–134, 1976.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C. and DOLAH, F. M. V. (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol. Proced.** 8(1):175-193.

MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. (1993) Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **J. Anim. Sci.** 71:1471–1476.

MRC (1997) Tropical beef breeds and performance assessment — a producer's guide. pp. 8–11. (Meat Research Corporation, Australia and Belmont Red Association of Australia: Rockhampton)

NORMAN, G.A. (1982) Effect of breed and nutrition on the productive traits of beef cattle in South-east Brazil: Part 3 – **Meat Quality. Meat Sci**., 6(2):79-96.

O'DONOVAN, P.B.; GEBREWOLDE, A.; KEBEDE, B. et al. Fattening studies with cross-bred (European × Zebu) bulls. 1. Performance on diets of native hay and concentrate. J. Agric. Sci., v.90, p.425–429, 1978.

OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factor that alter the growth and development of ruminants. J. Anim. Sci., v.71, p. 3138- 3150, 1993.

PENNY, L. F.; DRANSFILELD, E (1979) Relationship between toughness and troponin T in conditioned beef. **Meat Science** 3:135-141.

PEREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. (2008) Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue **BMC Molecular Biology** 9:79.

REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; BRUCE, H. L.; WANG, Y. H.; DALRYMPLE, B. P.; LEHNERT, S. A. (2003) A mixture model-based cluster analysis of DNA microarray gene expression data on Brahman anda Brahman composite steers red high-, medium- and low-quality diets. **Journal of animal science** 81, 1900-1910.

ROBINSON, B.W.S.; ERLE, D.J.; JONES, D.A.; SHAPIRO, S.; METZGER, W.J.; ALBELDA, S.M.; PARKS, W.C.; BOYLAN, A. 2000 Recent advances in molecular biological techniques and their relevance to pulmonary research. **Thorax**, 55:329-339.

ROBINSON, T.L.; SUTHERLAND, I.A..; SUTHERLAND, J. (2006) Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR, Vet. Immunol. Immunopathol. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.012

RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. (1998) Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil **C. Ciênc. Tecnol. Aliment**.18(4)405-409.

SANDRI, M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hypertrophy Physiology 23:160-170.

SAÑUDO, C., MACIE, E. S., OLLETA, J. L., VILLARROEL, M., PANEA, B., ALBERTÍ, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. Meat Science, 66, 925-932.

SARTORELLI, V. e FULCO, M (2004) Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy Science STKE ref11.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. (1994) Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. **J. Anim. Sci.**, 72:857-863.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. (1991) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **J. Anim. Sci**., 69:171-177.

SHERBECK, J.A.; TATUM, J.D.; FIELD, T.G.; MORGAN, J.B.L SMITH, G.C. (1995) Feedlot performance, carcass traits and palatability traits of Hereford and Hereford x Brahman steers. **J. Anim. Sci**. 73:3613-3620.

SHI, L. **DNA MICROARRAY (GENOME CHIP) – MONITORING IN THE GENOME ON A CHIP.** WWW.GENE-CHIPS.COM, 1998-2000.

SILVEIRA, A.C. (2003) Novilho superprecoce: técnicas de nutrição e manejo. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., , Goiânia. Anais. Goiânia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003. p.153- 166.

SIROL, M. L. F. G. (2007) FATORES GENÉTICOS QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE, Material didático apresentada na disciplina Métodos de Avaliação da Qualidade de Carnes do prof. Prof. Roberto de Oliveira Roça http://dgta.fca.unesp.br/carnes/materialparadownload.php

SORIA, L.A.; CORVA, P.M. (2004) Fatores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 12(2):73-88.

STAMATOYANNOPOULOS, J.A. 2004 The genomics of gene expression. **Genomics**, 84(3):449-457.

SUCHITA, S.P.; SIPKOVSKY, S.; KRUSKA, R.; JEFFERS, A.; McNULTY, A.; COUSSENS, M.J.; TEMPELMAN, R.J.; HALGREN, R.G.; SAAMA, P.M.; BAUMAN, D.E.; BOISCLAIR, Y.R.; BURTON, J.L.; COLLIER, R.J.; DePETERS, E.J.; FERRIS, T.A.; LUCY, M.C.; McGUIRE, M.A.; MEDRANO,

J.F.; OVERTON, T.R.; SMITH, T.P.; SMITH, G.W.; SONSTEGARD, T.S.; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; YAO, J.; COUSSENS, P.M. 2003 Development and testing a high-density cDNA microarray resource for cattle. **Physiol. Genomics** 15:158-164.

SUDRE, K.; CASSAR-MALEK, I.; LISTRAT, A.; UEDA, Y.; LEROUX, C.; JURIE, C.; AUFFRAY, C.; RENAND, G.; MARTIN, P.; HOCQUETTE, J. F. (2005) Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine skeletal muscles in Charolais bulls divergently selected for muscle growth . **Meat science**, 70:267-277.

SUDRE, K.; LEROUX, C.; CASSAR-MALEK, I.; PETIT, E.; LISTRAT, A.; AUFFRAY, C.; PICARD, B.; MARTIN, P.; HOCQUETTE, J. F. (2003) Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. **Journal of biochemistry**, 133:745-756.

TAUTZ, D.; 2000 Evolution of transcriptional regulation. Genetics e Development, 10,5: 575-579.

VELLOSO, C. P. (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I British Journal of Pharmacology 154:557–568.

WANG, Y-H.; BYRNE, K. A.; REVERTER, A.; HARPER, G. S.; TANIGUCHI, M.; McWILLIAM, S. M.; MANNEN, H.; OYAMA, K.; LEHNERT, S. A. (2005) Trasncriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. **Mammalian genome.** 16:201-210.

WANG, Y-H.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; JAGER, N. D.; WANG. R.; McWILLIAM, S. M.; CAFÉ, L. M.; GREENWOOD, P. I.; LEHNERT, S. A. (2008) Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **J. Anim. Sci.** 0: jas.2008-1082v1-jas.2008-1082.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R.M. (1994) Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **J. Anim. Sci.** 72: 3145-3151.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM. R. D. (1990) Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. **J. Anim. Sci.** 68:2716–2728.

WITTKOPP, P.J.; HAERUM, B.K.; CLARK, A.G. (2004) Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. **Nature**, 430(6995):85-88.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. and STEWART JR., N. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics** 7:85.

CAPÍTULO 2 – Estudo da associação entre a expressão de genes pertencentes ao complexo calpaína/calpastatina e ao eixo somatotrófico com as características de maciez da carne, desempenho e qualidade da carcaça em bovinos das raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*).

RESUMO – Diferenças na velocidade de crescimento e na maciez da carne das diferentes raças bovinas vêm sendo avaliadas há algum tempo e demonstram que animais taurinos apresentam uma maior taxa de crescimento e melhor qualidade de carne do que animais zebuínos. O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar desempenho, características de composição e qualidade da carne, assim como a expressão de genes sabidamente relacionados com estas características em novilhos Abeerden Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*) abatidos aos 15 e 19 meses de idade. Vinte animais de cada raça foram utilizados, sendo metade abatida em cada uma das idades, os parâmetros avaliados foram peso de abate (PA), ganho de peso diário (GD), área do músculo *L. dorsi (AOL)*, espessura de gordura subcutânea (EGS), rendimento de carcaça (REND), força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação das miofibrilas (IFM), bem como a expressão dos genes GHR, IGF1, IGF1R, CAPN1, CAPN2 e CAST. Os resultados mostraram haver diferença significativa ($p<0,05$), na qual animais Angus apresentaram maior PA, GD, FMI e menor FC, estes resultados foram acompanhados de uma maior expressão do gene IGF1. Enquanto que, animais Nelore apresentaram uma maior expressão dos genes GHR, CAPN1 e CAST. Estes resultados demonstram que o desenvolvimento muscular possivelmente é modulado a nível muscular pelo IGF1 e que a menor maciez da carne possivelmente se deve a maior expressão do gene CAST.

Palavras-Chave: bovinos, desenvolvimento muscular, maciez da carne, PCR em tempo real.

Introdução

Na taxonomia a nomenclatura utilizada para os bovinos e a de subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, sendo que a divergência genética estimada entre elas é de aproximadamente 250 mil anos. Apesar desta proximidade filogenética, as duas subespécies apresentam características fenotípicas bastante distintas, com reflexos marcantes na eficiência produtiva, reprodutiva e na qualidade da carne produzida. Segundo Burrow e colaboradores (2001) nenhuma das raças bovinas, taurinas ou zebuínas possui todos os atributos necessários para produzir carne eficientemente em todos os ambientes e atingir a todos os requerimentos do mercado, uma vez que existe uma grande variabilidade nas características produtivas e adaptativas entre esses subgrupos de bovinos.

Diferenças na velocidade de crescimento e na maciez da carne das diferentes raças vêm sendo avaliadas há algum tempo e já foram revisadas por Marshall (1994) e Franke (1997). Frisch e colaboradores (1997) e MRC (1997) já demonstraram que animais taurinos apresentam uma maior taxa de crescimento e melhor qualidade de carne do que animais zebuínos. Contudo, Crouse e colaboradores (1989) sugeriram que raças *Bos taurus indicus* podem ser usadas para otimizar a eficiência de produção em programas de cruzamentos sem levar em consideração o impacto negativo da herança dos animais *Bos taurus indicus* na palatabilidade da carne.

Segundo revisão sobre o processo de hipertrofia e atrofia muscular, Solomon e Bouloux (2006), Sandri (2008) e Velloso (2008) apontam entre os genes controladores do crescimento muscular, o eixo somatotropico (GH, IGF-1) como um dos principais reguladores.

Em relação à maciez da carne, segundo Rubensam e colaboradores (1998) as proteases neutras ativadas pelo íon cálcio, denominadas calpaínas (CAPN1 e CAPN2), são parcialmente responsáveis pela proteólise *post-mortem* que conduz a um aumento progressivo da maciez da carne. Entretanto, apesar do importante papel das calpaínas na maturação, é o efeito inibidor de proteólise da calpastatina

(CAST), igualmente ativada pelo íon cálcio livre no sarcoplasma, que apresenta maior correlação com a maciez da carne conservada sob refrigeração.

A análise molecular do genoma dos animais de interesse pecuário pode contribuir de forma expressiva para solucionar algumas destas limitações, o que no caso da bovinocultura deve trazer ganhos significativos de produtividade. A utilização de informações contidas no DNA dos indivíduos, tais como: QTLs (Locus de características quantitativas), regiões microssatélites ou polimorfismos em genes candidatos, podem aumentar a acurácia das predições e a intensidade de seleção aplicada ao rebanho, diminuindo o intervalo entre gerações e economizando esforços em testes de progênie de touros.

Como conseqüência, a indústria da carne tem investido em pesquisas na busca por indicadores de qualidade da carne e no aumento do conhecimento da biologia do músculo na tentativa de controlar esta característica (Hocquette et al. 2007).

Conseqüentemente, esse estudo foi conduzido para avaliar e comparar desempenho, características de composição e qualidade da carne, assim como a expressão gênica de genes sabidamente relacionados com estas características em novilhos Abeerden Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*) abatidos aos 15 e 19 meses de idade.

Materiais e métodos

O experimento zootécnico de campo foi conduzido nas dependências do setor de confinamento do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP. Foram utilizados 40 animais machos inteiros não aparentados, sendo 20 da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e 20 da raça Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*), desmamados aos 240 dias de idade com peso variando entre 200 e 230 Kg. Os grupos genéticos foram alocados em baias experimentais separadamente, onde após um período de adaptação de 60 dias receberam uma dieta experimental que foi formulada de acordo com as normas do NRC (1996) para ganhos de peso diários acima de 1,4 Kg/dia.

Durante o período experimental, que durou 255 dias, os animais foram pesados a cada 28 dias para monitoramento do ganho de peso diário e ajustes nas dietas, sempre antes da primeira refeição do dia e com jejum alimentar prévio de 16 horas.

Os animais foram divididos em dois lotes, cada qual contendo metade dos animais de cada raça. O primeiro lote foi arraçoado com uma dieta mais energética, com 70% de concentrados e 30% de volumosos, visando a obtenção de maiores ganhos de peso diários para que os animais pudessem atingir o peso de abate (ao redor de 430 kg) precocemente (15 meses de idade). Para que os animais da raça Nelore pudessem suportar um período de confinamento mais longo e atingirem peso de abate por volta dos 19 meses de idade, o segundo lote recebeu uma dieta menos energética, formulada para conter 50% de concentrados e 50% de volumosos.

O alimento foi fornecido *ad libitum*, duas vezes ao dia, em sistema de ração completa, utilizando-se feno de gramínea “coast cross” como volumoso e uma mistura comercial contendo milho, caroço de algodão, farelo de soja e sal mineral, como concentrado.

O abate dos animais foi realizado em abatedouro comercial, seguindo-se fluxo normal do estabelecimento. Após a identificação e pesagem, as duas meias carcaças quentes foram resfriadas por 24 horas a 0 °C, período após o qual foram coletadas amostras de aproximadamente 2,5 cm de espessura, obtidas por cortes transversais do músculo *Longissimus dorsi* entre a 12ª e a 13ª costela da meia carcaça esquerda. Estas amostras foram identificadas e embaladas em sacos de polietileno, sendo submetidas ao processo de maturação por 14 dias em temperatura que variou de 0 a 1°C. Em seguida, elas foram congeladas e armazenadas a - 20°C para posterior análise da espessura de gordura subcutânea (EGS) e das medidas de maciez da carne (Força de Cisalhamento e Índice de Fragmentação Miofibrilar).

Por ocasião do abate também foi tomada a medida da área de olho de lombo (AOL) no músculo *Longissimus dorsi* (LD), de acordo com a metodologia

descrita por Müller (1987), que utiliza uma grade de plástico quadriculado (padrão USDA), enquanto que a EGS foi medida no terço médio da secção transversal desse corte, utilizando-se um paquímetro.

As análises de maciez da carne pelas medidas da força de cisalhamento (FC) e do índice de fragmentação miofibrilar (IFM) foram executadas no Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu, SP.

A FC foi determinada seguindo o procedimento descrito por Wheeler e colaboradores (1995). Brevemente, as amostras foram assadas em forno elétrico até atingirem a temperatura interna de 71 ºC e resfriada até 22 ºC. Então foram extraídos 8 cilindros de 1,27 cm de diâmetro paralelamente a direção das fibras e usados para determinar a força máxima de corte utilizando um Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) mecânico com capacidade de 25 kg (Marca Chatillon), com uma sonda de espessura de lâmina de corte de 1,016 mm, e uma barra deslizadora de 1,245 mm de espessura entre barras e velocidade de 200 mm/min. A força máxima de cisalhamento foi obtido pela média dos 8 cilindros de cada amostra.

O IFM da carne foi determinado de acordo com Culler e colaboradores (1978). Foram retirados três cilindros de 1,27cm de diâmetro, dos quais foram utilizados 3 gramas do músculo que foram homogeneizados em triturador por 30 segundos, com 40 mL da solução de extração (KCl 100 mM, fosfato de potássio 20 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM e azida sódica 1 mM). Em seguida, a solução homogeneizada foi centrifugada, por 15 minutos, a 1000 x g, a 4ºC. O precipitado foi dissolvido em 40 mL de solução de extração, agitado e centrifugado novamente, por 15 minutos, a 1000 x g, a 4ºC. Foram adicionados ao precipitado 10 mL de solução de extração e a suspensão obtida foi submetida a peneira de polietileno para remoção do tecido conectivo. Para facilitar a obtenção das miofibrilas foram adicionados mais 10 mL da solução de extração. Nesta suspensão de miofibrilas foi determinada a concentração de proteína pelo método do biureto, como descrito por Gornall e colaboradores (1949). Uma alíquota da

suspensão de miofibrilas foi diluída com a solução de extração até uma concentração protéica de 0,5 ± 0,05 mg/mL e realizada a leitura da densidade ótica a 540 nm em espectrofotômetro. Para obtenção do índice de fragmentação miofibrilar, o valor obtido de densidade ótica a 540 nm foi multiplicado por 200.

Uma semana antes do abate foram colhidas amostras do músculo LD, mediante procedimento cirúrgico realizado entre a 12ª e a 13ª costela, cujos pesos variaram entre 1 e 2 g de tecido. Estas amostras foram divididas em sub-amostras de aproximadamente 250 mg, embrulhadas em papel alumínio, identificadas, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para serem posteriormente armazenadas em freezer a -80ºC.

Para a extração do RNA total das amostras do músculo LD utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) e o kit PureLink Micro-to-Midi System (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e, para eliminar fragmentos residuais de DNA, as amostras de RNA foram tratadas com 20 unidades da enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega). A quantificação do RNA total e a avaliação de sua qualidade foram realizadas pela leitura das absorbâncias a 260 nm em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies), assim como por eletroforese capilar no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies).

Os cDNAs utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real qRT-PCR foram sintetizados através de reação de transcrição reversa, com a utilização do conjunto de reagentes comercial SUPERSCRIPT III FIRST-STRAND SYNTESIS SUPER MIX (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a avaliação da expressão dos genes, CAPN1 (μ-calpaína), CAPN2 (m-calpaína), CAST (Calpastatina), GHR (Receptor de Hormônio de crescimento), IGF-1 (Fator de crescimento semelhante a insulina 1) e IGF1R (Receptor de IGF-1) por qRT-PCR foram utilizados 6,25 μL do reagente POWER SYBR Green (Applied Biosystems), 0,6 μM de cada iniciador específico para cada gene, 30 ng de cDNA (molde) e água MilliQ (ultrapura) autoclavada para completar o volume de 12,5 μl.

A reação foi submetida ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7500 (Applied Biosystems), descrito a seguir: dois minutos a 50ºC, 10 minutos a 95ºC e quarenta ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 56ºC e 1 minuto a 72ºC. Por fim, foi empregado um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95ºC para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação.

Os valores de “threshold cycle” (Ct) foram obtidos utilizando-se o software ABI Prism 7500 SDS versão 1.1 (Applied Biosystems, USA), sendo posteriormente normalizados (ΔCt) com base nos valores de Ct obtidos para o gene constitutivo beta-2microglobulina (B2M). Já os níveis relativos de expressão entre as raças foram calculados de acordo com o método ΔΔCt, descrito por Livak e Schmittgen, (2001).

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se no modelo raça e idade de abate, para tal foi realizado o procedimento GLM do programa computacional “Statistical Analysis System” (SAS, 2004), enquanto que para a análise para verificar a existência de correlações entre as variáveis estudadas utilizou-se o procedimento COR do mesmo programa computacional.

Resultados e discussões

Os resultados de desempenho, características de carcaça e maciez da carne estão apresentados na Tabela 1, na qual se pode observar que o PA e a FC foram as únicas características que apresentaram diferenças significativas, tanto para a variável raça, quanto para a idade de abate, enquanto que o IFM diferiu significativamente apenas entre as raças. De todas as características estudadas, somente o GD apresentou diferenças significativas para a interação raça x idade de abate (Tabela 2).

Tabela 1 – Medias e desvios padrões para as variáveis estudadas, características de desempenho, carcaça e maciez de carne.

	Variáveis					
Raças	PA (Kg)	AOL (Cm2)	IFM	FC (Kg)	REND (%)	EGS (mm)
Angus	452.43 ± 36.19 a**	69.24 ± 8.28 a	83.50 ± 12.13 a**	3.42 ± 1.00 b**	0.53 ± 0.04 a	4.63 ± 0.72 a
Nelore	419.57 ± 29.50 b**	67.14 ± 6.83 a	57.03 ± 13.15 b**	5.16 ± 1.24 a**	0.55 ± 0.02 a	4.67 ± 1.15 a
Idade						
15 meses	421.36 ± 35.89 b**	68.09 ± 7.46 a	72.45 ± 15.68 a	3.94 ± 1.17 b*	0.53 ± 0.03 a	4.55 ± 0.83 a
19 meses	452.10 ± 30.77 a**	68.30 ± 7.89 a	67.86 ± 20.99 a	4.67 ± 1.59 a*	0.54 ± 0.04 a	4.67 ± 1.15 a

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas estatisticamente.
* p<0,05 ** p<0,01
PA = Peso ao abate AOL= Área de olho de Lombo IFM = Índice de fragmentação Miofibrilar FC = Força de cisalhamento
REND= Rendimento de carcaça EGS = Espessura de gordura subcutânea.

Tabela 2 – Medias e desvios padrões do ganho de peso diário, para raça e idade de abate.

	GD (Kg)		
	15	19	Geral
Angus	1.36 Aa	0.84 Ba	1.12 ± 0.31 a
Nelore	0.96 Ab	0.74 Ba	0.86 ± 0.22 b
Geral	1.16 ± 0.28 a	0.79 ± 0.15 b	

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha p<0,01
Letras minúsculas diferentes na mesma coluna p<0,01
GD = Ganho de peso diário

Como podem ser observados nessas tabelas, os animais da raça Angus tiveram melhor desempenho do que os da raça Nelore, pois apresentaram GD e PA superiores aos dos zebuínos, cujas magnitudes foram da ordem de aproximadamente 30 e 8%, respectivamente. Contudo, é preciso ressaltar que tanto na raça Angus, quanto na Nelore, os animais abatidos aos 15 meses de idade foram aqueles que tiveram os melhores GD, superando em 62 e 30%, respectivamente, os valores observados para os animais abatidos aos 19 meses de idade.

Estes resultados já eram esperados, uma vez que uma das características marcantes da raça Angus é a sua precocidade produtiva, enquanto que a da raça Nelore é a rusticidade, que na maioria das vezes está associada a um desenvolvimento um pouco tardio. À semelhança do que foi observado no presente trabalho, Ferrel e Jenkins (1998) também encontraram diferenças nos GD de animais da raça Angus (taurinos), quando comparados com os da raça Bramahn (zebuínos), enquanto que Sañudo e colaboradores (2004), verificaram maiores pesos ao abate em animais pertencentes à raças de crescimento rápido, quando comparados aos pertencentes às raças consideradas mais rústicas.

