

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

POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS
E SUAS RELAÇÕES COM O CRESCIMENTO E AS
CARACTERÍSTICAS DA CARNE EM BOVINOS NELORE
(Bos indicus)

Cruz Elena Enriquez Valencia
Zootecnista

2016

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

**POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS
E SUAS RELAÇÕES COM O CRESCIMENTO E AS
CARACTERÍSTICAS DA CARNE EM BOVINOS NELORE
(*Bos indicus*)**

Cruz Elena Enriquez Valencia

Orientador: Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo

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

E59p Enriquez Valencia, Cruz Elena
Polimorfismo e expressão de genes candidatos e suas relações com o crescimento e as características da carne em bovinos nelore (*Bos indicus*) / Cruz Elena Enriquez Valencia. -- Jaboticabal, 2016
vi, 60 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Luis Artur Loyola Chardulo
Banca examinadora: Saulo da Luz e Silva, Henrique Nunes de Oliveira, Simone Cristina Méo Niciura, Rogerio Abdallah Curi
Bibliografia

1. Calpastatina. 2. Miosina. 3. Fibras musculares. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS E SUAS
RELAÇÕES COM O CRESCIMENTO E AS CARACTERÍSTICAS DA CARNE EM
BOVINOS NELORE (*Bos indicus*)

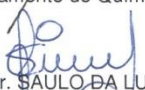
AUTORA: CRUZ ELENA ENRÍQUEZ VALENCIA

ORIENTADOR: LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



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



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



Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora SIMONE CRISTINA MEO NICIURA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP



Prof. Dr. ROGERIO ABDALLAH CURI
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Botucatu

Jaboticabal, 24 de junho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CRUZ ELENA ENRIQUEZ VALENCIA - nascida em 09 de agosto de 1985, na cidade de La Florida Nariño-Colômbia, filha de Pedro Gusman Enriquez Fajardo e Concepción de Jesus Valencia Acosta. Em Julho de 2008 obteve o título de Zootecnista pela Universidade Nacional de Colômbia, campus de Palmira Valle del Cauca. Em agosto de 2009, ingressou no curso de Mestrado, no Programa de Pós-graduação em Produção Animal Tropical na faculdade de Ciências Agropecuárias, Universidade Nacional de Colômbia Campus Palmira Valle del Cauca, sob orientação da Profa. Dra. Liliana Serna Cock e coorientação do Prof. Dr. Rómulo Campos Gaona, obtendo o título de Mestre em dezembro de 2011. Em agosto de 2012, iniciou o doutorado em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal - SP como bolsista do programa PAEDEX - UNESP (Programa de apoio a estudantes de doutorado do exterior), sob orientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo.

*“O único homem que está isento de erros,
é aquele que não arrisca acertar”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

A DEUS que me deu a vida, a saúde e a coragem nas circunstâncias adversas.

Aos meus pais amados, PEDRO E CONCEPCIÓN pelo seu desmedido amor, sua incessante dedicação e todo esse interminável sacrifício para me ensinar, formar e me orientar. Vocês ultrapassaram a posição dos melhores pais. Eternamente, vocês meu maior amor, amor imprescindível, amor indestrutível, amor sem limites, amor sem fim.....

Vocês minha maior motivação!!!!.

Aos meus irmãos, ALEIDA, PERE, MONICA, JUAN E AYDA e meus sobrinhos Viviana, Gatica, Adriam, Sebas, Jestin e Paula que com seu amor e incentivo, sempre me apoiaram, acompanharam e possibilitaram atingir este objetivo.

A família Valencia Muñoz, pelo seu apoio e carinho nos momentos mais críticos da minha vida especialmente para meu primo Alvaro Valencia (em memória). Sempre levarei vocês no meu coração.

A meu amor Wilmar pelo seu amor, carinho e apoio nesta etapa.

Dedico....

AGRADECIMENTOS

A Unesp e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal pela oportunidade e pelo crescimento acadêmico e científico que me proporcionaram durante minha formação doutoral.

Ao programa de apoio a estudantes de doutorado do estrangeiro (PAEDEx-UNESP) e a Associação Universitária Iberoamericana de pós-graduação (AUIP) pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo, pela oportunidade, amizade, carinho, compreensão e orientação.

Ao Professor Jesus Aparecido Ferro e a Professora Maria Inês Tiraboschi Ferro pela oportunidade e disponibilidade do laboratório de biologia Molecular do departamento de Tecnologia Unesp/Jaboticabal.

A Professora Maeli Dal Pai Silva pelas sugestões, conselhos e disponibilidade do laboratório de biologia do músculo estriado do departamento de Morfologia Unesp/Botucatú.

Ao professor Fernando Broetto pela amizade e disponibilidade do laboratório de química do departamento de química e Bioquímica Unesp/Botucatú.

Aos todos meus professores que participaram no meu crescimento acadêmico compartilhando comigo seus conhecimentos especialmente aos professores Luis Artur Loyola Chardulo, Henrique Nunes de Oliveira, Rogério Abdallah Curi, João Ademir de Oliveira e Gener Tadeu Pereira.

Aos componentes da banca examinadora de qualificação, Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi, Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva e o Prof. Dr. Fernando Sebastian Baldi Rey pelas relevantes sugestões que contribuíram a subir as últimas escadas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos componentes da comissão examinadora de defesa de Doutorado, Prof. Dra. Simone Cristina Méo Niciura, Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi e Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, pelas orientações e sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

As bruxas, Sol e Lume, minhas irmãs de coração, pela amizade, e pelo carinho durante todo este tempo de doutorado.

A Daiane, a pessoa com quem compartilhamos nossos primeiros anos do curso, riu e chorou junto comigo, mas sobre todo cada dia se esforçou em aperfeiçoar minha fala no Português. Mesmo agora estando longe, sempre grata com você!!.

A minha colega e amiga Jessica Malheiros que desde o início sempre me brindou seu apoio, foi paciente, esteve nos bons e maus momentos. Rimos junto, ficamos estressadas junto e solucionamos coisas junto... Obrigada por tudo isso Jessica!!!. Você sempre uma admirável pessoa.

Aos todos os meus colegas do laboratório de biologia Molecular, principalmente a Larissa, Daniele, Fernanda, Aline, Flávia, Raquel, Fernando e Helen pela grande ajuda, sugestões, carinho e apoio nessa primeira fase experimental.

Aos todos os meus colegas do laboratório de biologia do músculo estriado, especialmente a Ivan Vechetti e Bruno Duran pela sua paciência e ajuda nas diferentes análises de laboratório. Obrigada pelo grande suporte e amabilidade!!

Aos todos os meus colegas do laboratório de química, especialmente a Renata e o Edilson que mesmo não sendo do seu grupo, me acolheram e fizeram formar parte dele. Seu acolhimento, brincadeira e carinho tornaram meus dias de trabalho em Botucatu mais interessantes e sustentáveis. Gosto muito de vocês!!.

Aos todos meus amigos da Colômbia, Cuba e Venezuela vinculados na Unesp Jaboticabal, especialmente a Sol, Lume, Gusta, Dasmi, Fer, Colo, Wilmar, Ricardo, Yury, Dianis, Jessica, Lore, Any, Andrés, Elena, Yani, Elwi, Doni, Naudin e Orlando pela amizade, companheirismo e todos aqueles momentos compartilhados de futebol, festas e sorrisos durante todo este tempo de estudo. Obrigada por tudo gente!!!.

Aos meus irmãos e sobrinhos por cuidarem de meu maior tesouro (meus amados pais) durante todo o tempo que eu fiquei longe deles. Isso não tem preço e nunca poderei-lhes recompensar.

A todos os colegas de curso...

À vocês todos, meu grande apreço e enorme gratidão

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
CAPITULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Características gerais do músculo esquelético	4
2.2 Classificação e caracterização do tipo de fibra muscular	6
2.3 Características biológicas das fibras musculares.....	7
2.4 Tipo de fibra e crescimento muscular	9
2.5 Miosina.....	10
2.6. Tipo de fibra muscular e sua associação com as características de qualidade da carne	11
2.7 Transformação do músculo em carne e complexo Calpaína	13
2.8 Marcadores moleculares da Calpastatina	14
3. REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2 – Efeito do SNP g.98535683A>G do gene <i>CAST</i> sobre características da carne em bovinos de corte Nelore (<i>Bos indicus</i>) e em seus cruzamentos com <i>Bos taurus</i>	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Animais	28
2.2. Coleta de amostras e fenotipagem	29
2.3. Extração do DNA e genotipagem.....	30
2.4. Cálculo de frequências e análise de associação.....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4. REFERÊNCIAS	36
CAPITULO 3 – Expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina (MyHC) em bovinos Nelore com características contrastantes de crescimento e maciez da carne	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Produção e manejo dos animais experimentais.....	40

2.2 Abate, coleta de amostras e análises das características de qualidade da carne	41
2.3 Separação de grupos experimentais contrastantes	42
2.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)	43
2.5 Avaliação semi-quantitativa da expressão proteica por meio de eletroforese <i>SDS-PAGE</i>	44
2.6 Análise estatística	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Características de qualidade da carne	46
3.2 Expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina (MyHC)	49
3.2.1 Expressão gênica da cadeia pesada da miosina	50
3.2.2 Expressão proteica da cadeia pesada da miosina.....	51
3.2.3 Expressão gênica vs. Expressão proteica da cadeia pesada da miosina..	54
4. CONCLUSÕES	55
5. REFERÊNCIAS	56

**POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS E SUAS RELAÇÕES
COM O CRESCIMENTO E AS CARACTERÍSTICAS DA CARNE EM BOVINOS
NELORE (*Bos indicus*)**

RESUMO – Com o intuito de estudar o potencial de aplicação de genes candidatos na seleção animal para o melhoramento genético da qualidade de carne de bovinos Nelore (*Bos indicus*), o presente trabalho teve como objetivos principais: (1) Avaliar em bovinos Nelore e cruzamentos Nelore x *Bos taurus* a ocorrência de associações entre o SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST* e as características da carne produzida e (2) quantificar a expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina em bovinos Nelore com características fenotípicas contrastantes de crescimento e maciez da carne. Para o desenvolvimento do primeiro objetivo, 500 animais foram genotipados para o SNP g.98535683A>G:BTAU7 e fenotipados para força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e lipídeos totais (LIP). Associação significativa entre o SNP e a maciez da carne foi observada. O genótipo AA apresentou os melhores valores em relação a esta característica. As diferenças encontradas entre os genótipos AA e AG (AA - AG) foram de - 0,19 kg e 5,31 para FC e MFI, respectivamente. O SNP não mostrou associação significativa com AOL, EGS e LIP. Para a execução do segundo objetivo, 90 bovinos Nelore terminados em confinamento foram utilizados. Levando em consideração o peso final ao abate (PF) e a FC dos 90 animais, 24 indivíduos com características contrastantes de peso e maciez da carne foram selecionados e divididos em quatro grupos experimentais (6 animais/grupo). Os grupos corresponderam a animais leves com carne macia (PF = 493,50 kg e FC = 3,76 kg), animais leves com carne dura (PF = 515,66 kg e FC = 8,06 kg), animais pesados com carne macia (PF = 604,33 kg e FC = 3,99) e animais pesados com carne dura (PF = 605,33 kg e FC = 7,83 kg). Em cada grupo, foram avaliadas características fenotípicas como MFI, AOL, EGS, LIP, índice de marmorização (IM), coloração instrumental (L^* , a^* , b^*) e perdas por cozimento (PT). A análise de expressão dos genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1* foi feita por PCR em tempo real (RT-qPCR). A caracterização e quantificação proteica das isoformas da MyHC (MyHC-I, MyHC-IIa e MyHC-IIx/d) foi realizada por eletroforese SDS-PAGE. Em todas as análises (qualidade da carne e expressão gênica e proteica) não foi observada interação significativa entre crescimento e maciez da carne. Nas características AOL, EGS, IM e LIP não foi observado efeito significativo do crescimento e a maciez da carne. Porém, os animais pesados apresentaram maiores valores de L^* , a^* e b^* em relação aos animais leves. Na maciez, o grupo de carne macia mostrou maiores valores de L^* ($32,29 \pm 2,78$) que o grupo de carne dura ($29,10 \pm 2,61$). Por outro lado, maiores PT foram observadas em animais com carne dura em relação a animais com carne macia. Nos resultados de expressão gênica, o gene *MYH7* não mostrou diferenças entre animais leves e pesados. Entretanto, a expressão dos genes *MYH2* e *MYH1* foi significativamente menor nos animais pesados em relação aos animais leves. Quanto à maciez da carne, a expressão dos três genes não diferiram significativamente entre grupos de carne dura e macia. Na expressão proteica, as três isoformas (MyHC-I, IIa e IIx), não mostraram diferença significativa entre

animais leves e pesados. No entanto, as proporções da MyHC-I foram significativamente maiores no grupo de carne dura ($16,51 \pm 5,47$) em relação ao grupo de carne macia ($9,12 \pm 3,16$) e pelo contrário, as proporções da MyHC-IIa foram maiores no grupo de carne macia ($73,78 \pm 4,45$) em relação ao grupo de carne dura ($65,45 \pm 8,79$). A isoforma MyHC-IIx/d não mostrou efeito significativo sobre a maciez. Os resultados deste trabalho mostraram o potencial de aplicação do SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST* e da isoforma MyHC-IIa na seleção de animais para o melhoramento da maciez da carne de bovinos Nelore, além de, manifestar o diferencial de expressão dos genes *MYH1* e *MYH2* entre animais pesados e leves.

Palavras-chave: calpastatina, miosina, fibras musculares, maciez, polimorfismo

POLYMORPHISM AND EXPRESSION OF CANDIDATE GENES AND THEIR RELATIONSHIPS WITH THE GROWTH AND MEAT TRAITS IN NELLORE CATTLE (*Bos indicus*)

ABSTRACT – In order to study the potential of application of candidate genes in animal selection for breeding meat of Nellore cattle, this work had as main objectives: (1) Assess in Nellore cattle (*Bos indicus*) and crosses Nellore x *Bos taurus* the occurrence of associations between the g.98535683A>G:BTAU7 SNP in the CAST gene and traits of the meat produced and (2) quantify the gene and protein expression of myosin heavy chain in Nellore cattle with contrasting phenotypic traits of growth and meat tenderness. For the development of first objective, 500 animals were genotyped for the g.98535683A>G:BTAU7 SNP and phenotyped for shear force (SF), myofibrillar fragmentation index (MFI), ribeye area (RA), backfat thickness (BT) and total lipids (TL). Significant association between the SNP and meat tenderness was observed. The AA genotype showed the best values in relation to this trait. The differences found between genotypes AA and AG (AA - AG) were – 0.19 kg and 5.31 for SF and MFI, respectively. The SNP did not show significant association with RA, BT and TL. For the execution of the second aim, 90 feedlot Nellore cattle were used. Considering the final slaughter weight (FW) and the SF of the 90 animals, 24 individuals with contrasting characteristics of weight and tenderness of meat were selected and divided into four experimental groups (6 animals / group). The groups corresponded to lightweight animals with tender meat (FW = 493.50 kg and SF = 3.76 kg), lightweight animals with tough meat (FW = 515.66 kg and SF = 8.06 kg), heavy animals with tender meat (FW = 604.33 kg and SF = 3.99) and heavy animals with tough meat (FW = 605.33 kg and SF = 7.83 kg). In each group, were evaluated phenotypic characteristics as MFI, RA, BT, TL, marbling index (MI), instrumental color (L^* , a^* , b^*) and cooking losses (CL). The expression analysis of the *MYH7*, *MYH2* and *MYH1* genes was performed by Real-Time PCR (RT-qPCR). The characterization and quantification of the MyHC isoforms (MyHC-I, MyHC-IIa and MyHC-IIx/d) was carried out by SDS-PAGE. In all analyzes (meat quality and gene and protein expression) there was no significant interaction between growth and meat tenderness. In the traits MFI, RA, BT, IM and TL it was not observed significant effect of the growth and the tenderness of meat. However, the heavy animals showed higher values of L^* , a^* and b^* than lightweight animals. In the tenderness, the tender meat group showed higher values of the L^* (32.29 ± 2.78) than the tough meat group (29.10 ± 2.61). On the other hand, higher CL were observed in animals with tough meat than animals with tender meat. In the results of gene expression, the *MYH7* gene did not show differences between lightweight and heavy animals. However, the expression of the *MYH2* and *MYH1* genes was significantly lower in heavy animals than lightweight animals. As for meat tenderness, the expression of the three genes did not differ significantly between tough and tender meat groups. In the protein expression, the three isoforms (MHC-I, IIa and IIx), did not show significant difference between lightweight and heavy animals. Nevertheless, the MyHC-I proportions were significantly higher in the tough meat group (16.51 ± 5.47) than tender meat group (9.12 ± 3.16) and on the contrary, the proportions of the MyHC-IIa were higher in tender meat group (73.78 ± 4.45) than

tough meat group (65.45 ± 8.79). The MyHC-IIx isoform did not show significant effect on tenderness meat. The results of this work showed the potential of application of the g.98535683A>G:BTAU7 SNP in gene *CAST* and the MyHC-IIa isoform in animal selection to improve meat tenderness of Nellore cattle, in addition, it showed the differential expression of *MYH1* and *MYH2* genes between heavy and lightweight animals.

