

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VALIDAÇÃO DE GENES E PROTEÍNAS
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS À
QUALIDADE DE CARNE E CARÇAÇA EM BOVINOS DA
RAÇA NELORE**

Gabriela Bonfá Frezarim
Zootecnista

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VALIDAÇÃO DE GENES E PROTEÍNAS
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS À
QUALIDADE DE CARNE E CARÇAÇA EM BOVINOS DA
RAÇA NELORE**

Gabriela Bonfá Frezarim

Orientadora: Prof.^a Dra. Lucia Galvão de Albuquerque

Coorientadora: Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca

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

2019

F896v Frezarim, Gabriela Bonfá
Validação de genes e proteínas diferencialmente expressos relacionados à qualidade de carne e carcaça em bovinos da raça Nelore / Gabriela Bonfá Frezarim. -- Jaboticabal, 2019
67 p.

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

Orientadora: Lucia Galvão de Albuquerque
Coorientadora: Larissa Fernanda Simielli Fonseca

1. Área de olho de lombo. 2. Maciez. 3. qRT-PCR. 4. LC-MS/MS. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VALIDAÇÃO DE GENES E PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS À QUALIDADE DE CARNE E CARÇAÇA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

AUTORA: GABRIELA BONFÁ FREZARIM

ORIENTADORA: LUCIA GALVÃO DE ALBUQUERQUE

COORIENTADORA: LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA

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



Pós-doutoranda LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora POLIANA FERNANDA GIACHETTO
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA - Campinas/SP

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Gabriela Bonfá Frezarim nascida no dia 1 de novembro de 1993, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, filha de José Paulo Frezarim e Lucia Helena Bonfá Frezarim. Iniciou o curso de Zootecnia em março de 2012 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal. Foi bolsista de iniciação científica (Pibic – CNPq) no período entre 2013 e 2016 sob orientação da professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque. Obteve o título de bacharel em Zootecnia em fevereiro de 2017. Em março de 2017, ingressou no curso de mestrado pelo programa Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque e co-orientação da Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca. Foi bolsista de CAPES pelo período de 03 de março de 2017, até 03 de março de 2019.

Agradecimentos

A Deus, que me dá forças para continuar a cada dia.

Aos meus pais que sempre me incentivaram perante os desafios, obrigada por todo amor e apoio, por vibrarem comigo a cada conquista, pelos conselhos, conversas e fé transmitida.

Ao meu namorado, fiel ouvinte das minhas inquietações e momentos de desânimos, obrigada pela paciência, amor, momentos felizes e por sempre acreditar em mim.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque pelas constantes demonstrações de sabedoria e exemplo profissional. Obrigada pela orientação durante todos esses anos, disponibilidade de ensinar, e suporte para a realização do projeto.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca pela amizade, disponibilidade, dedicação e paciência ao longo do projeto. Obrigada por responder minhas mensagens de domingo, feriado e quase madrugada, agradeço também pelos puxões de orelha, críticas, correções e sugestões.

Aos professores.

A minha grande amiga e companheira de laboratório Bruna (Uguína) pela amizade desde a graduação, companheirismo dentro e fora do laboratório, por todos os momentos felizes e angustiantes compartilhados. Essa jornada foi sem dúvida muito mais leve e feliz ao seu lado.

A todos os colegas de departamento que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto e tornaram essa caminhada mais leve e feliz.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.1.1 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Maciez da carne	4
3.2 Genes relacionados à maciez da carne	5
3.2.1 Calpaína e Calpastatina (<i>CAPN1, CAPN2, CAST</i>).....	5
3.2.2 Proteínas de Choque Térmico (<i>HSPB1 e DNAJA1</i>)	6
3.2.3 Proteína de ligação ao ácido graxo (<i>FABP4</i>)	7
3.2.4 Esteroil CoA Dessaturase (<i>SCD</i>)	8
3.2.5 Proteína quinase, AMP-ativada, gama 2, subunidade não catalítica (<i>PRAKAG3</i>)	8
3.2.6 Ceramidase ácida (<i>ASAH1</i>)	9
3.3 Área de Olho de Lombo (AOL)	10
3.4 Genes relacionados à Área de Olho de Lombo	12
3.4.1 Fator de Crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II)	12
3.4.2 Miostatina (<i>MSTN</i>)	12
3.4.3 Proteínas relacionadas a ubiquitina (<i>NEDD4, UBE4A</i>)	13
3.5 Métodos de Avaliação de Expressão gênica e proteica.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Coleta das Amostras	18
4.2 Análise de força de Cisalhamento e Área de olho de lombo	19

5. Análise da Expressão Gênica	20
5.1 Escolhas dos genes	20
5.2 Extração de RNA Total	22
5.3 Verificação da concentração e integridade do RNA Total extraído	22
5.4 Síntese da primeira fita de cDNA.....	24
6. PCR Quantitativa em Tempo Real	24
6.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	24
6.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores	27
6.3 Curva padrão e eficiência de amplificação.....	28
6.4 Escolha dos genes de referência	29
6.5 Método do CT Comparativo ($\Delta\Delta Ct$)	30
6.6 Análises estatísticas	30
7. Espectrometria de Massa	31
7.1 Extração Proteica das amostras	31
7.2 Preparação das amostras para análise proteômica	32
7.3 Análise por espectrometria de massas avançadas	32
7.4 Análise comparativa e quantificação	33
8. RESULTADOS	33
9. DISCUSSÃO	37
9.1 Genes relacionados à maciez da carne	37
9.2 Genes relacionados à AOL	40
9.3 Expressão Proteica	42
10. CONCLUSÃO	45

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
12. MATERIAL SUPLEMENTAR	59

VALIDAÇÃO DE GENES E PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS À QUALIDADE DE CARNE E CARÇAÇA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO- O conhecimento de mecanismos de regulação de genes associadas a características de qualidade de carne pode colaborar para o entendimento dos processos biológicos envolvidos com esses fenótipos, o que juntamente aos métodos quantitativos já utilizados, poderá auxiliar na seleção de animais mais jovens a um menor custo, tornando viável a inclusão dessas características em programas de melhoramento genético. Apesar dos vários estudos existentes sobre genes diferencialmente expressos, relacionados à qualidade de carne em diferentes espécies, há grande divergência em trabalhos com bovinos, em relação aos genes associados a essas características. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi validar genes diferencialmente expressos, comuns a diferentes trabalhos de expressão gênica global, encontrados na literatura, relacionados às características de maciez da carne e área de olho de lombo (AOL), em um rebanho comercial de bovinos da raça Nelore. Além disso, verificar se genes diferencialmente expressos seriam traduzidos em proteínas diferencialmente expressas, por meio da técnica de espectrometria de massas avançada (LC-MS/MS). Para isso, foram selecionados 24 animais Nelores extremos para cada característica estudada. Os genes foram escolhidos por meio de buscas realizadas em trabalhos na literatura. Foram selecionados 9 genes (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1*, *DNAJ1*, *FABP4*, *SCD*, *ASAH1* e *PRKAG3*) para maciez da carne e 5 genes (*IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *NEDD4*, *UBE4A*) para AOL. Para maciez, os genes *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1* e *DNAJA1* foram regulados positivamente em animais com carne dura. Para a AOL, apenas o gene *MSTN* foi regulado positivamente em animais com baixo AOL. Em relação às análises de proteínas, nenhuma proteína apresentou expressão diferencial. Estes resultados indicam que os transcritos sofreram algum tipo de modificação pós-transcricional e que mais estudos serão necessários para o entendimento das funções desses genes no processo de amaciamento da carne e desenvolvimento muscular.

Palavras chave: Área de olho de lombo, bovino de corte, espectrometria de massas avançada, LC-MS/MS, maciez da carne, qRT-PCR

VALIDATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND PROTEINS RELATED TO MEAT AND CARCASS TRAITS IN NELORE CATTLE

ABSTRACT: The knowledge of gene regulation mechanisms associated with meat quality traits may contribute to the understand the biological process involved with these phenotypes, which, jointly with the quantitative methods already used, may help in the selection of younger animals at a lower cost, making viable the inclusion of these traits in animal breeding programs. Despite the several studies on differentially expressed genes related to the meat quality in different species, there is a wide divergence in studies with cattle, regarding to the genes associated with these traits. In this context, the objective of the present work was to validate differentially expressed genes, common in different publications of global gene expression found in the literature, related meat tenderness and rib eye area (REA) in a commercial herd of Nelore cattle. Moreover, to verify if differentially expressed genes would be translated into differentially expressed proteins, by means advanced mass spectrometry technique (LC-MS/MS). For that, 24 extreme Nelore animals for each trait were used. The genes were chosen through searches in publications found in the literature. Were selected nine genes (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1*, *DNAJ1*, *FABP4*, *SCD*, *ASAH1* e *PRKAG3*) for meat tenderness and five genes (*IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *NEDD4*, *UBE4A*) for REA. For meat tenderness, the genes *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1* e *DNAJA1* were up regulated in animals with tough meat. For the REA, just the *MSTN* gene was up regulated in animals with low REA. Regarding protein analysis, no protein presented differential expression. These results indicate that the transcripts have been through some kind of post-transcriptional modification and more studies will be necessary for the understanding these genes roles in the process of meat tenderizing and muscular development.

Keywords: Loin eye area, beef cattle, advanced mass spectrometry LC-MS/MS, meat tenderness, qRT-PCR

1. INTRODUÇÃO

Visto que a possibilidade de expansão do mercado de carne bovina brasileira está diretamente associada com a competitividade do setor produtivo, qualidade pode ser uma característica fundamental para auxiliar neste processo.

Embora animais da raça Nelore apresentem grande adaptabilidade e rusticidade, animais zebuínos são inferiores às raças europeias quando se leva em consideração a qualidade de carne (Crouse et al., 1989; Ferraz e Felício., 2010). Dessa forma, a avaliação e seleção genética de características associadas ao rendimento e qualidade de carne são fatores indispensáveis para melhorar na carcaça do zebu brasileiro (Restle et al., 1999).

A maciez é a característica de maior influência na aceitação da carne bovina por parte dos consumidores, e em razão da alta competitividade do mercado, melhorar esta característica consiste em maximizar o consumo e competição com outras carnes (Paz e Luchiari Filho., 2000). A área de olho de lombo (AOL), por sua vez, atua como característica indicativa de rendimento de carcaça, ganho em peso e musculosidade. Trabalhos na literatura têm demonstrado alta correlação entre AOL e o desenvolvimento muscular (Luchiari Filho., 2000; Bianchini et al., 2008; Bridi e Constantino., 2009; Lopes et al., 2011), indicando sua associação com maior rendimento de cortes com alto valor comercial.

Apesar de serem altamente valorizadas no mercado internacional, as características de qualidade da carne na raça Nelore não têm sido muito consideradas em programas de melhoramento genético, uma vez que são dispendiosas e de difícil mensuração. Desta forma, o conhecimento dos genes associados a essas características, vem complementar os métodos quantitativos tradicionais e genômicos já utilizados, possibilitando a seleção de animais jovens com elevado valor genético (Goddard e Haeyes., 2009; Tizioto et al., 2012; Tizioto et al., 2013; Fonseca et al., 2017).

Dentre os genes mais descritos na literatura, os da família da Calpaína (*CAPN1* e *CAPN2*) e calpastatina (*CAST*) parecem exercer papel fundamental no mecanismo de maciez da carne. Enquanto as calpaínas atuam na degradação das fibras musculares após o *rigor mortis*, a calpastatina age inibindo a ação da calpaína (Dransfield.,1993). Concomitantemente, os genes

que codificam proteínas da família *Heat shock*, *DNAJA1* (DnaJ Heat Shock Protein Family Hsp40 Member A1) e *HSPB1* (Heat shock protein beta-1) atuam como possíveis genes candidatos, devido à sua função anti-apoptótica e ações protetoras em proteínas miofibrilares que influenciam na conversão do músculo em carne e, conseqüentemente, na maciez (Bernard et al., 2007).

Os genes envolvidos no metabolismo lipídico como *SCD* (Estearoil-CoA dessaturase) e *FAPB4* (Proteína de ligação a ácido graxos) também parecem atuar sobre a maciez, através da redução na densidade e aumento da suculência da carne (Zhao et al., 2012), assim como os genes *PRKAG3* (Subunidade regulatória gama 3 da proteína quinase ativada por AMP) e *ASAH1* (Ceramidase Ácida) atuantes no metabolismo do glicogênio e regulação da concentração intracelular de ceramida e esfingosina (Cheung et al., 2000; Lucki & Sewer, 2011).

Em relação a área de olho de lombo, buscas na literatura apontam que, os fatores de crescimento semelhantes a insulina, *IGF-1* e *IGF-2*, são possíveis marcadores moleculares devido à sua atuação, estimulando o crescimento e proliferação celular (Davis et al., 2003). De forma inversa, a miostatina (*MSTN*) parece atuar limitando o crescimento do tecido muscular, ocasionando a diminuição no desenvolvimento normal do músculo. Por consequência, o silenciamento do gene acarreta um maior crescimento muscular, (Mcpheeron e Lee., 1997), aumentando o rendimento de cortes comerciais.

Os genes da família das ubiquitinas, *NEDD4* e *UBE4A*, desempenham função crucial na regulação de proteínas, atuando por meio da marcação de proteínas indesejadas, para que sejam degradadas no complexo proteassoma (Heinemeyer et al., 2004). Gomes et al. (2013) relataram que genes que regulam o sistema ubiquitina-proteassoma podem estar associados ao crescimento em animais da raça Nelore.