Estas diferenças fenotípicas entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* já foram revisadas por Marshall (1994) e Franke (1997) e, em muitos casos, até já foram incorporadas nas práticas zootécnicas, como é o caso das tabelas de exigências nutricionais do NRC (National Resource Council) que são diferentes para as duas subespécies em questão (Chizzoti et al, 2007).

No tocante à maciez da carne, os resultados obtidos para ambas as variáveis estudadas (FC e IFM), evidenciaram que os animais da raça Angus possuem carne mais macia do que os da raça Nelore, pois o valor médio da FC dessa última raça (5,16 ± 1,24) foi aproximadamente 50% maior do que o observado para a raça Angus (3,42 ± 1,00), enquanto que o valor de IFM da raça Nelore foi 31% menor do que o da raça Angus (57,03 ± 13,15 e 83,50 ± 12,13, respectivamente). É preciso lembrar que no método IFM, quanto maior os valores

observados, maior a degradação das miofibrilas e, portanto, maior a maciez da carne.

Com relação à idade, observou-se que os animais mais jovens, embora mais leves, apresentaram valores de FC ~15% menores e de GD 47% maiores, quando comparados com os animais mais velhos (19 meses de idade). De maneira que os animais mais jovens reúnem características mais desejáveis para animais de abate, como maior maciez da carne e melhor desempenho produtivo, considerando-se a classificação adotada por Abularach e colaboradores (1998) e Dikeman e colaboradores (2005), na qual o valor máximo da FC para se considerar uma carne macia é de 5 Kg, quando medido pelo método de WBSF.

A diferença na maciez da carne quando se compara raças taurinas e zebuínas já vem sendo documentada há muito tempo (Damon et al. 1960; Carpenter et al. 1961; Ramsey et al. 1963; Lucket et al. 1975; Crouse et al. 1987; Wheeler et al. 1996), mas ainda continua sendo um assunto atual.

Publicações mais recentes também reportam resultados similares aos encontrados no presente trabalho. Neste sentido, trabalhando com animais puros da raça Angus terminados em confinamento, Costa e colaboradores (2002) verificaram que o aumento da idade e do peso de abate não alteraram de forma drástica os índices de FC, que variaram na faixa 4,6 a 3,3 Kg. Trabalhando com animais pertencentes a raças taurinas, Chambaz e colaboradores (2003), Cuvelier e colaboradores (2006) e Revilla e Vivar-Quintana (2006), verificaram que, além dos valores de FC não terem variado significativamente entre essas raças, todos eles se encontram abaixo do limite superior para se considerar uma carne como macia (≤ 5,0).

Com relação à maciez da carne de animais das raças zebuínas, os resultados do presente trabalho também se assemelham aos encontrados na literatura, nos quais os animais abatidos com menos de 15 meses de idade apresentam maior maciez do que animais abatidos em idades mais avançadas. Neste sentido Riley e colaboradores (2005), trabalhando com animais da raça

Brahman abatidos com 13 meses encontraram valores médios de FC de 4,9 kg para carne maturada por 14 dias, enquanto Pringler e colaboradores (1997) relataram valores de 6,1 kg para animais 100% Brahman abatidos com aproximadamente 20 meses de idade. No mesmo sentido, Leme e colaboradores (2000) determinaram a FC na carne de animais de raças puras, bem como resultantes de distintos cruzamentos entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, que foram abatidos em várias idades e verificaram um aumento dos valores da FC nos animais com maior grau de sangue *Bos taurus indicus*, enquanto que os animais de raças taurinas e seus cruzamentos praticamente mantiveram os mesmos valores de FC com o passar do tempo.

Segundo Gerrard e colaboradores (1987) a maciez da carne é influenciada pela interação existente entre idade ao abate e a condição sexual do animal, que resulta em uma grande oscilação na FC da carne dos animais inteiros, cujos valores tendem a aumentar com o avanço da idade, sendo que os menores valores são encontrados nos animais que possuem entre 12 e 18 meses de idade.

Cabe ressaltar que os valores mais altos de FC (> 7.0 kg) encontrados na literatura foram obtidos em animais *Bos taurus indicus* castrados, abatidos com mais de 20 meses de idade (Vaz et al. 2001; Heinemann et al. 2003), fato que pode estar associado a taxa de crescimento muscular, que também é um fator importante para a determinação da maciez da carne.

Os resultados do estudo da expressão dos genes CAPN1, CAPN2, CAST, GHR, IGF1, IGF1R por qRT-PCR estão apresentados na Tabela 3, na qual se pode observar que o IGF1 foi o único gene diferencialmente expresso para os dois fatores estudados (raça e idade ao abate), enquanto que os genes CAPN1, CAST e GHR se mostraram diferencialmente expressos somente para o fator raça. Os resultados da análise da expressão relativa $\Delta\Delta$Ct (ou “Fold change”) dos genes que apresentaram diferenças significativas estão apresentados na Figura 1.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrões dos valores de ΔCt obtidos nas analises de qRT-PCR.

	Variáveis					
Raças	CAPN1	CAPN2	CAST	GHR	IGF1	IGF1R
Angus	1.71 ± 0.41 a**	3.75 ± 0.41 a	3.46 ± 0.55 a**	3.82 ± 0.52 a*	7.44 ± 0.45 b**	5.82 ± 0.65 a
Nelore	1.31 ± 0.39 b**	3.58 ± 0.40 a	2.93 ± 0.60 b**	3.46 ± 0.43 b*	7.95 ± 0.43 a**	5.60 ± 0.48 a
Idade						
15 meses	1.46 ± 0.46 a	3.65 ± 0.38 a	3.19 ± 0.67 a	3.66 ± 0.51 a	7.55 ± 0.44 b*	5.69 ± 0.64 a
19 meses	1.57 ± 0.43 a	3.68 ± 0.46 a	3.20 ± 0.61 a	3.62 ± 0.51 a	7.84 ± 0.43 a*	5.73 ± 0.52 a

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas estatisticamente.
* p<0,05 ** p<0,01
Menores valores significam maiores expressões
CAPN1 = Calpaína 1 CAPN2 = Calpaína 2 CAST = Calpastatina GHR = Receptor do hormônio de crescimento
IGF1 = Fator de crescimento semelhante a insulina 1 IGF1R = Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1

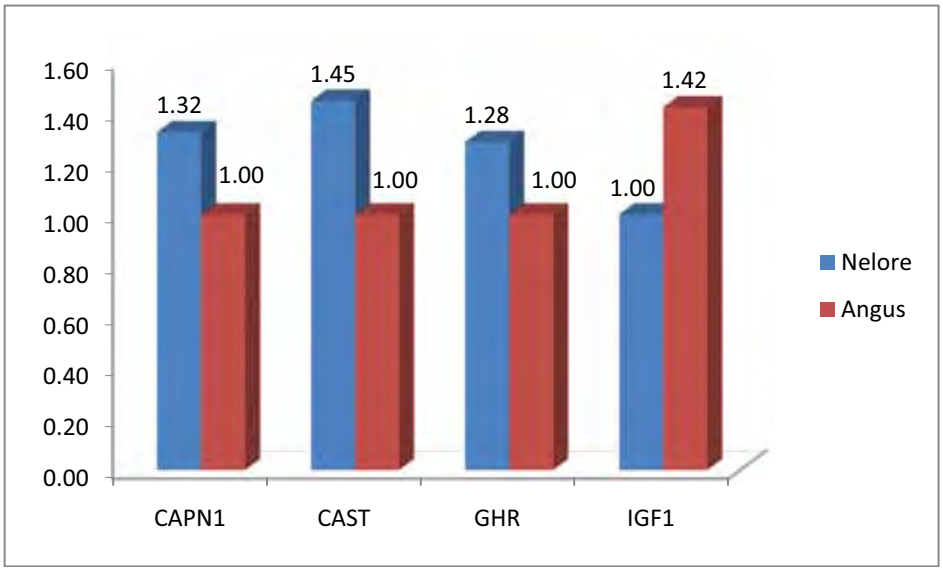

Figura 1- Expressão relativa dos genes diferencialmente expressos por qRT-PCR ($p<0,05$)
CAPN1 = Calpaína 1 CAST = Calpastatina GHR = Receptor do Hormônio de crescimento
IGF1 = Fator de crescimento semelhante a insulina

No tocante a expressão relativa dos genes relacionados com desempenho, verifica-se que a expressão do GHR foi 28% maior nos animais da raça Nelore, enquanto que a do IGF1 se mostrou 42% superior naqueles da raça Angus, sugerindo que o IGF1 endócrino (IGF1 muscular) também deve apresentar um papel de modulador do crescimento muscular, pois segundo Sandri, (2008), o aumento da massa muscular depende da taxa de renovação protéica e celular, que ocorre principalmente pelo aumento da síntese e diminuição da degradação protéica.

Santorelli e Fulco (2004) em revisão sobre o processo de atrofia e hipertrofia muscular, ressaltaram que este fenômeno esta ligado a algumas moléculas que pertencem a vias metabólicas estabelecidas e, que entre elas, a molécula do IGF1 ocupa um lugar de destaque. Mesmo sendo o IGF1 sintetizado pelo fígado o principal estimulador do crescimento muscular, o interesse dos pesquisadores pelo IGF1 sintetizado no músculo tem aumentado

substancialmente, devido à hipótese de que isoformas específicas expressas no músculo estão envolvidas com hipertrofia muscular (Musaro et al. (2001) e McCall et al. (2003)). Por outro lado, o fato de seu receptor (IGF1R) não estar diferencialmente expresso em nenhum dos tratamentos experimentais sugere que a ação autócrina e/ou parácrina do IGF1 independe da quantidade de receptores disponíveis.

O IGF1 também se mostrou diferencialmente expresso entre as idades estudadas, sendo sua expressão maior aos 15 meses do que aos 19 meses de idade, mostrando coerência com os resultados de desempenho do presente trabalho, uma vez que os animais mais jovens foram os que apresentaram maior desenvolvimento.

Já em relação aos genes envolvidos com o processo de amaciamento da carne, CAPN1 e CAST foram mais expressos nos animais da raça Nelore, apresentando valores 32% e 45% superiores aos observados nos animais da raça Angus, respectivamente (Figura1), sugerindo que a menor maciez da carne dos animais zebuínos provavelmente não é resultante da menor expressão das proteases (CAPN1 e CAPN2), mas sim a maior expressão do seu inibidor (CAST). Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos por Whipple et al. (1990), que ao medir a atividade dessas enzimas em taurinos e zebuínos detectaram maior atividade enzimática do inibidor CAST nos animais zebuínos, porém não observaram diferenças na atividade enzimática das proteases em nenhum dos grupos genéticos. Ainda de acordo com Geesink e Koohmaraie, (1999) e Geesink e colaboradores (2006), o aumento do nível de atividade da CAST 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 por esta enzima.

Neste sentido, a degradação das miofibrilas e das proteínas que fazem parte do citoesqueleto pelo sistema calpaína-calpastatina tem sido apontada como o principal fator responsável pelo processo de amaciamento da carne (Koohmaraie, 1992; Taylor et al. 1995; Koohmaraie, 1996; Boeh et al. 1998;

Wheler et al. 2000; Delgado et al. 2001 e Koohmaraie et al. 2002). Entretanto, a hipótese de que o amaciamento da carne é realizado por um complexo multienzimático composto pelas calpaínas e por outras enzimas com funções menos conhecidas (proteosomas e caspases, p. ex), num processo que se assemelha a apoptose, está sendo cada vez mais aceita pela comunidade científica (Luciano et al. 2007)

Diversos autores têm documentado a maior atividade enzimática da CAST e maiores valores de FC no músculo de animais zebuínos, quando comparados com os taurinos (Wheler 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 de seu RNAm em estudos de expressão gênica não havia sido relatada até o presente momento.

Dessa maneira, apesar da síntese do RNAm e a produção da proteína correspondente nem sempre serem correlacionadas, os resultados do presente trabalho sugerem que a maior expressão do gene CAST nos animais da raça Nelore pode estar realmente relacionada com uma maior atividade da enzima calpastatina, que por sua vez tem forte influencia sobre a menor maciez da carne apresentada por estes animais.

Os resultados da análise de correlações entre os parâmetros estudados estão apresentados na Tabela 4, na qual fica evidente que o PA esteve positivamente correlacionado com a AOL e o IFM, enquanto que o GD apresentou correlações positivas com AOL e IFM e negativa com FC. Estes resultados robustecem a hipótese de que existe uma relação entre crescimento muscular e maciez da carne, na qual a alta taxa de crescimento antes do abate está relacionada com a maior maciez da carne (Fishell et al. 1985; Thomson et al. 1999; Vestergaard et al. 2000b; Purchas et al. 2002; Zgur et al. 2003).

Tabela 4. Valores de correlações e nível de significância para as variáveis estudadas.

	PA	GD	REND	AOL	EGS	IFM	FC	CAPN1	CAPN2	CAST	GHR	IGF1	IGF1R
PA	1	0.26544 0.0893	-0.28985 0.066	0.49177 0.0009	-0.06974 0.6817	0.35442 0.0213	-0.11927 0.4519	0.24773 0.1137	0.02526 0.8738	0.08411 0.5964	0.02944 0.8532	-0.17542 0.2665	0.05793 0.7155
GD		1	-0.22026 0.1664	0.37065 0.0157	-0.17405 0.3029	0.47268 0.0016	-0.44316 0.0033	0.08374 0.598	-0.07677 0.6289	0.07078 0.656	0.0834 0.5995	-0.39699 0.0092	0.08301 0.6012
REND			1	-0.0627 0.697	-0.24753 0.1455	-0.24501 0.1226	0.02084 0.8971	-0.04493 0.7803	-0.08313 0.6053	0.0005 0.9975	0.01024 0.9494	0.24763 0.1185	0.11401 0.4778
AOL				1	0.04948 0.7712	0.10581 0.5048	-0.00368 0.9815	0.03303 0.8355	-0.00259 0.987	-0.12893 0.4158	-0.10899 0.4921	-0.07756 0.6254	0.00834 0.9582
EGS					1	-0.0531 0.7549	0.12135 0.4743	-0.01528 0.9285	0.19221 0.2544	0.05257 0.7573	-0.12547 0.4593	-0.24172 0.1495	0.16334 0.3341
IFM						1	-0.6723 <.0001	0.26243 0.0932	0.09452 0.5516	0.24188 0.1228	0.24515 0.1176	-0.41114 0.0068	0.05203 0.7435
FC							1	-0.21274 0.1762	-0.13784 0.384	-0.34112 0.0271	-0.1943 0.2176	0.39553 0.0095	0.00333 0.9833
CAPN1								1	0.77091 <.0001	0.77989 <.0001	0.67689 <.0001	0.20694 0.1885	0.65664 <.0001
CAPN2									1	0.70242 <.0001	0.47949 0.0013	0.14709 0.3526	0.51181 0.0005
CAST										1	0.63633 <.0001	0.04276 0.788	0.36672 0.0169
GHR											1	0.17714 0.2618	0.64437 <.0001
IGF1												1	0.17414 0.2701
IGF1R													1

PA = Peso ao abate, GD = Ganho de peso diário, AOL= Área de olho de Lombo, IFM = Índice de fragmentação miofibrilar, FC = Força de cisalhamento, REND= Rendimento de carcaça, EGS = Espessura de gordura subcutânea, CAPN1 = Calpaína 1, CAPN2 = Calpaína 2, CAST = Calpastatina, GHR = Receptor do hormônio de crescimento, IGF1 = Fator de crescimento semelhante a insulina 1, IGF1R = Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1.

Valores de significância $p<0,05$. VERDE = Correlações entre as características fenotípicas, VERMELHO = Correlações entre as características fenotípicas e ΔCts dos genes, AZUL = Correlações entre os ΔCts dos genes.

Thomson e colaboradores (1999) relataram que o aumento da taxa de crescimento foi acompanhado pelo aumento da atividade da enzima μ-calpaina. Sendo assim, uma alta taxa de degradação de proteínas miofibrilares no "*ante mortem"*, levaria a uma alta taxa de degradação também no "*post mortem"* melhorando a maciez da carne (Zgur et al. 2003). Estes mesmos autores concluem que a influencia da taxa de crescimento na maciez da carne depende principalmente das mudanças na taxa de renovação protéica. Assim, se a alta taxa de crescimento estiver relacionada com altas taxas de síntese e de degradação protéica, espera-se que ocorra um aumento da maciez da carne, pois o processo de síntese cessa no "*post mortem"*, mas o de proteólise não.

Os dois parâmetros utilizados para avaliar a maciez da carne (FC e IFM) apresentaram uma correlação negativa. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que apresenta correlações entre -0,47 e -0,61 em músculos bovinos (Barkhouse et al. 1996; Purchas et al. 1999; Vestergard et al. 2000).

Os resultados da Tabela 4 também mostram que GD apresenta uma correlação negativa com o ΔCt do gene IGF1, sendo que o mesmo gene apresentou uma correlação positiva com a FC. Cabe ressaltar que, quanto menor o valor de ΔCt maior será a expressão do gene. Dessa maneira uma correlação negativa significa que quanto maior o GD maior será a expressão de IGF1, este resultado era esperado, uma vez que o IGF1 é o maior modulador de crescimento muscular como discutido anteriormente.

O ΔCt do IGF1 também apresentou uma correlação negativa com o IFM, mostrando que animais com maior expressão de IGF1 (maiores GD) apresentaram maior fragmentação das miofibrilas, ou seja, maior maciez da carne. Por outro lado, a FC também apresentou uma correlação negativa com o ΔCt do gene calpastatina, mostrando que quanto maior for a FC (menor maciez) maior é a expressão de calpastina, que é o inibidor das calpaínas.

Finalmente, os resultados da expressão relativa obtida por qRT-PCR foram validados pela técnica de microarranjos e são mostrados na Figura 2, onde se

pode observar que dos 6 genes avaliados por qRT-PCR, 4 apresentaram o mesmo padrão de expressão pela técnica de microarranjos (CAPN2, CAST, GHR e IGF1R). A diferença entre os outros dois genes (CAPN1 e IGF1) pode ser atribuída a diferenças na abordagem estatística utilizada em cada método, fato que é aceitável, pois Morey e colaboradores (2006) ressaltaram que as técnicas de microarranjos e de qRT-PCR freqüentemente apresentam resultados discordantes, e que isto ocorre devido às falhas inerentes a cada um dos métodos. Neste mesmo trabalho, os autores demonstram que existe uma correlação de aproximadamente 70% entre os resultados destes dois métodos, podendo variar para mais ou para menos em função da magnitude das diferenças na expressão, do p-value e "fold change". De maneira que no presente trabalho foi possível validar aproximadamente 67% de genes avaliados, resultado que pode ser considerado bastante satisfatório.

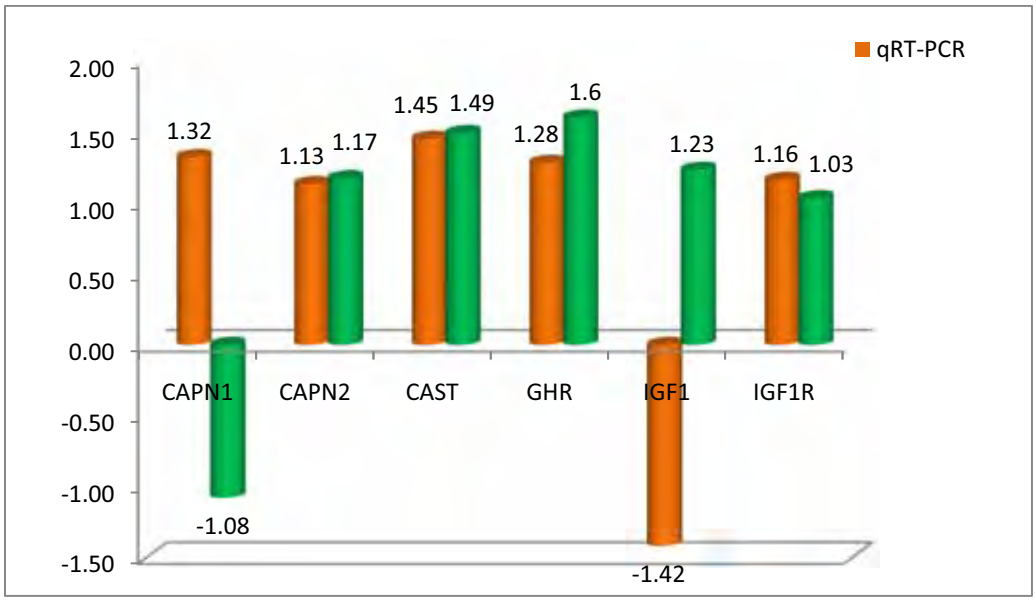

Figura 2 – Expressão relativa dos genes diferencialmente expressos comparando resultados de "Fold Change" entre qRT-PCR e Microarranjo

Valores positivos significam maior expressão na raça nelore e valores negativos significam maior expressão na raça angus
CAPN1 = Calpaína 1 CAPN2 = Calpaína 2 CAST = Calpastatina GHR = Receptor do Hormônio de crescimento IGF1 = Fator de crescimento semelhante a insulina 1 IGF1R = Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1

Conclusões

- Uma maior expressão dos genes tanto do CAPN1 quanto do CAST nos animais da raça Nelore demonstra que possivelmente é a maior expressão do inibidor do complexo de proteólise das miofibrilas e não da protease em si, o principal responsável pela menor maciez da carne apresentada por estes animais quando comparados com animais da raça Angus.

- Uma maior expressão do gene IGF1 nos animais da raça Angus sugere que a produção de IGF1 no tecido muscular (IGF1 endógeno) parece ter um papel importante e determinante no desenvolvimento muscular e no processo de amaciamento da carne de bovinos, devendo ser estudada sob uma ótica mais ampla.

- As expressões dos genes GHR, IGF1, CAPN1 e CAST no tecido muscular de bovinos devem ser avaliadas em um numero maior de amostras, coletadas em períodos diferentes do desenvolvimento animal, visando à confirmação dos resultados do presente trabalho.