Keywords: calpastatin, myosin, muscle fibers, tenderness, polymorphism

CAPITULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Em função da sua rusticidade, adaptação aos trópicos e produtividade, a raça bovina Nelore (*Bos indicus*), juntamente com os produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus*, é responsável por quase toda a carne bovina produzida no Brasil (FERRAZ e FELÍCIO, 2010). Desde 2003, o Brasil posiciona-se entre o primeiro e o segundo maior exportador mundial de carne bovina *in natura*.

Países com alta escala de produção e exportação de carne bovina, como o Brasil devem priorizar a produtividade dentro dos padrões de qualidade exigidos pelos consumidores. Em geral, na produção de gado de corte, características como ganho de peso e peso final ao abate são importantes para determinar a eficiência econômica de qualquer sistema de produção bovina, enquanto que o controle de qualidade da carne produzida é de suma importância para satisfazer as exigências dos consumidores.

Dentro das características de qualidade da carne, a cor é a mais importante para a carne fresca. Em carnes cozidas, a maciez é classificada como a característica de palatabilidade mais relevante seguida pelo sabor e suculência (VERBEKE et al., 2010; JOO et al., 2013). Por outro lado, características como área de olho de lombo, deposições de gordura intramuscular e subcutânea influenciam diretamente no rendimento e/ou na qualidade da carne produzida. A área de olho de lombo prediz o tamanho do animal e o rendimento de cortes cárneos presentes na carcaça (PEREIRA et al., 2009). A marmorização da carne confere suculência e sabor, interferindo no hábito de consumo e no preço final do produto (KILLINGER et al., 2004). A deposição de gordura subcutânea é importante para garantir a qualidade da carcaça após o resfriamento (TAIT; WILSON; ROUSE, 2005).

Devido à composição da carne ser constituída por tecido animal, as características de qualidade podem ser influenciadas por inúmeros fatores como idade, sexo, raça, manejos pré e pós abate, composição química do músculo,

composição das fibras musculares e atividade enzimática no *post-mortem* (LEFAUCHEUR et al., 2010; CHRIKI et al., 2013).

O músculo esquelético consiste principalmente em miofibras, as quais representam 75 – 90 % do volume muscular. Deste modo, a característica de composição das fibras musculares é de importância no estudo de qualidade da carne, devido a sua influência em vários aspectos incluindo cor, capacidade de retenção da água, maciez, suculência e sabor (revisado por LEFAUCHEUR, 2010). Vários estudos usando diferentes raças bovinas e em diferentes países têm demonstrado que o número, tamanho e tipo de fibra estão relacionados com as características de qualidade da carne especialmente na maciez (MALTIN et al., 1998; RENAND et al., 2001; HOCQUETTE et al., 2007; GUILLEMIN et al., 2012; CHRIKI et al., 2013; PICARD et al., 2014; SACCÀ et al., 2015). No entanto, as proteínas biomarcadores da maciez dependem da raça e das propriedades contráteis e metabólicas específicas de cada músculo e precisam ser avaliadas em músculos de diferentes gêneros e raças bovinas (PICARD et al., 2014).

A organização e expressão das fibras musculares podem estar moduladas por eventos envolvendo o ajuste do crescimento muscular, resultando em maiores conteúdos de fibras ou fibras mais resistentes à proteólise (D'ALESSANDRO et al., 2012). Portanto, a taxa de crescimento do animal e sua relação com as fibras musculares e/ou a maciez da carne também tem sido avaliada. Wegner, Albrecht e Fiedler (2000) estimaram a importância das mudanças das características das fibras musculares relacionadas ao crescimento (0- 24 meses) e a raça sobre a qualidade da carne. Mcgilchrist et al. (2016) estudaram o efeito da seleção para desenvolvimento muscular sobre as características miofibrilares e a qualidade da carne. Não obstante, a questão do efeito do tipo de fibra e a maciez da carne ainda é controversa e resultados definitivos não foram gerados (D'ALESSANDRO et al., 2012).

A cadeia pesada da miosina (MyHC), a proteína mais abundante do músculo, é usada para o reconhecimento molecular dos tipos de fibra num determinado músculo. Cada gene da família da miosina (*MYH*) codifica para uma isoforma específica (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). No músculo esquelético de bovinos adultos, tem-se encontrado principalmente as isoformas MyHC-I, IIa, e IIx (TANABE;

MUROYA; CHIKUNI, 1998; CHIKUNI; MUROYA; NAKAJIMA, 2004) codificadas pelos genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1*, respectivamente (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Estudos demonstraram o enfraquecimento das miofibrilas musculares como o acontecimento chave no processo de amaciamento da carne (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Os membros do sistema proteolítico cálcio-dependente (complexo calpaína) desempenham papel fundamental neste processo (GEESINK, 2006). Este sistema é caracterizado por três enzimas: μ -calpaína, m-calpaína e um inibidor específico das calpaínas, a calpastatina. Estas proteínas são codificadas pelos genes *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST*, respectivamente.

Desta forma, os genes da miosina (*MHY7*, *MH2*, *MH1*), o gene da μ -calpaína (*CAPN1*) e da calpastatina (*CAST*) são considerados fortes candidatos para o estudo no melhoramento das características de qualidade da carne em animais de produção, especialmente na maciez da carne.

Por seu papel inibidor das calpaínas, vários SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) do gene *CAST* têm sido identificados e avaliados quanto ao seu efeito e associação com a maciez da carne bovina em raças de ambas as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, assim como em cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus* (CASAS et al., 2006; VAN EENENNAAM et al., 2007; CURI et al., 2009; ALLAIS et al., 2011; CHUNG; DAVIS, 2012; AVILÉS et al., 2013).

Recentemente, Calvo et al. (2014) identificaram um novo SNP do gene *CAST* (g.98535683A>G:BTAU7) associado à maciez da carne aos sete dias *post-mortem* na raça Parda de Montaña (*Bos taurus*). Este polimorfismo, encontra-se localizado no éxon 7 e é responsável pela troca de aminoácido Thr182Ala (treonina por alanina na posição 182 da sequência de aminoácidos, NM_174003). Segundo Casas et al. (2005), resultados de associação entre marcadores moleculares e características de interesse que são obtidos para populações de animais *Bos taurus* não são imediatamente aplicáveis em populações de animais *Bos indicus*, antes que possam ser amplamente estudados e validados.

Portanto, visto que os efeitos dos biomarcadores sobre fenótipos são parâmetros intrínsecos de cada raça, o presente trabalho teve como objetivos principais: (1) Avaliar em bovinos Nelore (*Bos indicus*) e cruzamentos Nelore x *Bos*

taurus a ocorrência de associações entre os genótipos do SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST* e as características da carne. (2) Quantificar a expressão gênica e proteica da MyHC em animais da raça Nelore com características contrastantes de crescimento e maciez da carne. Estes dois objetivos visaram avaliar o potencial de aplicação do SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST* e a MyHC na seleção de animais para o melhoramento genético da carne de bovinos Nelore.

Neste sentido, no presente Capítulo será apresentada a base teórica para o desenvolvimento dos dois objetivos anteriormente expostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do músculo esquelético

Os componentes principais do tecido muscular são água, proteínas e lipídeos. As proteínas estão classificadas pela sua solubilidade e sua localização no tecido muscular como proteínas do estroma, proteínas do sarcôplasma e proteínas miofibrilares (KARLSSON; KLONT; FERNANDEZ, 1999). As miofibrilas representam 75 - 90 % do volume muscular e seu diâmetro varia entre 10 a 100 μm (LEFAUCHEUR, 2010). Cada miofibrila é constituída por dois tipos de filamentos longitudinais: o filamento grosso, que contém principalmente a proteína miosina (MyHC), e o filamento delgado, constituído das proteínas actina, tropomiosina e troponina (KARLSSON; KLONT; FERNANDEZ, 1999).

As fibras musculares são originadas a partir de células precursoras miogênicas chamadas mioblastos, os quais proliferam e se fundem para formar miotubos que finalmente se diferenciam em fibras musculares (Figura 1) (PICARD et al., 2002). A formação de miotubos ocorre primeiramente por mioblastos embrionários e, posteriormente, a partir de mioblastos fetais originando respectivamente as fibras musculares primárias e secundárias (Figura 1) (PICARD et al., 2002). Após o nascimento, a primeira geração de mioblastos originará as fibras

de contração lenta (tipo I), enquanto que a segunda geração será convertida principalmente em fibras de contração rápida (tipo II) (FIEMS, 2012).

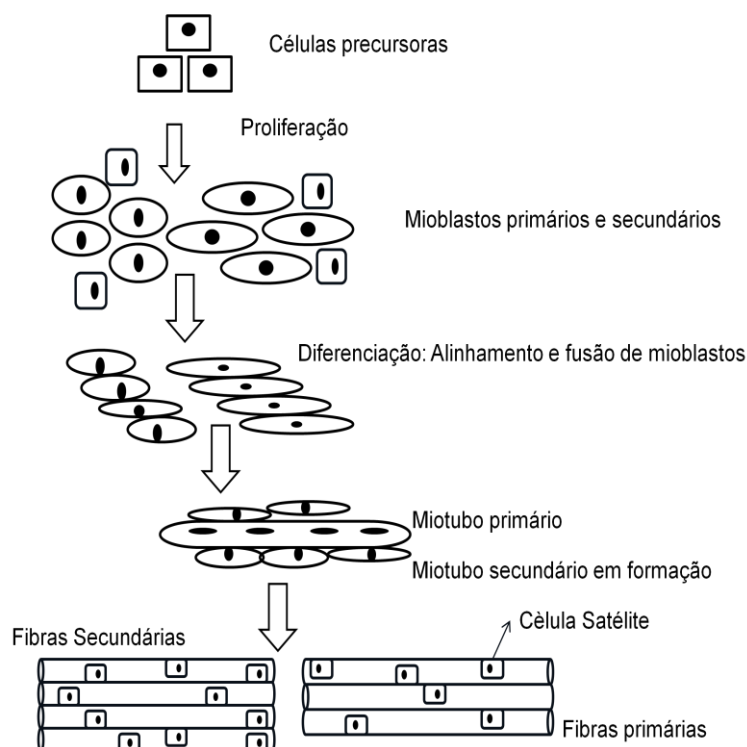


Figura 1. Representação esquemática da formação das fibras musculares. Adaptado com modificações de Picard et al. (2002).

A diversidade do músculo esquelético pode ser atribuída às características heterogêneas das fibras musculares (CHOI; KIM, 2009), caracterizando a base da flexibilidade do músculo e permitindo a sua utilização para diferentes atividades de baixa e alta intensidade (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

A composição do tipo de fibra pode variar em diferentes espécies e tipo de músculo dependendo da sua função, raça, sexo, hormônios e atividade física (HOCQUETTE, 2010; CHRIKI et al., 2012; CHRIKI et al., 2013). Como mostrado na Figura 2, MALTIN et al., (2001) observaram diferenças nas proporções e no tamanho das fibras do músculo *Longissimus lumborum* em animais bovinos das raças Aberdeen Angus e Holstein do mesmo sexo, idade e sobre o mesmo regime de alimentação.

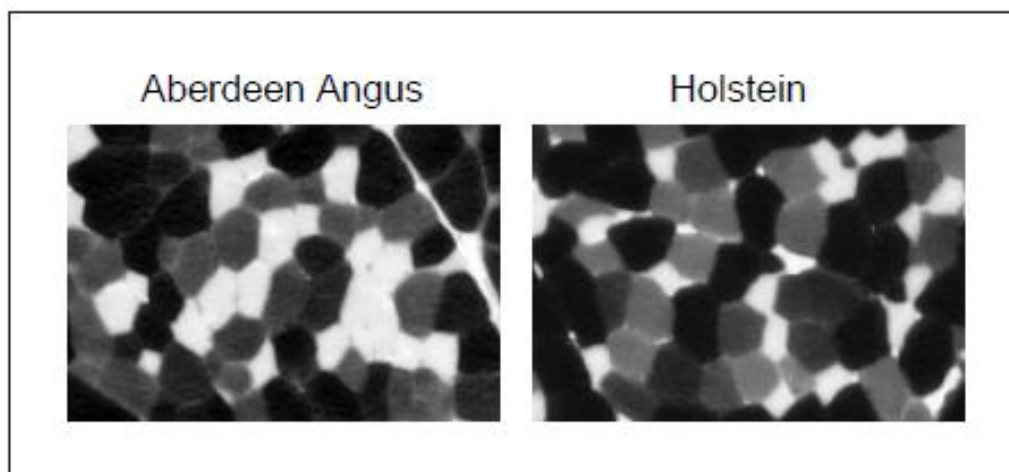


Figura 2. Diferenças nas proporções do tipo de fibra e tamanho da fibra das secções transversais do m. *Longissimus lumborum* das raças de gado Aberdeen Angus e Holstein. Escala de 100 μ m (Maltin et al., 2001).

2.2 Classificação e caracterização do tipo de fibra muscular

Na classificação do tipo de fibra muscular, diferentes métodos têm sido introduzidos ao longo do tempo. Vários tipos de classificação têm sido o foco de um ou mais aspectos do rendimento contrátil e metabólico das fibras musculares, fundamentada principalmente, nas duas vias metabólicas utilizadas pelo músculo esquelético para a produção de ATP. A via aeróbica ou oxidativa está relacionada com a produção de ATP na mitocôndria, por meio da oxidação de glicogênio, glicose, aminoácidos, corpos cetônicos e lipídeos com alto requerimento de oxigênio. Já a via anaeróbica ou glicolítica possui relação com as reservas de glicogênio que são rapidamente convertidas em lactato sem requerimento de oxigênio (revisado por LEFAUCHEUR, 2010).

Brooke e Kaiser (1970), baseados nas diferenças na estabilidade ácida e alcalina de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da miosina (mATPase), descreveram três diferentes fibras que incluem os tipos I, IIA e IIB. Outros métodos convencionais baseados nas reações histoquímicas da capacidade oxidativa utilizando a enzima succinato desidrogenase (SDH) e a capacidade glicolítica empregando a enzima NADH-tetrazólio redutase (NADH-TR), classificaram os três tipos de fibras em vermelhas, intermediárias e

brancas (RAHELIC; PUAC, 1981). Peter et al. (1972), baseando-se na combinação das reações mATPase e NADH-TR, classificaram as fibras musculares em lentas oxidativas ou tipo I correspondendo às fibras de metabolismo aeróbico, rápidas glicolíticas ou tipo IIB obedecendo às fibras de metabolismo anaeróbico, e rápidas oxidativas-glicolíticas ou tipo IIA caracterizando às fibras de metabolismo oxidativo e glicolítico. Diferenças nos resultados entre estes métodos foram observados e, conseqüentemente, a classificação do tipo de fibra no músculo depende da técnica utilizada na sua classificação (PICARD; DURIS; JURIE, 1998).

2.3 Características biológicas das fibras musculares

As fibras do músculo esquelético estão caracterizadas pela organização de arranjos ordenados em unidades idênticas conhecidas como sarcômeros (HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). A estrutura e composição molecular do sarcômero é similar entre diferentes tipos de fibras, no entanto, muitas proteínas contrácteis podem existir como várias isoformas, as quais são responsáveis pelas grandes variações nas propriedades mecânicas ativas e passivas das miofibrilas nos diferentes tipos de fibras musculares.

Cada isoforma é uma cópia de uma proteína que possui apenas pequenas diferenças com a outra isoforma da mesma proteína. A ligeira diversidade dentro das suas sequências de aminoácidos dá origem a diferentes propriedades estruturais e funcionais (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). A partir do descobrimento das isoformas da MyHC e, portanto, da heterogeneidade do sarcômero, distintas propriedades funcionais são atribuídas às isoformas da MyHC as quais são consideradas a base das diferenças funcionais entre as fibras do músculo esquelético (BOTTINELLI, 2001).

Cada tipo de fibra apresenta distintas características funcionais, estruturais, metabólicas, químicas e morfológicas como apresentado na Tabela 1. Geralmente, a fibra de tipo I ou fibra de contração lenta é usada para manter a postura enquanto que as fibras tipo II ou fibras de contração rápida são especializadas em produzir movimento (LEFAUCHEUR; GERRARD, 2000). Assim, as fibras tipo I utilizam grande quantidade de energia *in vivo*, porque são normalmente recrutadas para

manter as contrações de baixa intensidade. Estas fibras demonstram baixa atividade ATPase miofibrilar e retículo sarcoplasmático (revisado por LEFAUCHEUR, 2010) e geram energia para síntese de ATP predominantemente por transferência de energia aeróbica (revisado por CHOI; KIM, 2009). Elas são pobres em glicogênio, ricas em mioglobina e triglicérides e altamente resistentes à fadiga (revisado por LEFAUCHEUR, 2010).