Apesar dos vários estudos existentes sobre genes diferencialmente expressos relacionados à qualidade de carne em diferentes espécies (Pan, 2003; Lehnert et al., 2007; Liu et al., 2009; Li et al., 2016; Piórkowska et al., 2016; Fang et al., 2018; Horodyska et al., 2018), há grande divergência em trabalhos com bovinos, em relação aos genes associados a essas características, nas várias populações estudadas. Essas divergências podem ocorrer devido a

diversos fatores, como raça, ambiente, nutrição, idade do animal, castração ou não dos animais, entre outros.

Juntamente ao estudo de genes diferencialmente expressos, a proteômica pode auxiliar no entendimento das proteínas envolvidas na expressão das características relacionadas à qualidade da carne, além da identificação de possíveis biomarcadores para a melhoria de carne e carcaça.

Uma vez que as proteínas são as moléculas funcionais finais resultantes do dogma central da biologia, essas estão mais propensas a refletir as diferenças na expressão gênica entre indivíduos e consequente diferença de fenótipo.

Desta forma, analisar genes e proteínas diferencialmente expressos comuns a vários trabalhos, relacionados às características de qualidade da carne e carcaça, como Maciez e Área de olho de lombo (AOL), em uma população comercial, de animais criados a pasto, sistema de manejo adotado na maior parte do Brasil, pode auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão de características de interesse econômico e auxiliar a inclusão dessas características em programas de melhoramento genético animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar, em uma população comercial de bovinos Nelore, genes diferencialmente expressos, identificados na literatura em várias populações, relacionados à maciez da carne e área de olho de lombo (AOL), além de identificar se os genes diferencialmente expressos são traduzidos em proteínas diferencialmente expressas.

2.1.1 Objetivos específicos

a) Identificar na literatura genes diferencialmente expressos comuns em trabalhos de Expressão Gênica Global (RNA-Seq, Microarranjo, entre outros), além de trabalhos de identificação de marcadores moleculares, relacionados às características estudadas.

b) Validar, por meio de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), os genes diferencialmente expressos encontrados, relacionados às características de maciez da carne e área de olho de lombo, medidas no *Longissimus thoracis*, em uma população de bovinos Nelore comercial.

c) Verificar se os genes diferencialmente expressos estão sendo traduzidos em proteínas diferencialmente expressas por meio de espectrometria de massas avançada (LC-MS/MS).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Maciez da carne

A maciez é a característica de maior influência na aceitação do produto pelo consumidor, e o atributo sensorial de maior relevância para a qualidade da carne (Henchion et al., 2017). O processo de amaciamento é bastante complexo e pode ser afetado por várias vias metabólicas, além de fatores pré e pós-abate (Alves et al., 2005). A fase de pré-abate inclui as condições e práticas que se aplicam durante o período em que o animal é transportado da fazenda até o frigorífico. Durante este período, os animais são expostos a uma série de fatores que podem acarretar alto nível de estresse, e conseqüentemente, ineficiência na conversão do músculo em carne. Fatores intrínsecos da espécie como idade, sexo, raça e outro fatores como castração, quantidade de tecido conjuntivo, gordura intramuscular e o comprimento do sarcômero também influenciam no processo de amaciamento (Maltin et al., 2003; Ferguson e Warner, 2008).

Dentre os fatores pós-abate, os processos metabólicos são determinantes na maciez final (Alves et al., 2005). Os sistemas de proteases das calpaínas e catepsinas são os dois maiores e mais estudados sistemas proteolíticos responsáveis pela proteólise do tecido muscular pós-abate (Koohmaraie e Geesink., 2006). As catepsinas atuam por meio do desarranjo da estrutura muscular, enquanto as calpaínas, dependentes de cálcio, atuam na degradação das fibras musculares e enfraquecimento da estrutura muscular após o *rigor mortis* (Goll et al. 2003; Kemp et al., 2010). Outra enzima dependente de cálcio, com função inibitória a calpaína, parece exercer importante papel sobre a maciez. A calpastatina age na formação do complexo calpaína-calpastatina,

inibindo a ação da calpaína e impedindo a degradação de fibras musculares, acarretando na diminuição da maciez da carne (Kemp et al., 2010).

3.2 Genes e proteínas relacionados à maciez da carne

3.2.1 Calpaina (*CAPN1*, *CAPN2*) e Calpastatina (*CAST*)

Sabe-se que os processos bioquímicos *post mortem* são passos chave na maciez da carne. O amaciamento é um processo enzimático de sistemas proteolíticos, e numerosos autores sugerem que as calpaínas são as únicas, ou principais, proteases responsáveis pela maciez da carne (Delgado et al., 2001; Koohmraie et al., 2002). O sistema de calpaína no músculo esquelético compreende duas proteases dependentes de íon Ca^{2+} , calpaína 1 e 2 (μ - e m-calpaina) e um terceiro polipeptídeo, calpastatina, cuja única função conhecida é inibir as duas calpaínas (Goll et al., 2003).

As duas proteases *CAPN1* e *CAPN2* mais frequentemente descritas, denominadas μ - e m-calpaina, respectivamente, se diferenciam pela quantidade de cálcio necessária para sua ativação na ordem de micromolar e milimolar, respectivamente (Goll et al., 1991). No contexto molecular, os genes que codificam a μ -calpaína (*CAPN1*), m-calpaína (*CAPN2*) e da calpastatina (*CAST*) estão localizados em bovinos, respectivamente, nos cromossomos 29 (SMITH et al., 2000), 16 e 7 (Bishop et al., 1993).

Estudos realizados nas últimas décadas indicaram que *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST* desempenham papel fundamental na degradação *post mortem* das proteínas miofibrilares e na maciez da carne bovina durante o armazenamento (Smith et al., 2000; Kemp et al., 2010). As calpaínas atuam na degradação das proteínas titina, nebulina, desmina, troponina e tropomiosina, resultando no enfraquecimento da interação entre filamentos finos/disco-Z, constituintes do sarcômero, componente básico do músculo estriado (Lana e Zolla., 2016).

Dransfield, (1993), descreveu um modelo de amaciamento, baseado na ativação das calpaínas resultante do aumento na concentração de cálcio livre no início do *rigor mortis*, no qual, a queda do pH de 6,5 para 5,7 aumentaria a atividade da μ -calpaína, principal enzima responsável pelo amaciamento da carne, enquanto a m-calpaína, seria ativada quando o pH estivesse em torno de 5,7 sendo a responsável pela continuidade do processo de amaciamento. O

modelo descreve ainda a inibição das calpaínas pela calpastatina na medida em que vai ocorrendo o amaciamento da carne.

3.2.2 Proteínas de Choque Térmico (*HSPB1* e *DNAJA1*)

Alguns genes codificadores das proteínas da família heat shock (Hsp) estão descritos na literatura como tendo relação com a maciez da carne (Bernard et al., 2007; Carvalho et al., 2012; Baldassini et al., 2015; Malheiros et al., 2018). Essas proteínas desempenham papel anti-apoptótico nos músculos, e sua elevada expressão pode retardar os processos de morte celular e, conseqüentemente, maturação da carne, o que resulta em impacto negativo sobre a maciez (Ouali et al., 2006).

As Hsps fazem parte da família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, que possuem a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana, além da preservação da estrutura proteica permitindo a sobrevivência celular sob condições adversas (Alberts et al., 2017).

Após o abate do animal, e conseqüente deficiência do suprimento sanguíneo, as células musculares iniciam o processo de apoptose decorrente da interrupção do fornecimento de oxigênio e nutrientes para o músculo. Em resposta, as proteínas de choque térmico são ativadas na tentativa de impedir o início da morte celular apoptótica e manter a homeostase celular. A função protetora desempenhada por essas proteínas acarreta no atraso da taxa de maturação muscular e diminui a degradação das proteínas miofibrilares (Ouali et al., 2006; Lomiwes et al., 2014).

Dentre as proteínas de choque térmico, o gene *HSPB1* codificador da proteína Hsp27, parece ser um alvo muito importante. Devido à função desenvolvida na manutenção da integridade proteica, sugeriu-se que a regulação negativa da proteína na carne macia favorecesse a degradação proteolítica da actina e miosina e conseqüente maior maciez (Bernard et al., 2007; Kim et al., 2008).

Malheiros et al. (2018), trabalhando com bovinos Nelore em análise de qRT-PCR, encontraram associação negativa da expressão do gene com a maciez, corroborando com Carvalho et al. (2014), que, por meio da técnica de

western blotting, também encontrou associação da maior expressão da proteína com a dureza da carne.

Bernard et al. (2007), em análise de microarray, associaram a expressão do gene DNAJA1 com a menor maciez da carne bovina. Esse gene codifica uma proteína da família Hsp40, co-chaperona da proteína Hsp70. O complexo Hsp40 / Hsp70 possui atividade anti-apoptótica e está envolvido na preservação de funções celulares e no reparo de estruturas proteicas danificada (Picard et al., 2010; Guillemín et al., 2011). A função anti-apoptótica desempenhada pelo complexo, acarreta no retardamento da morte celular durante a conversão do músculo em carne, e conseqüente diminuição da maciez.

3.2.3 Proteína de ligação ao ácido graxo (*FABP4*)

As proteínas de ligação a ácidos graxos (*FABP4*) são uma família de pequenas proteínas citoplasmáticas conhecidas como chaperonas lipídicas intracelulares, que regulam o tráfego lipídico e as respostas nas células. Essas proteínas se ligam a compostos hidrofóbicos, incluindo os ácidos graxos de cadeia longa e possuem funções que incluem a absorção, transporte e metabolismo de ácidos graxos (Kaikaus et al., 1990).

O gene *FABP4* direciona os ácidos graxos de cadeia longa para a oxidação ou esterificação nas mitocôndrias e nos peroxissomos, favorecendo o armazenamento de gordura entre as fibras musculares (Gerbens., 2004), além de atuar no influxo e efluxo de ácidos graxos nos adipócitos dependendo de condições catabólicas e anabólicas respectivamente. Esse gene tem sido amplamente utilizado como marcador do tecido adiposo, em estudos destinados ao desenvolvimento de adipócitos em animais de produção (Chavey et al., 2006; Michal et al., 2006), e trabalhos da literatura vem associando a *FABP4* a um aumento desejável da gordura intramuscular (Michal et al., 2006; Lee et al., 2010; Pannier et al., 2010).

A deposição de gordura intramuscular influencia na qualidade da carne e afeta a escolha dos consumidores, já que maiores escores de marmoreio estão associados à suculência e ao sabor da carne. O efeito da marmorização na maciez está relacionado com a redução da densidade da carne, facilitando a mastigação devido à menor tensão entre as camadas de tecido conjuntivo

(Alves et al., 2005). Desta forma, genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos são geralmente considerados potenciais genes candidatos para a maciez da carne. Zhao et al. (2012), em análise de microarray no músculo *Longissimus thoracis* de animais da raça Angus, identificaram o gene *FABP4* como regulador positivo para a maciez.

3.2.4 Estearoil CoA Dessaturase (SCD)

A quantidade de tecido adiposo intramuscular (marmoreio) é a principal característica utilizada para predizer a palatabilidade. O marmoreio é composto por ácidos graxos formados através da biohidrogenação ruminal dos lipídios da dieta, favorecendo uma carne mais macia, saborosa e suculenta (Alves et al., 2005; Westerling e Hedrick., 1979).

A enzima Estearoil CoA Dessaturase (*SCD*) desempenha papel chave no metabolismo dos ácidos graxos, sendo responsável pela conversão de ácidos graxos saturados em ácidos graxos monoinsaturados nos adipócitos de mamíferos (Ntambi., 1999), além de influenciar na deposição de gordura na carcaça de animais em crescimento (Ostrowska et al., 1999).

Os produtos da ação do gene *SCD* influenciam o perfil de ácidos graxos que estão correlacionados com a qualidade da carne e escore de marmoreio. Wang et al. (2005), estudando a diferença de expressão gênica do músculo *Longissimus thoracis* entre bovinos Japanese Black (JB) e Holandeses (HOL), encontraram maior expressão de *SCD* em Japanese Black quando comparado aos bovinos Holandeses. Isso indicou o aumento na síntese de ácido graxo monoinsaturado e conseqüente marmoreio. Zhao et al. (2012), identificando vias e genes relacionados à maciez da carne bovina em músculo *Longissimus thoracis* de animais Angus, identificaram o gene *SCD* como regulador positivo para a maciez.

3.2.5 Subunidade regulatória gama 3 da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (*PRKAG3*)

A proteína codificada pelo gene *PRKAG3*, é uma subunidade reguladora ($\gamma 3$) da proteína quinase (AMPK) ativada por adenosina mono fosfato (AMP), que desempenha papel fundamental no controle da homeostase energética

(Cheung et al., 2000). A subunidade $\gamma 3$ está envolvida na regulação da atividade da AMPK no músculo esquelético, além de influenciar no metabolismo do glicogênio. AAMPK é considerada uma mediadora de combustível celular, sendo ativada quando há queda no status de energia a fim de restaurar o equilíbrio energético dentro da célula (Roux et al., 2006).