- Os índices de correlações encontrados no presente trabalho, apesar de não serem altos demonstram uma evidencia de relação entre desenvolvimento muscular e maciez da carne, sendo assim apesar de os animais das raças Aberdeen Angus e Nelore apresentarem diferenças marcantes em relação a estas características, estas diferenças podem ser reduzidas quando se utiliza manejos intensivos de produção, que permitem o abate de animais mais jovens.

Referências

ABULARACH, M. L. S., ROCHA, C. E., FELÍCIO, P.E. (1998). Quality traits of boneless rib cut (L. dorsi muscle) from Nellore young bulls. **Ciência Tecnologia Alimento**. 18, 205-210.

BARKHOUSE, K. L.; VAN VLECK, L. D.; CUNDIFF, L. V.; KOOHMARAIE, M.; LUNSTRA, D. D.; CROUSE, J. D. (1996) Prediction of Breeding Values for Tenderness of Market Animals from Measurements on Bulls **J. Anim. Sci.** 74:2612–2621.

BOEHM, M. L.; KENDALL, T. L.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. (1998) Changes in the calpain and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Journal of animal science** 76: 2415-2434.

BURROW, H. M;. MOORE, S. S.; JOHNSTON, D. J.; BARENDSE W.; BINDON, B. M. (2001) Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 41, 893–919.

CARPENTER, J. W.;PALMER, A. Z.; KIRK, W. G.; PEACOCK, F. M.; KOGER, M. (1961) Slaughter and carcass characteristics of Brahman and Brahman shorthorn crossbred steers. **Journal of Animal Science** 20:336-340.

CHAMBAZ, A., SCHEEDER, M. R. L., KREUZER, M., DUFEY, P. A. (2003). Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. **Meat Science,** 63:491-500.

COSTA, E. C., RESTLE, J., BRONDANI, I. L., PEROTTONI, J., FATURI, C., MENEZES, L. F. G. (2002). Carcass composition, meat quality and cholesterol content in the Longissimus dorsi muscle of young red Angus steers confined and slaughtered with different weights. **Brazilian Journal of Animal Science.** 31:417-428.

CROUSE, J. D., CUNDIFF, L. V., KOCH, R. M., KOOHMARAIE, M., SEIDEMAN S. C. (1989) Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, 67, 2661-2668.

CROUSE, J. D.; SEIDMAN, S. C.; CUNDIFF, L. V.; (1987) The effect of carcass electrical stimulation on meat obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle **Journal of Food Quality** 10:407- 416.

CULLER R. D., PARRISH, F. C., SMITH, G. C., CROSS, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, 43, 1177-80.

CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; GREGORY, K. E.; CROUSSE, J. D.; DIKEMAN, M. E. (1993) Characteristics of Diverse Breeds in Cycle IV of the Cattle Germplasm Evaluation. Beef Res. Rep. No. 4. R. L. Hruska US Meat Anim. Res. Ctr., USDA, ARS, Clay Center, NE.

CUVELIER, C., CLINQUART, A., HOCQUETTE, J. F., CABARAUX, J. F. (2006). Comparison of composition and quality traits of meat from young finishing bulls from Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus breeds. **Meat Science**. 74:522-531.

DAMON, R. A.; CROWN JR, R. M.; SINGLETARY, C. B.; McCRAINE, S. E. (1960) Carcass characteristics of purebred and crossbred steers in the Gulf Coast region **Journal of Animal Science** 19:820-844.

DELGADO, E.F.; GEESINK, G.H.; MARCHELLO, J.A.; GOLL D.E.; KOOHMARAIE M. (2001) The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **J. Anim. Sci.,** 79: 398-412.

DIKEMAN, M. E., POLLAK, E. J., ZHANG, Z., MOSER, D. W., GILL, C. A., DRESSLER, E. A. (2005). Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for warner-blatzler shear force in three beef cattle breeds. **Journal of Animal Scien**ce. 83, 2461-2467.

FERRELL, C.; JENKINS T.G. (1998) Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high-concentrate diet during the finishing period: II. Angus, Boran, Brahman, Hereford, and Tuli sires. **J. Anim. Sci.** 76:647-657.

FISHELL, V.K.; ABERLE, E.D.; JUDGE, M.D.; PERRY, T.W. (1985): Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth-rate. **J. Anim. Sci.**, 61:151–157.

FRANKE D.E. (1997) Postweaning performance and carcass merit of F1 steers sired by Brahman and alternative subtropically adapted breeds. **Journal of Animal Science** 75, 2604–2608.

FRISCH J.E. (1997) Breeding productive, adapted beef cattle for tropical regions. In 'Proceedings CEA '97 V Congreso Internacional De Transferencia Tecnologica Agropecuaria: Cria y Mejoramiento Genetico'. 24–25 November 1997, Paraguay, Associacion Rural Del Paraguay. pp. 137–162.

GEESINK, G.H. AND M. KOOHMARAIE (1999) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by l-calpain under postmortem conditions. **J. Anim. Sci.**, 77: 2685-2692.

GEESINK, G.H., S. KUCHAY, A.H. CHISHTI AND M. KOOHMARAIE (2006) Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **J. Anim. Sci.**, 84: 2834-2840.

GERRARD, D.E., JONES, S.J., ABERLE, E.D., LEMENAGER, R. P., DIEKMAN, M. A., JUDGE M. D. (1987) Collagen stability, testosteronesecretion and meat tenderness in growing bulls and steers. **Journal of Animal Science**, 65, 1236-42.

GORNALL, E. D., BARDAWILL, C. J., E DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biology and Chemistry,** 177, 751–766.

HEINEMANN, R. J. B., PINTO, M. F., ROMANELLI, P. F. (2003). Factors affecting meat texture from Nellore and crossbreed Limousin-Nellore steers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, 963-971.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. (2007) Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **The International Journal of Animal Biosciences**, v.1, p.159-173.

IBRAHIM, R. M.; GOLL, D. E.; MARCHELLO, J. A.; DUFF, G. C.; THOMPSON, V. F.; MARES, S. W.; AHMAD, H. A. (2008) Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers **J Anim Sci** 86:1426-1433.

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

KOOMARAIE, M (1992) The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie** 74:239-245.

KOOMARAIE, M (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat science suppl**. 43:193-201.

LEME, P. R., BOIN, C., MARGARIDO, R. C. C., TEDESCHI, L. O., HAUSKNECHT, J. C. O'F. V, ALLEONI, G. F., FILHO, A. L. (2000). Growth performance in feedlot and carcass characteristics of beef cattle from several crossbreds slaughtered in three body weight ranges. **Brazilian Journal of Animal Science.** 29:2347-2353.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2-δδct method**. METHODS** V.25, P. 402-408.

LUCKETT, R. L.; BINDER, T. D.; ICAZA, E. A.; TURNER, J. W. (1975) Tenderness studies in straightbred and crossbred steers **Journal of Animal Science** 40:468-475.

MARSHALL DM (1994) Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 72, 2745–2755.

McCALL GE, ALLEN DL, HADDAD F, BALDWIN KM. (2003) transcriptional regulation of IGF-I expression in skeletal muscle. Am **J. Physiol cell Physiol** 285:831–839.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C. and DOLAH, F. M. V. (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol. Proced.** 8(1):175-193.

MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. (1993) Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **J. Anim. Sci.** 71:1471–1476.

MRC (1997) Tropical beef breeds and performance assessment — a producer's guide. pp. 8–11. (Meat Research Corporation, Australia and Belmont Red Association of Australia: Rockhampton)

MUSARO, A.; MCCULLAGH, K.; PAUL, A.; HOUGHTON, L.; DOBROWOLNY, G.; MOLINARO, M., BARTON, E.R.; SWEENEY, H.L.; ROSENTHAL, N. (2001) localized IGF1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nat Genet** 27: 195–200.

NRC. Nutrient requirements of beef cattle (2000) updated 7. ED. WASHINGTON, DC: National Academy Press,

O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. (1997) Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **J. Anim. Sci.** 75:1822–1830.

PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. (1997) Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **J. Anim. Sci.** 75:2955–2961.

PURCHAS, R. W.; BURNHAM; D. L.; MORRIS, S. T. (2002) Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers **J Anim Sci** 80:3211-3221.

PURCHAS, R.W.; YAN, X.; HARTLEY, D.G. (1999) The influence of a period of ageing on the relationship between ultimate pH and shear values of beef m. longissimus thoracis **Meat Science** 51:135-141.

RAMSEY, C. B.; COLE, J. W.; MEYER, B. H.; TEMPLE, R. S. (1963) Effects of type and breeds of British, Zebu as Dairy cattle on production, palatability and composition. II. Palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels **Journal of Animal Science** 22:1001-1008.

REVILLA, I., VIVAR-QUINTANA, A. M. (2006) Effect of breed and ageing time on meat quality and sensory attributes of veal calves of the “Ternera de Aliste” quality label. **Meat Science**. 73, 189-195.

RILEY, D. G., JOHNSON, D. D., CHASE JR., C. C., WEST, R. L., COLEMAN, S. W., OLSON, T. A., HAMMOND, A. C. (2005). Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**. 70, 347-356.

RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. (1998) Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil **C. Ciênc. Tecnol. Aliment**.18(4)405-409.

SANDRI, M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hypertrophy **Physiology** 23:160-170.

SAÑUDO, C., MACIE, E. S., OLLETA, J. L., VILLARROEL, M., PANEA, B., ALBERTÍ, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. **Meat Science**, 66, 925-932.

SAS - Statistical Analysis System Institute. The SAS System. Cary (NC); 2004.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; J. REAGAN, O. (1991) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **J. Anim. Sci**. 69:171–177.

SOLOMON, A. M. e BOULOUX, P. M. G. (2006) Modifying muscle mass – the endocrine perspective **Journal of Endocrinology** 191:349-360.

TAYLOR, R. G.; GEESINK, G. H.; THOMPSON, V. F.; KOOHMARAIE, M; GOLL, D. E. (1995) Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of animal science** 73: 1351-1367.

THOMSON, B.C.; MUIR, P.D.; DOBBIE, P.M. (1999): Effect of growth path and breed on the calpain system in steers finished in a feedlot. **J. Agric. Sci.,** 133:209–215.

VAZ, F. N., RESTLE, J., FEIJÓ, L. D., BRONDANI, I. L., ROSA, J. R. P., SANTOS, A. P. (2001). Quality and composition of meat from entire or castrated beef

cattle from different Charolais X Nellore genetic groups. **Brazilian Journal of Animal Science**. 30, 518-525.

VELLOSO, C. P. (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I **British Journal of Pharmacology** 154:557–568.

VESTERGAARD, M.; OKSBJERG, N.; HENCKEL, P. (2000) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. **Meat Sci.,** 54:177–185.

VESTERGAARD, M.; THERKILDSEN, M.; HENCKEL, P.; JENSEN, L.R.; ANDERSEN, H.R.; SEJRSEN, K. (2000b) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship between muscle fiber characteristics, fiber fragmentation and meat tenderness **Meat Science** 54:187-195.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; CROUSE, J. D. (1996) Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and Longissimus palatability **Journal of Animal Science** 74:1023-1035.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. AND SHACKELFORD. S. D. (1995) Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement [online]. Available at: http://192.133.74.26/MRU_WWW/protocol/WBS.html.

WHEELER, T. L.; SAVELL, J. W.; CROSS, H. R.; LUNT, D. K.; SMITH, S. B. (1990) Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **J. Anim. Sci.** 68:4206–4220.

WHELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M. (2000) Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. **Journal of animal science** 78: 958-965.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM. R. D. (1990) Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. **J. Anim. Sci**. 68:2716–2728.

ŽGUR, M. S.; ČEPON, S.; ČEPIN (2003) Influence of growth rate in two growth periods on intramuscular connective tissue and palatability traits of beef **Czech J. Anim. Sci.,** 48 (3): 113–119.

CAPÍTULO 3 – Efeitos da raça e da idade ao abate sobre o perfil transcricional do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos das raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*).

RESUMO - Apesar de se conhecer alguns dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento muscular e de amaciamento da carne, ainda não se tem um conhecimento global de todos os fatores que participam da manifestação dessa característica. O presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar o perfil do transcrissoma do músculo *Longissimus dorsi* de animais que possuem características contrastantes no desenvolvimento muscular e na maciez da carne (Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*)) em diferentes idades de abate. Foram identificados aproximadamente 850 e 350 genes diferencialmente expresso para as raças Angus e Nelore, respectivamente, nas duas idades de abate. Animais Angus apresentaram maior número de genes em todas as categorias funcionais de processos metabólicos (proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA e RNA) e apresentaram como categorias mais relevantes: regulação de secreção da insulina, diferenciação de células T-helper, atividade de ATPase, atividade de isomerase de esteróides e atividade de hidrolase, enquanto que animais Nelore apresentaram categorias relevantes como gliconeogênese, fosforilação de proteínas e aminoácidos, resposta a estímulos bióticos, translocação de proteínas nucleares STAT e migração de células glial. Também foi possível identificar redes de genes envolvidas com as características fenotípicas estudadas. A comparação dos resultados do presente trabalho com trabalhos anteriores indicaram 17 e 8 genes como possíveis genes candidatos para desenvolvimento muscular e maciez da carne, respectivamente.

Palavras-Chave: Bovinos, tecido muscular, Microarranjos, Transcrissoma.

Introdução

Em países de clima tropical, animais *Bos taurus indicus* são largamente utilizados devido à melhor produtividade das fêmeas, tolerância ao calor e resistência a parasitas exibido por animais dessas raças, o que tem feito deles parte valiosa da produção de carne nesses países, entretanto animais *Bos taurus indicus* são freqüentemente discriminados devido às percepções negativas do seu mérito de carcaça e palatabilidade quando comparados com animais *Bos taurus taurus* (King et al. 2006).

Os programas de melhoramento genético em bovinos tem buscado alternativas na seleção de animais *Bos taurus indicus* puros, que apresentam características desejáveis, comparáveis àquelas apresentadas por *Bos taurus taurus*, sem o inconveniente da má adaptação ao ambiente tropical, e têm conseguido um grande avanço no melhoria de diversas características produtivas, todavia, a eficiência desse método de seleção é bastante limitada quando se trata de características de difícil mensuração ou que não podem ser mensuradas diretamente (resistência a doenças, características de carcaça), que possuem baixa herdabilidade (fertilidade), ou ainda que apresentam correlações genéticas negativas (produção de leite e concentração de gordura no leite) (Schwerin et al. 1995).

Apesar de se conhecer alguns dos mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento muscular e de amaciamento da carne, ainda não se tem um conhecimento global de todos os fatores que participam da manifestação dessa característica. Dessa maneira, conhecer mais sobre diferenças genéticas, moleculares e bioquímicas entre raças e animais que apresentam estas diferenças é de extrema importância (Sudre et al. 2005).

A expansão da era genômica foi um fenômeno que ocorreu a nível mundial, resultando no crescimento significativo do número de espécies a terem seu genoma seqüenciado, incluindo os animais domésticos tais como bovinos, suínos e frangos. Estes conhecimentos irão contribuir mais rapidamente para a identificação de marcadores que serão úteis para o melhoramento animal, todavia

estes conhecimentos não elucidam por completo a forma de atuação dos genes na formação das diferenças fenotípicas.

Neste sentido, nos últimos anos a ciência genômica tem evoluído gradualmente para a descoberta de determinantes genéticas (genômica estrutural) e assinaturas genéticas (genômica funcional) (Hocquette et al. 2007). A genômica funcional, através do transcrissoma e do proteoma, é a vertente da genômica cujo foco está voltado para a elucidação das funções que cada gene exerce no organismo e, ao mesmo tempo, como esses genes interagem entre si dentro das redes biológicas que controlam as características fenotípicas (Furlan et al. 2007).

De acordo com Brown e Feder (2005), a variação na expressão gênica entre membros da mesma espécie é a matéria prima da evolução. Neste sentido, diversos trabalhos consideraram que a principal fonte de variação genética entre indivíduos pode ser atribuída às diferenças de expressão gênica, motivadas por alterações em regiões regulatórias, e não às diferenças localizadas nas regiões codificantes (Kohn et al. 2004; Wittkopp et al. 2004; Stamatoyannopoulos, 2004).

Assim sendo, estas duas subespécies de bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, constituem um modelo biológico ideal para o desenvolvimento de estudos comparativos de genômica funcional, visando à identificação de genes diferencialmente expressos e relacionados com a determinação das características fenotípicas contrastantes.

Embora o volume de publicações sobre o assunto ainda não seja expressivo para bovinos, a tecnologia de microarranjos já esta sendo utilizada em estudos de nutrição dos ruminantes, desenvolvimento muscular embrionário e acúmulo de gordura intramuscular (Sudre et al. 2003; Wang et al. 2008; Wang et al. 2005; Lehnert et al. 2007; Birne et al, 2005; Reverte et al. 2003). Além desses existem alguns trabalhos publicados que estudaram o trascriptomas de músculos de animais adultos em várias raças (Sudre et al. 2005; Bernard et al. 2007; Sadkowski et al. 2009).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar o perfil do transcrissoma do músculo *Longissimus dorsi* de animais das

raças Nelore (*Bos taurus indicus*) e Aberdeen Angus (*Bos taurus taurus*) que possuem características contrastantes no desenvolvimento muscular e na maciez da carne, em diferentes idades de abate.

Materiais e Métodos

O experimento zootécnico de campo foi desenvolvido nas dependências do setor de confinamento do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu/SP. Foram utilizados 24 animais machos inteiros *Bos taurus indicus* da raça Nelore e 24 animais machos inteiros *Bos taurus taurus* da raça Aberdeen Angus. Os animais foram desmamados (n=48) com pesos entre 200 e 230 Kg e transferidos para os currais de confinamento. Os grupos genéticos (n=24) foram alocados em baias coletivas cobertas, com área livre de 25 m^2 e disponibilidade de cocho de 1,0 m /cabeça. As baias eram providas de bebedouros e cochos para fornecimento de água e de mistura mineral. Foram alojados 5 animais por baia, sendo separados por raça estes receberam durante um mesmo período de 28 dias, uma dieta de adaptação. Após este período os animais passaram a dieta experimental que foi formulada de acordo com as normas do NRC (2000) para ganhos de peso diários acima de 1,4 Kg/dia. Sendo assim todos os animais foram terminados em confinamento dentro dos critérios estabelecidos pelo modelo biológico superprecose. O desenvolvimento dos animais foi acompanhado por pesagem a cada 28 dias, até a determinação do ponto de abate.

Os animais foram abatidos em dois períodos distintos, aos 15 meses quando os animais da raça Angus atingiram peso de abate de aproximadamente 450 Kg (15 arrobas) e 19 meses de idade quando os animais da raça Nelore atingiram este critério, em cada período foram abatidos doze (12) animais de cada grupo racial.

Uma semana antes de cada abate foram colhidas por biopsia amostras de 1,0 a 2,0 g de tecido dos músculos *Longissimus Dorsi* (Músculo Glicolítico) entre a

12ª e 13ª costela, estas foram subdivididas em amostras menores e mantidas a -80°C até a hora da extração de RNA.

Para extração do RNA total, utilizou-se 350 mg de tecido muscular seguindo o principio do reagente Trizol (Invitrogen) e o kit “PureLink Micro-to-Midi System” (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante e as amostras de RNAtotal assim obtidas foram imediatamente quantificadas e avaliada a qualidade das mesmas através de espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies) e de eletroforese capilar com o 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies), respectivamente.

Após a confirmação da qualidade do RNA total, 15 ug foram utilizadas para a síntese das fitas de DNA complementar (cDNA) dos RNAs mensageiros (mRNA) e posterior marcação com os corantes fluoroféros Alexa 555 e Alexa 647 (Invitrogen). Para isso utilizou-se o “kit SuperScript ™ Plus Indirect cDNA Labeling System” (Invitrogen) que contém um nucleotídeo aminoalil-modificado e uma aminohexil-modificada junto com outros dNTPs. Os passos foram os recomendados pelo fabricante, sendo modificado somente a forma de purificação do cDNA marcado na qual foram utilizadas colunas de “sephadex Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns” (GE healthcare), seguindo as diretrizes do fabricante dos fluoróforos, uma vez que estes deveriam ser purificados em tampão de separação PBS pH 7,2.

Os cDNAs marcados e purificados foram hibridados utilizando microarranjos de oligonucleotídeos longos (70 mers) de alta densidade (microarranjos) denominados BLO Plus, desenhados com bases nas seqüências de *Bos taurus taurus* que estão depositados no “GeneBank”, representando mais de 8.400 genes bovinos. Entretanto, como a anotação do genoma bovino ainda se encontra incompleta, a anotação da lâmina foi realizada com base em várias espécies, como mostrado na Tabela1 (GeneLink database - http://cafg.msu.edu) fornecidos pelo Centro de Genômica Funcional Animal (CAFG) da Universidade Estadual de Michigan (MSU).

Nesta etapa, foi utilizado uma estação de hibridização (“GeneTAC Hybridization Station Microarray Hybridization Chamber, Genomic Solutions, USA”), as hibridizações foram realizadas em sistema “stepdown” em três passos, seguindo as seguintes temperaturas, 42, 35 e 30 ºC por seis horas cada uma. Após esse processo, a estação realizou lavagens automáticas para a remoção das sondas não incorporadas.

Após as lavagens, as lâminas foram lidas em scanner GenePix4000B (Molecular Devices) para obtenção das imagens. Para este propósito foi utilizado o protocolo padrão segundo a recomendação do fabricante, com a preocupação de balancear e equilibrar previamente as intensidades dos sinais de verde e vermelho. Os dados de intensidade luminosa de cada spot para ambos os canais foram obtidos pelo próprio programa do equipamento. Para isso foi utilizado um arquivo contendo os nomes e posições de cada gene no arranjo.