Tabela 1. Características biológicas das fibras musculares

Característica	I	Ila	IIx	IIb
Velocidade de contração	+	+++	++++	+++++
ATPase Miofibrilar	+	+++	++++	+++++
Metabolismo oxidativo	+++++	++++,+++++	+,++	+
Metabolismo glicolítico	+	++++	++++	+++++
Hexoquinasa	+++++	+++	+	+
GLUT-4	+++++	+++	+	+
Fosfocreatina	+	+++++	+++++	+++++
Glicogênio	+	+++++	++++	+++++
Triglicerídeos	+++++	++	+	+
Vascularização	+++++	+++	+,++	+
Mioglobina	+++++	++++	++	+
Capacidade tampão	+	++++	+++++	+++++
Diâmetro	++	+,++	++++	+++++
Resistência à fadiga	+++++	++++	++	+

+ muito baixo; ++ baixo; +++ médio; ++++ alto; +++++ muito alto. Adaptado de Lefaucheur (2010).

Pelo contrário, o grupo de fibras tipo II utiliza a glicose como combustível e são facilmente fatigados, mostram alta atividade ATPase miofibrilar e retículo sarcoplasmático (revisado por LEFAUCHEUR, 2010). Portanto, as fibras do tipo II, especialmente do tipo IIb, têm a capacidade de transferir energia rapidamente para ações musculares fortes e rápidas (revisado por CHOI; KIM, 2009), além de não utilizarem grande quantidade de energia *in vivo*, pois são recrutadas apenas para manter movimentos agudos e de curta duração.

O tipo de fibra IIb é rica em glicogênio, pobre em mioglobina e triglicérides e altamente fatigável. As características das fibras tipo IIx são similares às das fibras IIb, com exceção da velocidade de contração da IIx ser menor e seu metabolismo oxidativo ligeiramente maior. Finalmente, as fibras IIa demonstram propriedades contráteis e metabólicas intermediárias entre os tipos de fibra I e IIb (revisado por LEFAUCHEUR, 2010).

2.4 Tipo de fibra e crescimento muscular

Na produção de gado de corte, o maior interesse é o peso final de abate representado pela massa muscular da carcaça. A estrutura da massa muscular e as condições para seu crescimento estão determinadas pelo desenvolvimento da fibra muscular na gestação (ALBRECHT et al., 2013).

Em bovinos, o músculo esquelético amadurece durante o final da gestação, e a hiperplasia das fibras musculares (incremento no número de fibras) é estabelecido aproximadamente até os 180 dias (6 meses) (PICARD et al., 2002; FIEMS, 2012). Deste modo, o crescimento pós-natal em bovinos só consiste de hipertrofia (incremento no tamanho da fibra) (WEGNER; ALBRECHT; FIEDLER, 2000). Esse crescimento é acompanhado de modulação nas proporções dos diferentes tipos de fibras. Na fase de crescimento pos-natal (0 – 12 meses) o metabolismo oxidativo diminui e o metabolismo glicolítico aumenta (PICARD, 2012). Essas alterações estão associadas à diminuição na proporção do tipo de fibra IIa (rápidas oxidativas-glicolíticas) e no incremento da proporção de fibras IIx (rápidas-glicolíticas) (JURIE et al., 1995).

Em machos, este processo de aumento de fibras tipo IIx continua até os 12 meses, depois o processo é gradualmente invertido (PICARD, 2012). Assim, parece que o aumento do metabolismo glicolítico associado ao incremento na proporção de fibras IIx ocorre no período de intenso crescimento muscular. Depois dos 12 meses de idade, as proporções de I e IIa aumentam e a proporção IIx diminui e, portanto, os músculos são mais de tipo oxidativo (PICARD, 2012).

2.5 Miosina

Dentre as proteínas miofibrilares a cadeia pesada da miosina (MyHC) pode ser considerada uma das mais abundantes (LEE; JOO; RYU, 2010), compreendendo aproximadamente 35 % do “pool” de proteínas (revisado por LEFAUCHEUR, 2010). A MyHC (aproximadamente 520 kDa) é conhecida como a proteína motor molecular, capaz de converter energia química em energia mecânica por meio de alterações estruturais (revisado por CHOI; KIM, 2009).

O genoma de mamíferos contém pelo menos 10 genes da família MYH altamente conservados na evolução dos vertebrados, em que cada gene codifica uma isoforma diferente de MyHC. A maioria está associada em dois grupos, o primeiro contendo as isoformas MyHC- α e MyHC- β /lento (MyHC-1) codificadas pelo genes *MYH6* e *MYH7*, e o segundo contendo as isoformas MyHC-IIa, MyHC-IIx, e MyHC-IIb codificadas pelos genes *MYH2*, *MYH1*, e *MYH4* e duas isoformas de desenvolvimento MyHC-emb e MyHC-neo codificadas pelos genes *MYH3* e *MYH8*, respectivamente. Outras isoformas como MyHC-EO, MyHC-15 e MyHC-16 codificadas pelos genes *MYH13*, *MYH15* e *MYH16* também têm sido observadas em alguns músculos de mamíferos (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

As isoformas da MyHC fornecem a base da classificação mais comum dos tipos de fibras (PETTE; STARON, 2000; RYU; KIM, 2005; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Diversos estudos em diferentes espécies relataram que o conteúdo das isoformas da MyHC estão grandemente correlacionados com a composição e as características do tipo de fibra muscular (TERMIN; STARON; PETTE, 1989; SCHIAFFINO et al., 1989; FRY; ALLEMEIER; STARON, 1994; RIVERO; TALMADGE; EDGERTON, 1997; STARON et al., 2000; SERRANO et al., 2001; CHOI; RYU; KIM, 2006).

Histoquimicamente, as fibras tipo I expressam a isoforma MyHC I, as fibras tipo IIA expressam a isoforma MyHC IIa, e as fibras tipo IIB expressam a isoforma MyHC IIb ou MyHC IIx (SCHIAFFINO et al., 1989; GORZA, 1990). Dessa forma, a existência de suas várias isoformas diferencialmente distribuídas nos diferentes tipos de fibras musculares fazem da MyHC o melhor marcador disponível para reconhecimento dos tipos de fibra (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

A classificação do tipo de fibra poderia ser idealmente realizada utilizando anticorpos monoclonais específicos produzidos contra cada isoforma da MyHC. Desafortunadamente, nem todos esses anticorpos estão disponíveis e podem ser usados nas diferentes técnicas como imunohistoquímica, Western blot e ELISA, nas diferentes espécies e distintas idades do animal (revisado por LEFAUCHEUR, 2010). Consequentemente, a separação electroforética das isoformas da MyHC ainda representa a abordagem mais direta para determinar a composição de miofibras de um determinado músculo.

2.6. Tipo de fibra muscular e sua associação com as características de qualidade da carne

As características de qualidade da carne de maior interesse são aparência, suculência, maciez e sabor, as quais podem ser avaliadas por meio das propriedades biofísicas e químicas, tais como capacidade de retenção de água, cor medida pela refletância de luz (L^* , a^* , b^*), pH, força de cisalhamento ou índice de fragmentação miofibrilar e teor de gordura intramuscular (revisado por MUCHENJE et al., 2009). A cor define a aparência da carne. A gordura intramuscular (marmoreio) incrementa suculência e sabor da carne. Enquanto que a capacidade de retenção de água é definida como a capacidade da carne para reter água durante a aplicação de forças externas, tais como o corte ou o aquecimento, afetando diretamente a maciez e suculência (revisado por PEARCE et al., 2011).

A MyHC é o maior consumidor de ATP no músculo esquelético (LEE; JOO; RYU, 2010). Cada isoforma da MyHC hidroliza ATP em diferentes taxas. Consequentemente, segundo a sua distribuição no músculo, estes, apresentam diferentes capacidades para gerar ATP aerobicamente, ativar atividades ATPase, sequestrar e liberar Ca^{2+} , produzir nucleotídeos de adenina, estimular a glicólise, produzir lactato e diminuir o pH em função da sua capacidade de tamponamento (BOWKER et al., 2004), alterando as propriedades físicas e químicas da carne.

No caso da cor, o aumento da proporção de fibras tipo I diminui a estabilidade da cor com uma possível mudança para coloração amarronzada (RENERRE, 1990). O conteúdo de gordura intramuscular também pode ser alterado dependendo do tipo

de fibra muscular (KLONT; BROCKS; EIKELENBOOM, 1998). As fibras tipo I e IIa contêm maiores quantidades de fosfolipídios e triglicerídeos em relação ao tipo IIx (LEFAUCHEUR, 2006; HOCQUETTE et al., 2010). Segundo Hwang et al. (2010), o conteúdo de gordura intramuscular apresenta correlação positiva com a porcentagem de fibras oxidativas e negativa com o tipo de fibras glicolítica.

Por sua vez, a maciez tem sido positivamente relacionada com as fibras tipo I ($r = 0,48$) e negativamente com a frequência das fibras tipo II ($r = - 0,38$) (MALTIN et al., 1998; HWANG et al., 2010). Porém, outros estudos mostram correlação negativa da MyHC-I e a maciez da carne (CROUSE et al., 1991; ZAMORA et al., 1996; ZHAO et al., 2014). Consequentemente, a relação entre a composição do tipo da fibra e a maciez ainda é controversa e parece depender de vários fatores, relacionados aos animais (raça, idade e manejo) e às características musculares (conteúdos de gordura, colágeno e sistemas de atividade proteolítica) (SACCÀ et al., 2015).

Nos últimos anos, análises de proteoma e interactoma têm sido usadas para compreender melhor o processo de maciez na subespécie *Bos taurus* (GUILLEMIN et al., 2011; PICARD et al., 2014). Nestas análises Guillemin et al. (2011) observaram que na raça Charolês, a MyHC-IIx é positivamente relacionada com a maciez em músculos glicolíticos (maiores proporções de MyHC-IIx) e negativamente relacionada em músculos oxidativos (maiores proporções de MyHC-I) enquanto que a MyHC-I é positivamente relacionada com a maciez dos músculos oxidativos e negativamente relacionada com a maciez de músculos glicolíticos. Este fato foi confirmado por Chriki et al. (2013) num estudo de meta-análise usando 332,000 dados do tipo de fibra e atividade enzimática de músculos de raças da sub-espécie *Bos taurus*. Os autores mostraram relação positiva entre a MyHC-I e a maciez da carne do músculo *Longíssimos thoracis* (músculo oxidativo) de vacas e novilhos Limousin, Charolês e Blonde'Aquitaine e relação negativa com a maciez do músculo Semitendinoso (músculo glicolítico) das mesmas raças. PICARD et al. (2014) em estudos com as raças Aberdeen Angus, Limousin e Blond d'Aquitaine observaram que a relação de MyHC-IIx e a maciez da carne depende da raça e das propriedades contráteis e metabólicas específicas de cada músculo.

Em raças da subespécie *Bos indicus* e especificamente na raça Nelore, são poucos os trabalhos realizados em relação a cadeia pesada da miosina e sua

influencia sobre as características de qualidade da carne. Malheiros (2014), num estudo de associação das isoformas da cadeia pesada da miosina observou relação negativa da MyHC-IIa e a força de cisalhamento ($r = -0,34$) mostrando que a MyHC-IIa parece estar positivamente associada á maciez da carne.

2.7 Transformação do músculo em carne e complexo Calpaína

Após o abate do animal e a interrupção do fluxo sanguíneo, os músculos esqueléticos tornam-se estruturas isoladas e não são mais fornecidos oxigênio e nutrientes exógenos. A produção de ATP é necessária para manter o músculo no estado relaxado, portanto, na ausência de ATP, a actina e miosina unem-se formando pontes irreversíveis de actomiosina gerando encurtamento do sarcômero e rigidez muscular, estabelecendo assim o *rigor mortis*. A conversão do músculo em carne inicia-se pela ativação de ATPases, modificação das concentrações de nucleotídeos adenina e degradação do glicogênio em ácido láctico por meio da glicólise. Isto leva a produção de ácido láctico que contribui na queda do pH dependendo da taxa de produção de H^+ e da capacidade de tamponamento do músculo. Em adição a estas alterações físico-químicas, os sistemas proteolíticos são estimulados, levando ao amaciamento da carne (LEFAUCHEUR, 2010).

Na maturação, a carne fresca é conservada embalada a vácuo e mantida sob refrigeração em temperaturas acima do ponto de congelamento ($-1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período após o abate, podendo chegar de 7 a 28 dias. Neste processo a carne se torna mais macia e aromática pela ação prolongada das enzimas endógenas responsáveis pela hidrólise das proteínas miofibrilares do tecido muscular. Como revisado por Ouali et al. (2006), os sistemas proteolíticos catalogados como responsáveis pela hidrólise das proteínas miofibrilares mais estudados são: o sistema das catepsinas, o sistema das calpaínas e o sistema das proteosomas.

O sistema das catepsinas foi o primeiro sistema enzimático considerado nos estudos de proteólise da carne. Porém, depois de vários estudos foi descartada sua contribuição neste processo (revisado por KEMP et al., 2010). Pesquisadores demonstraram que o complexo proteolítico cálcio-dependente (complexo calpaína) é

um dos maiores responsáveis pelas variações na extensão do amaciamento no *post-mortem* (revisado por KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

O complexo calpaína está constituído principalmente pelas proteínas μ -calpaína, uma enzima que requer baixa concentração de cálcio, a m-calpaína requer alta concentração do mesmo e a calpastatina considerado inibidor específico das calpaínas (GOLL et al., 2003). Estas proteínas são codificadas pelos genes *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST*, respectivamente. A μ -calpaína é essencial na proteólise *post-mortem* (GEESINK, 2006). Não obstante, evidências demonstram que a atividade da μ -calpaína é inibida pela sobre expressão de calpastatina resultando em grande redução de proteólise das fibras musculares (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; KENT; SPENCER; KOOHMARAIE, 2004; GEESINK, 2006). Deste modo, a calpastatina desempenha um papel central na regulação da atividade da calpaína e, portanto é considerada a proteína diretamente responsável da regulação da proteólise *post-mortem* (KENT; SPENCER; KOOHMARAIE, 2004) e, por conseguinte, da maciez da carne.

2.8 Marcadores moleculares da Calpastatina

Na ciência da carne, os polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs contribuem para uma rápida identificação de marcadores genéticos para o melhoramento das características de qualidade (HOCQUETTE et al., 2007b). Estes marcadores moleculares são a forma mais frequente de variação de DNA em mamíferos e possuem características favoráveis em relação a sua identificação, pois, são abundantes e geralmente envolvem dois alelos facilmente detectáveis (HOCQUETTE et al., 2007b).

Devido à importante função que desempenha o complexo calpaína-calpastatina no processo de amaciamento da carne, a exploração de polimorfismos dos genes *CAPN1* e *CAST* para predizer a qualidade da carne em bovinos foi proposta há vários anos e ainda continua sendo usada na busca de marcadores com potencial para o melhoramento na maciez de diferentes raças bovinas.

Por seu papel inibidor das calpaínas, e conseqüentemente, regulador da proteólise *post-mortem* e maciez da carne, SNPs (polimorfismos de nucleotídeo

único) do gene *CAST* foram identificados e avaliados com relação a sua associação com a maciez da carne em raças de ambas as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, assim como cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus*. Em 2002, Barendse (2002) identificou um SNP do gene *CAST* (AF_159246.1:g.2959A>G) caracterizado pela substituição de uma adenina por guanina na região 3'UTR do gene. Este SNP foi avaliado em vários estudos usando diferentes grupos genéticos. Casas et al. (2006); Morris et al. (2006) e Curi et al. (2009) observaram associação significativa entre este marcador e a maciez da carne de animais *Bos taurus*, *Bos indicus* e cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus*.

Recentemente, Calvo et al. (2014), identificaram um novo SNP do gene *CAST* (g.98535683A>G:BTAU7) associado a maciez da carne aos sete dias *post-mortem* na raça Parda de Montaña (*Bos taurus*). Este polimorfismo, encontra-se localizado no exon 7, sendo responsável pela troca de aminoácido Thr182Ala (treonina por alanina na posição 182 da sequência de aminoácidos, NM_174003). Porém, este SNP do gene *CAST* (g.98535683A>G:BTAU7) ainda não foi estudado e validado em raças da subespécie *Bos indicus*. Como observado por Allais et al. (2011), os efeitos dos marcadores são específicos de raça e não podem ser estendidos para todas as raças. Portanto, se torna necessário a corroboração dos seus efeitos sobre as características de interesse nas diferentes raças e subespécies.

3. REFERÊNCIAS

ALBRECHT, E.; LEMBCKE, C.; WEGNER, J.; MAAK, S. Prenatal muscle fiber development and bundle structure in beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 8, p. 3666–3673, 2013.

ALLAIS, S.; JOURNAUX, L.; LEVÉZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; RAYNAUD, P.; HOCQUETTE, J. F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; RENAND, G. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 1, p. 1–11, 2011.

AVILÉS, C.; JUÁREZ, M.; PEÑA, F.; DOMENECH, V.; CLEMENTE, I.; MOLINA, A. Association of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 and CAST genes with beef tenderness from Spanish commercial feedlots. **Czech Journal Animal Science**, v. 58, n. 10, p. 479–487, 2013.

BARENDSE W.J. DNA Markers for Meat Tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1. 2002.