A mudança no teor de glicogênio no músculo está relacionada com a qualidade da carne, por influenciar no processo de maturação *post mortem* e no pH final. Após o abate, o músculo continua exercendo suas funções metabólicas na tentativa de manter a homeostase. Como o aporte de oxigênio é interrompido, a produção de ATP é realizada exclusivamente por via anaeróbica, utilizando o glicogênio como substrato e liberando o ácido láctico que se acumula no músculo, acarretando na queda do pH final da carne. A quantidade de glicogênio armazenado na musculatura animal no momento do abate será decisiva na correta conversão do músculo em carne e pH final (Alves., 2005; Ouali et al., 2006).

Bongiorni et al. (2016), comparando a expressão do gene *PRKAG3* em tecido muscular, de duas raças bovinas italianas, divergentes para maciez da carne, encontraram diferença significativa na expressão do gene, indicando um armazenamento deficiente de glicogênio no músculo esquelético e consequente influência na maciez da carne. Outros estudos demonstraram que mutações no gene *PRKAG3* de suíno afetaram a maciez da carne ao influenciar no conteúdo de glicogênio antes do abate no músculo esquelético (Milan et al., 2000; Ciobanu et al., 2001). Desta forma, o padrão distinto de expressão do gene *PRKAG3* pode influenciar no armazenamento de glicogênio e consequente maciez da carne.

3.2.6 Ceramidase ácida (*ASAH1*)

A ceramidase ácida codificada pelo gene *ASAH1* desempenha papel fundamental na regulação da concentração intracelular de Ceramida e Esfingosina, através da hidrolização desses compostos (Lucki & Sewer, 2011). As ceramidas são lipídeos constituintes da membrana celular de eucariotos que medeiam as vias de sinalização celular regulando vários processos biológicos, incluindo diferenciação e apoptose. (Kanfer & Hakomori, 2012). Além disso, esses metabólicos esfingolpídicos contribuem para múltiplos aspectos da

carcinogênese, incluindo proliferação celular, migração, angiogênese e resistência tumoral. Como a hidrólise da ceramida é a principal via para formar a esfingosina, o *ASAH1* desempenha papel crucial na regulação da homeostase celular, controlando o equilíbrio entre ceramida e esfingosina dentro da célula (Lucki & Sewer., 2011).

Mutações em humanos no gene *ASAH1* e consequente deficiência da enzima ceramidase, levam ao distúrbio de armazenamento lisossomal *Farber*, responsável pelo acúmulo de esfingolipídios e anormalidades nas articulações bem como fígado, garganta, tecidos e sistema nervoso central (Alves et al., 2013). Estudo realizado por Li et al. (2002), em camundongos, demonstrou a perda da atividade da ceramidase ácida, quando o gene *ASAH1* era modificado por mutação. A redução da atividade desta enzima levou ao armazenamento de níveis elevados de ceramida e lipídios.

Fonseca et al. (2017), analisando genes diferencialmente expressos relacionados à maciez da carne em tecido muscular de bovinos da raça Nelore, por meio da técnica de RNA-Seq, encontraram o gene *ASAH1* como regulador positivo para a maciez. Da mesma forma, Nagai et al. (2015), também em trabalho com animais Nelore, encontraram maior expressão do gene *ASAH1* em animais com carne mais macia, quando comparado a animais com carne menos macia. Não foram encontradas maiores evidências de como esse gene estaria influenciando diretamente na maciez da carne bovina.

3.3 Área de Olho de Lombo (AOL)

A área de olho de lombo (AOL) pode ser considerada como parâmetro direto para avaliação do desenvolvimento muscular animal, estando associada com o crescimento muscular, rendimento de carcaça, ganho de peso, além de cortes com alto valor comercial, como picanha e contrafilé (Luchiari Filho., 2000).

O crescimento muscular animal pode ser dividido em duas etapas: a hiperplasia (aumento do número de células musculares) e a hipertrofia (aumento do tamanho das células musculares). A hiperplasia é determinada pela proliferação de células musculares (mioblastos) que ocorrem durante o período gestacional. As fibras musculares são originadas através de mioblastos que se fundem formando os miotubos, que originarão as miofibrilas (fibras musculares).

Durante o desenvolvimento embrionário, os mioblastos sofrem diferenciação e dão origem aos diversos músculos do corpo (Hagiwara et al., 2014).

Os fatores transcricionais miogênicos, pertencentes à família MyoD tem um papel chave na diferenciação muscular. Além destes, os fatores de crescimento (Fatores de crescimento semelhantes à insulina - IGFs) podem estar atuando na regulação da miogênese, determinando a quantidade de fibras musculares (Oksbjerg et al., 2004; Silva e Carvalho., 2007).

A hipertrofia, segunda fase de crescimento, ocorre após o nascimento do animal, acarretando no aumento do tamanho das células. O equilíbrio entre a quantidade de proteína muscular sintetizada e a quantidade de proteína muscular degradada é determinante no crescimento muscular (Silva e Carvalho., 2007). Os dois processos ocorrem simultaneamente na fibra muscular, porém, no crescimento, a síntese deve superar a degradação.

O elevado potencial adaptativo das fibras musculares presentes no músculo, é atribuído a uma população de células denominadas células satélites (Foschini et al., 2004). As células satélites são células musculares com capacidade de se diferenciar e se fundir para aumentar o número de fibras musculares existentes formando novas fibras. São ativadas em resposta a traumas e estímulos de crescimento, e contribuem para o crescimento muscular pós-natal, regeneração das fibras musculares danificadas e para a manutenção do músculo esquelético adulto. No processo de hipertrofia, novos núcleos de células satélites devem ser acrescentados às fibras adultas (Koochmaraie et al., 2002; Machado, 2008).

Neste contexto, o aumento da massa muscular, e conseqüente porção comestível da carcaça, é resultante da combinação dos dois fatores, hiperplasia e hipertrofia. Diversos trabalhos já demonstraram a correlação entre a massa muscular e tamanho de fibras musculares (Oksbjerg et al., 2004; Goodall e Schmutz, 2007; Bianchini et al., 2008; Lopes et al., 2011), resultando na melhoria na qualidade de carcaça e conseqüente retorno econômico ao produtor.

3.4 Genes relacionados à Área de Olho de Lombo

3.4.1 Fator de Crescimento semelhante à insulina (*IGF-1* e *IGF-2*)

Genes que codificam o fator de crescimento semelhante à insulina-1 e 2 (*IGF-1* e *IGF-2*) são considerados genes candidatos para o crescimento e desenvolvimento animal, em razão da importância desempenhada no metabolismo e fisiologia dos animais (Horvat e Mendrano., 1995; Davis et al., 2003; Goodall & Schmutz., 2007). Nos mamíferos, a insulina regula o metabolismo celular, enquanto o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*) atua como importante regulador do crescimento celular, estimulando o crescimento e a sobrevivência de vários tipos celulares (Schmid., 1995).

A maior parte do *IGF-1* circulante é produzida pelo fígado e sua expressão é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH) (Alberts., 2017). No entanto, outros tecidos também podem produzir *IGF-1* de maneira autócrina e parácrina, incluindo a glândula mamária e músculo bovino (Plath-Gabler et al., 2001).

A ação do *IGF-1* é mediada pela ligação ao seu receptor específico denominado receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (*IGF-1R*), existente em vários tipos de células e tecidos. A ligação ao *IGF-1R* inicia a sinalização intracelular estimulando o crescimento e proliferação celular e inibindo a morte celular programada (Alberts et al., 2017). De maneira semelhante, a proteína codificada pelo *IGF-2* atua como fator de crescimento e diferenciação fetal desempenhando papel crucial no crescimento muscular, bem como na proliferação e diferenciação de mioblastos (Flisikowski et al., 2005; Micke et al., 2011).

Guo et al. (2015), em análise utilizando Microarray no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Brahman, identificaram o gene *IGF-1* como regulador positivo para AOL da mesma forma, Silva et al. (2019) identificaram o gene *IGF-2* também como regulador positivo para AOL em animais da raça Nelore.

3.4.2 Miostatina (*MSTN*)

A miostatina é um fator de diferenciação de crescimento, produzida e liberada pelos miócitos que age como regulador negativo no desenvolvimento da

massa muscular esquelética, inibindo a proliferação e diferenciação dos mioblastos durante a miogênese. (Mcpherron e Lee., 1997). Estudos realizados em camundongos, bloqueando a ação do gene *MSTN*, demonstraram um aumento significativo e generalizado na massa muscular esquelética, devido principalmente ao aumento do número de fibras musculares (hiperplasia) e também à espessura das fibras (hipertrofia) (Mcpherron e Lawler., 1997).

Em bovinos, diversas mutações ocorrentes no gene, acarretam no aumento do número de fibras musculares e crescimento do músculo, (Lee e Mcpherron., 2001) aumentando o rendimento de carcaça. Essa condição determina o fenótipo musculatura dupla, ou hipertrofia muscular (*double-muscling*) em algumas raças, como Piemontês, Limousin e Belgian Blue (Grobet et a., 1997; Kambadur et al., 1997; Smith et al., 1998; Lee & Mcpherron, 2001).

O fenótipo de musculatura dupla está associado a problemas como redução de fertilidade, baixa viabilidade dos bezerros e problemas de parto (Ménissier, 1982; Arthur et al., 1988); porém, do ponto de vista econômico, a musculatura dupla se torna bastante interessante. Essa condição acarreta um aumento muscular e conseqüentemente maximiza o rendimento de cortes nobres. Além disso, diminui a porcentagem de ossos e aumenta a área de olho de lombo, sendo considerada um importante marcador molecular para o crescimento muscular (Casas et al., 2000; Thomas et al., 2000; Siqueira., 2015).

Guo et al. (2015), em análise utilizando microarray no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Brahman, identificaram o gene *MSTN* como regulador negativo para o maior ganho de peso e conseqüente crescimento. Adicionalmente Zhang et al., (2011), comparando a expressão do gene em tecido muscular de animais machos e fêmeas da raça Quinchuan, encontraram maior expressão do gene em fêmeas que apresentaram menor crescimento.

3.4.3 Proteínas relacionadas a ubiquitina (*NEDD4*, *UBE4A*)

A ubiquitina é uma proteína encontrada nas células eucarióticas, que desempenha papel crucial na regulação de proteínas. Sua atuação se dá por meio da marcação de proteínas indesejadas através da atuação de enzimas

específicas, a fim de que sejam degradadas no proteossoma (WALTERS et al., 2004).

O gene *NEDD4* (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 4, E3 ubiquitin-protein ligase) é o responsável por originar proteínas da família ubiquitina-ligases. Dessa forma, em resposta a sinais específicos, diferentes proteínas-alvo (por exemplo, proteínas mal dobradas), são marcadas para a degradação no proteossoma. Além disso, as ubiquitinas ligases auxiliam no processo de *turnover* proteico, desempenhando papel imprescindível na degradação de proteínas musculares (Alberts., 2017).

O gene *NEDD4* também atua como importante fator de regulação e sinalização do IGF-1R, atuante como receptor do gene *IGF-1*. Como já discutido, os IGFs são responsáveis pelo crescimento pós-natal e estão fortemente relacionados à diferenciação muscular (Mcpheeron e Lee, 1997; Mcpheeron e Lawler, 1997). Estudos com camundongos *knockout* para o gene *NEDD4* mostraram que a diminuição da expressão da proteína codificada pelo gene, reduziu a expressão do *IGF-1R* causando o atraso no desenvolvimento embrionário e redução do crescimento (Cao et al., 2008).

A poliubiquitinação de algumas proteínas para degradação no proteossoma, requer enzimas específicas do tipo E4 que auxiliam na extensão de cadeias de poliubiquitina para posterior degradação. O gene *UBE4A* (Ubiquitin conjugation fator E4 A) codifica uma enzima do tipo E4 e pode desempenhar papel específico em diferentes processos bioquímicos além da ubiquitinação, incluindo crescimento e diferenciação (Contino et al., 2004). Gomes et al. (2013) relataram que genes que regulam o sistema ubiquitina-proteossoma podem estar associados ao crescimento e característica de carcaça em animais da raça Nelore. Vignato et al. (2017), em análise RNA-seq do músculo *Longissimus thoracis* associado a característica de área de olho de lombo, encontraram que ambos os genes, *NEDD4* e *UBE4A*, foram regulados negativamente para menores AOL em bovinos Nelore.

3.5 Métodos de Avaliação de expressão gênica e proteica

A expressão gênica é um mecanismo altamente regulado que controla a função e adaptabilidade de todas as células vivas, incluindo procariotas e eucariotas. A regulação, em qualquer uma das etapas do processo, pode levar a uma expressão gênica diferencial que acarretará em variações fenotípicas entre os indivíduos (Lehninger et al., 2000).

Genes diferencialmente expressos para diversas características, vem sendo amplamente utilizados como ferramenta em estudos que visam relacionar a expressão gênica à fenótipos importantes para a produção animal, incluindo estudos relativos à qualidade da carne em Nelore (Bernard et al., 2007; Carvalho et al., 2014; Berton et al., 2016; Fonseca et al., 2017; Malheiros et al., 2018).

Existem diferentes técnicas para o estudo e quantificação da expressão gênica global e sua regulação. A técnica de microarranjos, por exemplo, trouxe uma revolução à análise de expressão gênica. Essa técnica determina, simultaneamente, os níveis de expressão de milhares de genes, porém limita-se a quantificar genes pré-determinados, existentes no arranjo. O princípio da técnica consiste em uma coleção de spots com milhares de sondas (cDNA ou oligonucleotídeos) de sequências complementares a molécula alvo correspondente. As sondas se hibridizam com as moléculas alvos de cDNA previamente marcadas com fluoróforos e são detectadas por um scanner de fluorescência. O computador então, é utilizado para captar e armazenar os dados que serão convertidos em resultados quantitativos de expressão gênica. (Hegde et al., 2000).