Os dados gerados foram processados utilizando-se o pacote computacional LIMMA, desenvolvido em linguagem R (http://www.r-project.org/), o qual é oferecido sem qualquer custo a partir da website do projeto BioConductor (http://www.bioconductor.org/download). Dessa forma foram normalizados através da técnica de regressão local robusta LOWESS (Cleveland e Devlin, 1988), e os genes diferencialmente expressos foram analisados estatisticamente utilizando-se um teste F moderado, sendo ajustado, em decorrência da multiplicidade do teste, pelo procedimento de menor valor de FDR (“False Discovery rate”) e B-estatistico implementado pelo pacote LIMMA.

Tabela 1. Distribuição por espécies dos Entrez ID utilizados para a anotação do "BLO plus array".

A lâmina possui 9854 Entrez ID assim distribuídos	
N° genes	Espécies
5200	*Bos taurus*
2411	*Homo sapiens*
648	*Canis familiaris*
202	*Pan troglodites*
110	*Mus musculus*
105	*Sus scrofa*
57	*Rattus norvengicus*
35	*Ovis aries*
7	*Felix catus*
4	*Rattus sp.*
25	outros
12	desconhecidos

Os conjuntos de genes diferencialmente expressos foram analisados através de análises de agrupamento e caracterização funcional com base no banco de dados do "Gene Ontology" (GO). Para estas análises foram utilizados as ferramentas: "onto-express" (http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm) (Draguici et al. 2003), que compara a freqüência dos genes diferencialmente expresso em todas as categorias do GO bem como a freqüência dessas categorias em toda a lâmina; o programa DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp) (Dennis et al. 2003), que utiliza além da categorização do GO outras informações relevantes ao gene para formar conjuntos funcionais, ou seja grupos de genes que pertencem a uma mesma função e o programa Gene Ontology Tree Machine (http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm), que classifica e seleciona as categorias que apresentam maior número de genes observado do que o esperado (categorias enriquecidas).

Uma análise de redes de interação entre genes foi realizada utilizando o software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA; http://www.ingenuity.com, Redwood City, CA). Este aplicativo possibilita a descoberta, visualização e exploração de

interações em rede. Para tal, o software utiliza conhecimentos de relações entre genes/proteínas publicados em artigos científicos em humanos, ratos e camundongos.

Resultados

1) Diferenças fenotípicas

Baseado nos resultados de estudos prévios (Ferraz et al. 2009 – dados não publicados) a Figura 1 mostra a distribuição dos animais que tiveram a carne classificada como dura ou macia. Esta classificação é baseada em Abularach e colaboradores (1998) e Dikeman e colaboradores (2005) na qual uma carne é considerada dura se apresentar força de cisalhamento (FC) > 5,0 Kg e considerada macia se apresentar FC < 5,0 Kg. Os resultados mostram que os animais da raça Nelore apresentaram uma maior proporção de indivíduos com carne dura nas duas idades, quando comparados com animais da raça Angus. Porém, é preciso destacar que a maior diferença na maciez da carne entre as raças se verificou aos 19 meses de idade, quando aproximadamente 73% dos animais da raça Nelore apresentaram carne considerada dura, contra apenas 20% dos indivíduos da raça Angus.

Na Figura 2 podem ser vistos os resultados do ganho de peso diário (GD) dos animais das raças Angus e Nelore em cada um dos períodos estudados, onde se verifica que os indivíduos da raça Angus apresentaram desempenho superior aos da raça Nelore. De maneira que estes resultados evidenciaram que, na mesma idade e sob as mesmas condições de manejo e alimentação, os animais da raça Angus apresentaram uma taxa de crescimento 30% maior do que os da raça Nelore (1,12 e 0,86 Kg/dia, respectivamente), embora seja necessário ressaltar que, independente da raça, a maior taxa de crescimento se verificou no período dos 8 aos 15 meses de idade.

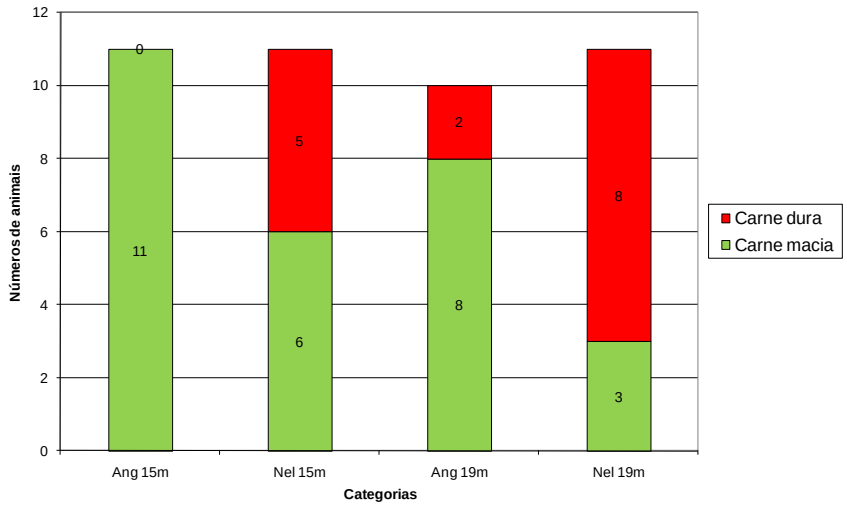

Figura 1 – Distribuição do número de animais conforme a maciez do músculo *Longissimus dorsi.*

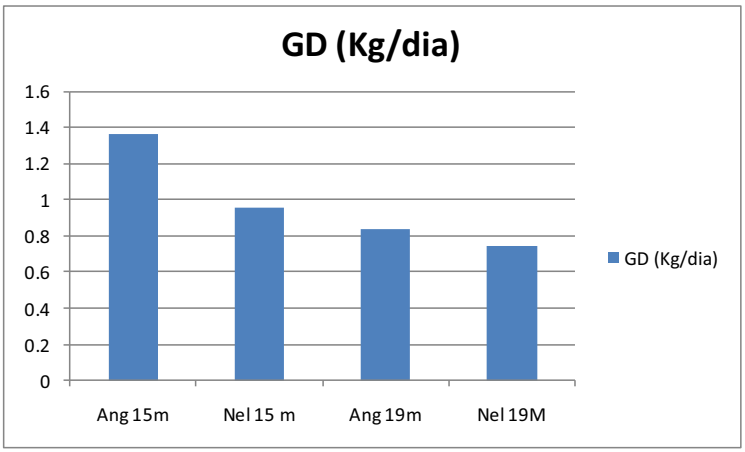

Figura 2 – Ganho de peso diário (GD) dos animais das raças Angus e Nelore nos dois períodos estudados (8 a 15 meses e 15 a 19 meses de idade).

2) Análise da expressão gênica diferencial

2.1) Resultados gerais dos ensaios de expressão gênica pela técnica de microarranjos de oligosnucleotídeos

Os resultados gerais de todas as análises efetuadas (análise estatística, classificação funcional e redes de interação gênica) encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo geral dos resultados das análises efetuadas

	15 meses		19 meses	
	Angus	Nelore	Angus	Nelore
Análise estatística				
Genes DE	857	374	856	347
Genes DE exclusivos	200	238	219	211
Variação do FC	1.29 a 3.44	1.32 a 2.46	1.31 a 3.11	1.33 a 2.85
Classificação funcional				
Processo Biológico	342	162	350	146
Proc. Biológicos Enriquecidos	16	17	9	22
Função Molecular	368	169	377	151
Func. Molecular Enriquecidos	9	3	17	5
Análise do IPA				
Redes gênicas	33	14	32	13
Vias de Metabolismo	1	5	1	5
Vias de Sinalização Crescimento	0	6	0	6

DE = Diferencialmente expresso; FC = “Fold Change”.

2.2) Análise estatística para identificação de genes diferencialmente expressos

Na Tabela 3 encontram-se discriminados os números de genes diferencialmente expressos selecionados dentro dos parâmetros estudados (raça e idade de abate) em cada um dos diferentes graus de confiabilidade estatística

utilizados: p-valor (p<0,05), FDR < 0,05, e B>0 vide Materiais e Métodos. Como esperado, estes resultados evidenciam uma diminuição no número de genes DE selecionados em função do aumento do grau de confiabilidade estatística utilizado. Contudo, este efeito parece ser mais pronunciado na raça Nelore do que na Raça Angus, haja vista que as reduções no número de genes selecionados na raça Nelore foram de aproximadamente 22%, 15% e 3,5% respectivamente quando se passou do menor para o maior grau de confiabilidade, enquanto que na raça Angus foi de 23%, 19% e 7,9%.

Tendo em vista que a estatística B é a que apresenta o maior grau de confiabilidade estatística, os grupos de genes diferencialmente expressos identificados por este método foram os selecionados para as análises de classificação funcional e de redes de interação gênica.

Tabela 3. Distribuição dos genes diferencialmente expressos de acordo com o grau de confiabilidade estatística.

			Genes DE		
		Total de oligos arranjados	P <0,05	FDR<0,05	B >0
15 meses	Angus	10179	2297	1843	857
	Nelore	10179	2125	1493	374
19 meses	Angus	10179	2436	1955	856
	Nelore	10179	2293	1673	347

Os grupos de genes selecionados para cada raça nas duas idades de abate estão apresentados sob forma de diagrama de Venn na Figura 4, onde é possível observar que apesar de a raça Angus possuir um maior número de genes DE em comparação com a raça Nelore, a maioria deles (637 genes) estão presentes em ambas as idades fazendo com que o número de genes DE exclusivos de cada raça em cada idade de abate seja bastante semelhante. Assim sendo, verifica-se que a grande diferença no número total de genes DE entre as raças se deve aparentemente a um menor número de genes comuns a ambas as idades de abate na raça Nelore.

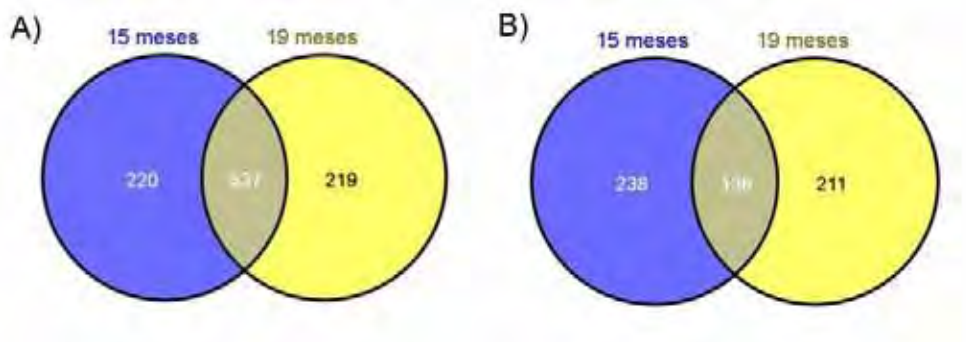

Figura 4. Diagrama de Venn da distribuição dos genes mais expressos A) Genes DE em animais Angus B) Genes DE em animais Nelore.
Oliveros (2007)

A lista com os genes diferencialmente expressos de maiores diferenças, se encontram na Tabela suplementar 1. Nesta Tabela é possível observar que dentre os vinte genes da Raça Angus que apresentaram maior diferença de expressão (maior "Fold Change") aos 15 meses, 14 deles (NBL1, MGC143374, BTN1A1, JUP, ATP6V0B, TES, MGC152269, LOC540045, PSMA1, Vps13c, DQX1, RGD1306917 e MGC139610) também se encontram entre os vinte genes com maior FC aos 19 meses. Por outro lado, somente dois genes (ITGB4 e MED6) estão selecionados como mais expressos nas duas idades na raça Nelore entre os vinte primeiros genes.

2.3 Categorização funcional

Na tabela de anotação da lâmina BLO Plus fornecida pelo fabricante estão presentes 9854 Entrez gene ID dos quais somente 8816 foram identificados pelos programas de anotação funcional (DAVID e Onto-express). Destes 4411 (46%), 4470 (51%) e 4119 (46%) foram classificados como Processos Biológicos, Função Molecular e Componente Celular, respectivamente. Proporções similares também foram observadas para os genes considerados DE no presente trabalho.

A distribuição dos genes DE nos principais processos metabólicos listados pelo Gene Ontology (GO) estão apresentados na Figura 5. Nesta é possível

verificar que, por possuírem um maior número de genes DE em relação a raça Nelore, os indivíduos da raça Angus também apresentaram maior número de genes dentro dos principais processos metabólicos. Contudo, dentro dos processos metabólicos de proteínas, DNA e RNAm, somente os animais da raça Nelore apresentaram discrepância no número de genes em função da idade de abate.

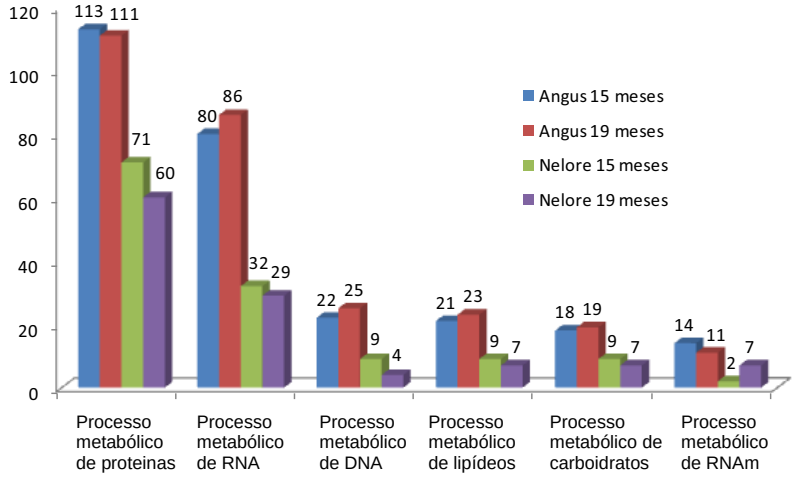

Figura 5. Distribuição dos genes entre as categorias de processos metabólicos do GO.

A distribuição dos genes DE dentro de outras categorias listadas no GO que apresentam relevância para a qualidade da carne e desempenho animal está apresentada na Tabela 4. De forma similar ao que ocorreu com os principais processos metabólicos, os animais da raça Angus apresentaram maior número de genes DE em todos os processos relacionados com estas duas características.

Cabe ressaltar que somente os animais da raça Angus apresentaram genes nas categorias atividade de hormônios, ativação de caspases e secreção de insulina, enquanto que apenas os indivíduos Angus abatidos aos 15 meses apresentam genes envolvidos com desenvolvimento de fibras musculares.

Tabela 4. Distribuição dos genes DE entre as categorias com maior importância para desenvolvimento e maciez da carne.

		Angus 15 meses		Angus 19 meses		Nelore 15 meses		Nelore 19 meses		
ID GO	Category	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count chip
GO:0045449	regulation of transcription	59	9.90	64	10.74	28	4.70	25	4.19	596
GO:0030154	cell differentiation	47	14.29	52	15.81	36	10.94	30	9.12	329
GO:0004871	signal transducer activity	41	8.07	43	8.46	41	8.07	30	5.91	508
GO:0006950	response to stress	30	7.73	35	9.02	21	5.41	16	4.12	388
GO:0005509	calcium ion binding	28	9.96	27	9.61	13	4.63	12	4.27	281
GO:0006508	proteolysis	23	10.04	18	7.86	13	5.68	9	3.93	229
GO:0006915	apoptosis	23	8.49	27	9.96	15	5.54	14	5.17	271
GO:0008289	lipid binding	19	17.12	16	14.41	8	7.21	6	5.41	111
GO:0008092	cytoskeletal protein binding	18	12.68	16	11.27	4	2.82	9	6.34	142
GO:0030246	carbohydrate binding	17	22.37	15	19.74	4	5.26	8	10.53	76
GO:0007186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	16	13.01	19	15.45	6	4.88	6	4.88	123
GO:0003779	actin binding	14	13.33	11	10.48	3	2.86	7	6.67	105
GO:0006461	protein complex assembly	13	20.63	17	26.98	2	3.17	2	3.17	63
GO:0008047	enzyme activator activity	12	13.95	14	16.28	3	3.49	3	3.49	86
GO:0008610	lipid biosynthetic process	11	13.25	12	14.46	4	4.82	0	0.00	83
GO:0030029	actin filament-based process	11	12.36	11	12.36	6	6.74	6	6.74	89
GO:0009888	tissue development	10	11.63	10	11.63	2	2.33	6	6.98	86
GO:0008202	steroid metabolic process	9	19.15	8	17.02	2	4.26	2	4.26	47
GO:0008083	growth factor activity	8	11.94	6	8.96	7	10.45	3	4.48	67
GO:0040007	growth	7	7.61	8	8.70	0	0.00	5	5.43	92
GO:0001501	skeletal development	6	15.38	6	15.38	3	7.69	2	5.13	39

GO:0046034	ATP metabolic process	6	31.58	5	26.32	0	0.00	2	10.53	19
GO:0005179	hormone activity	5	21.74	5	21.74	0	0.00	0	0.00	23
GO:0007517	muscle development	5	8.47	4	6.78	0	0.00	3	5.08	59
GO:0007599	hemostasis	5	13.51	4	10.81	3	8.11	2	5.41	37
GO:0005261	cation channel activity	4	8.89	4	8.89	2	4.44	0	0.00	45
GO:0005516	calmodulin binding	4	10.26	4	10.26	2	5.13	0	0.00	39
GO:0008203	cholesterol metabolic process	4	18.18	4	18.18	0	0.00	2	9.09	22
GO:0005496	steroid binding	3	15.00	0	0.00	2	10.00	0	0.00	20
GO:0006919	caspase activation	3	23.08	3	23.08	0	0.00	0	0.00	13
GO:0030073	insulin secretion	3	60.00	3	60.00	0	0.00	0	0.00	5
GO:0030414	protease inhibitor activity	3	5.77	3	5.77	6	11.54	3	5.77	52
GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	3	15.00	4	20.00	3	15.00	0	0.00	20
GO:0048747	muscle fiber development	3	15.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	20
GO:0006006	glucose metabolic process	3	8.57	7	20.00	2	5.71	3	8.57	35
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	3	4.23	6	8.45	4	5.63	4	5.63	71
GO:0006096	glycolysis	2	12.50	3	18.75	2	12.50	0	0.00	16
GO:0006631	fatty acid metabolic process	2	4.08	3	6.12	4	8.16	2	4.08	49
GO:0006766	vitamin metabolic process	2	8.00	2	8.00	2	8.00	2	8.00	25

Já pela análise de enriquecimento das categorias do GO (usando GO tree machine) (dados não mostrados), que leva em consideração o número de genes observados em relação do esperado para cada categoria, observa-se que as categorias regulação de secreção da insulina, diferenciação de células T-helper, atividade de ATPase, atividade de isomerase de esteróides e atividade de

hidrolase se mostraram enriquecidas nos indivíduos da raça Angus em ambas as idades estudadas.

Entretanto, para esta mesma raça as categorias atividade de oxiredutase, gametogênese, organização de peroxissomos e transporte, se mostraram enriquecidas somente aos 15 meses de idade, enquanto que as categorias sinalização mediada por fosforoinosídeos, atividade de helicase, atividade de metiltransferase e atividade de receptor de peptídeos estiveram enriquecidas exclusivamente aos 19 meses.

Por outro lado os animais da raça nelore apresentaram em ambas as idades o enriquecimento de categorias como gliconeogenese, fosforilação de proteínas e aminoácidos, resposta a estímulos bióticos, translocação de proteínas nucleares STAT e migração de células glial. Já as categorias biossíntese de proteínas e fase G1 da mitose, assim como regulação do sinal de transdução, desenvolvimento de tecidos, regulação da endocitose e transporte de ânions, mostraram-se enriquecidas somente aos 15 e 19 meses respectivamente.

2.4 Análise de redes metabólicas

Como pode ser observado na Tabela 2, foram identificadas aproximadamente 33 e 14 redes para as raças Angus e Nelore, respectivamente, em ambas as idades. Na impossibilidade de se avaliar todas elas foram destacadas dois agrupamentos de redes, uma aos 15 meses que englobam genes envolvidos no processo de desenvolvimento muscular (Figura 6) e outro aos 19 meses que contém genes envolvidos no processo de maciez da carne (Figura 7), ambos altamente relacionados com as diferenças fenotípicas apresentadas anteriormente.

Aos 15 meses foi possível observar que animais da raça Angus apresentaram uma maior quantidade de genes envolvidos com proliferação celular (EIF4E, E2F4, EDN1, GHR, CEP57, PTN, HOxC10, GDF9) e processo de

transcrição (POP7, LSM7, LSM10, SRRM2, PMF1), enquanto que animais da raça Nelore apresentaram genes relacionados com morte celular (IL1, RAC1, LAMB2, PLA2, IFNGR4, ANPEP).

Aos 19 meses foi possível observar que animais da raça Nelore apresentam um menor número de genes envolvidos no processo de proteólise (F2 e F11), bem como genes envolvidos com inibição desse processo (CAST e SERPINB). Além disso, esses animais apresentaram genes da família das integrinas (ITGB4, ITGAV, β-INTEGRINA), cuja função está relacionada com regulação de proteases, bem como os genes HSP70, BIN1, MTF1, PGLYRP1 que estão envolvidos com morte celular.

Por outro lado, animais da raça Angus apresentam maior número de genes envolvidos no processo de proteólise (CASP2, PLAT, UBE2G1, UBE2L3, ADAMTS4 e MMP15), assim como genes da família das actinas (ACTN1, ACTN4, α-actina, G-actina) envolvidos com a formação do tecido muscular. Outra família de genes DE mais abundante na raça Angus foram os da família HSP40 (DNAJB11, DNAJC14, DNAJC13), que estão envolvidos com conformação e transporte de proteínas e modificação de RNAm.