BOTTINELLI, R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story. **Pflugers Archives**, v. 443, n.1, p. 6 – 17, 2001.

BOWKER, B. C.; GRANT, A. L.; SWARTZ, D. R.; GERRARD, D. E. Myosin heavy chain isoforms influence myofibrillar ATPase activity under simulated postmortem pH, calcium, and temperature conditions. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 139–147, 2004.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. Three "Myosin Adenosine Triphosphatase" systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 18, n. 9, p. 670–672, 1970.

CALVO, J. H.; IGUÁCEL, L. P.; KIRINUS, J. K.; SERRANO, M.; RIPOLL, G.; CASASÚS, I.; JOY, M.; PÉREZ-VELASCO, L.; SARTO, P.; ALBERTÍ, P.; BLANCO, M. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 775–782, 2014.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMANT, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13–19, 2005.

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

CHIKUNI, K.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 87–94, 2004.

CHOI, Y. M.; KIM, B. C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**, v. 122, n. 2-3, p. 105–118, 2009.

CHOI, Y. M.; RYU, Y. C.; KIM, B. C. Effect of myosin heavy chain isoforms on muscle fiber characteristics and meat quality in porcine longissimus muscle. **Journal of Muscle Foods**, v. 17, n.4, p. 413–427, 2006.

CHRIKI, S.; PICARD, B.; JURIE, C.; REICHSTADT, M.; MICOL, D.; BRUN, J. P.; JOURNAUX, L.; HOCQUETTE, J. F. Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: Longissimus thoracis and semitendinosus. **Meat Science**, v. 91, n. 4, p. 423–429, 2012.

CHRIKI, S.; RENAND, G.; PICARD, B.; MICOL, D.; JOURNAUX, L.; HOCQUETTE, J. F. Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. **Livestock Science**, v. 155, n. 2-3, p. 424–434, 2013.

CHUNG, H.; DAVIS, M. Effects of genetic variants for the calpastatin gene on calpastatin activity and meat tenderness in Hanwoo (Korean cattle). **Meat Science**, v. 90, n. 3, p. 711–714, 2012.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; DE OLIVEIRA, H. N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, n. 4, p. 456–462, 2009.

D'ALESSANDRO, A.; MARROCCO, C.; RINALDUCCI, S.; MIRASOLE, C.; FAILLA, S.; ZOLLA, L. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4381–4398, 2012.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. DE. Production systems - an example from Brazil. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 238–243, 2010.

FIEMS, L. O. Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat. **Animals**, v. 2, n. 3, p. 472–506, 2012.

FRY, A. C.; ALLEMEIER, C. A; STARON, R. S. Correlation between percentage fiber type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 68, n.3, p. 246 – 251, 1994.

GEESINK, G. H. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2834–2840, 2006.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 10, p. 2685–92, 1999.

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

GORZA, L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 38, n. 2, p. 257–265, 1990.

GUILLEMIN, N.; BONNET, M.; JURIE, C.; PICARD, B. Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 352–365, 2011.

GUILLEMIN, N. P.; JURIE, C.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F.; MICOL, D.; LEPETIT, J.; PICARD, B. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 2, p. 26–38, 2012.

HOCQUETTE, J.; JURIE, C.; PICARD, B.; ALBERTI, P.; PANEA, B.; CHRISTENSEN, M.; FAILLA, S.; GIGLI, S.; LEVÉZIEL, H.; OLLETA, J.L.; SANUDO, C.; ERTBJERG, P.; NUTE, G.R.; WILLIAMS, J.L. Metabolic and contractile characteristics of Longissimus thoracis muscle of young bulls from 15 European breeds in relationship with body composition. In: Proceeding of the 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, p. 111–114, 2007a.

HOCQUETTE, J. F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I. PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v. 1, n. 01, p. 159–173, 2007b.

HOCQUETTE, J. F. Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle. **Animal**, v. 4, n. 11, p. 1797–1809, 2010.

HOCQUETTE, J. F.; GONDRET, F.; BAÉZA, E.; MÉDALE, F.; JURIE, C.; PETHICK, D. W. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, v. 4, n. 02, p. 303, 2010.

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

HWANG, Y. H.; KIM, G. D.; JEONG, J. Y.; HUR, S. J.; JOO, S. T. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 456–461, 2010.

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

JURIE, C.; ROBELIN, J.; PICARD, B.; GEAY, Y. Post-natal changes in the biological characteristics of Semitendinosus muscle in male Limousin cattle. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 125–135, 1995.

KARLSSON, A. H.; KLONT, R. E.; FERNANDEZ, X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. **Livestock Production Science**, v. 60, n. 2-3, p. 255–269, 1999.

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

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

KILLINGER, K. M.; CALKINS, C. R.; UMBERGER, W. J.; FEUZ, D. M.; ESKRIDGE, K. M. Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3288–3293, 2004.

KLONT, R. E.; BROCKS, L.; EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. **Meat science**, v. 49, n. S1, p. S219–29, 1998.

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

LEE, S. H.; JOO, S. T.; RYU, Y. C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 166–170, 2010.

LEFAUCHEUR, L. Myofibre typing and its relationships to growth performance and meat quality. **Archives Tierzucht Dummerstorf**, v. 49, n. 04-17, p. 4–17, 2006.

LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing - Relation to meat quality. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 257–270, 2010.

LEFAUCHEUR, L.; GERRARD, D. Muscle fiber plasticity in farm mammals. **Journal Animal Science**, v. 77, n. E-Suppl, p. 1–19, 2000.

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

MALTIN, C. A.; DELDAY, M. I.; SINCLAIR, K. D.; STEVEN, J.; SNEDDON, A. A. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 359–374, 2001.

MALTIN, C. A.; SINCLAIR, K. D.; WARRISS, P. D.; GRANT, C. M.; PORTER, A. D.; DELDAY, M. I.; WARKUP, C.C The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. **Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 341–348, 1998.

MCGILCHRIST, P.; GREENWOOD, P. L.; PETHICK, D. W.; GARDNER, G. E. Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral content. **Meat Science**, v. 114, p. 8–17, 2016.

MORRIS, C. A.; CULLEN, N. G.; HICKEY, S. M.; DOBBIE, P. M.; VEENVLIET, B. A.; MANLEY, T. R.; PITCHFORD, W. S.; KRUK, Z. A.; BOTTEMA, C. D. K; WILSON, T. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. **Animal Genetics**, v. 37, n.1, p. 411–414, 2006.

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279–289, 2009.

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

PEARCE, K. L.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; HOPKINS, D. L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. **Meat Science**, v. 89, n. 2, p. 111–124, 2011.

PEREIRA, P. M. R. C.; PINTO, M. F.; DE ABREU, U. G. P.; DE LARA, J. A. F. Características de carcaça e qualidade de carne de novilhos superprecoces de três grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1520–1527, 2009.

PETER, J. B.; BARNARD, R. J. EDGERTON, V. R.; GILLESPIE, C. A.; STEMPEL, K. E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, n. 14, p. 2627–2633, 1972.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 2000.

PICARD, B.; DURIS, M. P.; JURIE, C. Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. **Histochemical Journal**, v. 30, n. 7, p. 473–479, 1998.

PICARD, B.; LEFAUCHEUR, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M. J. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. **Reproduction, nutrition, development**, v. 42, n. 5, p. 415–431, 2002.

PICARD, B. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, Anais.. p. 51–80, 2012. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

PICARD, B.; GAGAOUA, M.; MICOL, D.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; TERLOUW, C. E. M. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9808–9818, 2014.

RAHELIC, S.; PUAC, S. Fibre types in longissimus dorsi from wild and highly selected pig breeds. **Meat Science**, v. 5, n. 6, p. 439–450, 1981.

RENAND, G.; PICARD, B.; TOURAILLE, C.; BERGE, P.; LEPETIT, J. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**, v. 59, n. 1, p. 49–60, 2001.

RENERRE, M. Review: Factors involved in the discoloration of beef meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 613–630, 1990.

RIVERO, J. L.; TALMADGE, R. J.; EDGERTON, V. R. A sensitive electrophoretic method for the quantification of myosin heavy chain isoforms in horse skeletal muscle: histochemical and immunocytochemical verifications. **Electrophoresis**, v. 18, n. 11, p. 1967–1972, 1997.

RYU, Y. C.; KIM, B. C. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. **Meat Science**, v. 71, n. 2, p. 351–357, 2005.

SACCÀ, E.; CORAZZIN, M.; PIZZUTTI, N.; LIPPE, G.; PIASENTIER, E. Early post mortem expression of genes related to tenderization in two Italian Simmental young bulls' skeletal muscles differing in contractile type. **Animal Science Journal**, v. 86, n.12, p. 992-998, 2015.

SCHIAFFINO, S.; GORZA, L.; SARTORE, S.; SAGGIN, L.; AUSONI, S.; VIANELLO, M.; GUNDERSEN, K.; LØMO, T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 10, n. 3, p. 197–205, 1989.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SERRANO, A. L.; PÉREZ, M.; LUCÍA, A.; CHICHARRO, J. L.; QUIROZ-ROTHER, E.; RIVERO, J. L. Immunolabelling, histochemistry and in situ hybridisation in human skeletal muscle fibres to detect myosin heavy chain expression at the protein and mRNA level. **Journal of anatomy**, v. 199, n. 3, p. 329–337, 2001.

STARON, R. S.; HAGERMAN, F. C.; HIKIDA, R. S.; MURRAY, T. F.; HOSTLER, D. P.; CRILL, M. T.; RAGG, K. E.; TOMA, K. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 48, n. 5, p. 623–629, 2000.

TAIT, R. G.; WILSON, D. E.; ROUSE, G. H. Prediction of retail product and trimmable fat yields from the four primal cuts in beef cattle using ultrasound or carcass data. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 6, p. 1353–1360, 2005.

TANABE, R. I.; MUROYA, S.; CHIKUNI, K. Sequencing of the 2a, 2x, and slow isoforms of the bovine myosin heavy chain and the different expression among muscles. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 1056–1058, 1998.

TERMIN, A.; STARON, R. S.; PETTE, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. **Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 453–457, 1989.

VAN EENENNAAM, A. L.; LI, J.; THALLMAN, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, M. E.; GILL, C. A.; FRANKE, D. E.; THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 891–900, 2007.

VERBEKE, W.; VAN WEZEMAEL, L.; DE BARCELLOS, M. D.; KÜGLER, J. O.; HOCQUETTE, J. F.; UELAND, Ø.; GRUNERT, K. G. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee. Insights from a qualitative study in four EU countries. **Appetite**, v. 54, n. 2, p. 289–296, 2010.

WEGNER, J.; ALBRECHT, E.; FIEDLER, I. Growth-and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1485–1496, 2000.

ZHAO, C.; ZAN, L.; WANG, Y.; SCOTT UPDIKE, M.; LIU, G.; BEQUETTE, B. J.; BALDWIN VI, R. L.; SONG, J. Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle. **Livestock Science**, v. 161, n. 1, p. 201–209, 2014.

CAPÍTULO 2 – Efeito do SNP g.98535683A>G do gene *CAST* sobre características da carne em bovinos de corte Nelore (*Bos indicus*) e em seus cruzamentos com *Bos taurus*

RESUMO - O objetivo deste estudo foi estimar em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos produzidos no Brasil (Nelore e seus cruzamentos com *Bos taurus*) as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST*, bem como avaliar a ocorrência de associações entre esse polimorfismo e características da carne. Quinhentos animais de seis diferentes grupos genéticos (Nelore, Angus x Nelore, Canchim, tricross Brangus, tricross Pardo-Suíço e Rubia Galega x Nelore) foram genotipados para o SNP g.98535683A>G:BTAU7 e fenotipados para força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e lipídeos totais (LIP). Nos seis grupos genéticos foram detectados os alelos A e G do SNP g.98535683A>G:BTAU7. O alelo A apresentou maior frequência em relação ao alelo G em todos os grupos genéticos. No estudo de associação entre genótipos e as características de interesse foi utilizado o método dos quadrados mínimos. O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas incluiu além do efeito de genótipo, o efeito de grupo contemporâneo. Associação significativa entre o SNP g.98535683A>G:BTAU7 e a maciez foi observada, onde o genótipo AA apresentou os melhores valores em relação à esta característica. As diferenças encontradas entre os genótipos AA e AG (AA - AG) foram de - 0,19 kg e 5,31 para FC e MFI, respectivamente. O SNP g.98535683A>G:BTAU7 não mostrou associação significativa com AOL, EGS e LIP. Estes resultados mostraram o potencial de aplicação do SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST* na seleção de animais e no melhoramento genético da característica na raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos com *Bos taurus*.

Palavras-chave: calpastatina, cobertura de gordura, maciez da carne, marmoreio, polimorfismo de DNA

1. INTRODUÇÃO

Em função da sua rusticidade, adaptação aos trópicos e boa produtividade, a raça Nelore (*Bos indicus*), juntamente com os produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus*, é responsável pela quase totalidade da carne bovina produzida no Brasil, país detentor do maior rebanho comercial do mundo e, desde 2003, primeiro ou segundo maior exportador mundial de carne bovina *in natura*. A pecuária desempenha papel importante na economia brasileira dado que em 2015 foi responsável por 6,79% do PIB nacional, o equivalente a 400,65 bilhões de reais (CEPEA, 2016). Em 2015 foram abatidos 30,64 milhões de bovinos, o que resultou na produção de 7,49 milhões de toneladas de carcaça e na exportação de 1,08 milhões de toneladas de carne fresca (IBGE, 2016).

As deposições de gordura intramuscular e subcutânea influenciam diretamente na qualidade da carne. A marmorização da carne decorrente da deposição de gordura intramuscular confere suculência e sabor, interferindo no hábito de consumo e no preço final do produto (KILLINGER et al., 2004). O aumento da deposição de gordura subcutânea é importante para garantir a qualidade da carcaça após o resfriamento (TAIT; WILSON; ROUSE, 2005). De acordo com Dransfield, (1994), a terminação de carcaça adequada garante o menor impacto proporcionado pelo resfriamento rápido, evitando o encurtamento das fibras e consequentemente garantindo a maior maciez da carne. Além disso, a maior temperatura interna da carcaça pós-resfriamento observada em animais com maior cobertura de gordura concorre para a maior ação glicolítica muscular, o menor índice de pH, a inibição das proteases cálcio-dependentes, e consequentemente para a maior maciez da carne.

Além da terminação adequada da carcaça, inúmeros outros fatores como idade, sexo, raça, manejos pré e pós abate, atividade enzimática no *post-mortem*, composição das fibras musculares e preparo do produto pelo consumidor podem influenciar na maciez da carne, atributo considerado o mais importante pelo mercado consumidor. O sistema proteolítico cálcio-dependente tem sido considerado um dos maiores responsáveis pelas variações na extensão do amaciamento no *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1994), e é caracterizado por três componentes: uma enzima que

requer baixa concentração de cálcio (μ -calpaína), outra que requer alta concentração do mesmo (m-calpaína) e um inibidor específico das calpaínas, a calpastatina. Dessa forma, os genes da μ -calpaína (*CAPN1*) e da calpastatina (*CAST*), localizados nos cromossomos 29 e 7 dos bovinos (BTAU29 e BTAU7), respectivamente, são considerados fortes candidatos funcionais para a característica maciez da carne em animais de produção.

Genes candidatos para características de interesse podem ser identificados com base em conhecimentos de fisiologia, análises de expressão gênica diferencial e varredura do genoma (ZHU; ZHAO, 2007). É notório que a maior parte das características de produção em animais de interesse zootécnico é governada por grande número de genes, ou seja, são quantitativas. Assim, a identificação de locos de características quantitativas (QTL) no genoma destes animais vem sendo focada nos últimos anos em estudos de genoma inteiro (GWAS), os quais são realizados por meio da genotipagem de centenas de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) utilizando chips de alta densidade (HAYES; GODDARD, 2010). No entanto, existe a possibilidade da existência de *major* gene ou genes principais que seriam responsáveis pela maior parte da variação de uma característica (ZHU; ZHAO, 2007).

A incorporação de informações moleculares, provenientes diretamente da análise do DNA, em programas de seleção e melhoramento tem sido recomendada no sentido de aumentar a sua eficiência (DEKKERS, 2004). Em meados da década de 1990 foi proposta a exploração de polimorfismos dos genes *CAPN1* e *CAST* para prever a qualidade da carne em bovinos. Segundo Curi et al. (2009), desde então, polimorfismos do tipo SNP presentes nesses genes vêm sendo estudados e associados com maciez tanto na subespécie *Bos taurus* quanto na *Bos indicus*.

Recentemente, Calvo et al. (2014) identificaram um novo polimorfismo no gene da calpastatina *CAST* nas raças taurinas (*Bos taurus*) *Parda de Montaña* e *Pirenaica*. Este polimorfismo, o SNP g.98535683A>G:BTAU7, encontra-se localizado no exon 7, sendo responsável pela troca de aminoácido Thr182Ala (treonina por alanina na posição 182 da sequência de aminoácidos, NM_174003). Estes autores consideraram a possibilidade de se tratar de polimorfismo causal uma vez que o SNP provoca substituição de aminoácido não sinônima não conservativa e foi

significativamente associado à maciez da carne aos sete dias *post-mortem* na raça *Parda de Montaña*.