A técnica de RNA-Seq, por sua vez, além de quantificar a expressão de todos os genes em uma célula em um dado momento, fornece uma medida muito mais precisa de níveis de transcritos e suas isoformas (WANG, 2009). Ao contrário das abordagens baseadas em hibridização, o RNA-Seq não se limita a detectar transcritos pré-determinados existentes no arranjo, mas todas as espécies de RNA presentes em uma amostra biológica. Utilizando-se do sequenciamento de segunda geração (NGS – Next Generation Sequencing), são gerados milhões de leituras curtas (reads) de cDNA que são mapeadas a um genoma ou um transcriptoma de referência possibilitando a estimativa da expressão gênica (Wang; Gerstein; Snyder, 2009).

A qualidade dos dados de expressão gênica obtidos a partir de microarranjos pode variar muito com a plataforma e os procedimentos utilizados (Morey; Ryan; Van Dolah., 2006). Neste sentido, a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) vem como ferramenta de validação altamente sensível e comumente utilizada para a confirmação dos resultados de expressão gênica obtidos a partir da análise de microarranjo e RNA-Seq, além de quantificar a expressão de genes específicos. (Morey; Ryan; Van Dolah, 2006; Robinson et al., 2007; Fonseca et al., 2015; Fonseca et al., 2017; Malheiros et al., 2018).

A qRT-PCR é uma variação da técnica de PCR convencional comumente utilizada para quantificar DNA ou RNA em uma amostra. Enquanto na PCR convencional a análise é feita após todos os ciclos estarem completos, na PCR em tempo real, o acúmulo do produto de amplificação a cada ciclo é mensurado em tempo real, à medida que a reação progride. Se uma sequência específica é abundante na amostra, a sua amplificação e identificação ocorre anteriormente quando comparado a amostras com menores quantidades, conferindo a técnica maior sensibilidade e menor chance de contaminação já que não há o manuseio dos produtos amplificados. (Life Technologies., 2016).

A detecção em tempo real dos produtos da PCR é possível devido a utilização de uma molécula fluorescente, que maximiza a emissão de fluorescência conforme aumenta a quantidade do produto. As químicas de fluorescência comumente utilizadas incluem corantes que se ligam a moléculas de dupla fita (*SYBR Green*) ou sondas de sequências específicas marcadas com fluorescência (*TaqMan*). Desta forma, a mudança na fluorescência ao longo do tempo é captada por termocicladores específicos e utilizada para calcular a quantidade de *amplicon* produzido em cada ciclo (Life Technologies, 2016).

O estudo da expressão gênica possibilita a identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela falta de concordância entre a concentração de RNA e proteína (Chen et al., 2002; Tian et al. , 2004 ; Dhingra et a., 2005; Rogers et al., 2008). Além disso, informações sobre processos que modulam a função e a atividade proteica, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação, são perdidas na análise de RNA.

Nesse contexto, aliado as técnicas de identificação e quantificação de mRNA, a análise proteômica vem complementar o estudo sobre os mecanismos biológicos atuantes célula, sendo fundamental para o entendimento dos processos fisiológicos e estudo da sua relação com o fenótipo. Uma vez que o produto final da expressão gênica são as proteínas, a análise proteômica pode fornecer informações sobre as modificações pós-traducionais sofridas por essas moléculas (Salvato & Carvalho., 2010).

As técnicas proteômicas vem sendo utilizadas desde o final da década de 1970, quando os pesquisadores começaram a construir bancos de dados de proteínas utilizando a então recém desenvolvida técnica de eletroforese em gel bidimensional (O'Farrell., 1975). Na eletroforese em gel bidimensional, as proteínas são separadas por seu ponto isoelétrico com subsequente separação por SDS-PAGE. A técnica maximiza o número de proteínas que podem ser identificadas e fornece dados eficientes para análise proteômica (Issaq & Veenstra., 2008). A abordagem permitiu um grande avanço com a criação de bancos de dados de todas as proteínas expressas, mas havia a necessidade de métodos mais sensíveis para a caracterização da proteína.

Na década de 1990, a espectrometria de massa surgiu como um poderoso método que removeu a maioria das limitações da análise proteômica. A técnica trata-se de um dos principais métodos para a confirmação inequívoca da presença de uma determinada proteína, além de investigação dos compostos que a constitui. Se baseia na mensuração da relação entre massa e carga de íons para identificar e quantificar as moléculas presentes nas amostras (Domon & Aebersold., 2006). As proteínas são extraídas e clivadas de forma enzimática ou química, a fim de se obter pequenos peptídeos que serão inseridos no espectrômetro de massa para posterior ionização. As partículas carregadas possuem uma dinâmica muito precisa quando submetidas a um campo elétrico ou magnético no vácuo, tornando possível a mensuração das massas dos fragmentos peptídicos constituintes das amostras. Utilizando-se métodos computacionais é possível determinar a sequência de aminoácidos do peptídeo original e assim identificar a proteína da qual ele foi originado (Alberts et al., 2017).

A técnica de espectrometria de massas fornece importante informações sobre as proteínas que são efetivamente codificadas pelo genoma e que são

responsáveis pelos fenótipos dos animais. Sendo assim, verificar se os transcritos diferencialmente expressos estão sendo traduzidos em proteínas nos trará mais indícios sobre a influência desses genes na expressão das características econômicas de interesse estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de carne de 189 bovinos Nelore pertencentes ao programa de melhoramento genético animal Cia de Melhoramento, provenientes da fazenda São Marcelo, localizada no município de Tangará da Serra, MT. Os animais foram criados e recriados a pasto e terminados em confinamento (com duração de aproximadamente 100 dias) e apresentavam idade média de 24 meses. Foram abatidos em frigorífico comercial e, imediatamente após o abate, foram coletadas amostras de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) e armazenadas em tubo falcon de 15 mL contendo 5 mL de RNA later (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram acondicionadas à -80° C e posteriormente foram utilizadas para extração do RNA total e proteínas do tecido muscular.

Durante a desossa, após 24h de armazenamento em câmara fria, foram separadas amostras de tecido muscular (*longissimus thoracis*), localizadas entre a 12^a e 13^a costelas de cada meia carcaça esquerda. Esse procedimento é o usual em frigoríficos brasileiros, sendo esse tipo de carne, sem maturação, a mais encontrada nos mercados do país. Essas amostras foram utilizadas para realização das medidas de maciez da carne e área de olho de lombo (AOL), segundo o proposto por Wheeler et al. (1995) e USDA Quality Grade (1989), respectivamente.

4.2 Análise de força de Cisalhamento e Área de olho de lombo

Para a análise de força de cisalhamento (FC) as amostras foram assadas até atingirem a temperatura interna de 71°C, como padronizado e proposto por Wheeler et al. (1995). Para o procedimento, utilizou-se o equipamento Salter *Warner- Bratzler Shear Force* mecânico com capacidade de 25 kg e velocidade

de seccionamento de 20 cm/minuto. A fim de se aumentar a precisão das medidas, foram retirados do centro das amostras oito replicatas de amostra de ½ polegada em sentido longitudinal às fibras musculares, que foram utilizados para a análise de força de cisalhamento.

A determinação da Área de olho de lombo (AOL) foi realizada pelo método do quadrante de pontos, conforme a metodologia descrita por *USDA – Quality and Yield Grade 1989*, utilizando uma régua quadriculada com áreas conhecidas, posicionada sobre a amostra.

Os fenótipos dos animais foram pré-corrigidos para os efeitos fixos de grupos de contemporâneos (GC) e para a covariável idade do animal ao abate, já que os animais foram abatidos em datas diferentes. Os GC foram definidos como safra e fazenda ao nascimento e grupo de manejo e fazenda ao sobreano. As soluções dos efeitos fixos foram obtidas utilizando um banco de dados com 4694 e 4839 animais para AOL e maciez da carne, respectivamente. Foi aplicado um modelo animal uni-característica por meio do software AIREMLF90 (MISZTAL et al., 2014). O modelo na forma matricial pode ser descrito como:

$$y = X\beta + Zu + e,$$

onde **y** é o vetor de observações (AOL ou maciez da carne), **β** é o vetor dos efeitos sistemáticos (GC e idade ao abate), **u** é o vetor dos efeitos genéticos aditivos aleatórios, **e** é o vetor dos efeitos residuais aleatórios, **X** e **Z** são matrizes de incidências conhecidas que associam **β** e **u**, respectivamente, a **y**.

Após a obtenção dos dados ajustados, foram selecionados 12 animais extremos para cada característica, para os estudos de expressão gênica. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos extremos, foi realizado o teste T de Student utilizando-se *software R* (Tabela 1).

Tabela 1: Número de animais (N), médias ajustadas, desvios-padrão (DP), valores mínimos e máximos para força de cisalhamento (kgf) e área de olho de lombo (cm) (AOL) de amostras musculares de bovinos Nelore com características extremas para qualidade de carne.

	N	MÉDIAS	DP	MÍNIMOS	MÁXIMOS	P-VALOR
CARNE MACIA	12	3,31	0,69	1,99	4,12	8,99E-15
CARNE DURA	12	9,16	0,54	8,66	10,05	
AOL ALTA	12	82,93	3,91	79,14	91,51	2,09E-11
AOL BAIXA	12	58,40	1,41	55,68	60,09	

5. Análise da Expressão Gênica

5.1 Escolha dos genes

Os genes analisados foram escolhidos após revisão da literatura em trabalhos de expressão gênica publicados em periódicos, além de base de dados públicas. Para isso, foram utilizados mecanismos de pesquisa como Google Scholar, Scopus e Science Research. Os genes relacionados à AOL (Tabela 2) e maciez da carne (Tabela 3), encontrados com maiores frequências, foram utilizados no presente estudo.

Para a característica de AOL, todos os genes escolhidos foram encontrados em trabalhos de expressão gênica global (Tabela 2). Para a característica de maciez, os genes utilizados foram encontrados tanto em trabalhos de expressão gênica global como de identificação de marcadores moleculares (SNPs) (Tabela 3). Os genes *CAPN1*, *CAPN2* e *CAST* têm sido considerados os mais atuantes no processo de amaciamento da carne e têm sido associados à essa característica em trabalhos de GWAS (Magalhães et al., 2016; Castro et al., 2017), no entanto, não têm apresentado expressão diferencial significativa em trabalhos de expressão gênica global (Nagai, 2015; Fonseca et al., 2017; Gonçalves et al., 2018). Dada a importância do complexo calpaína-calpastatina para a determinação dos fenótipos sob estudo, esses genes foram incluídos em nosso trabalho, a fim de verificar o comportamento dos mesmos em uma população comercial.

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos relacionados a área de olho de lombo da carne encontrados na literatura e seus respectivos autores.

GENE	AUTOR	RAÇA	MÉTODO
<i>IGF-1</i>	Guo et al., (2015)	Brahman	RNAseq
	Sadkowski et al., (2009)	Limousin	Microarray
<i>IGF-2</i>	Silva et al., (2019)	Nelore	RNAseq
	Goodall & Schmutz et al., (2007)	Bovinos Bos taurus	Genotipagem ¹ e PCR
	Guo et al., (2015)	Brahman	RNAseq
<i>MSTN</i>	Silva et al., (2019)	Nelore	RNAseq
	Zhang et al., (2011)	Quinchuan	Microarray
<i>NEDD4</i>	Vignato et al., (2017)	Nelore	RNAseq
<i>UBE4A</i>	Vignato et al., (2017)	Nelore	RNAseq

¹ Genotipagem SNP específico

Tabela 3: Genes diferencialmente expressos para maciez da carne encontrados na literatura e seus respectivos autores.

GENE	AUTOR	RAÇA	MÉTODO
<i>CAPN1</i>	Pinto et al., (2010)	Nelore	Genotipagem ¹
	Page et al., (2002)	Angus	Genotipagem ¹
	Castro et al., (2017)	Nelore	GWAS ²
	White et al., (2005)	Brahman	Genotipagem ¹
	Magalhães et al., (2016)	Nelore	GWAS ²
<i>CAPN2</i>	Zhang et al., (1996)	Angus/ Hereford	PCR-RFLP ³
	Costello et al., (2007)	Bovinos Irlandeses	PCR-RFLP ³
	Saccà et al., (2018)	Simmental x Goudali	qPCR
	Magalhães et al., (2016)	Nelore	GWAS ²
<i>CAST</i>	Pinto et al., (2010)	Nelore	Genotipagem ¹
	Natras et al., (2014)	Brahman/Angus	qRT-PCR ⁴
	Dias, (2016)	Nelore	qRT-PCR ⁴
	Curi et al., (2009)	Nelore	ARMS – PCR ⁵
	Bernard et al., (2007)	Charolês	Microarray
<i>HSPB1</i>	Malheiros et al., (2018)	Nelore	qRT-PCR
	Baldassini et al., (2015)	Nelore	Espectrometria de Massas
	Carvalho et al., (2012)	Nelore	qRT-PCR
<i>DNAJA1</i>	Bernard et al., (2007)	Charolês	Microarray
	Malheiros et al., (2018)	Nelore	qRT-PCR
<i>FABP4</i>	Zhao et al., (2012)	Angus	Microarray
<i>SCD</i>	Zhao et al., (2012)	Angus	Microarray
<i>ASAH1</i>	Fonseca et al., (2017)	Nelore	RNA-Seq
	Nagai et al., (2015)	Nelore	RNA-Seq
<i>PRKAG3</i>	Bongiorni et al., (2016)	Maremamma & Chianina	RNA-Seq

¹ Genotipagem SNP específico, ² Genotipagem com chip de alta densidade, ³ Polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição ⁴ PCR em tempo real, ⁵ Sistema de mutação refratário à amplificação

5.2 Extração do RNA Total

Para as extrações do RNA total de todas as amostras foram utilizados 50 mg de tecido muscular anteriormente estocados em RNA *later* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e o *kit* para extração de RNA RNeasy *Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), conforme o protocolo do fabricante.