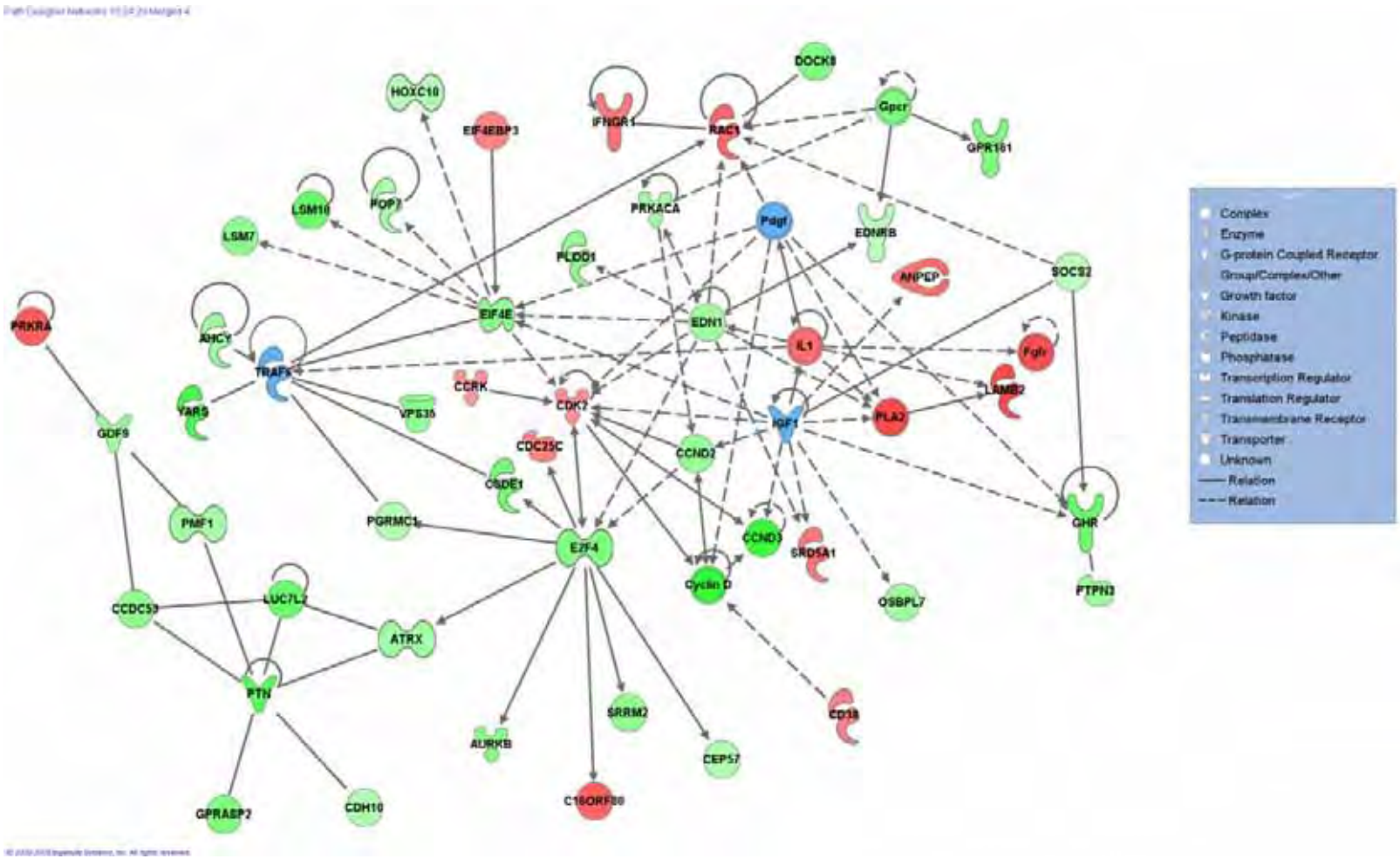

Figura 6. Agrupamento de redes de interação gênica formados por genes DE aos 15 meses (Verde = mais expresso em animais Angus; Vermelho = mais expresso em animais Nelore; Azul = presente na lâmina, mas não selecionado como DE); linhas cheias = interação forte; linhas segmentadas = relação mais fraca.

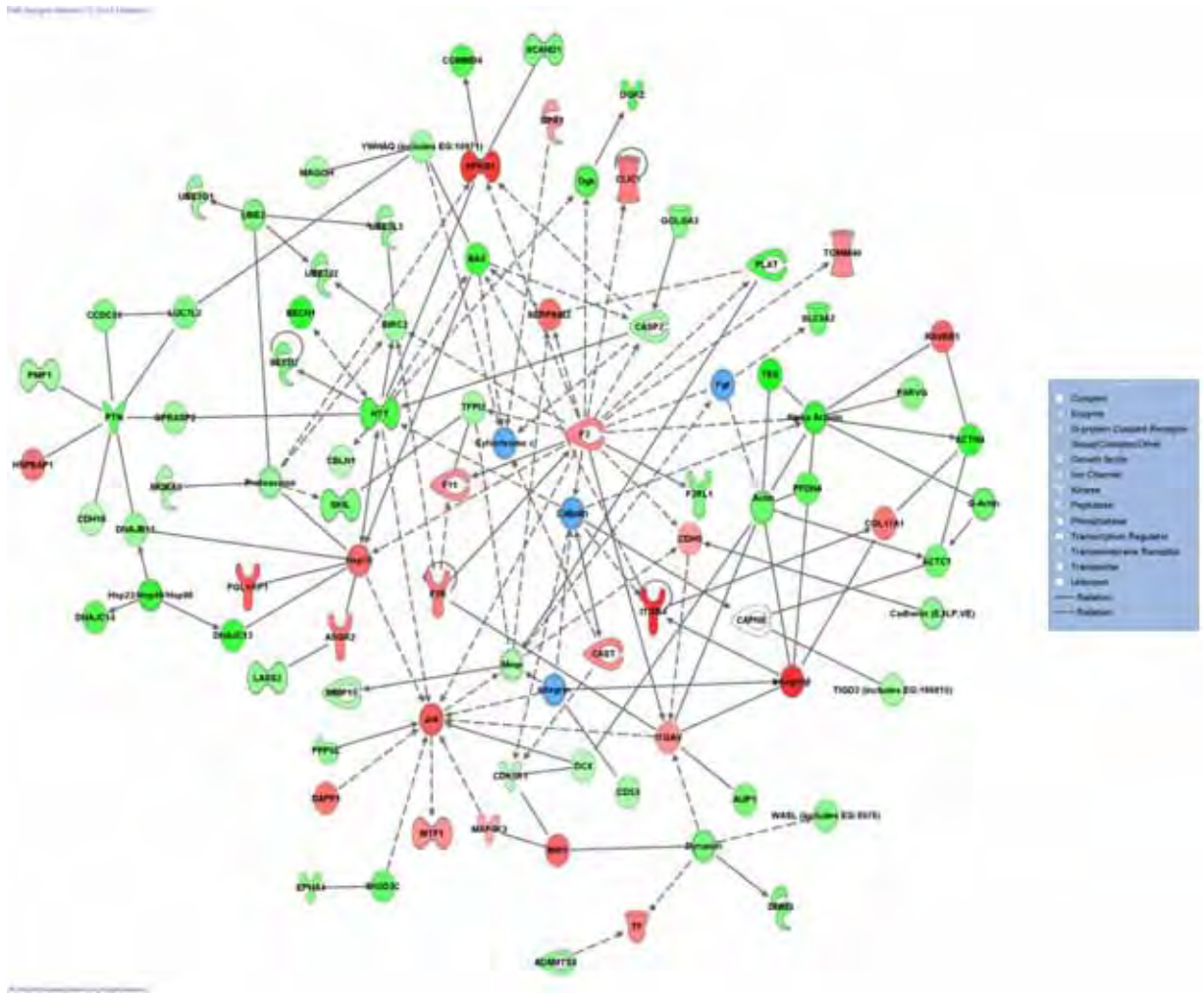

Figura 7. Agrupamento de redes de interação gênica formados por genes DE aos 19 meses (Verde = mais expresso em animais Angus; Vermelho = mais expresso em animais Nelore; Azul = presente na lâmina, mas não selecionado como DE); linhas cheias = interação forte; linhas segmentadas = relação mais fraca.

Discussão

Já faz algum tempo que os trabalhos de pesquisa vem demonstrando a existência de diferenças fenotípicas marcantes entre animais *Bos taurus taurus* (taurinos) e *Bos taurus indicus* (zebuínos), dentre as quais pode-se destacar a maior precocidade ou maior taxa de crescimento dos taurinos (Marshall, 1994; Franke, 1997, Frisch et al. 1997; Ferrel e Jenkins, 1998 e Sañudo et al. 2004) e a menor maciez da carne dos zebuínos (Crouse et al. 1987; Shackelford et al. 1991; Gallinger et al. 1992, Wheeker et al. 1996 e O´Conners et al. 1997). Não obstante, o volume de informações sobre os mecanismos genéticos que determinam tais diferenças, além de insignificante, é oriundo de estudos que utilizam os mais variados modelos biológicos e metodologias analíticas, dificultando a comparação dos resultados dos trabalhos realizados nessa área.

No presente trabalho, a utilização da técnica de microarranjos para estudo da expressão gênica permitiu a identificação de um número significativo de genes DE no músculo LD de taurinos e zebuínos que apresentaram diferenças fenotípicas quanto à taxa de crescimento e maciez da carne nas diferentes idades de abate.

Entretanto, ficou bastante evidente que o critério estatístico utilizado para seleção dos genes DE exerceu forte influência nos resultados obtidos, e que as ferramentas de bioinformática disponíveis apresentaram certa limitação quando utilizadas para análise funcional do transcrissoma da espécie bovina.

Análise Estatística

Independentemente do modelo estatístico utilizado, o grande desafio dos estudos de expressão gênica com microarranjos é o de se fazer uma estimativa precisa da proporção de genes verdadeiramente DE.

Dentre os modelos mais utilizados encontra-se o teste t, que estima o valor de p (ou p-value), que representa a probabilidade de que as diferenças

observadas tenham ocorrido ao acaso e não por influência das condições experimentais testadas. Entretanto, devido à multiplicidade de testes que são efetuados em cada experimento com microarranjos, uma vez que estes possuem milhares de genes, é bastante comum se gerar uma alta taxa de falsos positivos dentro do conjunto de genes identificados como DE (Rosa et. al., 2007). Na tentativa de se corrigir este tipo de erro, um dos procedimentos recomendados é a utilização do ajuste da significância pela Taxa de Falsos Positivos ou FDR (do inglês “False Discovery Rate”), que estima a proporção de falsos positivos esperados dentro do experimento e recalcula o valor do p-valor (p-valor ajustado).

No mesmo sentido, Lonnsterdt e colaboradores (2002), sugerem o uso de critérios mais robustos, utilizando inferências Baesianas para ordenar os genes pelo critério estatístico B, que utiliza a distribuição “a priori” dos resultados para estimar a probabilidade “a posteriori” de cada gene ser realmente DE. Tanto os resultados observados por esses autores, quanto àqueles reportados por Qin e colaboradores (2004), demonstram claramente que, quanto mais robusto o critério estatístico utilizado, menor é o número de falsos positivos entre os genes selecionados como DE.

Considerando-se os resultados da análise que utilizou o método estatístico mais conservador (B>0), verifica-se que a taxa média de genes DE identificados para o conjunto dos tratamentos (~6%), quando se considera o número de genes DE em relação ao total de oligonucleotídeos arranjados na lâmina, foi ligeiramente superior a encontrada por Rocha (2009), cujo valor médio foi de ~4,8 %, porém foi 3 vezes maior do que a quantidade relatada por Sadkowski e colaboradores (2009), que identificaram ~2,1% de genes DE quando compararam o transcrissoma do músculo *Semitendinoso* de animais com 12 meses de idade pertencentes a raças com diferentes aptidões produtivas (corte e leite).

Tais comparações exemplificam bem a influência que as variações metodológicas (p. ex. tipo de microarranjo, número de genes representados no arranjo, delineamento experimental, método estatístico utilizado, etc...) exercem sobre a proporção de genes DE identificados em cada trabalho.

Quando as metodologias são muito similares, como no caso de Rocha (2009), as diferenças nas taxas de genes DE são mínimas, porém tendem a aumentar à medida que as diferenças metodológicas se tornam maiores. É o caso dos resultados relatados por Sadkowski e colaboradores (2009) que, apesar de terem realizado procedimentos laboratoriais idênticos aos do presente trabalho, utilizaram músculo (Semitendinoso), microarranjo (feito de cDNAs, sem repetições na lâmina) e método estatístico totalmente diferentes. De maneira que as diferenças metodológicas dificultam sobremaneira as comparações dos resultados relatados na literatura com aqueles obtidos no presente trabalho.

Por outro lado, o elevado número de genes DE comuns a ambas as idades nos animais da raça Angus (667 genes), sugere fortemente que a expressão gênica no tecido muscular desses animais é mais estável do que naqueles da raça Nelore, que apresentaram apenas 136 genes comuns aos 15 e aos 19 meses de idade. Ou seja, diferentemente do que ocorre com os animais da raça Nelore, o perfil da expressão gênica no músculo LD dos animais da raça Angus não se altera de forma tão expressiva ao longo do tempo, uma vez que o número de genes DE exclusivos em cada idade é bastante semelhante entre as duas raças, enquanto que o número de genes DE comuns a ambas as idades na raça Angus é aproximadamente cinco vezes maior do que na raça Nelore (Figura 4).

Tal hipótese é ainda reforçada pelo fato de que 70% dos 20 genes DE com maior FC estão presentes em ambas as idades na raça Angus, enquanto que na raça Nelore, apenas 10% dos genes que tiveram maior FC foram selecionados como DE em ambas as idades de abate (Tabela Suplementar 1).

Genes Diferencialmente Expressos

Apesar de algum avanço no conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de crescimento muscular e amaciamento da carne, as informações disponíveis ainda são bastante escassas e fornecem uma visão fragmentada sobre esses assuntos. Contudo, alguns trabalhos que

utilizaram a tecnologia de microarranjos para estudar o transcrissoma no tecido muscular de bovinos estão contribuindo para melhorar o entendimento do papel exercido pelos genes na manifestação dessas características (Sudre et al. 2003; Sudre et al. 2005; Wang et al. 2005; Lehnert et al. 2007; Lee et al. 2007; Wang et al. 2008; Birne et al, 2005; Reverte et al. 2003; Bernard et al. 2007 e Sadkowski et al. 2009).

No presente trabalho foram identificados 1661 genes DE, sendo 1076 na raça Angus e 585 na raça Nelore, independentemente da idade de abate (Figura 4). Destes, 87 genes (~ 5 % do total) também foram identificados em outros estudos de transcrissoma do tecido muscular de bovinos.

Dentre os 87 genes DE acima citados, 17 deles (GHR, SREBF2, ANKRD1, TMSB10, COL24A1, CTNNBL1, ITGB4BP, ITGB1BP3, KCTD8, MTMR9, AKAP13, TRIP11, VAMP2, GOT1, ARL6, BECN1 e CDH4), apresentaram maior expressão em animais de maior desenvolvimento muscular, tanto no presente trabalho (nos animais da raça Angus), quanto naqueles da literatura cujo foco estava voltado para o estudo do desenvolvimento muscular e, assim sendo, podem ser considerados como candidatos para estudos de genética molecular.

O receptor do hormônio de crescimento (GHR) é um importante componente do eixo somatotrófico, o principal responsável pelo controle do crescimento muscular, cujo envolvimento com os mecanismos de atrofia e hipertrofia muscular já se encontra bem documentado na literatura (Sartorelli e Fulco, 2004; Solomon e Bouloux, 2006 e Sandri, 2008). Juntamente com o gene VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), o GHR também está relacionado com o desenvolvimento fetal, sendo que a expressão de ambos se mostra aumentada nos indivíduos que apresentam maior desenvolvimento muscular, como relatado por Listrat e colaboradores (2005) e Tajika e colaboradores (2008), respectivamente.

Ainda dentro desse grupo encontram-se genes que codificam fatores de transcrição, como o ANKRD1 (ankyrin repeat domain 1), cuja expressão é modulada pela miostatina e, portanto, está envolvido com o processo de

miogenese (Yang et al. 2005), assim como o ITGB4BP, também denominado EIF6 (eukaryotic translation initiation factor 6), que podem estar relacionados com o aumento da produção de proteínas celulares nos animais que apresentam maior taxa de crescimento.

Outros genes interessantes que se encontram inclusos nesse grupo são aqueles que codificam proteínas envolvidas nos processos de proliferação celular e apoptose, estando, portanto, relacionados com o controle do desenvolvimento muscular.

É o caso do gene MTMR9 (myotubularin related protein 9), que segundo Mei e colaboradores (2009), atua na regulação positiva da modulação do filamento de actina durante o desenvolvimento muscular e, possivelmente, participa da via de sinalização Hedgehog, que estimula a proliferação celular nos vertebrados, enquanto que os produtos dos genes CDH4 (cadherin 4) e ITGB1BP3 (integrin beta 1 binding protein 3) estão associados com a apoptose, com a inibição da miogenese (Kucharczak et al. 2008) e com a regulação negativa da diferenciação de mioblastos na célula (Sadkowski et al. 2008), participando, portanto, da regulação negativa do desenvolvimento muscular. Dois outros genes desse grupo que também estão relacionados com o controle negativo da proliferação celular são o TMSB10 (thymosin beta 10) e o BECN1 (beclin 1), cujas proteínas estão associadas ao processo apoptótico (Lee et al. 2001; Rho et al. 2005) e (Liang et al. 1999; Wang et al. 2007), respectivamente.

Estas observações sugerem que, mesmo nos animais que apresentaram maiores taxas de desenvolvimento muscular, como foi o caso dos pertencentes a raça Angus no presente trabalho, esse processo necessita ser controlado para que não haja um crescimento desordenado do tecido muscular. Por outro lado, é preciso lembrar que o crescimento muscular nos animais adultos se deve principalmente a hipertrofia e não a hiperplasia das células musculares. De maneira que estes genes relacionados com o apoptose e com o controle negativo da proliferação celular podem estar associados com outras funções relacionadas ao desenvolvimento muscular, que ainda não estão descritas na literatura.

Por outro lado, alguns genes pertencentes a esse grupo parecem estar relacionados com a precocidade na deposição de gordura corporal, haja vista que essa característica parece estar associada com o desenvolvimento muscular precoce em bovinos. É o caso dos genes CTNNBL1 (catenin, beta like 1) e ARL6 (ADP-ribosylation factor-like 6), que estão relacionados com a obesidade em humanos (Andreassen et al. 2009 e Vogel et al. 2009 e Fan et al. 2004; Schrick et al. 2006, respectivamente), assim como o do gene SREBF2 (sterol regulatory element binding transcription factor 2), cuja função está associada a homeostase do colesterol e de lipídeos e com a sinalização pela insulina (Kotska et al. 2004; Wang et al. 2005; Chittur et al. 2008).

Finalmente, não se sabe até o presente momento qual é o envolvimento que dois genes pertencentes a esse grupo, GOT1 (glutamic-oxaloacetic transaminase 1), que participa do metabolismo de aminoácidos, ciclo da uréia e de Krebs e KCDT8 (potassium channel tetramerisation domain containing 8), cujas funções ainda não foram descritas na literatura, possam ter com o processo de desenvolvimento muscular.

Com relação à maciez da carne, até a presente data existe somente um trabalho na literatura que utilizou a tecnologia de microarranjos para estudar diferenças na expressão gênica no músculo LD de animais que apresentavam características de qualidade de carne contrastantes (Bernard et al. (2007). Estes autores identificaram 146 genes DE relacionados com a maciez da carne, 8 dos quais (ANXA11, ANXA2, ASGR1, CCND2, CCND3, CCNJ, CASP2 e TPM4) pertencentes a famílias de genes que também se mostraram DE nos animais que apresentaram maior maciez da carne no presente trabalho (no caso, os da raça Angus), sugerindo que os genes que fazem parte dessas famílias deveriam ser considerados candidatos para futuros estudos de genética molecular relacionados com essa característica.

Alguns pesquisadores acreditam que o processo de amaciamento da carne é resultante da ação sinérgica de sistemas enzimáticos endógenos e, embora as principais peptidases desses sistemas ainda não tenham sido identificadas, este

processo poderia ser explicado pela morte celular programada (Herrera-Mendez, et al. 2006). Segundo Luciano e colaboradores (2007), existem alguns aspectos que são comuns aos dois processos (apoptose e amaciamento da carne), dentre os quais a inversão na polaridade da membrana, aumento na concentração do íon cálcio no citoplasma, que é necessário para ativação de diversas proteases, além de ser um importante efetor na sinalização e controle da apoptose. Os mesmos autores ressaltam que durante o estresse as células se defendem principalmente com a síntese de proteínas de choque térmico (HSPs), que possuem atividade anti-apoptotica, fato que explicaria a menor maciez da carne de animais que sofrem estresse antes do abate, que pode ocorrer tanto pela diminuição do pH, como pela inibição da apoptose celular.

Neste sentido, os genes da família anexina (ANXA2 e ANXA11) estão envolvidos com a proliferação celular e apoptose, sendo que ANXA2 está relacionada com sinalização de cálcio e a fosforilação da tirosina (Chiang et al.,1999). No mesmo sentido, as ciclinas D (CCND2 e CCND3) também estão envolvidas na estimulação do processo de proliferação celular. Ambas têm sido descrito na literatura como antiapoptoticos (Banerji et al 2001; Ausserlechner et al. 2004).

A CASP2 (Caspase 2) é membro da família de proteases acido cisteína-aspartico, e sua ativação tem o papel central de executar a fase de apoptose celular. Apesar do CCND3 ser relacionado com o estimulo da proliferação celular, quando este interage com o CASP2, ele potencializa a ativação da protease iniciando o processo de morte celular (Mendelsohn et al. 2002).

Por outro lado, existe uma correlação positiva entre taxa de crescimento muscular e a maciez da carne (Purchas et al. 2002 e Zgur et al. 2003), que depende principalmente da taxa de renovação protéica, ou seja, que o amaciamento da carne pode ser favorecido pelas proteases que participam desse processo, notadamente quando as taxas de síntese e degradação das proteínas celulares se encontram bastante elevadas.