Entretanto, antes de transpor os marcadores moleculares das populações nas quais foram identificados para a comercialização, é muito importante a corroboração dos seus efeitos sobre as características de interesse em diferentes raças e ambientes (BARENDSE, 2005), em processo conhecido como validação. Segundo Casas et al. (2005), resultados de associação entre marcadores moleculares e características de interesse obtidas para populações de animais *Bos taurus* não são imediatamente aplicáveis em populações de animais *Bos indicus*, antes que possam ser amplamente estudados e validados. Outro fato importante é que muitos polimorfismos que ocorrem e se encontram associados a características interessantes em animais *Bos taurus*, sequer ocorrem em animais *Bos indicus* denotando a necessidade do uso ou desenvolvimento de outros marcadores para o gene ou região cromossômica para que possam ser efetuados os estudos nas raças dessa subespécie.

Tendo em vista que os efeitos de polimorfismos de DNA sobre fenótipos são parâmetros intrínsecos de cada população, linhagem ou raça em determinado ambiente, e considerando a possibilidade da existência de genes principais controlando características de interesse econômico em animais de produção, o presente trabalho tem como objetivos estimar em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos produzidos no Brasil (Nelore e seus cruzamentos com *Bos taurus*) as frequências alélicas e genotípicas do SNP g.98535683A>G do gene *CAST*, bem como avaliar a ocorrência de associações entre esse polimorfismo e características da carne produzida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados dados de qualidade de carne e de carcaça, além de amostras de DNA, de 500 animais da raça Nelore e seus cruzamentos com diversas raças taurinas.

Deste total, 200 animais machos Nelore (*Bos indicus*), terminados em confinamento com idade inferior a dois anos, cujas amostras foram colhidas como parte do projeto “Estudo genético quantitativo da qualidade da carcaça e da carne em bovinos da raça Nelore” (Proc. CNPq 480369/2009-7), foram provenientes de fazendas que integram o programa de melhoramento genético da Conexão Delta G. O programa começou em 1993 para a raça Nelore, contando hoje com aproximadamente 200.000 cabeças e 110.000 vacas com escrituração zootécnica, em cinco estados. Nestas fazendas, os animais nascidos em determinado período (inferior a três meses) são agrupados e submetidos ao mesmo manejo até a desmama. Após a desmama são formados novos grupos que persistem sob as mesmas condições de manejo até o sobreano, quando os animais são destinados à reprodução ou seguem para o confinamento até o abate. O banco de dados com as informações constantes dos arquivos zootécnicos da Conexão delta G foi disponibilizado, permitindo a formação dos grupos de contemporâneos dos animais de acordo com o ano de nascimento, fazenda e grupos de manejo desde o nascimento até o abate.

Também foram utilizados dados de 256 animais, sendo 114 animais da raça Nelore, 67 cruzados Angus x Nelore ($1/2$ *Bos taurus* + $1/2$ *Bos indicus*), 41 da raça Canchim ($5/8$ Charoles + $3/8$ *Bos indicus*), 19 tricross Brangus ($9/16$ *Bos taurus* + $7/16$ *Bos indicus*) e 15 tricross Pardo-Suíço ($3/4$ *Bos taurus* + $1/4$ *Bos indicus*), originários de rebanhos comerciais de sete fazendas do estado de São Paulo, e terminados nos anos de 2003, 2005, 2006 e 2007 no setor experimental de confinamento do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu/SP, no sistema de produção Superprecoce. Neste sistema de produção, os animais provenientes de

lotes homogêneos de cada fazenda entram em confinamento imediatamente após a desmama, onde permanecem até que o grupo tivesse atingido peso e terminação adequada para o abate. Também foram utilizados 44 bovinos provenientes do cruzamento entre reprodutores Rubia Galega (*Bos taurus*) e matrizes Nelore (Rubia Galega x Nelore: $1/2$ *Bos taurus* + $1/2$ *Bos indicus*), produzidos em sistema semi-intensivo de criação conduzido no ano de 2006. Deste total de 300 animais, cujas amostras foram colhidas como parte do projeto “Polimorfismos de genes candidatos funcionais como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos de corte zebuínos e cruzados” (Proc. Fapesp FAPESP nº 2006/04552-4), 32 eram fêmeas e 268 eram machos inteiros, os quais foram abatidos com idades entre 15 e 19 meses.

2.2. Coleta de amostras e fenotipagem

Após o abate dos animais, realizado em frigoríficos comerciais de acordo com as normas estipuladas para o abate humanitário de bovinos, as carcaças foram identificadas e resfriadas por no mínimo 24 horas. Após o resfriamento foram colhidas duas amostras do músculo *Longissimus thoracis* com osso e espessura aproximada de 2,54 cm entre a 11ª e a 13ª costela em direção cranial da meia-carcaça esquerda de cada animal. As amostras foram embaladas a vácuo e maturadas a 2 °C durante 7 dias.

A amostra colhida entre a 12ª e a 13ª costelas foi utilizada para a medição da Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura Subcutânea (EGS) e a realização do ensaio de Força de Cisalhamento (FC), utilizando-se uma lâmina Warner Bratzler. A segunda amostra coletada entre a 11ª e 12ª costelas foi utilizada para a realização das análises químicas da carne como Lipídeos totais (LIP), Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e extração de DNA genômico. A AOL foi mensurada pelo método do quadrante de pontos (USDA - Quality and Yield Grade, 2000), bem como a EGS, medida em paquímetro e expressa em (mm). Os demais parâmetros fenotípicos, LIP, MFI e FC, foram determinados em Laboratório conforme as metodologias descritas por Bligh e Dyer (1959), Culler et al. (1978) e Wheeler, Koohmaraie e Shackelford (1995), respectivamente.

2.3. Extração do DNA e genotipagem

A extração do DNA genômico a partir de 250 mg das amostras de carne foi realizada pelo método não fenólico, utilizando digestão com proteinase K e precipitação com NaCl e álcool.

A determinação dos alelos A e G do polimorfismo g.98535683A>G foi realizada por meio da técnica de PCR–RFLP, na qual fragmento de 238 pb do exon 7 do gene *CAST* bovino foi amplificado e digerido com enzima de restrição (CALVO et al., 2014). Cada reação, com volume final de 12,5 µL, foi constituída de 30 ng de DNA genômico, 0,16 µM de cada *primer* (*forward* 5' TGC ATC ATG TCC AGC AGA 3' e *reverse* 5' CAC GTG TGC TCA CCT TGT CAG CTG GTA 3'), 0,24 mM de cada dNTP, 2,4 mM de MgCl₂, 1X PCR buffer (20mM de Tris-HCl, pH 8.4; 50mM de KCl), 2% DMSO e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Após desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, a amplificação foi realizada em 40 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 58 °C por 40 segundos e 72 °C por 40 segundos, seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Alíquotas de 12,5 µL dos produtos de amplificação foram digeridas com 6 U da enzima *HhaI* (Invitrogen, EUA) a 37 °C por 8 horas.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados e digeridos foi realizada em gel de agarose a 3% em sistema de eletroforese horizontal. Padrão de peso molecular de 100pb foi utilizado para permitir o cálculo do tamanho dos mesmos. A documentação dos géis foi realizada utilizando-se sistema digital de fotodocumentação e os genótipos dos indivíduos foram determinados por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

2.4. Cálculo de frequências e análise de associação

A partir dos genótipos identificados nos géis foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo. A ocorrência de diferenças nas frequências alélicas dentro e entre os grupos genéticos estudados foi calculada por meio do método de estudo completo de tabelas de contingência (CURI; MORAES, 1981).

No estudo de associação entre genótipos e as características de interesse (AOL, EGS, LIP, FC e MFI) foi utilizado o método dos quadrados mínimos e o

procedimento do Modelo Linear Geral (GLM) do programa SAS v.9.1 (SAS, 2004). O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas de interesse incluiu além do efeito de genótipo, o efeito de grupo contemporâneo como segue: $Y_{ijk} = \mu + G_i + GC_j + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} = característica de interesse, μ = média geral, G_i = efeito fixo do i ésimo genótipo, GC_j = efeito fixo do j ésimo grupo contemporâneo, e e_{ijk} = erro aleatório. A determinação dos grupos contemporâneos incluiu as variações de grupo genético, sexo, idade de abate, ano de confinamento e fazenda de origem. Estas variações não puderam ser consideradas separadamente no modelo uma vez que há confundimento importante entre elas. Genótipos cujas frequências foram menor ou igual a 10% na amostra total de animais estudados foram excluídos das análises. O efeito de touro não foi incluído no modelo linear uma vez que o número de animais genotipados filhos dos mesmos touros era muito pequeno. Dessa forma, em razão do grande número de pais, a possibilidade de confundimento entre efeitos de genótipo e de touro sobre as características de produção foi diluída. A correção *False Discovery Rate* (FDR) de Benjamini e Hochberg (1995) foi aplicada para ajuste das significâncias dos efeitos dos genótipos e grupos contemporâneos sobre as características de interesse considerando que as análises envolvem comparações múltiplas. As médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim como descrito por Calvo et al. (2014), o genótipo AA do SNP g.98535683A>G do gene *CAST* foi caracterizado pela presença de um fragmento de 238pb. Os indivíduos heterozigotos AG apresentaram três fragmentos de restrição de 238, 178 e 60pb, e os homozigotos de genótipo GG foram identificados pela presença de dois fragmentos de 178 e 60pb (Figura 1).

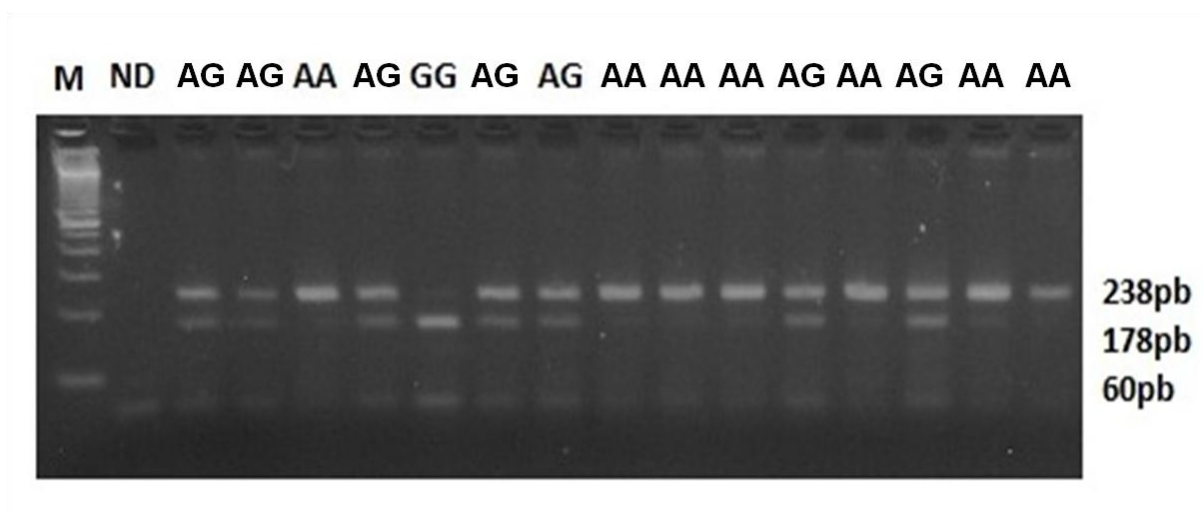


Figura 1. Padrão de bandas obtido na análise por PCR–RFLP e eletroforese em gel de agarose 3% para o polimorfismo g.98535683A>G do gene CAST. M indica o padrão molecular de 100 pb, ND, controle negativo da reação de PCR e os genótipos amplificados AA, AG e GG decorrentes das digestões com a enzima *HhaI*. Os números ao lado direito da figura indicam o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de base.

Para o polimorfismo g.98535683A>G do gene CAST, foram detectados os alelos A e G na amostra de animais estudados. Pôde-se observar frequência maior do alelo A em relação ao G dentro de todos os grupos genéticos estudados (Tabela 1). Apesar do pequeno número de indivíduos de alguns dos grupos genéticos, em geral não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos A e G entre os animais *Bos indicus* e *Bos taurus* x *Bos indicus* (Tabela 1), sugerindo que essas frequências sejam semelhantes nas subespécies *Bos indicus* e *Bos taurus*. Neste sentido, Calvo et al. (2014) encontraram para o alelo A as frequências 0,68 e 0,60 nas raças *Parda de Montaña* e *Pirenaica* (ambas *Bos taurus*), respectivamente. Os três genótipos foram observados nos diferentes grupos genéticos, exceção feita aos Angus x Nelore e Tricross Pardo Suíço que não apresentaram a ocorrência de indivíduos de genótipo GG como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo g.98535683A>G do gene *CAST* bovino nos diferentes grupos genéticos. O número de animais de cada grupo genético encontra-se indicado entre parênteses.

Grupo Genético	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
Nelore (314)	0,751 ^{AB}	0,249 ^B	0,564	0,377	0,060
Angus x Nelore (67)	0,910 ^A	0,090 ^B	0,820	0,180	0,000
Rubia Galega x Nelore (44)	0,875 ^A	0,125 ^B	0,772	0,204	0,024
Canchim (41)	0,682 ^B	0,318 ^B	0,560	0,244	0,196
Tricross Brangus (19)	0,736 ^{AB}	0,264 ^B	0,581	0,264	0,105
Tricross Pardo Suíço (15)	0,900 ^A	0,100 ^B	0,800	0,200	0,000

A, B: valores significativamente diferentes entre grupos genéticos ($P < 0,05$).

Na análise de associação entre os genótipos do polimorfismo g.98535683A>G do gene *CAST* e as características de interesse, foram considerados somente os genótipos AA e AG (Tabela 2). Os indivíduos GG foram excluídos desta análise uma vez que a frequência deste genótipo na amostra total de animais foi de 6%. Foram observadas associações significativas ($P < 0,05$) entre genótipos e as características FC e MFI, sendo o genótipo homozigoto AA favorável em relação ao genótipo heterozigoto AG. As diferenças encontradas entre os genótipos AA e AG (AA - AG) foram de - 0,19 kg para FC e 5,31 para MFI. Após a correção dos valores de significância estatística em função da utilização de testes múltiplos nas análises de associação, as relações entre FC e MFI e os genótipos mostraram-se próxima de significativa ($P = 0,124$) e significativa ($P = 0,004$), respectivamente. Em conjunto, estes resultados demonstram a existência de efeito do polimorfismo g.98535683A>G do gene *CAST* sobre a maciez da carne bovina maturada, estudada no presente trabalho, sendo o alelo A favorável em relação ao G. A falta de conexão entre as formas alélicas do gene *CAST* e as características relacionadas ao crescimento (AOL) e à deposição de gordura (EGS e LIP) era esperada, uma vez que, até onde

se tem conhecimento, o seu produto proteico não participa da fisiologia destas características. Quando as análises de associação foram realizadas nos grupos genéticos com maior número de indivíduos (Nelore e Angus x Nelore) encontrou-se resultados significativos ($P < 0,05$) para FC no Angus x Nelore e para MFI no Angus x Nelore e no Nelore.

Tabela 2. Médias dos quadrados mínimos e erros padrão das características avaliadas, determinados para os genótipos do polimorfismo g.98535683A>G do gene CAST. O número de animais de cada grupo genético encontra-se indicado entre parênteses.

Genótipo	Característica				
	AOL ^{ns} (cm ²)	EGS ^{ns} (mm)	LIP (%) ^{ns}	FC* kg	MFI*
AA	68,58	5,79	1,23	3,79	59,80
(312)	±0,81	±0,22	±0,16	±0,08	±1,44
AG	68,72	5,82	1,22	3,98	54,50
(158)	±0,95	±0,26	±0,09	±0,09	±1,70

*Significativo ($P < 0,05$); ^{ns}Não significativo ($P > 0,05$).

AOL: área de olho de lombo; EGS: espessura de gordura subcutânea; LIP: Lipídeos totais; FC: força de cisalhamento; MFI: índice de fragmentação miofibrilar

Estes achados de associação são semelhantes aos resultados de Calvo et al. (2014), que ao trabalharem com a raça taurina *Parda de Montanã*, também encontraram superioridade dos indivíduos portadores do alelo A em relação ao G, no que diz respeito à maciez da carne maturada por sete dias (medida por força de cisalhamento); indivíduos de genótipo GG apresentaram carne menos macia que indivíduos de genótipo AA e AG. No presente trabalho, indivíduos GG foram excluídos das análises de associação tendo em vista que, em função do pequeno número de indivíduos com este genótipo ($n = 30$), poderia ocorrer inconsistência de resultados. O mesmo pode ser suposto em relação ao trabalho de Calvo e colaboradores, que, ao trabalharem com 144 da raça *Parda de Montanã*, não encontraram diferenças na maciez da carne entre indivíduos de genótipo AA e AG.

Por essa razão, com base nos resultados destes dois trabalhos não é possível determinar a forma de interação entre os alelos deste loco.