Foram pesados 50 mg de cada amostra e depositadas em tubos falcon de 50 mL, contendo 1mL de *Quiazol Lysis Reagent*. As amostras foram homogeneizadas no homogeneizador de tecidos ultraturrax T50 (IKA) por três vezes durante 30 segundos, com intervalo de também 30 segundos. A seguir, o conteúdo foi transferido para um microtubo plástico de 2mL, onde permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos. Transcorrido o tempo, foram adicionados 200uL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Após a incubação de 3 minutos em temperatura ambiente a amostra foi centrifugada a 12000x g durante 15 minutos a 4°C. Formaram-se então 3 fases, sendo que a superior, incolor, continha o RNA.

O RNA foi então transferido para um novo microtubo de 2 mL e adicionou-se o mesmo volume de etanol 70%, aproximadamente 600 uL. O conteúdo foi homogeneizado, e transferiu-se 700uL para a coluna de sílica, na qual foi centrifugado por 8.000xg por 1 minuto. Esse passo foi novamente realizado utilizando todo o conteúdo restante no microtubo. A seguir, foram adicionados a membrana de sílica o mix contendo 10 ul de DNase I (1500 kunitz units) e 70 uL de tampão RDD, fornecidos pelo *Kit RNase-Free DNase* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e incubaram-se as amostras a temperatura ambiente por 15 minutos.

Decorrido o tempo de espera, adicionou-se 350uL do tampão RW1 e centrifugou-se por 1 minuto, a 8.000xg. Posteriormente, por duas vezes, adicionou-se 500 ul do tampão RPE e centrifugou-se por 1 minuto a 8.000xg, a fim de eliminar o etanol e outros contaminantes. Por fim, o RNA foi eluído em 30 ul de água livre de RNase, por centrifugação, durante 1 minuto a 8.000xg e armazenado em freezer -80.

5.3 Análise do RNA Total extraído

Para a determinação da pureza do RNA, foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007) nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. Relações 260/280 próximas a 2 indicavam amostras mais puras, enquanto relações menores poderiam indicar a presença de proteínas ou outros contaminantes absorvidos no comprimento de 280 nm. A proporção 260/230 foi utilizada como medida secundária de pureza.

As razões 260/280 e 260/230 das amostras de RNA ficaram próximas à 2 (mínimo de 1,8 e máximo de 2,1) e por isso, foram consideradas satisfatórias para continuação do experimento, por estarem livres de contaminações.

Para a avaliação da integridade do RNA foi utilizado *aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009). A análise resultou em um eletroferograma para cada amostra, o qual foi analisado automaticamente pelo aparelho, o que possibilita a detecção de traços de degradação. Adicionalmente, foi calculada a razão 28S/18S, referentes à relação entre os dois tipos de RNAs ribossomais de eucariotos. Em caso de degradação, os picos do eletroferograma, referentes ao 28S e 18S, sofreriam uma diminuição no sinal da fluorescência, e outros picos correspondentes à fragmentos degradados, seriam detectados. Além disso, com o Bioanalyzer determinou-se o índice RIN (*RNA integrity number*), que varia de 1 a 10 na escala de qualidade (sendo 10 o melhor) (SCHROEDER et al., 2006).

Os valores de RIN das amostras de RNA variaram entre 7,0 e 7,4 com média de 7,1, (Material suplementar, figuras 1 e 2), confirmando que as amostras não estavam degradadas e que poderiam ser utilizadas na técnica de qRT-PCR. Para a quantificação das amostras e confirmação da ausência de contaminação por DNA genômico, foi utilizado o aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010). Para ambas as características estudadas foram observadas concentrações de RNA total que variaram de 120 ng/uL a 600 ng/uL. Os valores relativos à contaminação por DNA genômico foram muito baixos. Para as amostras relativas à característica de maciez, foi encontrada a média de contaminação de 0,65%, com um mínimo de 0,35 e máximo de 0,91, já para área

de olho de lombo, a média obtida foi de 0,73% com o mínimo de 0,27 e máximo de 0,93.

5.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em cada reação foi adicionado 1 ul de oligo(dT)₂₀, 1 ul de *random hexamers* e 1 ul de *annealing buffer*. Além disso, foram adicionados 1000 ng de RNA total e água ultrapura até totalizar 7 ul. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C, e a seguir adicionou-se 10ul de *2x first stand* em cada amostra, além de 2 ul de *Super Script enzyme Mix*. Posteriormente, encubou-se a reação novamente a 50°C por 10 minutos, seguidos de 50 minutos a 50° e finalmente 5 minutos a 85°C. Após o procedimento, o cDNA foi armazenado a -20°C.

6. PCR Quantitativa em Tempo Real

6.1. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Por meio do banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram obtidas as sequências de nucleotídeos de RNA mensageiro, utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. Foram desenhados 14 pares de oligonucleotídeos iniciadores referente aos genes alvos estudados: *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1*, *DNAJA1*, *FABP4*, *SCD*, *ASAH1* e *PRKAG3* para a característica de Maciez da carne (Tabela 4), e *IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *UBE4A* e *NEDD4* para a característica de área de olho de lombo (Tabela 5). Outros três genes de referência foram selecionados, a fim de normalizar as reações: Beta Actina (*ACTB*), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) e hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) (Tabela 6).

Para o desenho dos oligonucleotídeos, foi utilizado o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2004). Os iniciadores foram escolhidos considerando-se o seu tamanho, tamanho do *amplicon*, temperatura de desnaturação, porcentagem de citosina e guanina e ausência na formação de dímeros ou *hairpins*. Posteriormente, a especificidade das sequências dos

oligonucleotídeos escolhido, foi verificada utilizando-se o algoritmo BLASTN do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) em relação ao genoma bovino.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR para a obtenção dos amplicons dos genes relacionados a característica de Maciez da carne

GENE	Número de Acesso (GENBANK)	Sequência (5' – 3')	TM ¹ do Amplicon (C°)	Tamanho do Amplicon (pb ²)
<i>CAPN1</i> -F <i>CAPN1</i> -R	NM_174259.2	CTCTCAGGAGGCAGCACATCT CTTGCGCAGCTCGTACCA	85	75
<i>CAPN2</i> -F <i>CAPN2</i> -R	NM_001103086.1	TCTTTCAACGACTTCCTGAGACACTA ACTTCTTGTAGCTGTCACTGGTGAGT	80	88
<i>CAST</i> -F <i>CAST</i> -R	NM_001025569.1	TGCCTTGTATCCGACTTCAC CCCCAGCTGACTGAGCTTTT	79	104
<i>HSPB1</i> -F <i>HSPB1</i> -R	NM_001025569.1	GAACAGCCGGAAACAAGTAAAGA GGGTGAGGATGTCCAGTGATG	83	76
<i>DNAJA1</i> -F <i>DNAJA1</i> -R	NM_001015637.1	GGAGGAGAACAGGCAATTAAGAA ACAACGTTTTTACCTCTCCTCTCTCT	80	125
<i>SCD</i> - F <i>SCD</i> - R	NM_173959.4	TGGTCAGCTCCCCTCATAGTAAG GCTCACCACCATAACCACCAAT	79	58
<i>FABP4</i> - F <i>FABP4</i> - R	NM_174314.2	CTGCCACCAGAGTTTATGAGAGA ACCAACATAACCATATCAAAATCAG	78	64
<i>ASAH1</i> - F <i>ASAH1</i> - R	NM_001075459.2	TGGTGGCTGGAAGGATGTT GGTTGATTTTCTGCAGTCTTCAG	83	119
<i>PRKAG3</i> - F <i>PRKAG3</i> - R	NM_001162421	CCCTTTTGTAGGTTCCGCTCTT GCTTCTGGGAGCACAAGCA	84	80

¹: temperatura de Melt; ²: pares de base

Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR para a obtenção dos amplicons dos genes relacionados a característica de AOL

GENE	Número de Acesso (GENBANK)	Sequência (5' – 3')	TM ¹ do Amplicon (°C)	Tamanho do Amplicon (pb ²)
<i>IGF-1 F</i>		TCAGCAGTCTTCCAACCCAAT		
<i>IGF-1 R</i>	NM_001077828.1	GCACAGGGCCAGATAGAAGAGA	81	72
<i>IGF-2 F</i>		TGTGCAGCTGAGACCGAATT		
<i>IGF-2 R</i>	NM_174087.3	GGAGCACGGAACAGGAAAAC	82	77
<i>MSTN-F</i>		CGGCTCCTTGGGAAGACGAT		
<i>MSTN-R</i>	NM_001001525.3	AGACTCCGTGGGCATGGTAAT	83	67
<i>NEDD4-F</i>		CCCTTCAGGACAACCTAACAGATG		
<i>NEDD4-R</i>	NM_010812047.2	TCGGTTGTCAACACTTTCTGTTTC	79	113
<i>UBE4A-F</i>		GACTGAGCCACAGATGCTACAAA		
<i>UBE4A-R</i>	NM_001098999	TGCCTATGGCCAGCTGAAC	81	80

¹: temperatura de Melt; ²: pares de base

Tabela 6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR para a obtenção dos amplicons a partir dos genes de referência

GENE	Número de Acesso (GENBANK)	Sequência (5' – 3')	TM ¹ do Amplicon (°C)	Tamanho do Amplicon (pb ²)
<i>GAPDH-F</i>		CCGTTTCGACAGATAGCCGTAA		
<i>GAPDH-R</i>	NM_001034034	CGACCTTCACCATCTTGTCTCA	83	69
<i>BACTIN-F</i>		CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG		
<i>BACTIN-R</i>	NM_177945	AAGGGTGTAAACGCAGCTAACAGT	83	85
<i>HPRT1-F</i>		TGATGAAGGAGATGGGTGGC		
<i>HPRT1-R</i>	NM_001034035	CCAACAGGTCGGCAAAGAAC	83	81

¹: temperatura de Melt; ²: pares de base

6.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

A determinação da concentração adequada dos oligonucleotídeos nas reações de qRT-PCR foi realizada por meio de diluições, onde as concentrações dos iniciadores variaram entre 100/100, 300/300 e 600/600 nanomolar para forward e reverse. Todas as reações foram realizadas em triplicatas, em placas de 96 poços seladas com adesivo óptico. Para isso, foram utilizados 100ng do pool de cDNA das amostras de tecido muscular para cada par de iniciadores.

Para as reações foram utilizados 6,25ul de SYBR Green, 2,75ul de água ultrapura, 1ul de amostra, além de 1.25ul para cada iniciador. As melhores concentrações dos iniciadores foram escolhidas por meio da análise da curva de dissociação (derivada negativa da taxa de fluorescência, $-Rn'$, em função da temperatura de desnaturação) observando a formação de um único pico referente a temperatura de melt (TM). Além disso, foram escolhidas as combinações com menores Ct e picos únicos, que indicam a ausência de produtos inespecíficos como dímeros ou hairpins.

Em relação aos genes relacionados com a maciez da carne, foram escolhidas as combinações dos iniciadores diretos e reversos: *CAPN1* (600/600), *CAPN2* (100/100), *CAST* (300/300), *DNAJA1* (100/100), *HSPB1* (600/600), *FABP4* (300/300), *SCD* (300/300), *ASAH1*(100/100) e *PRKAG3* (600/600) (Material suplementar, Figura 3 e 4). Para os genes relacionados a AOL: *IGF1* (100/100), *IGF2*(100/100), *MSTN* (300/300), *NEDD4*(100/100) e *UBE4A* (300/300) (Material suplementar, Figura 5). Já para a amplificação dos genes de referência as concentrações escolhidas foram: *GAPDH* (300/300) BETA ACTINA (300/300) e *HPRT1* (100/100) (Material suplementar, Figura 6).

Para obtenção das reações foi utilizado o *kit* SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA,USA). O *master mix* contém o tampão, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA polimerase e o ROX como referência passiva. O volume final de cada reação foi de 12,5ul e continha além dos componentes do *master mix*, os oligonucleotídeos nas concentrações pré-determinada, 50ng de pool de cDNA e água ultrapura. Todas as reações foram realizadas no equipamento 7500 Real – Time pCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2009) com os seguintes passos para amplificação: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos.

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa 7500 software v2.0.6 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2011).