Cabe ressaltar que o gene da tropomiosina 4 (TPM4) é uma proteína muito importante na organização dos filamentos de actina e, conseqüentemente na estruturação do tecido muscular e pode ser definido como um marcador citoesquelético de crescimento (Vlahovich et al. 2007) .

Por fim, até o presente momento não foi encontrado na literatura algum possível envolvimento dos genes, CCNJ (Cyclin J) e ASGR1 (asialoglycoprotein receptor 1) no processo de amaciamento da carne.

Categorização Funcional

Inicialmente, é preciso salientar que houve certa dificuldade em se fazer categorização funcional desses genes DE, uma vez que maioria dos programas disponíveis para tal função, inclusive os usados no presente trabalho (DAVID e o Onto-express), utilizam a terminologia padronizada (Ontologia) do *Gene Ontology* (GO), que faz a classificação funcional dos genes em três categorias: Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular, com o objetivo de sistematizar a descrição dos genes e das funções das proteínas na célula de forma padrão, para que possam ser aplicados a qualquer tipo de organismo.

Sucede que o banco de dados do GO ainda está incompleto, ou seja, nem todos os genes que já foram identificados e anotados nos diferentes organismos estão incluídos nas categorias ontológicas, fato que limitou a categorização funcional de boa parte dos genes DE identificados nesse trabalho. Embora 89,5% dos genes anotados representados no arranjo tenham sido identificadas pelos dois programas de categorização, somente cerca de 50% dos genes DE foram selecionados dentro de cada categoria ontológica. Não obstante o efeito aditivo que se observa no processo de categorização, que faz com que o percentual total de genes DE categorizados seja maior do que o observado individualmente em cada uma das três categorias ontológicas é inegável que houve uma perda significativa de informação neste tipo de análise.

Contudo, os resultados obtidos no processo de categorização reforçam ainda mais a hipótese de que a expressão gênica no músculo LD dos animais da raça Angus é mais estável ao longo do tempo, uma vez que estes não apresentaram grandes discrepâncias no número de genes DE dentro das categorias que representam os principais processos metabólicos (Figura 5), enquanto que os da raça Nelore, apresentaram maior variação no número de genes DE nas diferentes da idades de abate dentro das categorias que englobam genes envolvidos no metabolismo de proteínas, DNA e RNAm.

No tocante ao desenvolvimento muscular e qualidade da carne, os resultados da categorização funcional dos genes DE evidenciaram algumas diferenças marcantes entre as raças, bem como entre as idades de abate dentro da raça Angus (Tabela 4), sugerindo que o maior número de genes DE envolvidos com a atividade hormonal, secreção de insulina, bem como ativadores do mecanismo de apoptose podem estar relacionados com maior ganho de peso e maior maciez da carne apresentados pelos animais dessa raça. O possível envolvimento da secreção de insulina e do metabolismo de esteróides com estas características é reforçado pela análise de enriquecimento das categorias (dados não mostrado), na qual estas categorias se mostram enriquecidas na raça Angus em ambas as idades de abate.

Cabe ainda ressaltar que os animais da raça Angus também apresentaram maior número de genes relacionados com o metabolismo de proteínas, sinalização da transdução e com o metabolismo de ácidos nucléicos, categorias relacionadas com a taxa de renovação protéica e celular (Sartorelli, 2004), que podem ter favorecido o desenvolvimento muscular nesses animais, refletindo no maior GPD observado para esta raça, quando comparada com a Nelore. Resultados semelhantes foram relatados por Wang e colaboradores (2005) e Sadkowski e colaboradores (2009) que compararam o transcrissoma do músculo de animais pertencentes a raças bovinas com diferentes aptidões (produção de carne ou de leite) e observaram maior número de genes DE pertencentes a estas três categorias nos animais selecionados para produção de carne.

Por outro lado, a categoria sinalização mediada por fosfoinositídeos, que está relacionada com a proliferação celular e hipertrofia das células em diferentes tecidos, assim como com a mobilização de cálcio dentro da célula e, portanto, potencialmente relacionada com o crescimento muscular e a maciez da carne, se mostrou enriquecida somente nos animais da raça Angus que foram abatidos aos 19 meses de idade, enquanto que os genes pertencentes à categoria desenvolvimento de fibras musculares foram identificados somente nos animais da raça Angus abatidos aos 15 meses, sugerindo que os mesmos possam estar relacionados com a precocidade produtiva que é uma característica marcante dessa raça.

Isto posto, verifica-se que a categorização funcional se mostrou uma ferramenta pouco eficiente para auxiliar no entendimento de como os genes DE identificados nesse trabalho poderiam estar relacionados com os diferentes fenótipos observados nos animais das raças Angus e Nelore abatidos em diferentes idades. De maneira que foi necessário lançar mão de outra ferramenta de bioinformática, a montagem das redes de interações gênicas (Ingenuity Pathways Analisys - IPA), na tentativa de melhor elucidar a relação entre os genes DE e as características fenotípicas estudadas.

Redes de interações gênicas

Embora a análise IPA tenha identificado um número significativo de redes de interações formadas com os genes DE, tanto para os animais da raça Angus (n=33), quanto para os da Nelore (n=14), o fato das maiores diferenças no crescimento (GD) e na maciez da carne entre os animais das duas raças terem sido observadas aos 15 e aos 19 meses, respectivamente, fez com que se optasse por uma análise detalhada das redes de interação gênicas mais envolvidas com essas características fenotípicas em cada idade de abate (Figuras 6 e 7). Por outro lado, é preciso deixar claro que as inferências sobre a biologia destas duas características, tendo como base apenas o perfil do transcrissoma,

devem ser vistas com a devida cautela, pois, como já se sabe, o processo de tradução não tem uma relação direta com a quantidade RNAm específico de cada proteína presente na célula (Gygi et al. 1999, Chen et al. 2002).

Desenvolvimento Muscular (15 meses)

A análise da rede de interação dos genes relacionados com o crescimento aos quinze meses de idade evidencia a importância do eixo somatotrófico no controle dessa característica, sugerindo que o IGF-1 deve exercer um papel central no controle do desenvolvimento muscular, uma vez que está direta ou indiretamente relacionado com a atividade dos genes que se encontram nos principais pontos de entroncamento da rede e, dessa forma, pode influenciar na atividade da maioria dos genes que dela fazem parte. Além disso, o fato desse gene não se apresentar DE no músculo LD de nenhuma das raças estudadas sugere que o mesmo deve atuar de forma endócrina (IGF-1 produzido no fígado), e não de forma parácrina ou autócrina (IGF-1 sintetizado no próprio músculo).

Por outro lado, a maior expressão do gene GHR (receptor do hormônio de crescimento) nos animais da raça Angus indica que, possivelmente, o hormônio do crescimento (GH) também está envolvido na regulação dessa característica, uma vez que seu receptor está diretamente relacionado com o único regulador da tradução que faz parte dessa rede (EIF4E) e, à semelhança do que ocorre com o GHR, está DE somente nos animais da raça Angus.

É importante ressaltar que de forma diferente do que ocorreu nos animais da raça Nelore, a maioria dos genes presentes nessa rede se mostrou DE exclusivamente nos animais da raça Angus, inclusive aqueles que se encontram nos principais entroncamentos, onde estão posicionados um regulador da tradução (EIF4E), um regulador do ciclo celular (E2f4) e um ativador das vias de sinalização celular (EDN1), cujas funções estão relacionadas, entre outras, com a prevenção do apoptose, estimulação da proliferação celular e com o processo de hipertrofia, respectivamente.

Além disso, dentre os genes DE exclusivos dos animais da raça Angus que fazem parte da rede encontram-se 2 fatores de crescimento (PTN e GDF9), 4 reguladores da transcrição (E2F4, ATRX, HOXC10 e PMF1) e 1 da tradução (EIF4E), enquanto que os animais da raça Nelore não tiveram nenhum gene DE com essas funções essenciais para o desenvolvimento muscular.

De maneira que, além dos genes acima citados, há ainda uma predominância de genes relacionados com a proliferação e crescimento celular (PTPN3, GPR161, CCND2, CCND3), bem como com o aumento do processo de transcrição (POP7, LSM7, LSM10, SRRM2, PMF1), e conseqüentemente com o aumento na produção de proteínas musculares, que estão DE exclusivamente nos animais da raça Angus.

Por outro lado, esta rede de interações evidenciou que embora os animais da raça Nelore apresentem alguns genes relacionados com o crescimento e diferenciação celular (IL1, CDK2, CCRK), os mesmos possuem maior número de genes envolvidos com a morte celular (RAC1, LAMB2, FgFr, PLA2, ANPEP, IFNGR4), sugerindo que o tecido muscular destes animais tenderiam a ter número e tamanho de células menores do que os da raça Angus.

Tendo em vista que o músculo é um tecido altamente plástico e capaz de se adaptar as demandas funcionais (Velloso et al. 2008), e que a hipertrofia e atrofia musculares são processos biológicamente ligados, sendo que as poucas vias metabólicas que determinam se o tecido muscular responderá aos estímulos com o aumento da síntese protéica e crescimento celular (hipertrofia) ou com o aumento da degradação protéica e redução da prolifereação celular (Atrofia) são controladas pela atividade ou inatividade de um conjunto único moléculas (Sartorelli e Fulco, 2004), as informações contidas nessa rede de interações sugerem fortemente que a taxa de renovação protéica nos animais da raça Angus deve ser positivo e maior do que nos da raça Nelore, devendo ser um dos principais fatores que determinou a maior taxa de crescimento muscular apresentada pela raça Angus neste trabalho.

Maciez da Carne (19 meses)

Os fatores que afetam a maciez da carne são divididos em *ante-mortem* (raça, idade, sexo, dentre outros) e *post-mortem* (maturação, esfriamento da carcaça, pH da carne, dentre outros) (Sirol, 2007).

Alguns aspectos não enzimáticos, tais como: temperatura, pH e concentração de Ca^{2+}, influenciam o processo de amaciamento da carne no *post-mortem* (Takahashi, 1999), porém, segundo Koohmaraie e Geesink, (2006), a ação das proteases sobre as proteínas musculares, notadamente nas miofibrilas, são essenciais para esse processo. Segundo estes autores, são três os principais sistemas proteolíticos presentes no músculo que têm sido considerados responsáveis pelo amaciamento da carne: sistema calpaína-calpastatina, sistema das catepsinas, e complexo multicatalítico de proteases.

O sistema Ca^{2+} dependente calpaína–calpastatina, que é composto pelas proteases CAPN1, CAPN2 e CAPN3 (calpaínas), assim como pelo inibidor das duas primeiras, a CAST (calpastatina), é aquele que tem sido mais estudado até o momento (Whipple et al. 1990;Morgan et al. 1993; Koohmaraie, 1994; Geesink e Koohmaraie, 1999; Geesink et al. 2006). Segundo Hugues et al. (2001) as calpaínas são proteases que degradam as proteínas miofibrilares do músculo tais como: troponina T, desmina, conectina, titina, tropomiosina, nebulina e proteinas da linha M. Porém, as seqüências helicoidais da calpastatina impedem as calpainas de se ligarem as membranas resultando numa redução da degradação dessas proteínas e conseqüentemente diminuindo a maciez da carne (Mellgren et al. 1989).

Ainda que as duas calpaínas presentes no microarranjo BLO PLUS (CAPN1 e CAPN2) não tenham se mostrado diferentemente expressas em nenhuma das raças estudas, a maior expressão do gene da calpastatina observada nos animais da raça Nelore sugere uma possível relação desse inibidor do sistema com a menor maciez da carne apresentada por esse grupo de animais. Contudo, é preciso lembrar que as amostras de tecido muscular utilizadas na

análise do transcrissoma foram coletadas através de biópsias realizadas antes do abate. Assim sendo, é possível que tais resultados não representem exatamente o perfil transcricional que seria encontrado no tecido músculo no *post-mortem*, embora o estudo realizado por Pringle et al. (1997) tenha evidenciado que a atividade da calpastatina aumentava e a da calpaína se reduzia nos animais que apresentavam maior proporção de genes *Bos taurus indicus*.

Esta rede de interação dos genes relacionados com a maciez da carne evidencia ainda que o processo de proteólise deva estar mais ativo nos animais da raça Angus, que apresentam maior número de genes DE relacionados com a proteólise (PLAT, CASP2, MMP15, ADAMT54, UBE2G1 E UBE2L3) do que os da raça Nelore (F2 e F11), tendo ainda um número de inibidores menor (apenas o TFP12) do que os apresentados pela raça zebuína (CAST e SERPINB2). Além disso, os animais da raça Nelore apresentam maior número de genes da família das integrinas (ITGB4, ITGAV, β-INTEGRINA), os quais estão envolvidos com regulação da atividade das proteases.

Apesar de não estarem presentes nessa rede de interações, é preciso ressaltar que diversos genes da família do colágeno (COL4A6, COL6A3, COL11A1, COL12A1, COL17A1) se mostraram mais expressos nos animais Nelore e, segundo Bayley, (1985), a natureza e a extensão das ligações entre as moléculas do colágeno aumentam em função da idade, prejudicando o processo de amaciamento da carne.

De maneira que a maciez da carne é uma característica complexa, sendo determinada por uma série de fatores intrínsecos ao músculo, muitos dos quais podem ser influenciados não somente pela genética ou idade do animal, mas também por fatores externos. De fato, Koohmaraie (2003) afirma que, na comparação de raças distintas, somente 46% das variações na maciez da carne se devem à genética, enquanto os outros 54 % estão associados às variações ambientais.

Por outro lado, sedimenta-se cada vez mais a hipótese de que o amaciamento da carne é realizado por um complexo multienzimático composto

pelas calpaínas e outras enzimas com funções menos conhecidas (proteosomas e caspases), num processo que se assemelha à apoptose (Luciano et al. 2007), hipótese esta que é reforçada pelos resultados do presente trabalho, onde os animais que apresentaram carne mais macia (raça Angus), também tiveram maior número de proteases, menor número de inibidores de proteases, além de outros grupos de genes DE que estão relacionados com a conformação e transporte de proteínas (DNAJB11, DNAJC14, DNAJC13) e com a estruturação do tecido muscular (ACTN1, ACTN4, α-actina, G-actina), que podem interferir positivamente nessa característica.

Finalmente, deve-se ressaltar que os resultados já podem ser considerados validados com os resultados apresentados no trabalho anterior, no qual 4 genes (CAPN2, CAST, GHR e IGF1R) confirmaram o mesmo padrão de expressão do microarranjo quando avaliados pela técnica de qRT-PCR. Porém, mais genes devem ser avaliados para aumentar ainda mais a confiabilidade da validação.

Conclusões

- Embora utilizando um microarranjo no qual estavam representados aproximadamente 1/3 do total de genes presentes no genoma bovino, o uso de uma abordagem estatística mais conservadora para se analisar o transcrissoma do tecido muscular de bovinos que apresentaram taxa de crescimento e índice de maciez da carne divergentes, permitiu a identificação de um número significativo de genes DE entre os fenótipos estudados, mostrando que o transcrissoma do tecido muscular dessas duas raças bovinas é bastante distinto.

- A distribuição dos genes DE dentro dos tratamentos experimentais permitiu levantar a hipótese de que, comparados aos da raça Nelore, os animais da raça Angus apresentam maior estabilidade na expressão gênica ao longo do tempo.

- A análise funcional dos genes DE evidenciou novos mecanismos que podem estar relacionados com os processos de desenvolvimento muscular e/ou com o amaciamento da carne, permitindo ainda a seleção de dois conjuntos de genes que devem desempenhar papéis importantes na manifestação dessas características, cujos componentes estão sendo apresentados como candidatos para estudos de genética molecular.

- Os resultados obtidos no presente trabalho, notadamente aqueles gerados pela análise das redes de interações gênicas, robustecem ainda mais a hipótese emergente de que o amaciamento da carne é realizado por um complexo multienzimático, do qual fazem parte as calpaínas, cujo processo se assemelha muito ao da apoptose.

Referências

ABULARACH, M. L. S., ROCHA, C. E., FELÍCIO, P.E. (1998). Quality traits of boneless rib cut (L. dorsi muscle) from Nellore young bulls. **Ciência Tecnologia Alimento**. 18, 205-210.

ANDREASEN, C.H.; MOGENSEN, M.S.; BORCH-JOHNSEN, K.; SANDBAEK, A.; LAURITZEN, T.; ALMIND; K.; HANSEN, L.; JØRGENSEN, T.; PEDERSEN, O.; HANSEN, T. (2009) Studies of CTNNBL1 and FDFT1 variants and measures of obesity: analyses of quantitative traits and case-control studies in 18,014 danes. **BMC Medical Genetics,** 10:17.

AUSSERLECHNER, M.J.; OBEXER, P.; BÖCK, G.; GELEY, S.; KOFLER, R. (2004) CYCLIN D3 and c-myc control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. **Cell Death And Differentiation** 11:165–174.

BAILEY, A. J. (1995) The role of collagen in the development of muscle and relationship to eating quality Journal of animal science 60(6):1580-1587.

BANERJI, L.; GLASSFORD, J.; LEA, N. C.; THOMAS, N S. B.; KLAUS, G. G. B.; LAM, E.W.F. (2001) BCR signals target $p27^{kip1}$ and Cyclin d2 via the PI3-k signalling pathway to mediate cell cycle arrest and apoptosis of Wehi 231 B cells **ONCOGENE** 20(50):7352-7367.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; CUNFF, M. L.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **J. Agric. Food Chem.** 55, 5229-5237.

BROWN, R.T.; FEDER, M. E. 2005 Reverse transcriptional profiling: non-correspondence of transcript level variation and proximal promoter polymorphism. **BMC Genomics**, 6:110.

BYRNE, K. A.; WANG, Y. H.; LEHNERT, S. A.; HARPER, G. S.; McWILLIAM, S. M.; BRUCE, H. L.; REVERTER, A. (2005) Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction **Journal of animal science** 83, 1-12.

CHEN, G.; GHARIB, T. G.; HUANG, C. C.; TAYLOR, J. M.; MISEK, D. E.; KARDIA, S. L.; GIORDANO, T. J.; LANNETTONI, M. D.; ORRINGER, M. B.; HANASH, S. M.; BEER, D. G. (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol. Cell. Proteomics** 1: 304–13.

CHIANG, Y.; RIZZINO, A.; SIBENALLER, Z.A.; WOLD, M.S.; VISHWANATHA, J.K. (1999) Specific down-regulation of Annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation **Molecular And Cellular Biochemistry** 199:139-147.

CHITTUR, S.V.; SANGSTER-GUITY, N.; MCCORMICK, P.J. (2008) Histone deacetylase inhibitors: a new mode for inhibition of cholesterol metabolism. **BMC Genomics**. 29;9:507.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; TEDESCHI, L. O.; CHIZZOTTI, F. H. M. AND CARSTENS, G. E. (2007) Energy and protein requirements for growth and maintenance of F1 Nellore x Red Angus bulls, steers, and heifers **J. Anim Sci**., doi: 10.2527/jas.2006-632.

CLEVELAND, W. S. AND DEVLIN, S. J. Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. **Journal of the American Statistical Association** 83: 596-610.1988.

COFFEY, S.G. (2007) Prospects for improving the nutritional quality of dairy and meat products. **Forum Nutr** 60:183–195.

CROUSE, J. D.; SEIDMAN, S. C.; CUNDIFF, L. V.; (1987) The effect of carcass electrical stimulation on meat obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle **Journal of Food Quality** 10:407- 416.

DAVOLI, R. E BRAGLIA, S. (2008) Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality **Briefings In Functional Genomics And Proteomics Advance** DOI 10.1093/BFGP/ELM036.

DENNIS G. JR; SHERMAN, B.T.; HOSACK, D.A.; YANG, J.; GAO, W.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. **Genome Biology**;4(5):P3.

DIKEMAN, M. E., POLLAK, E. J., ZHANG, Z., MOSER, D. W., GILL, C. A., DRESSLER, E. A. (2005). Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for warner-blatzler shear force in three beef cattle breeds. **Journal of Animal Scien**ce. 83, 2461-2467.

DRAGHICI, S; KHATRI, P.; BHAVSAR, P.; SHAH, A.; KRAWETZ, S.A.; TAINSKY, M.A. (2003) Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. **Nucleic Acids Res**, 31(13):3775-3781.

FAN, Y.; ESMAIL, M.A.; ANSLEY, S.J.; BLACQUE, O.E.; BOROEVICH, K.; ROSS, A.J.; MOORE, S.J.; BADANO, J.L.; MAY-SIMERA, H.; COMPTON, D.S.; GREEN, J.S.; LEWIS, R.A.; VAN HAELST, M.M.; PARFREY, P.S.; BAILLIE, D.L.; BEALES, P.L.; KATSANIS, N.; DAVIDSON, W.S.; LEROUX, M.R. (2004) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-biedl syndrome. **Nature Genetics** 36:989 – 993.

FERRELL, C.; JENKINS T.G. Body composition and energy utilization by steers of diverse genotypes fed a high-concentrate diet during the finishing period: II. Angus, Boran, Brahman, Hereford, and Tuli sires. J. Anim. Sci., v.76, p.647-657, 1998.

FISHELL, V.K.; ABERLE, E.D.; JUDGE, M.D.; PERRY, T.W. (1985): Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth-rate. **J. Anim. Sci.**, 61:151–157.

FRANKE D.E. (1997) Postweaning performance and carcass merit of F1 steers sired by Brahman and alternative subtropically adapted breeds. **Journal of Animal Science** 75, 2604–2608.

FRISCH J.E. (1997) Breeding productive, adapted beef cattle for tropical regions. In 'Proceedings CEA '97 V Congreso Internacional De Transferencia Tecnologica Agropecuaria: Cria y Mejoramiento Genetico'. 24–25 November 1997, Paraguay, Associacion Rural Del Paraguay. pp. 137–162.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J. E BORTOLOSSI, J. C. (2007) A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas **R. Bras. Zootec**., v.36, suplemento especial, p.331-341.