A proporção da variação fenotípica explicada pelo polimorfismo g.98535683A>G do *CAST* sobre a FC e MFI foi de 1,20 % e 2,71 %, respectivamente. Segundo Calvo et al. (2014), a variação fenotípica sobre a força de cisalhamento na raça *Parda de Montanã* foi de 18,41%, o que o caracterizaria como *major* gene. Entretanto, esses resultados são consideravelmente superiores aos encontrados no presente estudo para o conjunto de animais estudados. Esta diferença na magnitude de valores pode ser explicada em razão de diferenças de *background* genético e/ou de interações epistáticas entre o gene candidato e outros genes do genoma nos animais estudados nos dois trabalhos. A diferença também pode ser devido à diferenças de tamanho das amostras estudadas.

A corroboração dos resultados de associação entre o SNP g.98535683A>G do gene *CAST* e a maciez da carne em bovinos de corte de diferente *background* genético indica que o mesmo esteja em ligação ou em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo funcional. Não pode também ser descartada a possibilidade de funcionalidade do próprio polimorfismo tendo em vista que este se encontra localizado em região codificante (éxon 7), sendo responsável por troca de aminoácido não sinônima não conservativa (Thr182Ala – treonina por alanina na posição 182 da sequência de aminoácidos, NM_174003). Em trabalho realizado com subamostra da utilizada na presente pesquisa (CURI et al., 2009), encontrou-se associação significativa ($P < 0,05$) entre o SNP AF_159246.1:g.2959A>G da região 3' UTR do gene *CAST* e a maciez da carne medida por meio de força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar. A análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre o polimorfismo do gene *CAST* ora estudado e o da região 3' UTR mostraram valores de r^2 igual a 0,1725 e 0,2229 considerando-se apenas os animais Nelore e a amostra total de animais, respectivamente. Estes resultados indicam um fraco DL entre os dois locos (menor que 0,3), o que demonstra a independência dos dois SNPs e, portanto, dos seus efeitos sobre a maciez da carne.

Em conclusão, os achados do presente trabalho mostraram, em função da relação de genótipos com a maciez da carne maturada e da distribuição dos alelos favoráveis, o potencial de aplicação do SNP g.98535683A>G:BTAU7 do gene *CAST*

na seleção de animais e no melhoramento genético da característica na raça Nelore (*Bos indicus*), ao mesmo tempo que validaram, para a mesma e para seus cruzamentos com *Bos taurus*, resultados de associação anteriormente descritos na literatura.

4. REFERÊNCIAS

BARENDSE, W. J. The transition from quantitative trait loci to diagnostic test in cattle and other livestock. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, n. 8, p. 831 – 836, 2005.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, v. 57, n.1, p. 289 - 300, 1995.

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

CALVO, J. H.; IGUÁCEL, L. P.; KIRINUS, J. K.; SERRANO, M.; RIPOLL, G.; CASASÚS, I.; JOY, M.; PÉREZ-VELASCO, L.; SARTO, P.; ALBERTÍ, P.; BLANCO M. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 775–782, 2014.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE, JR. C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13–19, 2005.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB do agronegócio. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 30 abril 2016.

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

CURI, P. R.; MORAES, R. V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 712– 722, 1981.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, n. 4, p. 456–462, 2009.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, p. 313–328, 2004.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderisation-V: Inactivation of calpains. **Meat Science**, v. 37, n. 3, p. 391–409, 1994.

HAYES, B.; GODDARD, M. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. **Genome**, v. 53, n. 11, p. 876 – 883, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária – Março de 2016. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf>. Acesso em: 30 04 2016.

KILLINGER, K. M.; CALKINS, C. R.; UMBERGER, W. J.; FEUZ, D. M.; ESKRIDGE, K. M. Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3288–3293, 2004.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, n. 1-2, p. 93–104, 1994.

SAS (2004) SAS/STAT User's Guide, Version 9.1, Volumes 1-7. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

TAIT, R. G.; WILSON, D. E.; ROUSE, G. H. Prediction of retail product and trimmable fat yields from the four primal cuts in beef cattle using ultrasound or carcass data. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 6, p. 1353–1360, 2005.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement. Roman L. Hruska U. S. MARC. Agricultural Research Service, USDA, Clay Center, NE, USA, 1995.

ZHU, M.; ZHAO, S. Candidate gene identification approach: Progress and challenges. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 420–427, 2007.

CAPITULO 3 – Expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina (MyHC) em bovinos Nelore com características contrastantes de crescimento e maciez da carne

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo quantificar a expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina (MyHC) em animais da raça Nelore com características contrastantes de crescimento e maciez da carne. A partir de uma população de 90 bovinos contemporâneos da raça Nelore, foram selecionados 24 indivíduos com características contrastantes de peso e maciez da carne e divididos em quatro grupos experimentais (6 animais/grupo). Os grupos corresponderam a animais leves com carne macia (PF = 493,50 kg e FC = 3,76 kg), animais leves com carne dura (PF = 515,66 kg e FC = 8,06 kg), animais pesados com carne macia (PF = 604,33 kg e FC = 3,99) e animais pesados com carne dura (PF = 605,33 kg e FC = 7,83 kg). Em cada grupo, foram avaliadas características de qualidade da carne como índice de fragmentação miofibrilar (MFI) área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização (IM), lipídeos totais (LIP) coloração instrumental (L^* , a^* , b^*) e perdas por cozimento (PT). A análise de expressão dos genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1* foi feita por PCR em tempo real (RT-qPCR). A caracterização e quantificação proteica das isoformas da MyHC (MyHC-I, MyHC-IIa e MyHC-IIx/d) foi realizada por eletroforese SDS-PAGE. Em todas as análises (qualidade da carne e expressão gênica e proteica) não foi observada interação significativa entre crescimento e maciez da carne. Nas características AOL, EGS, IM e LIP não foi observado efeito significativo do crescimento e a maciez. Porém, os animais pesados apresentaram maiores valores de L^* , a^* e b^* em relação aos animais leves. Na maciez, o grupo de carne macia mostrou maiores valores de L^* ($32,29 \pm 2,78$) que o grupo de carne dura ($29,10 \pm 2,61$). Por outro lado, maiores PT foram observadas em animais com carne dura em relação a animais com carne macia. Nos resultados de expressão gênica, o gene *MYH7* não mostrou diferenças de expressão entre animais leves e pesados. Entretanto, a expressão dos genes *MYH2* e *MYH1* foi significativamente menor nos animais pesados em relação aos animais leves. Quanto à maciez da carne, a expressão dos três genes não diferiram significativamente entre grupos de carne dura e macia. Na expressão proteica, as três isoformas (MyHC-I, IIa e IIx), não mostraram diferença significativa entre animais leves e pesados. No entanto, as proporções da MyHC-I foram significativamente maiores no grupo de carne dura ($16,51 \pm 5,47$) em relação ao grupo de carne macia ($9,12 \pm 3,16$) e pelo contrário, as proporções da MyHC-IIa foram maiores no grupo de carne macia ($73,78 \pm 4,45$) em relação ao grupo de carne dura ($65,45 \pm 8,79$). A isoforma MyHC-IIx/d não mostrou efeito significativo sobre a maciez. Os resultados deste trabalho mostraram o potencial da MyHC-IIa como possível biomarcador para seleção e melhoramento da qualidade da carne de bovinos Nelore, além de, manifestar o diferencial de expressão dos genes *MYH1* e *MYH2* entre animais pesados e leves.

Palavras-chave: Fibras musculares, eletroforese, gene, isoforma, PCR

1. INTRODUÇÃO

Na produção de bovinos de corte do Brasil, a raça Nelore (*Bos indicus*), juntamente com os produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus* é responsável pela quase totalidade da carne bovina produzida (FERRAZ e FELÍCIO, 2010). De forma geral, na produção de gado de corte, o crescimento animal e a qualidade da carne são dois fatores de impacto econômico. No crescimento, o maior interesse é o peso final de abate. Enquanto que, na qualidade da carne, a maciez é a característica de maior importância para satisfação dos consumidores (TROY; KERRY, 2010).

O aumento da massa muscular pode ser adquirido principalmente por aumento no tamanho das fibras, e/ou a transformação de fibras de contração lenta para fibras de contração rápida (WEGNER; ALBRECHT; FIEDLER, 2000). No entanto, cada tipo de fibra apresenta diferentes características funcionais, estruturais, metabólicas, químicas e morfológicas (LEFAUCHEUR, 2010) que poderiam alterar os processos bioquímicos *post-mortem* e consequentemente afetar os mecanismos do amaciamento da carne (BOWKER et al., 2004). Portanto, o estudo conjunto das fibras musculares associado a características do crescimento e à maciez poderia se tornar um caminho viável para a ciência da carne.

Com o intuito de estudar a interação do crescimento e a maciez da carne, vários estudos em bovinos abordaram o efeito do padrão de crescimento e a maciez da carne (PURCHAS; BURNHAM; MORRIS, 2002; PERRY; THOMPSON, 2005; COSTA et al., 2015) ou a taxa de crescimento e sua relação com as fibras musculares e a qualidade da carne (WEGNER; ALBRECHT; FIEDLER, 2000; MCGILCHRIST et al., 2016). Outros, pelo contrário, avaliaram os efeitos do padrão de crescimento sobre o sistema calpaína e o amaciamento da carne (SAZILI et al., 2004). Entretanto, o diferencial de crescimento entre os animais experimentais nestes trabalhos foi manipulado por restrição alimentar, manipulação da dieta ou mudanças nutricionais.

Nos últimos anos, a estratégia tem consistido em comparar grupos extremos de crescimento e maciez por meio de análises de genômica e proteômica. (BERNARD et al., 2009; GUILLEMIN et al., 2011; D'ALESSANDRO et al., 2012;

CARVALHO et al., 2014). Nestes estudos, algumas isoformas (ex: MyHC-IIx) da cadeia pesada da miosina (MyHC) foram propostas como biomarcadores de maciez da carne em bovinos *Bos taurus* (PICARD et al., 2015). A MyHC é a proteína mais abundante do músculo e, portanto, comumente usada para o reconhecimento molecular dos tipos de fibra num determinado músculo. Cada gene da família da miosina (*MYH*) codifica para uma isoforma específica (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). No músculo esquelético de bovinos adultos, têm sido observadas principalmente as isoformas MyHC-I, IIa, e IIx/d (TANABE; MUROYA; CHIKUNI, 1998; CHIKUNI; MUROYA; NAKAJIMA, 2004) codificadas pelos genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1*, respectivamente (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

O estudo conjunto do gene e da proteína proporciona a ligação entre o genoma e os processos biológicos que dão origem ao fenótipo (HOCQUETTE et al., 2007c). Portanto, levando em consideração a importância das fibras musculares no crescimento e para a maciez da carne bovina, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica juntamente com a expressão proteica da MyHC em animais da raça Nelore com características contrastantes de crescimento e maciez da carne, visando o potencial de aplicação da MyHC na seleção de animais para o melhoramento genético da raça Nelore.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção e manejo dos animais experimentais

Foi utilizada uma população de 90 animais contemporâneos, machos inteiros da raça Nelore provenientes de uma única fazenda de sistema de pastejo contínuo (peso médio 390 ± 37 kg, idade média 24 meses) e terminados em confinamento por um período de 95 dias. O período de terminação foi conduzido no Confinamento Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ - Unesp, Botucatu/SP, seguindo procedimentos aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP sob protocolo número 159/2014.

Logo após a chegada no local de experimentação, os animais receberam vermífugo, foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 18 baias cobertas. Os animais foram adaptados à dieta pelo método de restrição, aumentando-se o oferecimento diário gradativamente até atingir o consumo *ad libitum* (PRITCHARD, 1998). A dieta foi baseada nas exigências e características nutricionais do programa NRC (2000) para animais inteiros em crescimento e com ganho esperado em torno de 1,6 kg/animal/dia. A dieta foi constituída de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de girassol, milho triturado, ureia, núcleo mineral e aditivo controlador de fermentação ruminal. Os animais foram pesados no início do período experimental e a cada 28 dias (até o final do período de confinamento), sempre na condição de jejum de aproximadamente 16 horas. Ao final, todos os dados de ganho de peso (GP), peso final ao abate (PF) e peso da carcaça quente (PCQ) foram registrados.

2.2 Abate, coleta de amostras e análises das características de qualidade da carne

Os animais foram abatidos (peso vivo e idade médias de 550 kg e 27 meses, respectivamente) de acordo com as normas estipuladas para o Abate Humanitário de Bovinos (LUDTKE et al., 2012) no frigorífico comercial ANGELELLI Ltda. - Piracicaba/SP, Brasil. Durante o abate, as carcaças foram devidamente identificadas e pesadas. No momento de preparação das carcaças para o resfriamento foram colhidas amostras do músculo *Longíssimos thoracis* (LT), que foram armazenadas a -80 °C em solução RNAlater® (Ambion, ThermoFisher Scientific, EUA) para os ensaios de expressão dos genes da MyHC (*MYH7*, *MYH2* e *MYH1*).

Após a colheita das amostras para os ensaios de expressão gênica, as carcaças foram resfriadas por 24 horas. Em seguida foram colhidas quatro amostras do músculo LT de aproximadamente 2,5 cm de espessura entre a 11ª e 13ª costelas da meia-carcaça esquerda de cada animal. Duas amostras foram embaladas a vácuo e maturadas a 2 °C durante 7 dias e duas foram armazenadas a -20 °C. As amostras colhidas entre a 12ª e 13ª costelas foram usadas para a medição da área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização (IM), coloração instrumental (L^* , a^* , b^*) e força de cisalhamento (FC).

As amostras colhidas entre a 11^a e 12^a costelas foram utilizadas para a realização das análises de quantificação de Lipídeos totais (LIP), Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e a expressão proteica por meio de eletroforese das isoformas da MyHC (MyHC-I, MyHC-IIa, MyHC-IIx/d) codificadas pela família de genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1*, respectivamente.

A AOL foi determinada pelo método do quadrante de pontos e expressa em cm² (USDA - *Quality and Yield Grade*, 2000). A EGS foi medida com paquímetro e expressa em milímetros (mm). A análise do IM foi medida utilizando a escala de graduação visual (USDA - *Quality and Yield Grade*, 2000), enquanto que a cor foi estimada utilizando o colorímetro *KONICA MINOLTA - CR 400 (Minolta Co. Ltd.)*, onde o equipamento foi calibrado para um padrão branco no sistema CIE $L^* a^* b^*$ e tomadas às medidas absolutas das coordenadas de luminosidade (L^*), coloração vermelha (a^*) e coloração amarela (b^*). As demais análises de FC, MFI e LIP foram determinadas conforme as metodologias descritas por Wheeler; Koohmaraie; Shackelford, (1995); Culler et al. (1978) e Bligh e Dyer, (1959), respectivamente. As perdas totais de água (PT) foram registradas durante o cozimento das amostras na análise da FC.

2.3 Separação de grupos experimentais contrastantes

Após as análises físicas e químicas da carne dos 90 animais abatidos, foram selecionados 24 indivíduos divididos em quatro grupos experimentais contrastantes (6 animais/grupo). Cada grupo foi obtido pela combinação de dois fatores: maciez, medida pela FC da carne, coletada 24 horas após o abate (FC_0) e crescimento medido, pelo PF. Segundo a maciez, foram selecionados animais de carne macia e animais de carne dura. O grupo de animais de carne macia incluiu valores de FC_0 entre 2,33 e 4,38 kg e o grupo de carne dura incluiu valores de FC_0 entre 6,30 e 9,93 kg. Segundo o crescimento, foram selecionados animais leves e animais pesados. O grupo de animais leves encerrou valores de PF entre 425,0 e 540,0 kg e o grupo de animais pesados atingiu valores de PF entre 550,0 e 688,0 kg. As características de maciez e crescimento de cada grupo apresentam-se resumidas na Tabela 1. Os quatro grupos contrastantes foram então classificados como leve com

carne macia (LM), leve com carne dura (LD), pesado com carne macia (PM) e pesado com carne dura (PD).

Tabela 1. Médias e desvio padrão do peso final ao abate (PF), ganho de peso (GP), força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI) dos grupos experimentais

Característica	LM	LD	PM	PD
PF (kg)	493,50 ± 42,94	515,66 ± 12,86	604,33 ± 48,80	605,33 ± 41,00
GP (kg)	129,66 ± 43,28	131,33 ± 22,81	189,33 ± 44,05	183,83 ± 12,27
FC_0* (kg)	3,76 ± 0,79	8,06 ± 1,29	3,99 ± 0,26	7,83 ± 0,82
FC_7** (kg)	3,16 ± 0,51	5,77 ± 0,55	3,87 ± 0,42	5,67 ± 0,56
MFI_0*	56,95 ± 12,47	39,13 ± 5,70	60,77 ± 6,59	44,15 ± 12,93
MFI_7**	65,73 ± 6,34	44,65 ± 5,53	64,85 ± 6,43	46,21 ± 4,89

*24 horas após abate. ** 7 dias de maturação. LM: Grupo de animais leves com carne macia; LD: Grupo de animais leves com carne dura; PM: Grupo de animais pesados com carne macia; PD: Grupo de animais pesados com carne dura

2.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)

Antes do processo de extração do RNA total das amostras dos quatro grupos experimentais, 100 mg de músculo LT de cada amostra previamente estocada em *RNAlater® Tissue Collection (Ambion, Life Technologies, EUA)* foram lavadas usando água *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA)*.