6.3 Curva Padrão e eficiência de amplificação

Para o cálculo da eficiência de amplificação, foi realizado a construção de uma curva padrão, por meio de uma diluição em série (2:1) das amostras de cDNA. A eficiência de amplificação demonstra o quanto a molécula alvo amplifica a cada ciclo durante a fase exponencial da reação, e são aceitáveis níveis de eficiência entre 90% e 110% (Livak e Schmittgen, 2001). Para a realização do cálculo, os valores do *threshold cycle* (Ct) são plotados em função do log da quantidade de molécula alvo. Assim, é obtida uma reta, onde quando maior a quantidade inicial de molécula alvo, menor será o valor do Ct. Uma reação com 100% de eficiência possui coeficiente angular da curva padrão de -3,32. Ângulos mais negativos apontam reações com menos de 100% de eficiência, enquanto ângulos mais positivos podem indicar problemas de pipetagem ou má qualidade da amostra (Life Technologies, 2016). A eficiência de amplificação deve ser determinada a partir do coeficiente angular da curva padrão (Bustin et al., 2009) por meio da equação:

$$\text{Eficiência da PCR} = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

Em relação ao coeficiente de correlação (R^2), medida que indica quão bom é um valor em prever outro, foram consideradas eficientes reações com valores superiores a 0,99, garantindo pequena variação entre as triplicatas. Foram realizadas 7 diluições seriadas na proporção de 2:1, utilizando *pools* de cDNA de amostras de tecido muscular. As reações foram realizadas sob as mesmas condições descritas no item anterior utilizando as concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores pré-determinadas. Todas as reações foram feitas em triplicatas, com controles negativos, e os resultados foram obtidos por meio do programa de análise *7500 software v 2.0.6* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2011).

As curvas padrão e a eficiência de amplificação para os genes relacionados a maciez da carne *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1*, *DNAJA1*, *FABP4*, *SCD*, *ASAH1* e *PRKAG3* (Material suplementar, Figura 7 e 8), relacionados a AOL, *IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *NEDD4* e *UBE4A* (Material

suplementar, Figura 9) e referência *GAPDH*, Beta Actina e *HPRT1* (Material suplementar, Figura 10) estavam com os valores de R^2 acima de 0,99 indicando pequena variação entre as replicatas técnicas e linearidade da curva, além de eficiências dos oligonucleotídeos iniciadores entre 100 e 110% (Livak e Schmittgen, 2001). Como as eficiências de amplificação do gene alvo e referência estavam dentro do limiar aceitável, foi utilizado o método do Ct comparativo, que descreve a alteração na expressão do gene alvo em um determinado experimento em relação ao calibrador (amostra usada como base para a quantificação dos transcritos) (Life Technologies, 2016).

6.4 Escolha dos genes de referência

Idealmente, um gene de referência não deve apresentar diferença significativa de expressão entre os tecidos estudados o nível de desenvolvimento dos mesmos (RADONIC et al., 2004). Primeiramente, os genes eleitos como candidatos, foram escolhidos com base em trabalhos da literatura e posteriormente, por meio do *Expression Suite Software v1.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2012) foi analisada a estabilidade dos mesmos, por meio da geração de um *score* para cada gene. O *score* é uma medida de como os valores de Ct (threshold cycle) variam em comparação com os outros genes escolhidos como endógenos. Quanto menor a pontuação, mais estável a expressão do gene e mais plana a linha do gráfico que demonstra as variações de Ct. As pontuações dos genes *GAPDH*, *ACTB*, e *HPRT1* para maciez foram respectivamente 0,612; 0,650; e 0,648, já para Área de olho de lombo, 0,596; 0,542; 0,523. Todos os genes de referência escolhidos estavam se expressando de maneira constante nas amostras, e por isso foram utilizados no experimento.

6.5 Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

Para o método do Ct comparativo foram utilizadas placas com 96 poços, nas quais os genes alvos e referência foram amplificados. Para ambas características, foram utilizadas amostras dos 24 animais extremos. As reações foram realizadas em triplicatas, contendo além do controle negativo, o controle positivo, que possibilita a verificação de possíveis problemas na corrida, já que são utilizadas amostras com curvas de amplificação conhecidas. As condições

das reações e equipamento utilizado foram os mesmos exemplificados no item 6.2. Todos os dados de Ct gerados (número de ciclos da PCR na qual a curva de reação da amostra intercepta a linha *Threshold*), foram analisados no Expression Suite Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2012).

6.6 Análises Estatísticas

Os dados gerados, foram analisados por meio do *software* estatístico SAS University Edition (https://www.sas.com/pt_br/software/university-edition/download-software.html). Para a normalização dos dados, primeiramente foi gerada uma média geométrica do valor do Ct, obtido para os três genes de referência (*GAPDH*, BETA ACTINA e *HRPT1*), conforme sugerido por Vandesompele et al. (2002). A expressão relativa dos genes alvo (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *DNAJA1*, *HSPB1*, *ASA1*, *PRKAG3*, *IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *NEDD4*, *UBE4A*) foi calculada como proposto por Steibel et al. (2009), conforme o modelo abaixo:

$$Y_{gikr} = T_{ig} + D_{ik} + e_{gikr},$$

onde, Y_{gijk} = Ct obtido com o *software* do termociclador para o gene g (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), em poço da placa (réplica técnica) para a amostra de animal k de tratamento i; T_{ig} representa o efeito do tratamento i na expressão do gene g. D_{ik} é um efeito específico de amostragem aleatória que capta as diferenças, tal qual, extração diferencial ou eficiências de amplificação entre as amostras, e e_{gikr} que se refere ao valor de resíduo.

7. Espectrometria de Massa

Para identificar se os genes diferencialmente expressos, estariam sendo traduzidos em proteínas diferencialmente expressas, as amostras musculares dos 24 animais extremos para cada característica foram submetidas a análise de espectrometria de massa. Para a realização do procedimento, foram realizados os passos abaixo conforme protocolo desenvolvido pela Veritas

LTDA. A utilização da técnica de espectrometria de massa, juntamente com a técnica de PCR em tempo real, vem como ferramenta para auxiliar na identificação de genes atuantes como biomarcadores, já que são as proteínas as determinantes finais dos fenótipos dos animais.

7.1 Extração proteica das amostras

As amostras de tecido muscular utilizadas na extração de proteínas foram inicialmente lavadas duas vezes com 100 mL de PBS gelado. O tecido foi então pesado, congelado em nitrogênio líquido e pulverizado em almofariz com o auxílio de pistilo. A extração das proteínas foi realizada pela adição de tampão contendo uréia 8M, Tris-HCl 0,15M pH 8,8, detergente O.G. (1-S-Octyl- β -D-Thioglucopyranoside, Termofisher) 0,5% e coquetel de inibidores de proteases 5% (v/v, Sigma), seguida de sonicação realizada em 3 ciclos de 1 minuto cada. Foram adicionados 1 mL de tampão para cada 100 mg de tecido. O extrato proteico foi obtido após a centrifugação a 12.000xg por 5 min a 4°C.

Para a determinação da quantidade de proteína presente em cada amostra foi utilizado o método de Bradford com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma). As amostras foram distribuídas nas microplacas em duplicatas de 1uL cada. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes nas amostras.

Para as amostras de carne macia e dura foram encontradas respectivamente concentrações médias de 19,70 mg/mL e 19,51 mg/mL de proteína, com máximo de 24,12 mg/mL e mínimo de 1,99 mg/mL para carne macia, e 38,10 mg/mL e 10,8 mg/mL para carne dura. Já para as amostras de AOL, as médias foram respectivamente para alto e baixo AOL 21,36 mg/mL e 21,78 mg/mL com máximo de 21,36 mg/mL e mínimo de 11,60 mg/mL para AOL alta e 55,68 mg/mL e 12,40 mg/mL para baixo AOL.

7.2 Preparação das amostras para análise proteômica

Para a preparação das amostras para a espectrometria de massas avançada, foram realizadas basicamente 3 etapas principais: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) limpeza e dessalinização das amostras. As amostras (50 µg/cada) foram submetidas a redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (ditiotretol) na proporção 1mg DTT/mg proteína e incubação por 2 horas em temperatura ambiente, seguida da alquilação pela adição de I.A. (iodoacetamida) na proporção 3 mg I.A./mg proteína e incubação por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. O volume das amostras foi diluído 5 vezes em solução de 0,1 M de bicarbonato de amônio pH $\geq 8,0$, obtendo-se um volume final de 500 µL.

As amostras foram então incubadas com 1 µg de tripsina (Promega) à 37°C durante a noite. Previamente à aplicação das amostras no espectrômetro de massas foi realizada a limpeza e dessalinização, utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (Waters), conforme descrição do fabricante, no qual, a coluna foi equilibrada com solução acetonitrila 5% contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 80%. As amostras foram em seguida secas em *speed vac* e aplicadas em espectrômetro de massas, sem a realização de replicatas técnicas.

7.3 Análise por espectrometria de massas avançada

As amostras digeridas foram analisadas em espectrômetro de massas OrbiTrap Fusion (ThermoScientific), que combina analisadores de massa de quadrupolo, OrbiTrap e íon trap em um único instrumento, oferecendo o máximo em flexibilidade e utilidade na aquisição de dados. Cerca de 1 µg de cada amostra foi injetado para análise. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS” (Rauch et al., 2006). Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade, com taxa de erro inferior a 5% (False Discovery RATE – FDR), foram agrupados em proteínas, utilizando-se o algoritmo “Protein Prophet”. Foi gerado uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 2.0%. Como referência, foi

utilizado o banco de dados: BOVINE PROTEOME UNIPROT (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000009136>).

7.4 Análise comparativa e quantificação

A contagem espectral, *spectral counts*, definida como o número total de espectros (peptídeos) identificados para uma proteína, é aceitável como uma medida semiquantitativa da abundância de proteínas em estudos proteômicos (Lundgren et al., 2010). Os *spectral counts* dentro de cada corrida foram somados e as contagens individuais de proteínas foram divididas (normalizadas) pelas contagens totais em cada corrida. As contagens espectrais normalizadas foram divididas pelo comprimento da proteína e os valores foram multiplicados por (100.000) para fins de simplificação. O teste T foi aplicado para comparar os diferentes grupos extremos para cada característica, e os critérios para seleção de proteínas diferencialmente expressas foram: teste T <0,05 e proteínas detectadas em um único grupo em 3 ou mais amostras.

8. RESULTADOS

Para maciez da carne, os genes *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1* e *DNAJA1* apresentaram expressão significativamente diferente entre os grupos analisados (carne macia e carne dura) (Tabela 7).

Tabela 7: Expressão dos genes *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1*, *DNAJA1*, *FABP4* e *SCD*, no músculo *Longissimus Thoracis* de bovinos Nelore com características extremas para maciez da carne.

GENE	GRUPO (maciez)	Fold Change¹	ERRO PADRÃO	P – VALOR
<i>CAPN1</i>	MACIA	1	0,15	0,0143*
	DURA	1,47	0,15	
<i>CAPN2</i>	MACIA	1	0,2	0,0009**
	DURA	1,53	0,2	
<i>CAST</i>	MACIA	1	0,15	0,0183*
	DURA	1,33	0,15	
<i>HSBP1</i>	MACIA	1	0,17	0,0225*
	DURA	1,43	0,17	
<i>DNAJA1</i>	MACIA	1	0,21	0,001**
	DURA	1,50	0,21	
<i>FABP4</i>	MACIA	1	0,4	0,3439 ^{ns}
	DURA	0,51	0,4	
<i>SCD</i>	MACIA	1	0,17	0,8859 ^{ns}
	DURA	0,72	0,17	
<i>ASAH1</i>	MACIA	1	0,2	0,3069 ^{ns}
	DURA	0,34	0,22	
<i>PRKAG3</i>	MACIA	1	0,31	0,4754 ^{ns}
	DURA	0,50	0,31	

ns: não significativo, *: significativo ao nível de 5%, ** significativo ao nível de 1% ¹ Fold change ou expressão relativa calculada em função do grupo de carne macia.

Todos os genes diferencialmente expressos apresentaram maior nível de expressão no grupo de carne dura, em relação ao de carne macia (Figura 11).

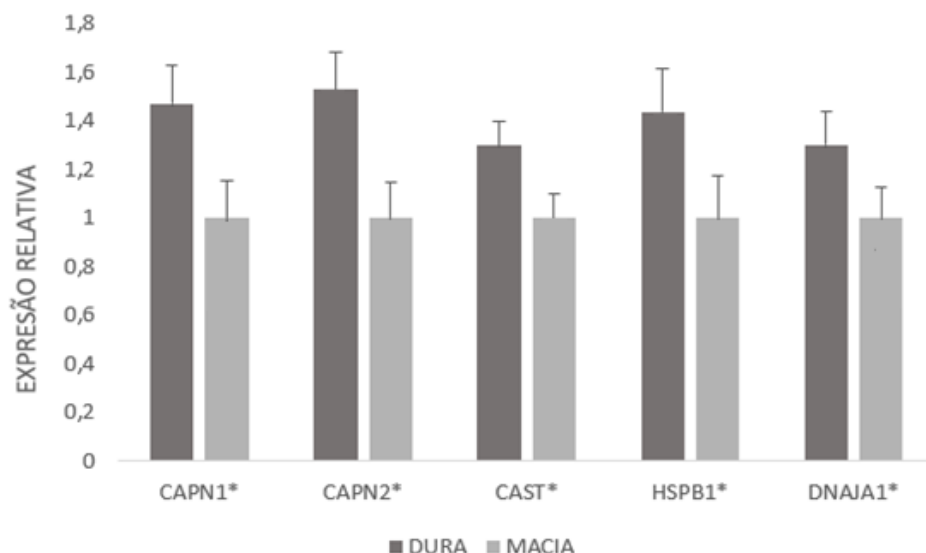


Figura 11: Expressão relativa dos genes alvo *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSPB1* E *DNAJA1* em grupos extremos para maciez da carne (*: significativo ao nível de 5%).