GAO, Y.; ZHANG, R.; HU, X.; LI, N. (2007) Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Sci** 77:36–45.

GEESINK, G.H. AND M. KOOHMARAIE (1999) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by l-calpain under postmortem conditions. **J. Anim. Sci.**, 77: 2685-2692.

GEESINK, G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H. AND KOOHMARAIE, M. (2006) Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **J. Anim. Sci.**, 84:2834-2840.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R. AEBERSOLD, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cell. Biol.** 19:1720-1730.

HERRERA-MENDEZ, C.H.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A. AND OUALI, A. (2006) Meat Aging: Reconsideration of the current concept. **Trends Food Sci. Tech.**, 17:394-405.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. (2007) Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **The International Journal of Animal Biosciences**, v.1, p.159-173.

KING, D. A., MORGAN, W. W., MILLER, R. K., SANDERS, J. O, LUNT, D. K, TAYLOR J. F., GILL, C. A., SAVELL, J. W. (2006). Carcass merit between and among family groups of *Bos indicus* crossbred steers and heifers. **Meat Science,** 72, 496-502.

KOHN, M.H., FANG, S., WU, C.I. (2004) Inference of positive and negative selection on the 5' regulatory regions of Drosophila genes. **Mol Biol Evol**, 21(2):374-383.

KOOHMARAIE, M. AND GEESINK, G.H. (2006) Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Sci**., 74: 34-43.

KOOMARAIE, M (1992) The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie** 74:239-245.

KOOMARAIE, M (1994) Muscle proteinases and meat ageing. **Meat science** 36:93-104.

KOOMARAIE, M (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat science suppl**. 43:193-201.

KOOMARAIE, M (2003) Understanding and managing variation in meat tenderness. In Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40 Santa Maria Anais CD-ROOM.

KOTZKA, J.; LEHR, S.; ROTH, G.; AVCI, H.; KNEBEL, B.; MULLER-WIELAND, D. (2004) Insulin-activated erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. **J Biol Chem**. 279(21):22404-11.

KUCHARCZAK, J.; CHARRASSE, S.; COMUNALE, F.; ZAPPULLA, J.; ROBERT, B.; TEULON-NAVARRO, I.; PÈLEGRIN, A.; GAUTHIER-ROUVIÈRE, C. (2008) R-cadherin expression inhibits myogenesis and induces myoblast transformation via RAC1 GTPase. **Cancer Res**. 68: 6559-6568.

LEE, S-H.; PARK, E-W.; CHO, Y-M.; KIM, S-K.; LEE, J-H.; JEON, J-T.; LEE, C-S.; IM, S-K.; OH, S-J.; THOMPSON, J. M.; YOON, D. (2007) Identification of differentially expressed genes related to intramuscular fat development in the early and late fattening stages of Hanwoo steers **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. 40(5):757-764.

LEE, S.H.; ZHANG, W.; CHOI, J.J.; CHO, Y.S.; OH, S.H.; KIM, J.W.; HU, L.; XU, J.; LIU, J.; LEE, J.H.; LEE, S.H. (2001) Overexpression of the thymosin beta-10 gene in human ovarian cancer cells disrupts f-actin stress fiber and leads to apoptosis Oncogene 20:6700-6706.

LEHNERT, S. A.; REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; WANG, Y-H.; NATTRASS, G. S.; HUDSON, N. J.; GREENWOOD, P. I.; (2007) Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. **BMC Development biology.** 7:95.

LEME, P. R., BOIN, C., MARGARIDO, R. C. C., TEDESCHI, L. O., HAUSKNECHT, J. C. O'F. V, ALLEONI, G. F., FILHO, A. L. (2000). Growth performance in feedlot and carcass characteristics of beef cattle from several crossbreds slaughtered in three body weight ranges. **Brazilian Journal of Animal Science**. 29:2347-2353.

LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKES, B.; HIBSHOOSH, H.; LEVINE, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by BECLIN 1 **NATURE** 402:672-676.

LISTRAT, A.; HOCQUETTE, J.F.; PICARD, B.; MÉNISSIER, F., DJIANE, J.; JAMMES, H. (2005) Growth hormone receptor gene expression in the skeletal muscle of normal and double-muscled bovines during foetal development. **Reprod Nutr Dev**. 45(4):393-403.

LIU, Y.J.; LIU, X.G.; WANG, L.; DINA, C.; YAN, H.; LIU, J.F.; LEVY, S.; PAPASIAN, C.J.; DREES, B.M.; HAMILTON, J.J.; MEYRE, D.; DELPLANQUE, J.; PEI, Y.F.; ZHANG, L.; RECKER, R.R.; FROGUEL, P.; DENG, H.W. (2008) Genome-wide association scans identified CTNNBL1 as a novel gene for obesity. **Hum. Mol. Genet.** 17:1803-1813.

LUCIANO, F. B.; ANTON, A. A.; ROSA, C. F. (2007) Biochemical aspects of meat tenderness: a brief review **Arch. Zootec.** 56 (R): 1-8.

MARSHALL DM (1994) Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 72, 2745–2755.

MEI, J.; LI, Z.; GUI, J.F. (2009) Cooperation of mtmr8 with pi3k regulates actin filament modeling and muscle development in zebrafish. **PLOS ONE** 4(3): E4979.

MENDELSOHN, A.R.; HAMER, J. D.; WANG, Z. B.; BRENT, R. (2002) Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death **PNAS** 99(10):6871-6876.

MILLER, R. K. (2001) Avaliação instrumental da qualidade da carne. In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia da Carne. São Pedro, Anais CTC-ITAL 179-186.

MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. (1993) Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **J. Anim. Sci.** 71:1471–1476.

MULLEN, A.M.; STAPLETON, P.C.; CORCORAN, D.; HAMILL, R.M. WHITE, A. (2006) Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. **Meat Sci** 74:3–16.

NRC. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. (2000) updated 7. ed. Washington, DC: National Academy Press.

O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. (1997) Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **J. Anim. Sci.** 75:1822–1830.

OLIVEROS, J.C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html.

PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. (1997) Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **J. Anim. Sci.** 75:2955–2961.

PURCHAS, R. W.; BURNHAM; D. L.; MORRIS, S. T. (2002) Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers **J Anim Sci** 80:3211-3221.

REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; BRUCE, H. L.; WANG, Y. H.; DALRYMPLE, B. P.; LEHNERT, S. A. (2003) A mixture model-based cluster analysis of DNA microarray gene expression data on Brahman anda Brahman composite steers red high-, medium- and low-quality diets. **Journal of animal science** 81, 1900-1910.

RHO, S.B.; LEE, K.W.; CHUN, T.; LEE, S.H.; PARK, K.; LEE, J.H. (2005) The identification of apoptosis-related residues in human thymosin beta-10 by mutational analysis and computational modeling. **J. Biol. Chem**. 280 (40):34003-34007.

RILEY, D. G., JOHNSON, D. D., CHASE JR., C. C., WEST, R. L., COLEMAN, S. W., OLSON, T. A., HAMMOND, A. C. (2005). Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**. 70:347-356.

ROSA, G. J. M. ; ROCHA, L. B.; FURLAN, L. R. (2007) Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica **R. Bras. Zootec.**, 36 suplemento especial:185-209.

SADKOWSKI, T.; JANK, M.; OPRZADEK, J.; MOTYL, T. (2006) Age-dependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile **Journal of Physiology and Pharmacology** 57(7):95-110.

SADKOWSKI, T.; JANK, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRZADEK, J.; MOTYL, T. (2009) Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. **J. Appl. Genet.** 50(2):109-123.

SADKOWSKI, T.; JANK, M.; ZWIERZCHOWSKI, L.; SIADKOWSKA, E.; OPRZADEK, J.; MOTYL, T. (2008) Gene expression profiling in skeletal muscle of Holstein-Friesian bulls with single-nucleotide polymorphism in the myostatin gene 5´-flaking region. **J. Appl. Genet.** 49(3):237-250.

SANDRI, M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hypertrophy **Physiology** 23:160-170.

SAÑUDO, C., MACIE, E. S., OLLETA, J. L., VILLARROEL, M., PANEA, B., ALBERTÍ, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. **Meat Science**, 66, 925-932.

SARTORELLI, V. e FULCO, M (2004) Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy **Science STKE** ref11.

SCHRICK, J. J.; VOGEL, P.; ABUIN, A.; HAMPTON, B.; RICE, D. S. (2006) ADP-ribosylation factor-like 3 is involved in kidney and photoreceptor development **American Journal Of Pathology**. 168:1288-1298.

SCHWERIN, M.; BROCKMANN, G.; VANSELOW, J.; SEYFERT, H. M. (1995) Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement- An overview**. Animal Research and Development** 42:15-26.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; J. REAGAN, O. (1991) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **J. Anim. Sci**. 69:171–177.

SIROL, M. L. F. G. (2007) FATORES GENÉTICOS QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE, Material didático apresentada na disciplina Métodos de Avaliação da Qualidade de Carnes do prof. Prof. Roberto de Oliveira Roça http://dgta.fca.unesp.br/carnes/materialparadownload.php

SOLOMON, A. M. e BOULOUX, P. M. G. (2006) Modifying muscle mass – the endocrine perspective **Journal of Endocrinology** 191:349-360.

STAMATOYANNOPOULOS, J.A. 2004 The genomics of gene expression. **Genomics**, 84(3):449-457.

SUDRE, K.; CASSAR-MALEK, I.; LISTRAT, A.; UEDA, Y.; LEROUX, C.; JURIE, C.; AUFFRAY, C.; RENAND, G.; MARTIN, P.; HOCQUETTE, J. F. (2005) Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine skeletal muscles in Charolais bulls divergently selected for muscle growth . **Meat science**, 70:267-277.

SUDRE, K.; LEROUX, C.; CASSAR-MALEK, I.; PETIT, E.; LISTRAT, A.; AUFFRAY, C.; PICARD, B.; MARTIN, P.; HOCQUETTE, J. F. (2003) Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. **Journal of biochemistry**, 133:745-756.

TAJIKA, Y.; MURAKAMI, T.; SATO, M.; KUBOTA, F.; YORIFUJI, H. (2008) VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development **Developmental Dynamics** 237(7):1886 – 1892.

TAKAHASHI, K. (1996) Structural weakening of skeletal muscle tissue during postmortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. Meat Sci.,43:67-80.

THOMSON, B.C.; MUIR, P.D.; DOBBIE, P.M. (1999): Effect of growth path and breed on the calpain system in steers finished in a feedlot. **J. Agric. Sci.,** 133:209–215.

VELLOSO, C. P. (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I **British Journal of Pharmacology** 154:557–568.

VESTERGAARD, M.; THERKILDSEN, M.; HENCKEL, P.; JENSEN, L.R.; ANDERSEN, H.R.; SEJRSEN, K. (2000) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship between muscle fiber characteristics, fiber fragmentation and meat tenderness **Meat Science** 54:187-195.

VLAHOVICH, N.; SCHEVZOV, G.; NAIR-SHALIKER, V.; ILKOVSKI, B.; ARTAP, S. T.; JOYA, J. E.; KEE, A. J.; NORTH, K. N.; GUNNING, P. W.; HARDEMAN, E.C. (2007) Tropomyosin 4 defines novel filaments in skeletal muscle associated with muscle remodelling/regeneration in normal and diseased muscle **Cell Motility And The Cytoskeleton** 65(1):73 – 85.

VOGEL, C.I.; GREENE, B.; SCHERAG, A.; MÜLLER, T.D.; FRIEDEL, S.; GRALLERT, H.; HEID, I.M.; ILLIG, T.; WICHMANN, H.E.; SCHÄFER, H.; HEBEBRAND, J.; HINNEY, A. (2009) Non-replication of an association of CTNNBL1 polymorphisms and obesity in a population of central european ancestry. **BMC Medical Genetics**, **10:**14.

WANG, Y-H.; BYRNE, K. A.; REVERTER, A.; HARPER, G. S.; TANIGUCHI, M.; McWILLIAM, S. M.; MANNEN, H.; OYAMA, K.; LEHNERT, S. A. (2005) Trasncriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. **Mammalian genome.** 16:201-210.

WANG, Y-H.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; JAGER, N. D.; WANG. R.; McWILLIAM, S. M.; CAFÉ, L. M.; GREENWOOD, P. I.; LEHNERT, S. A. (2008) Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **J. Anim. Sci.** 0: jas.2008-1082v1-jas.2008-1082.

WANG, Z.H.; XU, L.; DUAN, Z.L.; ZENG, L.Q.; YAN, N.H.; PENG, Z.L. (2007) BECLIN 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer hela cells **Gynecologic Oncology** 107(1):107-113.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; CROUSE, J. D. (1996) Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and Longissimus palatability **Journal of Animal Science** 74:1023-1035.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM. R. D. (1990) Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. **J. Anim. Sci**. 68:2716–2728.

WITTKOPP, P.J.; HAERUM, B.K.; CLARK, A.G. (2004) Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. **Nature**, 430(6995):85-88.

YANG, W.; ZHANG, Y.; MA, G.; ZHAO, X.; CHEN, Y.; ZHU, D. (2005) Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 326(3):660-666.

ŽGUR, M. S.; ČEPON, S.; ČEPIN (2003) Influence of growth rate in two growth periods on intramuscular connective tissue and palatability traits of beef **Czech J. Anim. Sci.,** 48 (3): 113–119.

CAPÍTULO 4

Apéndices

1) Tabela suplementar 1

Tabela suplementar 1 – Lista dos vinte genes de maiores "fold change" para cada grupo estudado.

Genes DE para Animais Angus aos 15 meses			
GENE SYMBOL	GeneName	FC	FDR
MGC138117	similar to Dullard homolog	3.44	8E-04
NBL1	similar to neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1 precursor	3.24	9E-06
MGC143374	similar to B aggressive lymphoma gene	3.19	1E-05
BTN1A1	butyrophilin, subfamily 1, member A1	3.08	5E-07
TMEM55B	transmembrane protein 55B	3.08	4E-06
JUP	junction plakoglobin	3.03	6E-05
ATP6V0B	similar to Atp6v0b protein	2.99	1E-04
TES	similar to Testin (TESS)	2.86	1E-05
MGC152269	similar to keratin 20	2.81	4E-05
NDST2	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2	2.80	5E-06
ACTN4	actinin, alpha 4	2.792782	2E-05
LOC540045	hypothetical LOC25946	2.745997	4E-06
HD	similar to HD protein	2.741885	5E-05
PSMA1	similar to Proteasome subunit alpha type 1 (Proteasome component C2) (Macropain subunit C2) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C2) (Proteasome nu chain) (30 kDa prosomal protein) (PROS-30)	2.685517	2E-05
Vps13c	similar to mKIAA3021 protein	2.684722	3E-05
IRF2BP1	similar to interferon regulatory factor 2 binding protein 1	2.67478	5E-06
DQX1	DEAQ box polypeptide 1 (RNA-dependent ATPase)	2.674245	2E-05
RGD1306917	similar to RIKEN cDNA 2900010M23	2.664405	1E-05
LOC515836	similar to novel protein	2.649867	4E-06
MGC139610	similar to progesterone membrane binding protein	2.647856	3E-05
Genes DE para Animais Angus aos 19 meses			
JUP	junction plakoglobin	3.11	6E-05
NBL1	similar to neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1 precursor	2.86	3E-05
BTN1A1	butyrophilin, subfamily 1, member A1	2.83	2E-06
MGC143374	similar to B aggressive lymphoma gene	2.77	4E-05

EIF5AL1	similar to Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) (eIF-4D) (Rev-binding factor)	2.74	3E-04
MGC152269	similar to keratin 20	2.74	6E-05
ATP6V0B	similar to Atp6v0b protein	2.69	3E-04
TES	similar to Testin (TESS)	2.68	3E-05
DQX1	DEAQ box polypeptide 1 (RNA-dependent ATPase)	2.64	3E-05
LPHN3	latrophilin 3	2.64	5E-05
Vps13c	similar to mKIAA3021 protein	2.64	5E-05
Zic3	similar to zinc finger protein of the cerebellum 3	2.55	9E-05
PSMA1	similar to Proteasome subunit alpha type 1 (Proteasome component C2) (Macropain subunit C2) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C2) (Proteasome nu chain) (30 kDa prosomal protein) (PROS-30)	2.55	4E-05
MGC139610	similar to progesterone membrane binding protein	2.52	5E-05
LOC540045	hypothetical LOC25946	2.51	1E-05
TNFSF9	TUMOR NECROSIS FACTOR (LIGAND) SUPERFAMILY, MEMBER 9	2.51	4E-04
FLJ20436	similar to hypothetical protein	2.49	2E-04
BECN1	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	2.49	2E-05
TMEM55B	transmembrane protein 55B	2.41	3E-05
RGD1306917	similar to RIKEN cDNA 2900010M23	2.41	3E-05
Genes DE para Animais Nelore aos 15 meses			
ITGB4	similar to Integrin beta-4 precursor (GP150) (CD104 antigen)	2.46	9E-06
MED6	similar to RNA polymerase transcriptional regulation mediator, subunit 6 homolog (Activator-recruited cofactor 33 kDa component) (ARC33) (NY-REN-28 antigen)	2.23	2E-03
MGC133891	similar to chromosome 10 open reading frame 27	2.11	2E-04
RELN	reelin	2.07	1E-03
CITED1	transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	2.05	2E-05
RAI16	similar to RAI16 protein	2.04	1E-05
LOC504235	similar to dudulin 2 isoform a	2.03	3E-04
KITLG	KIT LIGAND	2.00	9E-05
DEF6	similar to differentially expressed in FDCP 6 homolog; IRF4-binding protein	1.98	3E-04
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	1.95	6E-04
NTNG2	netrin G2	1.95	1E-03
AHNAK	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	1.92	7E-04
SLC25A5	solute carrier family 25 member 5	1.92	2E-04
LOC540849	similar to YLP motif containing protein 1 (Nuclear protein ZAP3) (ZAP113)	1.92	3E-05
EEF1G	EUKARYOTIC TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 GAMMA	1.90	4E-05

LOC507100	SIMILAR TO TRANSCRIPTION FACTOR PU.1 (31 KDA TRANSFORMING PROTEIN)	1.90	3E-05
DNAJB5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	1.89	2E-04
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	1.89	8E-05
CAMK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	1.89	4E-05
AP4M1	adaptor-related protein complex 4, mu 1 subunit	1.89	3E-04
Genes DE para Animais Nelore aos 19 meses			
ODZ1	similar to Ten-m1	2.85	1E-03
NELL2	NEL-like 2 (chicken)	2.10	3E-03
MED6	similar to RNA polymerase transcriptional regulation mediator, subunit 6 homolog (Activator-recruited cofactor 33 kDa component) (ARC33) (NY-REN-28 antigen)	2.09	3E-03
C4BPB	COMPLEMENT COMPONENT 4-BINDING PROTEIN, BETA	2.06	2E-03
PDZD3	similar to intestinal and kidney enriched PDZ protein	2.06	3E-03
ITGB4	similar to Integrin beta-4 precursor (GP150) (CD104 antigen)	2.05	9E-05
NFKB1	similar to NFKB1	1.96	7E-04
ZNF462	zinc finger protein 462	1.96	2E-03
C16ORF80	likely ortholog of mouse gene trap locus 3	1.90	5E-04
SH3KBP1	similar to SH3KBP1 binding protein 1	1.89	2E-04
SLIT2	slit homolog 2 (Drosophila)	1.88	8E-05
PPP2R5A	similar to protein phosphatase 2, regulatory subunit B isoform 1	1.85	2E-04
LOC484784	similar to FLJ00341 protein	1.84	1E-04
USP40	similar to ubiquitin specific protease 40	1.84	2E-04
DGCR2	LOC458644	1.82	1E-03
MGC159395	similar to FLJ00052 protein	1.82	9E-05
TBK1	TANK-BINDING KINASE 1	1.82	1E-04
VPS13C	similar to VPS13C-2A protein	1.82	5E-04
ANKRD1	similar to cardiac ankyrin repeat protein	1.81	7E-04
CNC05000	similar to Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 (BFA-resistant GEF 1)	1.79	8E-04

2) TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO SANDWICH

PEREZ-ENCISO, MIGUEL, FERRAZ, A. L. J., OJEDA, ANA, LOPEZ-BEJAR, MANEL Impact of breed and sex on porcine endocrine transcriptome variability: A Bayesian biometrical analysis. BMC Genomics. , v.10, p.89 - , 2009.

FERRAZ, A. L. J., OJEDA, A., LOPEZ-BEJAR, M., FERNANDES, L. T., CASTELLO, A., FOLCH, J. M., PEREZ-ENCISO, M. Transcriptome architecture across tissues in the pig. BMC Genomics. , v.9, p.173 - , 2008.

3) MATERIAL E MÉTODOS DETALHADO

Animais

O experimento zootécnico de campo foi desenvolvido nas dependências do setor de confinamento do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu/SP. Foram utilizados 24 animais machos inteiros *Bos taurus indicus* da raça Nelore e 24 animais machos inteiros *Bos taurus taurus* da raça Aberdeen Angus. Os animais foram desmamados (n=48) com pesos entre 200 e 230 Kg e transferidos para os currais de confinamento. Os grupos genéticos (n=24) foram alocados em baias coletivas cobertas, com área livre de 25m2 e disponibilidade de cocho de 1,0 m /cabeça. As baias eram providas de bebedouros e cochos para fornecimento de água e de mistura mineral. Foram alojados 5 animais por baia sendo separados por raça estes receberam durante um mesmo período uma dieta de adaptação. Após este período os animais passaram a dieta experimental que foi formulada de acordo com as normas do NRC (1996) para ganhos de peso diários acima de 1,4 Kg/dia. Sendo assim todos os animais foram terminados em confinamento dentro dos critérios estabelecidos pelo modelo biológico superprecose. O desenvolvimento dos animais foi acompanhado por pesagem a cada 28 dias, até a determinação do ponto de abate.