O RNA total foi extraído usando 1 mL de *TRIzol® reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA)* conforme as especificações do fabricante. A concentração, pureza e integridade do RNA total foram determinadas usando o espectrofotômetro *NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific,*

USA, 2007) e eletroforese em gel de agarose 1 %, respectivamente. A eliminação e confirmação da ausência do DNA genômico foram realizadas conforme as instruções do protocolo da DNA-se *TURBO DNA-free™ Kit* (Ambion, ThermoFisher Scientific, EUA) e o kit de quantificação de DNA, *Qubit dsDNA Assay Kit* (Invitrogen, EUA).

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante.

Para as reações de RT-qPCR seis sondas *TaqMan®* (ThermoFisher Scientific, EUA) foram usadas. Três sondas identificadas como Bt03224255_m1, Bt03223147_gH e Bt03223152_m1 pertenceram aos respectivos genes alvo *MYH7*, *MYH2* e *MYH1* e três sondas identificadas como Bt03210915_g1, Bt03241947_m1 e Bt03279175_g1 corresponderam aos respectivos genes de referência *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, *TATA box binding protein (TBP)* e *Beta actina (ACTB)*. Os genes de referência foram selecionados com base no trabalho de Giusti et al. (2013), considerados os mais estáveis no músculo LT de bovinos da raça Nelore.

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata no sistema *QuantStudio 12K Flex* (Applied Biosystems) seguindo as especificações do protocolo *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, EUA). Os dados de *threshold cycle (Ct)* obtidos nas diferentes reações foram analisados como descrito no item 2.6 (análise estatística).

2.5 Avaliação semi-quantitativa da expressão proteica por meio de eletroforese SDS-PAGE

Para a análise das isoformas da MyHC, as amostras do músculo LT dos quatro grupos experimentais foram processadas segundo a metodologia de Vechetti-Júnior et al. (2013). Na separação eletroforética foi usado um gel gradiente 7 - 10 % *SDS-PAGE* e um gel de empacotamento a 4 %. Vinte e cinco µL de amostra foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada a 70 V, 28 mA e 4 °C por uma hora e a 180 V, 12 mA e 4 °C, durante 29 horas. Nas corridas, dois tampões diferentes foram usados. Um tampão de corrida inferior composto por glicina (28,8 g), Trisma-base

(6,068 g), dodecilsulfato de sódio (2 g) e água destilada (2 L) e um tampão de corrida superior que foi idêntico ao tampão de corrida inferior, exceto pela adição de 0,468 mL de 2β-mercaptoetanol.

Os géis foram corados com corante *Coomassie Blue* (*Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA*), posteriormente, fotografados e as imagens capturadas usando *VDS Software* (*Pharmacia Biotech, EUA*). A identificação das isoformas (MyHC-I, MyHC-IIa, MyHC-IIx/d) foi determinada de acordo com seu peso molecular. A quantificação semi-quantitativa foi realizada por densitometria das bandas correspondentes à cada isoforma usando o *Imagem Mestre VDS Software* (*Pharmacia Biotech, EUA*).

2.6 Análise estatística

No estudo da expressão gênica foi empregado o procedimento mixed do programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2011). Primeiro, foi calculada a média geométrica dos três genes de referência (*GAPDH*, *TBP* e *ACTB*) usando os seus respectivos dados de Ct como sugerido por Vandesompele et al. (2002). Posteriormente a expressão relativa dos genes alvo (*MYH7*, *MYH2* e *MYH1*) normalizada pela expressão dos genes de referência foi estimada aplicando a estrutura de modelo linear misto para a quantificação relativa de dados de RT-PCR como proposto por Steibel et al. (2009).

$$Y_{gik} = G_{ig} + M_{gki} + C_{gki} + D_{ik} + e_{igk}$$

Onde Y_{gik} = Ct obtido pelo software do termociclador para o gene g (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), no rt poço da placa (referente à replica técnica) proveniente da amostra do animal k pertencente ao grupo i. G_{ig} = efeito do grupo i na expressão do gene g. M_{gk} = efeito específico do gene g na maciez da carne do animal k. C_{gk} = efeito específico do gene g no crescimento do animal k. D_{ik} = efeito específico da amostra (captura as diferenças entre as amostras que são comuns a ambos os genes, particularmente os que afetam a concentração de RNA, tal como extração diferencial ou eficiências de amplificação entre amostras). e_{igk} = refere-se ao resíduo.

Na análise de expressão proteica da MyHC entre os diferentes grupos experimentais foi utilizado o procedimento do Modelo Linear Geral (GLM) do programa SAS v.9.1 (SAS, 2004). O modelo incluiu além do efeito de maciez da carne e o efeito de crescimento do animal, a interação “maciez e crescimento” como segue: $Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + T \times C + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} = característica de interesse, μ = média geral, T_i = efeito da maciez da carne, C_j = efeito do crescimento animal, $T \times C_{ij}$ = efeito da interação maciez da carne e crescimento e e_{ijk} = erro aleatório. As médias dos quadrados mínimos foram comparadas pelo teste Tukey. Considerou-se como nível de significância estatística o valor de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características de qualidade da carne

Na avaliação das características físicas e químicas de qualidade da carne não foi observada interação significativa ($P > 0,05$) entre os dois fatores: crescimento animal e maciez da carne, portanto, todos os resultados são apresentados separadamente como efeito simple de cada fator. Como esperado, os valores médios de PI, GP, PF, PCQ, FC e MFI demonstraram grupos contrastantes para maciez e crescimento (Tabela 2). Igualmente, como já amplamente relatado na literatura, o processo de maturação durante sete dias diminuiu os valores de FC e incrementou os valores de MFI melhorando a maciez da carne de todos os grupos experimentais (Tabela 1 e 2).

Tabela 2. Médias e desvio padrão de peso inicial (PI), ganho de peso (GP), peso final ao abate (PF), peso da carcaça quente (PCQ), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmoreio (IM), lipídeos totais (LIP), força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI), coloração instrumental (L^* , a^* , b^*) e perdas totais de água no cozimento (PT) da carne de animais da raça Nelore selecionados por crescimento e maciez

	Leve	Pesado	Macia	Dura
PI (kg)	374,08 ± 31,26 ^b	418,25 ± 27,12 ^a	389,42 ± 36,75	402,92 ± 36,43
GP (kg)	130,50 ± 32,99 ^b	186,58 ± 30,96 ^a	159,5 ± 52,00	157,58 ± 32,51
PF (kg)	504,58 ± 32,36 ^b	604,83 ± 42,97 ^a	548,92 ± 72,60	560,50 ± 55,06
PCQ	284,04 ± 34,45 ^b	328,71 ± 34,0 ^a	306,25 ± 50,34	306,50 ± 1,90
AOL	76,66 ± 15,92	82,83 ± 6,74	85,58 ± 13,21	73,91 ± 8,40
EGS	4,33 ± 1,19	5,95 ± 4,71	5,46 ± 4,64	4,83 ± 1,83
IM	2,28 ± 0,39	2,50 ± 0,50	2,28 ± 0,41	2,49 ± 0,46
LIP	0,75 ± 0,25	0,85 ± 0,43	0,88 ± 0,41	0,72 ± 0,27
FC _{0*} (kg)	5,92 ± 2,46	5,92 ± 2,08	3,88 ± 0,57 ^B	7,95 ± 1,04 ^A
FC _{7**} (kg)	4,48 ± 1,45	4,79 ± 1,05	3,53 ± 0,58 ^B	5,74 ± 0,53 ^A
MFI _{0**}	48,04 ± 13,12	52,46 ± 13,08	58,86 ± 9,71 ^A	41,64 ± 9,88 ^B
MFI _{7***}	55,19 ± 12,38	53,53 ± 9,39	63,29 ± 6,60 ^A	45,43 ± 5,05 ^B
L^*	29,63 ± 3,08 ^b	31,76 ± 2,85 ^a	32,29 ± 2,78 ^A	29,10 ± 2,61 ^B
a^*	12,15 ± 1,57 ^b	14,22 ± 2,47 ^a	12,74 ± 2,10	13,64 ± 2,47
b^*	3,13 ± 1,11 ^b	5,25 ± 1,71 ^a	3,92 ± 1,86	4,47 ± 1,73
PT	20,99 ± 6,06	21,67 ± 4,33	18,16 ± 3,46 ^B	24,50 ± 4,69 ^A

24 horas após abate. * 7 dias de maturação. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha, diferem entre grupo de animais leves e pesados. Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma linha, diferem entre grupo de animais com carne dura e carne macia ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Nas características AOL, EGS, IM e LIP não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) do crescimento e a maciez (Tabela 2). Segundo a literatura, as características relacionadas com a deposição de gordura (EGS, IM e LIP) influenciam positivamente nos atributos sensoriais da carne incluindo gosto, sabor, suculência e maciez (HOCQUETTE et al., 2010). Entretanto, neste estudo, não foram observadas diferenças nessas características entre os grupos de carne macia e carne dura. Na raça Nelore, Malheiros (2014) observou associação negativa entre o LIP e a FC, sugerindo influência favorável do conteúdo de lipídeos sobre a maciez da carne. No entanto, esta associação foi baixa ($r_p = - 0,10$). Por outro lado, associação não significativa foi relatada pelo mesmo autor entre a EGS e o IM com a FC. Esta pobre associação da FC com as características de EGS, IM e LIP em animais da raça Nelore poderia ser a razão pela qual não foram observadas diferenças nas características de EGS, IM e LIP entre os grupos de carne macia e carne dura (Tabela 2).

Nos resultados dos índices de coloração (L^* , a^* , b^*) foi observado efeito significativo do crescimento e maciez da carne. Os animais pesados apresentaram maiores valores de L^* , a^* e b^* em relação aos animais leves (Tabela 2). As características de cor da carne são o resultado da interação do oxigênio com a mioglobina no músculo. A concentração da mioglobina parece incrementar com o tamanho do animal (ODDY et al., 2001). Esse fato poderia explicar os maiores valores de L^* , a^* e b^* observados nos animais pesados em relação aos animais leves. Resultados semelhantes foram relatados por (Purchas, Burnham e Morris, 2002). Os autores relataram carnes altamente vermelhas e amárelas em bovinos *Bos taurus* (Angus) com crescimento rápido em relação a bovinos com crescimento lento.

Nos grupos de maciez, o grupo de carne macia mostrou maiores valores de L^* ($32,29 \pm 2,78$) em comparação com o grupo de carne dura ($29,10 \pm 2,61$), indicando que carnes mais brilhantes estão associadas a maior maciez. Estudo recomendou a utilização dos índices de coloração (L^* , a^* , b^*) como ferramenta para prever a maciez da carne bovina (WULF et al., 1997). Entretanto, no presente trabalho, foram denotadas diferenças entre os grupos de carne macia e dura apenas para o índice L^* e não diferenças foram encontradas para os índices a^* , b^* .

Em relação às perdas totais por cozimento, diferenças entre os grupos experimentais foram observadas. Porém, estas diferenças não foram ocasionadas como efeito do crescimento. Assim, as PT foram maiores no grupo de animais com carne dura em comparação ao grupo de carne macia (Tabela 2). Estes resultados eram esperados visto que é extensamente conhecida a influência da distribuição e disponibilidade da água no músculo sobre os principais atributos de qualidade da carne como aparência, suculência, maciez e sabor (PEARCE et al., 2011). Em consequência, altas perdas de água ocasionam carnes duras e com menor suculência como constatado nos resultados deste estudo.

3.2 Expressão gênica e proteica da cadeia pesada da miosina (MyHC)

Para avaliar os efeitos potenciais da miosina sobre o crescimento e a maciez da carne de bovinos Nelore, ensaios de expressão gênica e proteica da MyHC foram realizados nas amostras do músculo LT dos animais de cada grupo experimental. Na expressão gênica foram avaliados os genes *MYH7* (MyHC-I), *MYH2* (MyHC-IIa + IIx/d) e *MYH1* (MyHC-IIx/d). A eletroforese (SDS-PAGE) do músculo LT permitiu a separação dessas três isoformas da MyHC (I, IIa e IIx/d) (Figura 1). A isoforma MyHC IIb não foi observada, como relatado por Chikuni, Muroya e Nakajima, (2004) em pesquisas de identificação e expressão da MyHC em músculo esquelético de bovinos adultos. Especificamente na raça de bovinos Nelore, Malheiros (2014), também não observou a presença da isoforma MyHC IIb na eletroforese do músculo LT.



Figura 1. Eletroforese da cadeia pesada da miosina (MyHC) do músculo *Longissimus thoracis* de animais Nelore. SDS-PAGE 7 – 10 %.

3.2.1 Expressão gênica da cadeia pesada da miosina

Nas análises de expressão gênica não foi observada interação significativa ($P > 0,05$) entre crescimento do animal e a maciez da carne. No crescimento, o gene *MYH7* não mostrou diferenças de expressão ($P > 0,05$) entre animais leves e pesados. Entretanto, a expressão dos genes *MYH2* e *MYH1* foi significativamente menor ($P < 0,05$) nos animais pesados ($\text{Log}_2 \text{Fold-Change}$ de - 0,46 e -1,81 para *MYH2* e *MYH1*, respectivamente) em relação aos animais leves (Figura 2A).

Em bovinos de corte as mudanças das características musculares dependem do padrão de crescimento (SCHREURS et al., 2008). A natureza dinâmica da modulação das fibras musculares respondem a sinais químicos, hormonais ou requerimentos de energia do músculo durante o desenvolvimento (ODDY et al., 2001). Em consequência, a maior expressão dos genes *MYH2* e *MYH1* nos animais leves reflete maior demanda do metabolismo glicolítico em relação aos animais pesados.

Tipicamente, o crescimento pós-natal de bovinos só consiste de hipertrofia. Esse crescimento é acompanhado de modulação dos diferentes tipos de fibras. As fibras tipo I são estabelecidas durante os primeiros meses de idade e, portanto, a modulação das fibras tipo IIx ocorre em detrimento das fibras IIa (WEGNER; ALBRECHT; FIEDLER, 2000). Estes eventos do crescimento pós-natal, poderiam explicar a ausência de diferenças significativas da expressão do gene *MYH7* entre animais leves e pesados.

Em relação à maciez da carne, a expressão dos genes *MYH7*, *MYH2* e *MYH1* não foi significativamente diferente ($P > 0,05$) entre animais de carne macia e animais de carne dura (Figura 2B). Em estudos de transcriptoma, Gonçalves (2015) e Fonseca (2016), não observaram expressão diferencial desses genes entre grupos de bovinos Nelore com características contrastantes de maciez (carne macia e carne dura) como observado neste trabalho.

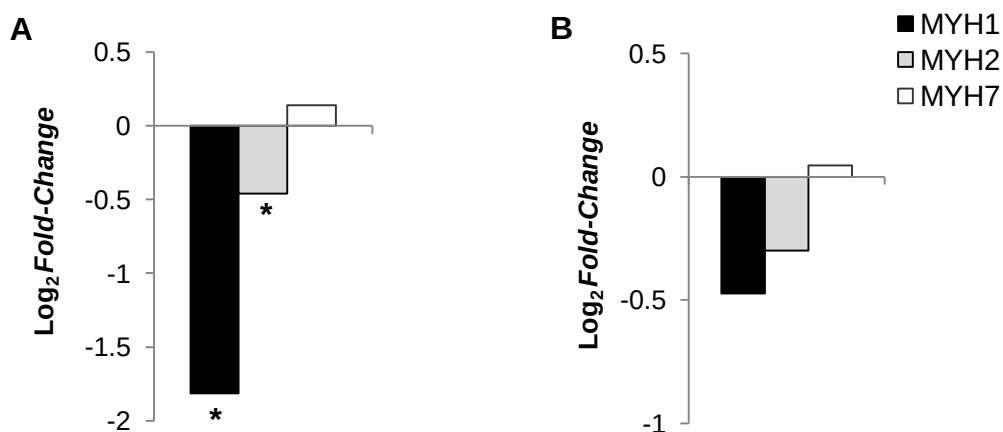


Figura 2. Expressão gênica relativa (*Fold-Change*) dos genes da cadeia pesada da miosina (*MYH*) do músculo *Longissimus thoracis* de grupos de animais Nelore com características contrastantes de **(A)** crescimento (animais pesados/animais leves) e **(B)** maciez (carne dura/carne macia) (b). *Significativo ($P < 0,05$).