Já para a característica de área de olho de lombo, apenas o gene *MSTN* diferiu significativamente entre os grupos extremos, sendo mais expresso no grupo de baixo AOL (Tabela 6, Figura 12).

Tabela 8: Expressão dos genes *IGF-1*, *IGF-2*, *MSTN*, *NEDD4* e *UBE4A* no musculo *Longissimus Thoracis* de bovinos Nelore com características extremas para área de olho de lombo (AOL).

GENE	GRUPO (AOL)	Fold Change ¹	ERRO PADRÃO	P - VALOR
<i>IGF-1</i>	ALTO	1	0,29	0,8745 ^{ns}
	BAIXO	0,93		
<i>IGF-2</i>	ALTO	1	0,23	0,3971 ^{ns}
	BAIXO	0,71		
<i>MSTN</i>	ALTO	1	0,24	0,0130*
	BAIXO	1,76		
<i>NEDD4</i>	ALTO	1	0,19	0,3400 ^{ns}
	BAIXO	1,14		
<i>UBE4A</i>	ALTO	1	0,22	0,4224 ^{ns}
	BAIXO	1,15		

ns: não significativo ao nível de 5%, *: significativo ao nível de 5% ¹ Fold change calculado ou expressão relativa calculada em função do grupo com alta AOL

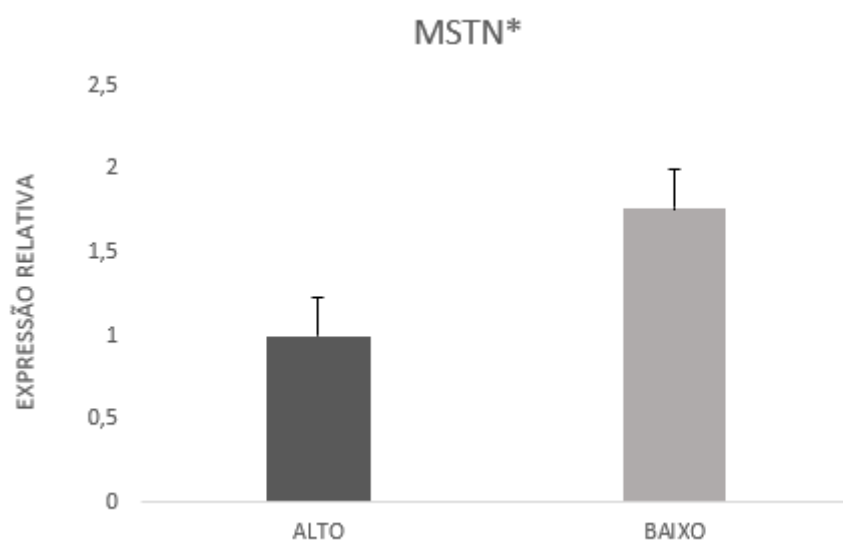


Figura 12: Expressão relativa do gene alvo *MSTN* em grupos extremos para AOL (*: significativo ao nível de 5%).

Em relação às proteínas, apenas as codificadas pelos genes *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST* e *HSPB1*, relacionadas à característica de maciez foram identificadas. Entretanto, nenhuma apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos contrastantes (Tabela 9)

Tabela 9: Identificação da proteína, símbolo do gene codificador, tamanho em termos de aminoácidos, média da quantidade de proteína nos respectivos grupos, razão e teste t.

Proteína	Gene	Tamanho	Média Duro (A)	Média Macio (B)	Razão A/B	T test
CAN1_BOVIN	<i>CAPN1</i>	716	0,19	0,17	1,07	0,36
CAN2_BOVIN	<i>CAPN2</i>	700	Na	0,14	Na	Na
ICAL_BOVIN	<i>CAST</i>	705	0,12	0,19	0,62	Na
HSPB1_BOVIN	<i>HSPB1</i>	201	15,96	14,83	1,08	0,15

Na: Não foi possível a quantificação da proteína no respectivo grupo.

9. DISCUSSÃO

9.1 Genes relacionados à maciez da carne

No presente trabalho a *CAPN1* e *CAPN2* apresentaram maior expressão em animais de carne dura (Tabela 7) sugerindo que esses genes não influenciaram na maciez da carne dos animais utilizados no presente estudo.

A proteólise das proteínas miofibrilares é a principal razão para as alterações estruturais no músculo esquelético *post mortem* e, conseqüentemente, para o amaciamento da carne (Koohmaraie et al., 1992). O sistema das calpainas/calpastatina foi descrito por vários autores como responsável pelo amaciamento da carne no processo *post mortem* (Koohmaraie et al., 1992; Steen et al., 1997; Dransfield et al., 1993; Kemp et al., 2010). A atividade das calpaínas é altamente regulada pelo seu inibidor específico calpastatina, que atua por meio da formação de um complexo calpaína/calpastatina, inibindo a degradação de fibras musculares. A μ -calpaína (*CAPN1*) requer baixos níveis de cálcio para sua ativação e, segundo Dransfield (1993), é o componente de maior significância na proteólise *post mortem* e amaciamento da carne, enquanto a m-calpaína (*CAPN2*) daria continuidade ao processo de amaciamento.

Nossos resultados concordam com outros estudos de expressão gênica que, utilizando RNA-Seq, não encontraram associação do gene *CAPN1* e *CAPN2* com a maciez em bovinos da raça Nelore (Nagai, 2015; Fonseca et al., 2017). Da mesma forma, Malheiros et al. (2018), por meio da técnica qRT-PCR, também não encontraram associação da expressão desses genes com a maciez da carne, sugerindo que essa característica em bovinos da raça Nelore, não depende diretamente da expressão dos genes da calpaína, e que outros genes estariam envolvidos no processo de amaciamento.

Existem evidências que a ação da *CAPN1* ocorre com a maturação da carne. Neste sentido, Carvalho et al. (2012), utilizando a técnica de qRT-PCR, também encontraram associação negativa entre a expressão do gene *CAPN1* e a maciez da carne sem maturação, bem como as amostras utilizadas no presente estudo. Entretanto, estes autores observaram que, com 14 dias de maturação, houve uma associação positiva entre a expressão do gene e a

maciez da carne. Uma possível explicação, é que logo após o abate, não é esperada uma ação imediata da u-calpaina na proteólise *post mortem*, mas que até os 14 dias de maturação esse efeito já seria evidente. Assim, a expressão maior destes genes em carne dura, não maturada, poderia ser esperada.

Em relação à enzima calpastatina (*CAST*), houve uma maior expressão em carnes mais duras quando comparada a carne mais macia, evidenciando sua ação inibitória da atividade das calpaínas e consequente diminuição da maciez da carne. Estes resultados concordam com os encontrados por outros autores que, em estudos com marcadores desenvolvidos no gene *CAST*, em bovinos, identificaram associação do gene com a maior força de cisalhamento da carne e, conseqüentemente, com a diminuição da maciez (Casas et al., 2006; Calvo et al., 2014). Adicionalmente, Dias et al. (2016) e Natrass et al. (2014), em estudos da expressão do gene *CAST* em tecido muscular em grupos de bovinos da raça Nelore e Brahman, respectivamente, contrastantes para maciez, também encontraram maior expressão do gene *CAST* relacionado à menor maciez da carne. Os autores sugeriram que as diferenças na força de cisalhamento da carne são consequência de alterações nos níveis de mRNA do gene, o que pode influenciar a atividade proteica e consequente a proteólise *post mortem* no músculo esquelético.

Os achados do presente trabalho em relação ao complexo calpaína/calpastatina sugerem que a menor maciez da carne seria atribuída à maior expressão do gene calpastatina, mas que outros fatores podem estar intermediando o processo de transcrição do gene até sua tradução em proteína efetiva. Além disto, outros genes possivelmente estão envolvidos no processo de maciez da carne.

Ao que se refere aos genes codificadores das proteínas de choque térmico (HSPs), *HSPB1* e *DNAJA1*, foi observada maior expressão em carne mais dura (Tabela 7), demonstrando associação negativa com a maciez da carne. Estudos propuseram que as HSPs no músculo, mediam a progressão da morte celular apoptótica e estão, portanto, envolvidas com o processo de amaciamento da carne (Bernard et al., 2007; Lomiwes et al., 2014; Malheiros et al., 2018). Os resultados do presente trabalho concordam com Bernard et al. (2007) que, em análise utilizando Microarray em músculo bovino, encontraram associação negativa da maior expressão do gene *HSPB1* com a maciez.

Adicionalmente, Baldassini et al. (2015), também observaram tendência de menor expressão da proteína Hsp27 em animais Nelore com carne macia, assim como Malheiros et al. (2018), trabalhando com bovinos Nelore, também encontraram associação negativa do gene com a maciez. O gene *DNAJA1*, também regulado negativamente para maciez da carne, codifica uma proteína Hsp40, co-chaperona de Hsp70. O complexo Hsp40/Hsp70 inibe a apoptose, retardando a morte celular durante a conversão do músculo em carne com consequente diminuição da maciez (Bernard et al., 2007; Picard et al., 2010).

Esta função específica de Hsp40 é, provavelmente, responsável pela associação negativa da expressão gênica de *DNAJA1* com maciez da carne em bovinos Nelore observados no presente estudo. Esses resultados corroboram com o encontrado por Malheiros et al. (2018) e Bernard et al. (2007) que, trabalhando com bovinos Nelore e Charolês, respectivamente, observaram associação negativa do gene em relação à maciez da carne.

Os genes *FABP4* e *SCD*, relacionados com o metabolismo lipídico, não foram diferencialmente expressos no presente trabalho (Tabela 8).

Contraditoriamente, Zhao et al. (2012), em análise utilizando Microarray em tecido muscular de animais da raça Angus divergentes para maciez, encontraram ambos os genes, como regulares positivos para a maciez. Estes autores trabalharam com animais da raça Angus (*Bos taurus*) que naturalmente, possuem carne mais macia e marmorizada, quando comparado a animais *Bos indicus*, como é o caso do Nelore (Whipple et al., 1990; Cunduff et al., 1992; Wheeler et al., 1994). Neste sentido, Crouse et al. (1989), estudando animais cruzados com diferentes proporções de genes zebuíno/taurino, concluíram que à medida que aumentava a proporção de genes zebuíno, havia um aumento na força de cisalhamento e, concomitantemente, ocorria a diminuição de marmoreio da carne. Além disso, Koohmaraie et al. (2002), sugeriram que apenas 15% da variação na maciez da carne bovina, era devido às diferenças de níveis de marmoreio e colágeno, e que outros 85% seriam atribuídas as ações enzimáticas no *post mortem*.

Em relação ao gene *PRKAG3*, não foi observada diferença significativa na expressão entre os grupos contrastantes (Tabela 7). A função do gene está relacionada ao controle da homeostase energética e a expressão diferencial pode indicar o armazenamento deficiente de glicogênio no músculo esquelético

com conseqüente influência no processo de amaciamento (Milan et al., 2000; Ciobanu et al., 2001; Bongiorno et al., 2016). Em contraste com nossos resultados, Bongiorno et al. (2016), comparando o perfil de expressão do gene em tecido muscular de duas raças italianas de grupos extremos para maciez, encontrou maior expressão do *PRKAG3* em grupo de carne macia quando comparado à carne mais dura. No músculo, o conteúdo de glicogênio afeta o pH final e conseqüentemente o processo de maturação *post mortem*, estando estritamente correlacionado com as características de qualidade da carne (Ouali et al., 2006). Nossos resultados sugerem que, independente do grupo de animais, parece não haver deficiência no armazenamento de glicogênio e que, provavelmente, a maior ou menor maciez da carne seriam devido a atuação de enzimas proteolíticas no *post mortem*.

Com relação ao gene *ASAH1*, não foi encontrada diferença de expressão entre os grupos extremos para maciez (Tabela 7). A ceramidase ácida codificada pelo gene *ASAH1* desempenha papel fundamental na regulação da concentração intracelular de Ceramida e Esfingosina, através da hidrólise de ceramida em esfingosina. Fonseca et al. (2017) e Nagai et al. (2015), em trabalhos com RNA-seq, ambos em bovino Nelore, encontraram o gene como regulador positivo em grupo de carne macia. Não foram encontradas maiores evidências de como o gene estaria influenciando diretamente na maciez da carne bovina, sendo necessários mais estudos para elucidar o mecanismo que contribui para o amaciamento da carne.

9.2 Genes relacionados a AOL

No presente estudo, o gene que codifica a miostatina (*MSTN*) apresentou regulação negativa para maiores áreas de olho de lombo (Tabela 8), evidenciando sua ação reguladora do crescimento muscular. Esses resultados concordam com Zhang et al., (2011) que, em análise utilizando Microarray do músculo bovino da raça Qinchuan, encontraram diferenças significativas da expressão do gene entre machos e fêmeas. Os machos, que apresentaram menor expressão do gene, exibiram maior deposição de proteína e crescimento muscular quando comparados às fêmeas. Trabalho semelhante, desenvolvido por Silva et al. (2019), utilizando bovinos Nelore, também encontraram regulação

negativa do gene para animais com maiores áreas de olho de lombo, indicando que a menor expressão do gene pode contribuir para o aumento do crescimento muscular nos animais estudados.

Em relação aos fatores de crescimento semelhante a insulina (*IGF-1* e *IGF-2*) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos extremos para AOL (Tabela 8). Os fatores de crescimento semelhante a insulina possuem funções que incluem proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (Schmid,1995). Nossos resultados corroboraram com os achados de Sanches et al. (2006), que analisando o músculo esquelético de novilhos mestiços Angus x Hereford, para alto e baixo potencial de crescimento, também não encontraram associação entre os fatores de crescimento e o aumento da quantidade de proteína muscular.