Os animais foram abatidos em dois períodos distintos, aos 15 meses quando os animais da raça angus atingiram peso de abate de aproximadamente 450 Kg (15@) e 19 meses de idade quando os animais da raça nelore atingiram este critério, em cada período foram abatidos doze (12) animais de cada grupo racial.

Coleta e armazenamento das amostras de músculo

Uma semana antes do período de abate foram colhidas amostras de 1,0 a 2,0g de tecido dos músculos *Longissimus Dorsi* (Músculo Glicolítico) entre a 12a e 13a costelas estas foram removidos mediante procedimento cirúrgico, no qual os animais foram sedados com xilasina (Rompun® Bayer) na dose de 1mL para cada 100 kg de peso vivo, por via intramuscular. Foi realizada a tricotomia e anti-sepsia da região, utilizando solução a base de iodo. A anestesia local foi feita pela infiltração de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na dose média de 10 mL. O pós operatório consistiu de aplicação de antibiótico à base de penicilinas na dosagem de 10 mL/100 Kg de peso e curativos diários com solução iodada. A retirada dos pontos foi feita no décimo dia. As amostras de músculos foram divididas em sub-amostras de aproximadamente 250mg, embrulhadas em papel alumínio, devidamente identificadas, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Na seqüência estas amostras serão armazenadas em freezer –80º C para aguardar a posterior extração de RNA.

Todos os procedimentos foram realizados no setor de clínica de grandes animais do hospital veterinário da FMVZ UNESP de Botucatu sob a coordenação do Prof. Dr. Rogério Martins Amorim.

Extração de RNA total das amostras de músculo

Para extração do RNA total, utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) e o kit PureLink Micro-to-Midi System (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em síntese, aproximadamente 0,350 mg de tecido foram

transferidos para um tubo de polipropileno descartável de 15 mL contendo 4mL de Trizol (Invitrogen) e homogeneizado em ultra-turrax por 3 x de 40 segundos, com intervalos de 40 segundos no gelo.

Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno descartável de 1,5 mL (tipo eppendorf) e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Após este período adicionou-se 200 µL de BCP (1-bromo-3-chloropropane, Molecular Research Center, Inc. USA), incubando novamente a amostra, à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugando por 30 segundos a 12.000 x g para a separação das fases. Em seguida foi transferido para um novo tubo aproximadamente 600 µl da fase aquosa que continha o RNA total adicionou-se igual volume de etanol 70% (v/v) para manutenção da solução na concentração de 35% de etanol, neste ponto as amostras foram agitadas rapidamente para evitar a formação de precipitados. A solução foi transferida para as colunas com membrana a base de sílica, sendo centrifugada por 30 segundos a 12,000 x g, o processo foi repetido até que todas as frações dos 4 tubos foram passadas pela mesma coluna, após foi adicionado 350 µL de Wash Buffer I e novamente centrifugado por 30 segundos a 12,000 x g, descartando-se conteúdo do tubo coletor.

Para eliminar fragmentos de DNA residuais, utilizou-se 20 unidades da enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega) com seu respectivo 10X Reaction Buffer estes foram adicionados a coluna e incubado por 30 minutos a 38ºC. Após esse período completou-se a lavagem com 350µL de Wash Buffer I e centrifugando por 30 segundos a 12,000 x g. A coluna foi novamente transferida para um outro tubo e foi novamente lavada por duas vezes com 500µL de Wash Buffer II e centrifugação por 30 segundos a 12,000 x g. O RNA foi eluído de cada coluna, adicionando-se 50µL de água milliQ livre de RNAse aquecida a 46 ºC e centrifugação por dois minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.

As amostras de RNAtotal assim obtidas foram imediatamente quantificadas e avaliadas as respectivas qualidade.

Quantificação e verificação da qualidade dos RNAs extraídos

Para determinação da quantidade dos RNAs extraídos, todas as amostras foram quantificadas por meio da medida das absorbâncias nos comprimentos de ondas 260 e 280nm, em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies).

Para a determinação da integridade do RNA total foi avaliada a relação 28s/18s através de eletroforese em géis de agarose (1,5%) em condições desnaturantes, na qual uma alíquota correspondente a 2,5 μg de RNA total foi preparada com 1μg de brometo de etídeo e de 1X tampão de amostra (formamida 66,7%, formaldeído 8%, azul de bromofenol 0,4%), incubada a 65 °C durante 7 minutos e imediatamente aplicadas em gel de agarose fundida em tampão de corrida (MOPS 20 mM, pH 7,0, acetato de sódio 5 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0) e adicionado formaldeído, a fim de se obter a concentração final de 2,2 M (8%).

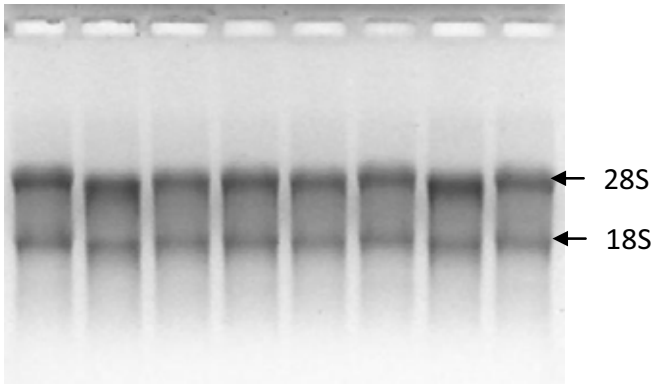

Figura 8 – Eletroforese para verificação da integridade do RNA total, apresentando as bandas 28s e 18s.

Síntese e marcação do cDNA para as Hibridações

Para realização da síntese das fitas de DNA complementar (cDNA) dos RNAs mensageiros (mRNA), utilizou-se o kit SuperScript ™ Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen) que contém um nucleotídeo aminoallyl-modificado e

uma aminohexyl-modificada junto com outros dNTPs. Foram utilizados 15ug de RNA total combinado com 5 ug de oligo-dT que foram incubados a 70ºC por 5 minutos para completo relaxamento das estruturas secundárias dos RNAs e em seguida colocados no gelo por 1 minuto para anelamento dos oligos dTs. A reação foi completada com 1X First-Strand buffer, 0,005M de DTT, 0,5 mM de dNTP mix (incluído os nucleotídeos amino-modificados), 40 unidades da enzima RNaseOUT™ e 800 unidades da enzima para transcriptase reversa (SuperScript™III RT) e incabadas a 46ºC, durante 3 horas.

Os moldes de RNAs foram removidos por hidrólise alcalina adicionando-se 15µL de NaoOH 1N a 70ºC por 10 minutos e em seguida as reações foram neutralizadas com 15µL de 1N HCl.

Para a remoção dos nucleotídeos não incorporados e resíduos da reação as amostras foram purificadas pelo sistema PureLink™PCR Purification System (Invitrogen), na qual o cDNA sintetizado foi misturado com Binding Buffer proveniente do kit, esta solução (cDNA/ Binding Buffer) foi transferida para uma coluna de afinidade que foi centrifugada a 3.300 x g por 1 minuto. Após foi realizado uma lavagem da coluna utilizando a solução Wash Buffer e centrifugando a 12.000 x g por 30 segundos. Os resíduos da lavagem foram removidos por centrifugação a máxima velocidade por 1 minuto.

O cDNA purificado foi obtido após duas eluições adicionando-se 25µL de água tratada com DEPC previamente aquecida a 46 ºC e incubado por 1 minuto, seguida por uma centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto e quantificados por meio da medida das absorbâncias nos comprimentos de ondas 260 e 280nm, em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies).

Nas reações de acoplamento o cDNA com amino-modificado foi marcado com o corante fluorescente N-hydroxysuccinimide (NHS)-ester através de ligações químicas. Para isso utilizou-se 2X Coupling Buffer suplido pelo próprio kit e os dyes (AlexaFluor 555 e AlexaFluor 647) sendo estes referentes ao cy3 e cy5 respectivamente, os corantes foram suspendidos em DMSO para a reação de

acoplamento ser otimizada, as amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

O produto do acoplamento também foi purificado para remoção dos corantes que não reagiram pelo sistema PureLink™PCR Purification System (Invitrogen). Para este fim foi utilizado o colunas de sephadex illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE healthcare), segundo as diretrizes do fabricante dos dyes, estes deveriam ser purificados em buffer de separação PBS pH 7,2 sendo assim as colunas do kit foram equilibradas com este tampão e as soluções contendo os cDNAs marcados foram diluidas com o mesmo, sendo em seguida passada através da coluna por 1 minuto a 750 x g.

O cDNA marcado recuperado foi também quantificado pelo espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies), quando o rendimento de cDNA marcado era >= a 200 ng de cada amostras estas eram combinadas e concentradas através de tubos de concentração Nanosep 30K Omega (PALL, Life Science). Após foram recuperadas com 40 µL de solução SlideHib 1 (Ambion) pré-aquecida a 70ºC sendo posteriormente adicionado 70 µL da mesma solução e mantidas a essa temperatura até o momento da aplicação nos “microarrays”.

Hibridação das lâminas de microarranjos de oligonucleotídeos com cDNAs marcados com fluoróforos

Os cDNAs marcados e purificados foram hibridados utilizando arranjos de oligos longos (70 mer) de alta densidade (microarranjos) desenhados com bases nas seqüencias de *Bos taurus taurus* que estão depositados no GeneBank, representando mais de 8.400 genes bovinos. Entretanto como a anotação do genoma bovino ainda se encontra incompleta, a anotação do chip foi realizada com base em várias espécies, como mostrado na Tabela1. As laminas foram adquiridas do Centro de genômica funcional animal (CAFG) da Universidade estadual de Michigan (MSU) /http://cafg.msu.edu).

O “chip” dispõe também de múltiplos “spots” que servem como controles positivos, nos quais estão depositados seqüências de genes que não apresentam

variação no padrão de expressão (PPIA, GAPDH, PGK1, RPL19, B2M, GUSB, RFLP2, 28S RNA, ACTB, 60S RNA), bem como de múltiplos “spots” para o controle negativo, nos quais estão depositados 10 seqüências artificiais cuidadosamente elaboradas (Stratagene “Alien” Genes) para não apresentarem hibridização. Os oligos longos (70 mers) que compõem o microarranjo foram sintetizados pela Operon Biotechnologies, Inc., com base em seqüências consenso depositadas no TIGR (The Institute for Genomic Research). Esta lamina foi adquirido junto ao Center for Animal Functional Genomics - Michigan State University, local onde foi desenvolvido a lamina de DNA bovino utilizado nos projetos do National Bovine Functional Genomics Consortium dos Estados Unidos.

As lâminas foram previamente tratadas com solução de SDS 1% e água milliQ, momentos antes da hibridização estas eram rehidratadas com vapor de água a 70 ºC e transferidas para uma estação de hibridização (GeneTAC Hybridization Station microarray hybridization chamber, Genomic Solutions, USA), que aquecia as laminas a 70 ºC para a aplicação da solução de hibridização.

Após a aplicação das sondas marcadas, as hibridizações foram realizadas em sistema de queda de temperaturas em três passos, seguindo as seguintes temperaturas, 42, 35 e 30 ºC por seis horas cada uma. Após esse processo, a estação realizou lavagens automáticas para a remoção das sondas não incorporadas, sendo a primeira com tampão de alta estringência (2 x SSC + 0,5% SDS) a 37 ºC, em seguida com tampão de média estringência (0,5 x SSC) a 25 ºC, passando para um tampão pós lavagem (0,05 x SSC) a 25 ºC e por último com água MilliQ a 42 ºC. Todos os tampões foram preparados no momento do uso. Cada lavagem foi realizada cinco vezes com duração de dois minutos cada, antes de passar para próxima solução. Posteriormente as lâminas foram secas por centrifugação a 1.000 RPM, em temperatura ambiente por 2 minutos, dentro de tubos cônicos de polipropileno com capacidade de 50 mL.

As lâminas foram estocadas e protegidas da luz até o momento da leitura em scanner GenePix4000B (Molecular Devices) para obtenção das imagens foi utilizado o protocolo padrão segundo a recomendação do fabricante com a

preocupação de balancear e equilibrar previamente as intensidades dos sinais de verde e vermelho alterando os “ganhos” em cada canal separadamente. Os dados de intensidade luminosa de cada spot para ambos canais foram obtidos pelo próprio software do scanner, para isso foi utilizado um “Gal.file” contendo os nomes e posições de cada gene na lâmina.

Normalização e análise estatística dos dados de microarranjos

Na etapa de elaboração de modelos estatísticos apropriados para a análise dos dados e interpretação dos resultados, o projeto contou com a colaboração de pesquisadores do Center for Animal Functional Genomics (CAFG) da Michigan State University.

Efeitos sistemáticos dos fluoróforos nas intensidades observadas em cada hibridização foram estudados utilizando-se o gráfico de dispersão M vs A construído para cada um dos microarrays, no qual cada par de ordenadas (X,Y) representa o logarítmico da relação de intensidades M = log (Cy3/Cy5) = logCy3 – logCy5 em função das médias das intensidade na escala logarítmica A = (logCy3+logCy5)/2 para cada um dos pontos (spots) do microarranjo, como descrito por YANG et al. (2002).

A correção de possíveis efeitos sistemáticos observados nos diagramas M vs A, usualmente denominada normalização dos dados, foi realizada através da técnica de regressão local robusta LOWESS (CLEVELAND e DEVLIN, 1988), implementada no pacote computacional LIMMA (SMYTH e SPEED, 2003). A eficiência da normalização com a técnica LOWESS foi avaliada pela monitoramento dos gráficos M vs A e dos diagramas de dispersão logCy3 vs logCy5 em cada um dos arranjos, antes e depois da normalização.

Os valores normalizados (ajustados) de M, logarítmico das relações de intensidades, foram então analisados estatisticamente utilizando-se um teste F moderado, no qual as estimativas dos erros-padrão para cada gene foram obtidas a partir de uma técnica de “shrinkage” utilizando-se um procedimento Bayesiano empírico para maior estabilidade nas inferências (SMYTH, 2004). Todas as

análises foram conduzidas utilizando-se o pacote computacional LIMMA, desenvolvido em linguagem R (http://www.r-project.org/), o qual é oferecido sem qualquer custo a partir da website do projeto BioConductor (http://www.bioconductor.org/download).

Para o ajuste do nível de significância em decorrência da multiplicidade de testes, referente a cada gene considerado no microarranjos, o procedimento descrito por STOREY (2003), definido como o menor valor de FDR para o qual uma determinada hipótese seria rejeitada (q-valor), tem sido amplamente usado em experimento de microarrays.

O pacote LIMMA também produz um índice estatístico chamado (B-estatístico) no qual estima a probabilidade de que o gene seja diferencialmente expresso, para isso assume-se que um B >= 0 corresponde a 50% de chance ou mais de este gene ser diferencialmente expresso (DE). Desse modo os genes considerados (DE) foram obtidos através da combinação das duas analises estatística valores de q-valor e B.

Síntese de cDNA para técnica de PCR quantitativo em tempo real

Os cDNAs utilizados nas analises de PCR quantitativo em tempo real foram sintetizados através de reação de trasncrição reversa (RT), com a utilização do kit comercial SUPERSCRIPT III FIRST-STRAND SYNTESIS SUPER MIX (Invitrogen). Para isso, em uma alíquota de 5 μg de RNA total foi adicionado 1 μL de Oligo dT (50 μM), 1 μL de Anneling buffer e se necessário, água tratada com DEPC completando o volume para 8μl. Ass amostra foram incubada a 65ºC por cinco minutos e em seguida colocadas no gelo. Foi adicionado 10 μL de 2X first-strand reaction Mix e 2 μL de Super script III RNA out enzime MIX e incubadas a 50ºC por 1 hora. Após esse período, para a inativação da enzima, as amostras foram incubadas a 85ºC por 5 minutos. As fitas moldes de RNA foram removidas por digestão com enzima RNAse H (1U). O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies) e em seguida foi estocado a -20ºC até o momento do uso.

Reação de PCR quantitativo em tempo real

A expressão dos genes B2M (beta-microglobulina), CAPN1 (Calpaína1), CAPN2 (Calpaína 2), CAST (Calpastatina), GHR (Receptor de Hormonio de crescimento), IGF-1 (Fator de crescimento semelhante a insulina 1) e IGF1R (Receptor de IGF-1) foram avaliadas pela técnica de PCR em tempo real. Para isso foram utilizadas 6,25μL do reagente POWER SYBR Green (Applied Biosystems), 0,6 μM de cada iniciador específico para cada gene, 30ng de cDNA (molde) e água MilliQ (ultrapura) autoclavada completando o volume final para 12.5 μl. A reação foi submetida ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7500 (Applied Biosystems), descrito a seguir: dois minutos a 50ºC, 10 minutos a 95ºC e quarenta ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 56ºC e 1 minuto a 72ºC. Por fim, foi empregado um ciclo final de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95ºC para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação.

Os valores de threshold cicle (Ct) foram obtidos utilizando-se o software ABI Prism 7500 SDS versão 1.1 (Applied Biosystems, USA). Os dados de expressão foram normalizados utilizando gene beta-2microglobulina (B2M) e os níveis relativos de expressão foram calculados de acordo com o método ΔΔCt (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados no qRT-PCR

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos	amplicon	Temp. Dissoc	GeneBank Acession
B2M-F	5'- TACCTTGGGTGCTACATGTCCAT-3'	70 pb	79°C	NM_173893
B2M-R	5'- CTGAAATTGTCTTCCCCACCTCTA-3'			
GHR-F	5' - GATTCATGCCGACATCCTAGTG- 3'	110 pb	76°C	NM_176608
GHR-R	5'- GGGTCTCATTTAGTTCTTTATAGTGCAGTT- 3'			
IGF1-F	5'- TGTGATTTCTTGAAGCAGGTGAA-3'	72 pb	78°C	NM_001077828
IGF1-R	5'- CAAGCACAGGGCCAGATAGAAG-3'			
IGF1R-F	5´-CCCTGGTGTTCCGAGTCTTG-3´	52 pb	78°C	XM_606794

IGF1R-R	5´-CCCCAGATAACCTCGTCAGAAG-3´			
CAPN1-F	5'- AACAGTTTGATGTTGACCGTTCA-3'	74 pb	81°C	NM_174261
CAPN1-R	5'- GAATCCTGCTGCCTCAAAGG-3'			
CAPN2-F	5´-AAACCCCCAGGGAAACCA-3´	64 pb	76°C	XM_864105
CAPN2-R	5´-TGTCATTAGCATTTTCCCCAAGT-3´			
CAST-F	5'- CCGAGCAGCCGCTGTTA- 3'	78 pb	83°C	NM_174003
CAST-R	5'- CCCAACTTCCATTAAGCCACAT- 3'			

Análises de maciez da carne

Por ocasião do abate foram colhidas secções transversais do músculo LD de 2,54 cm de espessura entre a 12a e 13a costelas da meia carcaça esquerda dos animais. Essas amostras foram embaladas em sacos plásticos a vácuo e após o resfriamento por 24 horas foram congeladas a -20°C até o momento da realização das análises de maciez da carne, mediante a determinação da força de cisalhamento e do índice de fragmentação miofibrilar (IFM), medida da área do músculo LD (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS).

As análises de maciez da carne por meio da força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar (IFM) foram executadas no Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu, SP.

A determinação da força de cisalhamento das amostras do músculo LD coletadas no abate dos animais foram realizadas segundo procedimento descrito por Wheeler et al. (1995). Brevemente, as amostras foram descongeladas sob refrigeração a 4°C durante 24 horas e quando apresentarem temperatura interna de 5 a 6°C foram assadas em forno elétrico até atingirem a temperatura interna de 71°C. Após este processo, foram retirados oito cubos de cada amostra. Esses cubos foram utilizados na determinação da força de cisalhamento em um Warner-Bratzler Shear Force (Chatillon) mecânico com capacidade de 25 kg, o valor considerado foi à média das oito medidas por amostra.

O índice de fragmentação miofibrilar da carne foi determinado de acordo com Culler et al. (1978). Foram retirados três cilindros de 1,27cm de diâmetro, destes foram utilizados gramas do músculo que foram homogeneizados em

triturador por 30 segundos, com 40 mL da solução de extração (KCl 100 mM, fosfato de potássio 20 mM, EDTA 1 mM, MgCl2 1 mM e azida sódica 1 mM). Em seguida, a solução homogeneizada foi centrifugada, por 15 minutos, a 1000 x g, a 4ºC. O precipitado foi ressuspendido em 40mL de solução de extração, agitado e centrifugado novamente, por 15 minutos, a 1000 x g, a 4ºC. Foi adicionados ao precipitado 10 mL de solução de extração e a suspensão obtida foi submetida a peneira de polietileno para remoção do tecido conectivo. Para facilitar a obtenção das miofibrilas foi adicionado mais 10 mL da solução de extração. Nesta suspensão de miofibrilas foi determinada a concentração de proteína pelo método do biureto, descrito por Gornall et al. (1949). Uma alíquota da suspensão de miofibrilas foi diluída com a solução de extração até uma concentração protéica de 0,5 ± 0,05 mg/mL e realizada a leitura da densidade ótica a 540 nm em espectrofotômetro. Para obtenção do índice de fragmentação miofibrilar, o valor obtido de densidade ótica a 540 nm foi multiplicado por 200.

A área do olho de lombo foi medida diretamente na carcaça utilizando uma gride de plástico quadriculado (padrão USDA), e a espessura de gordura foi medida no terço médio da secção transversal utilizando um paquímetro.

Os resultados de desempenho, maciez e expressão gênica foram avaliados por intermédio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2004) e os dados foram submetidos á analise de variância, por intermédio do procedimento GLM, foi também realizada uma analise se correlação entre as variáveis por intermédio do procedimento COR, para as analises foi considerado no modelo raça (Angus e Nelore) e idade ao abate (15 e 19 meses).