3.2.2 Expressão proteica da cadeia pesada da miosina

A eletroforese da MyHC não mostrou interação significativa ($P > 0,05$) entre crescimento do animal e a maciez da carne. Quando avaliado o efeito de cada fator, as três isoformas caracterizadas (MyHC-I, MyHC-IIa e MyHC-IIx/d) não mostraram diferenças entre animais leves e animais pesados (Figura 3A). Entretanto, as isoformas MyHC-I e MyHC-IIa mostraram efeito significativo ($P < 0,05$) sobre a maciez da carne. As proporções da MyHC-I foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo de carne dura ($16,51 \pm 5,47$) em relação ao grupo de carne macia ($9,12 \pm 3,16$) (Figura 3B) e pelo contrário, as proporções da MyHC-IIa foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo de carne macia ($73,78 \pm 4,45$) em relação ao grupo de carne dura ($65,45 \pm 8,79$) (Figura 3B). Deste modo, a MyHC-I mostrou efeito negativo (maiores proporções nos grupos de carne dura) e a MyHC-IIa efeito positivo (maiores proporções nos grupos de carne macia) sobre a maciez do músculo LT da raça Nelore. Esses resultados foram corroborados quando foi realizado um análise adicional de associação entre as isoformas da cadeia pesada da miosina e as principais características de qualidade da carne dos 90 animais (Tabela 3).

Nesses resultados foi observado associação positiva significativa ($P < 0,01$) da MyHC-I com a FC ($r = 0,355$). A MyHC-IIa ao contrário, apresentou associação significativa ($P < 0,01$) negativa com essa característica ($r = - 0,323$). Adicionalmente, associação positiva significativa da MyHC-IIa ($r = 0,248$; $P < 0,01$) com o índice L^* da cor da carne foi observado (Tabela 3). Consequentemente, os resultados deste trabalho demonstraram que altas proporções da MyHC-IIa favorece a maciez e melhora a luminosidade da cor da carne de bovinos da raça Nelore.

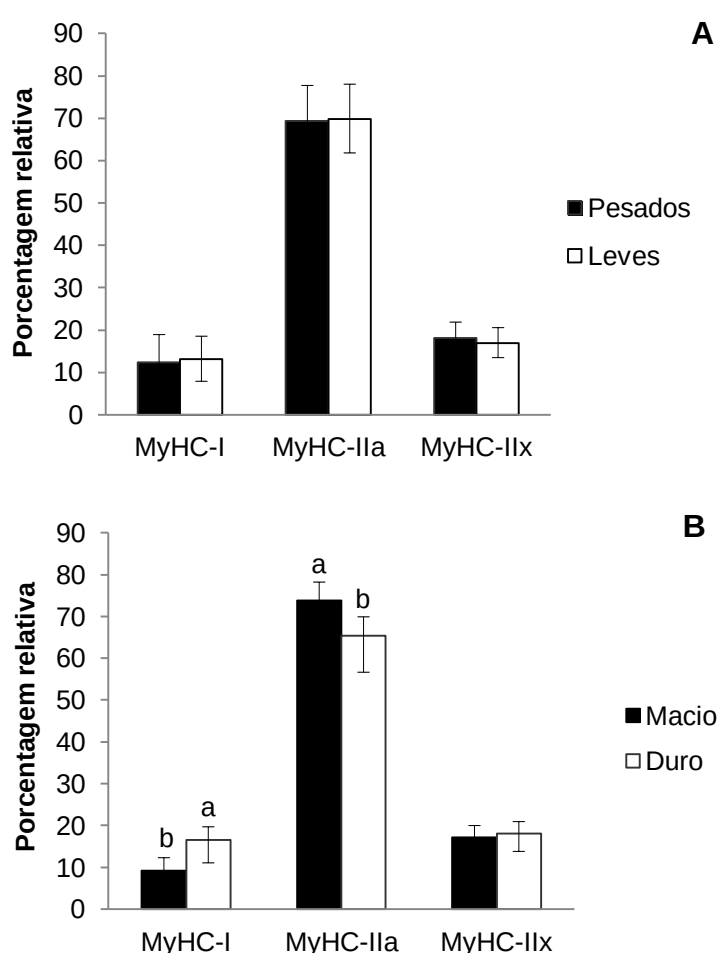


Figura 2. Porcentagem relativa das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC) do músculo *Longissimus thoracis* de animais Nelore com características contrastantes de crescimento (**A**) e maciez (**B**). As barras indicam o desvio padrão das médias. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre grupos.

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre as isoformas da cadeia pesada da miosina MyHC (I, IIa, IIx) e as características de força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI), luminosidade (L^*), coloração vermelha (a^*) e coloração amarela (b^*) da carne do músculo *Longíssimos thoracis* de animais Nelore

	FC	MFI	L^*	a^*	b^*
I	0,355**	-0,308**	-0,294**	-0,013	0,055
IIa	-0,323**	0,196	0,248**	-0,036	-0,095
IIx	0,143	0,018	-0,085	-0,076	0,098

*P < 0,05 **P < 0,01.

O efeito e a relação do tipo de fibra muscular e a maciez da carne bovina tem sido um assunto de debate ao longo do tempo. Como observado neste trabalho, alguns estudos mostraram efeito negativo da MyHC-I sobre a maciez da carne do músculo LT (CROUSE et al., 1991; ZAMORA et al., 1996; ZHAO et al., 2014). Outros, ao contrário, manifestam efeito positivo (RENAND et al., 2001; STRYDOM et al., 2000; JURIE et al., 2007b; CHRICKI et al., 2013).

Pesquisas de proteoma e interactoma em raças *Bos taurus* (Charolês, Aberdeen Angus, Limousin, e Blond d'Aquitaine) demonstraram que as associações entre as proteínas musculares e a maciez da carne dependem das propriedades contráteis e metabólicas específicas de cada músculo e de cada raça (PICARD et al., 2014). Assim, em músculos de raças bovinas caracterizados como oxidativos (maiores proporções de MyHC-I), a MyHC-I apresenta uma relação positiva com a maciez, enquanto que a MyHC-IIx/d mostra uma associação negativa. De outra forma, em músculos classificados como glicolíticos (maiores proporções de MyHC-IIx/d), a MyHC-I apresenta uma relação negativa com a maciez, enquanto que a MyHC-IIx/d mostra uma associação positiva (GUILLEMIN et al., 2011; PICARD et al., 2014). Os resultados observados neste estudo mantiveram essa relação. Em geral, o músculo LT se caracterizou por apresentar maiores proporções da MyHC-IIa em relação as isoformas MyHC-I e MyHC-IIx/d (Figura 3). Consequentemente, relação positiva da MyHC-IIa e negativa da MyHC-I com a maciez da carne foram observadas (Figura 3B).

A isoforma MyHC-IIx/d não mostrou efeito significativo ($P > 0,05$) sobre a maciez, portanto, não foram observadas diferenças entre animais de carne macia e animais de carne dura (Figura 3B). Estudos de proteoma mostraram relação positiva

da MyHC-IIx/d e a maciez da carne em raças *Bos taurus* (GUILLEMIN et al., 2011; PICARD et al., 2014). Estas discrepâncias poderiam estar associadas ao diferente padrão de composição de fibras musculares observado na raça Nelore em relação ao relatado na literatura para as raças *Bos taurus* (músculo LT com maiores proporções de MyHC-I). Em suínos, mostrou-se que a proporção das isoformas da MyHC difere entre raças afetando drasticamente a relação MyHC IIx:IIb (WIMMERS et al., 2008). Além disso, pesquisas de proteoma demonstraram que a associação entre a MyHC-IIx/d e a maciez da carne de bovinos é específica ao tipo de contração muscular (GUILLEMIN et al., 2011). Outra explicação a ser considerada é o fato da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentar diferentes vias metabólicas relacionadas com a qualidade da carne que não têm sido observadas nas raças *Bos taurus* (TIZIOTO et al., 2013). Além disto, recentes trabalhos em bovinos Nelore, mostraram pela primeira vez uma relação negativa entre a abundância do RNAm do gene *MyOD1* e a maciez da carne (TIZIOTO et al., 2016). É bem conhecido que a família *MyOD* regula a expressão das isoformas MyHC, especialmente da MyHC-IIx (ALLEN et al., 2001). Portanto, poder-se-ia insinuar que a atividade dessa isoforma sobre a maciez do músculo LT na raça Nelore pode ser regulada por outros fatores, como o gene *MyOD1* e consequentemente não pelo efeito direto da MyHC-IIx. Entretanto, investigações mais aprofundadas sobre os verdadeiros mecanismos de regulação gênica e proteica da MyHC no músculo LT de animais da raça Nelore são necessárias para corroborar essa informação.

3.2.3 Expressão gênica vs. Expressão proteica da cadeia pesada da miosina

Resultados contraditórios foram observados entre a expressão dos genes *MYH* com a expressão das isoformas da miosina. Como descrito anteriormente, foi observado diferenças de expressão dos genes *MYH1* e *MYH2* entre animais pesados e leves enquanto que, as isoformas MyHC-I e MyHC-IIa não foram diferencialmente expressas nesses grupos. Por outro lado, quando avaliada a expressão gênica como efeito da maciez da carne, a expressão dos genes não mostrou diferenças significativas em animais de carne macia em relação aos animais

de carne dura, pelo contrário, a expressão das isoformas MyHC-I e MyHC-IIa mostraram-se diferentes entre esses grupos. Esse efeito inverso de expressão gênica e proteica da miosina poderia estar explicado pelas alterações físicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem no *post-mortem* (revisado por LEFAUCHEUR, 2010; HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010), uma vez que, as amostras para as análises de expressão gênica foram coletadas imediatamente após o abate e pelo contrário, as amostras para as análises de expressão proteica foram coletadas 24 horas após o abate. No entanto, segundo a literatura, a miosina e seus componentes (miosina de cadeia pesada e miosina de cadeia leve) não mudam em grande quantidade durante o armazenamento *post-mortem*, especialmente quando é avaliada usando a abordagem por eletroforese SDS-PAGE (HUFF LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Futuros estudos avaliando as proporções das isoformas da MyHC imediatamente após o abate em relação as 24 horas após abate poderiam dilucidar diferenças ou alterações nas proporções das isoformas da MyHC ocasionadas durante a transformação do músculo em carne. Além disso, a avaliação conjunta de expressão gênica e proteica poderia ser idealmente realizada usando a combinação de técnicas de RT-qPCR para expressão gênica e anticorpos monoclonais específicos produzidos contra cada isoforma da MyHC (I, IIa e IIx) em técnicas como Western Blot. Desafortunadamente, nem todos esses anticorpos são comercialmente disponíveis nas diferentes espécies e distintas idades do animal (revisado por LEFAUCHEUR, 2010).

4. CONCLUSÕES

A análise da expressão gênica da cadeia pesada da miosina em grupos contrastantes de crescimento e maciez da carne de bovinos Nelore mostrou o diferencial de expressão desses genes de acordo ao padrão de crescimento dos animais.

A análise da expressão proteica, manifestou o potencial da MyHC-IIa como possível biomarcador para seleção e melhoramento da maciez e a cor da carne de bovinos Nelore.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, D. L.; SARTORIUS, C. A.; SYCURO, L. K.; LEINWAND, L. A. Different Pathways Regulate Expression of the Skeletal Myosin Heavy Chain Genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43524–43533, 2001.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. **Meat Science**, v. 82, n. 2, p. 205–212, 2009.

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

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, v. 96, n. 3, p. 1318–1324, 2014.

CHIKUNI, K.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 87–94, 2004.

COSTA, P.; SIMÕES, J. A.; COSTA, A. S. H.; LEMOS, J. P. C.; NAVAS, D.; HOCQUETTE, J. F.; CALKINS, C. R.; BESSA, R. J. B. Repercussions of growth path on carcass characteristics, meat colour and shear force in Alentejana bulls. **Animal**, v. 9, n. 08, p. 1414–1422, 2015.

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

D’ALESSANDRO, A.; MARROCCO, C.; RINALDUCCI, S.; MIRASOLE, C.; FAILLA, S.; ZOLLA, L. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4381–4398, 2012.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. DE. Production systems--an example from Brazil. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 238–243, 2010.

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

GIUSTI, J.; CASTAN, E.; DAL PAI, M.; ARRIGONI, M.; BALDIN, S. R.; DE OLIVEIRA, H. N. Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in Nelore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. **Meat science**, v. 94, n. 2, p. 247–52, 2013.

GONÇALVES, T. M. **Differential expression of genes related with meat tenderness in Nelore cattle**. 2016. 96 f. Dissertation (Master's degree in Science) – University of São Paulo “Luiz de Queiroz” college of agriculture, Piracicaba, 2016.

GUILLEMIN, N.; BONNET, M.; JURIE, C.; PICARD, B. Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 352–365, 2011.

HOCQUETTE, J. F.; GONDRET, F.; BAÉZA, E.; MÉDALE, F.; JURIE, C.; PETHICK, D. W. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, v. 4, n. 02, p. 303, 2010.

HOCQUETTE, J. F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I. PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v. 1, n. 01, p. 159–173, 2007.

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

LUDTKE, C. B.; CIOCCA, J. R. P.; BARBALHO, P. C.; DANDIN, T.; VILELA, J. A.; FERRARINI, C. Abate humanitário de bovinos. Rio de Janeiro: **WSPA**, p. 148, 2012.

LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing - Relation to meat quality. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 257–270, 2010.

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

MCGILCHRIST, P.; GREENWOOD, P. L.; PETHICK, D. W.; GARDNER, G. E. Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral content. **Meat Science**, v. 114, p. 8–17, 2016.

ODDY, V.H.; HARPER, G.S.; GREENWOOD, P.L.; MCDONAGH, M.B. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, n.7, p. 921–942, 2001.

PEARCE, K. L.; Rosenvold, K.; Andersen, H. J.; Hopkins, D. L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. **Meat Science**, v. 89, n. 2, p. 111–124, 2011.

PERRY, D.; THOMPSON, J. M. The effect of growth rate during backgrounding and finishing on meat quality traits in beef cattle. **Meat Science**, v. 69, n. 4, p. 691–702, 2005.

PICARD, B. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, **Anais**. p. 51–80, 2012. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

PICARD, B.; GAGAOUA, M.; MICOL, D.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; TERLOUW, C. E. M. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9808–9818, 2014.

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

PRITCHARD, R. H. Bunk management - Observations from research. Plains Nutrition Council Spring Conf. Texas A & M research and Extension. Pub. AREC 98-24. 68p. 1998.

PURCHAS, R. W.; BURNHAM, D. L.; MORRIS, S. T. Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 12, p. 3211–3221, 2002.

RENAND, G.; PICARD, B.; TOURAILLE, C.; BERGE, P.; LEPETIT, J. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**, v. 59, n. 1, p. 49–60, 2001.

SAZILI, A. Q.; LEE, G. K.; PARR, T.; SENSKY, P. L.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. The effect of altered growth rates on the calpain proteolytic system and meat tenderness in cattle. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 195–201, 2004.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SCHREURS, N. M.; GARCIA, F.; JURIE, C.; AGABRIEL, J.; MICOL, D.; BAUCHART, D.; LISTRAT, A.; PICARD, B. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 2872–2887, 2008.

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

STRYDOM, P.; NAUDE, R. T.; SMITH, M. F.; SCHOLTZ, M. M.; VAN WYK, J. B. Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. **Meat Science**, v. 55, n. 1, p. 79–88, 2000.

TANABE, R. I.; MUROYA, S.; CHIKUNI, K. Sequencing of the 2a, 2x, and slow isoforms of the bovine myosin heavy chain and the different expression among muscles. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 1056–1058, 1998.

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

TIZIOTO, P. C.; COUTINHO, L. L.; MOURÃO, G. B.; GASPARIN, G.; MALAGÓ-JR, W.; BRESSANI, F. A.; TULLIO, R. R.; NASSU, R. T.; TAYLOR, J. F.; REGITANO, L. C. A. Variation in myogenic differentiation 1 mRNA abundance is associated with beef tenderness in Nelore cattle. **Animal Genetics**, p. 2–4, 2016. Disponível em: doi: 10.1111/age.12434.

TROY, D. J.; KERRY, J. P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 214–226, 2010.

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

VECHETTI-JÚNIOR, I. J.; AGUIAR, A. F.; DE SOUZA, R. W. A.; ALMEIDA, F. L. A.; DE ALMEIDA DIAS, H. B.; DE AGUIAR SILVA, M. A.; CARANI, F. R.; FERRARESSO, R. L. P.; CARVALHO, R. F.; DAL-PAI-SILVA, M. NFAT isoforms regulate muscle fiber type transition without altering can during aerobic training. **International Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 10, p. 861–867, 2013.

WEGNER, J.; ALBRECHT, E.; FIEDLER, I. Growth-and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1485–1496, 2000.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement. Roman L. Hruska U. S. MARC. Agricultural Research Service, USDA, Clay Center, NE, USA, 1995.

WIMMERS, K.; NGU, N. T.; JENNEN, D. G. J.; TESFAYE, D.; MURANI, E.; SCHELLANDER, K.; PONSUKSILI, S. Relationship between myosin heavy chain isoform expression and muscling in several diverse pig breeds. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 4, p. 795–803, 2008.

WULF, D. M.; O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; SMITH, G. C. Using Objective Measures of Muscle Color to Predict Beef Longissimus Tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 684–692, 1997.

ZAMORA, F.; DEBITON, E.; LEPETIT, J.; LEBERT, A.; DRANSFIELD, E.; OUALI, A. Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. **Meat Science**, v. 43, n. 3-4, p. 321–333, 1996.