Adicionalmente, Lund- Larsen et al. (1977), observando a taxa de ganho de peso em touros dinamarqueses, também não encontraram correlação significativa entre o *IGF-1* e a área do músculo *Longissimus thoracis*, assim como Davis et al. (2003), que também não obtiveram associações positivas entre a concentração de *IGF-1* e a maior musculatura de touros e novilhas da raça Angus durante o confinamento pós desmame. O fato de não ter havido diferença significativa nos níveis de IGFs entre os grupos extremos para AOL, pode ser explicado pelo fato que bovinos em torno dos dois anos, como os utilizados no presente estudo, apresentam níveis mais baixos de síntese e acréscimo de proteína muscular no músculo esquelético, quando comparados a animais mais jovens. Apesar disso, foi observada uma maior expressão dos fatores de crescimento em animais com maiores áreas de olho de lombo

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão dos genes *NEDD4* e *UBE4A* entre os grupos (Tabela 8). Ambos os genes atuam no processo de ubiquitinação de proteínas, sendo fundamentais para a regulação de proteínas. Diferentemente dos resultados de nosso trabalho, Vignato et al. (2017), em análise de RNAseq do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore, encontraram regulação negativa de ambos os genes em grupos com menores AOL. Além da atuação em processos de ubiquitinação, a proteína *NEDD4* age como importante regulador positivo para a expressão do gene *IGF-1*. Como já discutido, os IGFs são responsáveis pelo crescimento pós-natal e estão relacionados à diferenciação muscular. Estudos em camundongos,

relataram que a perda da função do *NEDD4* resultou na redução do fator de crescimento semelhante a insulina (*IGF-1*) e consequente diminuição do crescimento e 65% do peso corporal (Cao et al., 2008). Esse fato poderia explicar o porquê o *IGF-1* também não foi regulado positivamente em animais com maiores AOL. Segundo Gomes et al. (2013), genes que codificam proteínas do complexo ubiquina-proteossoma, que estão relacionados aos processos de *turnover* proteico, podem influenciar na melhoria de características economicamente importantes em bovino Nelore como a AOL. Os resultados do presente trabalho, podem ser explicados pelo fato dos animais utilizados terem sido abatidos em torno dos 24 meses de idade e, provavelmente, apresentavam menores taxas de *turnover* proteico, quando comparados com animais jovens, como indicado por Buttery et al. (1981).

9.3 Expressão Proteica

Tanto as calpaínas como a calpastatina foram encontradas nas amostras, porém não foram diferencialmente expressas entre os grupos. Como discutido anteriormente, as calpaínas compõe uma família de proteínas proteolíticas dependente de cálcio, envolvidas na degradação da proteína do músculo no *post-mortem*, enquanto a calpastatina atua de maneira inibitória às calpaínas. Guillemín et al (2011), em estudos proteômicos utilizando novilhos Charolês, encontraram ambas as proteínas *CAPN1* e *CAPN2* mais expressas no músculo *Longissimus thoracis* de alta maciez. Esses resultados são coerentes, quando se considera que o sistema proteolítico desempenhado pelas calpaínas é de importância significativa para a maciez.

Assim, os resultados obtidos para expressão proteica das calpains e calpastatina não era esperado. Isso pode ter acontecido porque as amostras enviadas para análise de proteômica foram as mesmas utilizadas para extração do RNA, ou seja, coletadas logo após o *toilet* das carcaças, e dessa forma, pode não ter ocorrido uma ação imediata dessas proteases no amaciamento da carne logo após o abate. Além disso, mesmo que os genes que codificam essas proteínas foram diferencialmente expressos, os mecanismos de

regulação gênica pós transcricionais e traducionais, que serão discutidos mais abaixo, influenciam diretamente na produção final da proteína.

Em relação a proteína codificada pelo gene *HSPB1*, apesar de encontrada, não foi diferencialmente expressa entre os grupos. Já a proteína codificada pelo gene *DNAJA1* não foi identificada nas amostras estudadas. Em relação a estas proteínas de choque térmico, resultados contrastantes de estudos proteômicos são encontrados na literatura. Guillemin et al. (2011), utilizando amostras de músculo *Longissimus thoracis* de animais da raça Charolês, encontraram que ambas proteínas de choque térmico, *HSPB1* e *DNAJA1*, foram correlacionadas positivamente com a maior maciez da carne. Provavelmente isto aconteça devido ao impedimento da agregação de proteínas e consequente inibição da apoptose. A agregação estaria supostamente alterando os sítios de reconhecimento das proteínas miofibrilares, diminuindo a suscetibilidade à degradação proteolítica e consequente maciez. Por outro lado, Kim et al. (2008), também em estudos proteômicos em músculo *Longissimus thoracis* de animais nativos coreanos, encontraram correlação positiva significativa entre a concentração de *HSPB1* e a dureza da carne, sugerindo que sua função na manutenção da integridade proteica pode dificultar a degradação proteolítica de proteínas miofibrilares, levando à carne mais dura. Embora, os genes que codificam as proteínas de choque térmico tenham sido diferencialmente expressos entre os grupos, o mesmo não foi observado em relação à expressão das proteínas por eles codificadas. Estes resultados sugerem que mecanismos de regulação gênica, podem ter atuado, influenciando a produção de proteína.

Em relação à Miostatina, considerado um dos principais reguladores negativos da massa muscular esquelética, não foi possível sua identificação no presente estudo. Isso pode ter acontecido porque a miostatina, produzida em células do músculo esquelético, é secretada por meio de células musculares (Mcpheeron e Lee, 1997) sendo dificilmente detectada em extrato total de tecido.

O dogma central da biologia molecular explica a transferência de informação do DNA via RNA mensageiro para formação de proteínas. É mecanicamente muito bem conhecido como os genes são transcritos, o RNA processado e sequencialmente traduzido em proteínas. No entanto, a maioria dos relatos sobre abundância de mRNA e proteína encontra apenas uma fraca

correlação entre as respectivas abundâncias dessas duas classes de moléculas biológicas (Greenbaum et al., 2003; Maier & Güell & Serrano., 2009)

Como discorrido por Lehninger et al. (2010), de maneira geral, a partir do momento que o RNA mensageiro deixa o núcleo, ele pode ou não ser traduzido em proteínas, estando susceptível a fatores de regulação pós-transcricionais e pós-traducionais. Os RNAs não codificadores, conhecidos como RNA de interferência (RNAi), atuam como importante mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, por meio do pareamento com mRNAs específicos que induzem a destruição do mRNA ou repressão da tradução. Ainda que a proteína seja traduzida, após a tradução, muitas delas ainda são submetidas a uma ampla variedade de modificações químicas que são críticas para seu funcionamento.

Dentre as modificações pós-traducionais mais comuns estão a glicosilação que auxilia no endereçamento correto da proteína, e a fosforilação que atua ativando ou desativando proteínas, além de permitir a interação com outras proteínas que reconhecem o domínio fosforilado. Além disto, as proteínas podem ser marcadas para degradação no proteossoma, por meio da adição de um marcador químico denominado ubiquitina, funcionando como importante via de controle de permanência da proteína na célula e progressão do ciclo celular.

Vários outros trabalhos encontraram uma relação bastante baixa entre os perfis de mRNA e proteínas (Chen et al., 2002 ; Tian et al. , 2004 ; Dhingra et a., 2005; Rogers et al., 2008), e isso sugere que os diferentes mecanismos de controle estão agindo nos níveis transcriptômico e proteômico, impedindo que os genes diferencialmente expressos sejam traduzidos em proteínas diferencialmente expressas.

Além disso, um dos principais fatores pós-traducional que influenciam a correlação mRNA-proteína, é a meia-vida individual das proteínas. A vida útil celular de uma proteína depende de vários fatores: estabilidade intrínseca da proteína, processamento pós-traducional como a fosforilação e a ubiquitinação, e a localização da respectiva proteína. As proteínas estão em constante processo de renovação (*turnover*) o que torna as meias-vidas proteicas altamente variáveis entre alguns segundos a vários dias. (Glickman & Ciechanover, 2002; Maier & Güell & Serrano, 2009).

O ruído e o erro experimental da técnica também são considerados interferentes que explicam o resultado divergente entre a concentração de

mRNA e proteína, podendo influenciar na identificação correta dessas moléculas biológicas (Greenbaum et al., 2003). No geral, a literatura disponível mostra que a correlação dos níveis de mRNA e proteína está longe de ser perfeita e mais uma vez reforça o papel dos mecanismos reguladores que resulta nas divergências observadas entre a concentração de RNA mensageiro e proteína.

10. CONCLUSÃO

Foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes *CAST*, *DNAJA1* e *HSPB1* relacionados à característica de maciez da carne, e do gene *MSTN* relacionado à característica de área de olho do lombo. Estes genes foram validados em uma população comercial de bovinos Nelore e parecem exercer função chave na determinação da maciez da carne ou no desenvolvimento muscular. No entanto, nenhum gene avaliado, apresentou expressão proteica diferencial, sugerindo que os transcritos estão sofrendo processos de modificações pós-transcricionais.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.

ALVES, D. D. *et al.* Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.

ALVES, Mariana Q. *et al.* Molecular basis of acid ceramidase deficiency in a neonatal form of Farber disease: identification of the first large deletion in *ASAH1* gene. **Molecular genetics and metabolism**, v. 109, n. 3, p. 276-281, 2013.

ARTHUR, P. F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M. A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 29, n. 2, p. 163, 1988.

BALDASSINI, W. A. *et al.* Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 169, p. 65-72, 2015.

BERNARD, C. *et al.* New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 13, p. 5229-5237, 2007.

BERTON, M. P. *et al.* Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid. **BMC Genomics**, London, v. 17, n. 1, p. 972, 2016.

BIANCHINI, W. *et al.* Crescimento e características de carcaça de bovinos superprecoces Nelore, Simental e mestiços. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 554-564, 2008.

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

BONGIORNI, S. *et al.* Transcriptomic investigation of meat tenderness in two Italian cattle breeds. **Animal genetics**, v. 47, n. 3, p. 273-287, 2016.

BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C. Qualidade e Avaliação de Carcaças e Carnes Bovinas. *In*: CONGRESSO PARANAENSE DOS ESTUDANTES DE ZOOTECNIA, 30., 2009, Maringá. **Anais [...]**. Maringá: APEZ, 2009.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Birmingham, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUTTERY, P. J. Protein turnover in animals. **Tropical Animal Production**, Itzimna, v. 6, n. 3, p. 3-11, 1981.

CALVO, J. H. *et al.* A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (*CAS1*) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 775-782, 2014.

CAO, X. R. *et al.* *NEDD4* controls animal growth by regulating *IGF-1* signaling. **Science Signaling**, Washington, DC, v. 1, n. 38, p. 1-5, 2008.

CARVALHO, M.E. **Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba. 2012.

CARVALHO, M. E. *et al.* Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nelore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, 2014.

CASAS, E. *et al.* Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 3, p. 560-569, 2000.

CASAS, E. *et al.* Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 520-525, 2006.

CASTRO, L. M. *et al.* Genomewide association mapping and pathway analysis of meat tenderness in Polled Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 95, n. 5, p. 1945-1956, 2017.

CHAVEY, C. *et al.* Regulation of secreted protein acidic and rich in cysteine during adipose conversion and adipose tissue hyperplasia. **Obesity, Silver Spring**, Hoboken, v. 14, n. 11, p. 1890-1897, 2006.

CHEN, G. *et al.* Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Molecular & cellular proteomics**, v. 1, n. 4, p. 304-313, 2002.

CHEUNG, P.C.F. *et al.* Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 3, p. 659-669, 2000.

CIOBANU, D. *et al.* Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated γ 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. **Genetics**, v. 159, n. 3, p. 1151-1162, 2001.

CONTINO, G. *et al.* Expression analysis of the gene encoding for the U-box-type ubiquitin ligase *UBE4A* in human tissues. **Gene**, Amsterdam, v. 328, p. 69-74, 2004.

COSTELLO, S. *et al.* Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. **Meat Science**, Amsterdam, v. 75, n. 4, p. 551-557, 2007.

CROUSE, J. D.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 10, p. 2661-2668, 1989.

CUNDUFF, L. V. Genetic selection to improve the quality and composition of beef carcasses. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, Savoy, v. 45, p. 123-131, 1992.

CURI, R. A. *et al.* 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**, Chichester, v. 40, n. 4, p. 456-462, 2009.

DAVIS, M. E. *et al.* Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor-I concentration and ultrasound measurements of backfat thickness and longissimus muscle area in Angus beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 2164-2170, 2003.

DELGADO, E. F. *et al.* The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 398-412, 2001.

DHINGRA, V. *et al.* New frontiers in proteomics research: a perspective. **International journal of pharmaceutics**, v. 299, n. 1-2, p. 1-18, 2005.

DIAS, V. A. D. **Expressão das proteínas calpaína e calpastatina e suas relações com a qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*)**. 2016. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 2016.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 217-234, 1993.

EXPRESSION SUITE. Expression Suite Software. Version 1.0. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation, 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/forms/expres>. Acesso em: 15 out. 2018.

FANG, X. *et al.* Comparative transcriptome profile of genes differentially expressed in longissimus dorsi muscles between Japanese black (Wagyu) and

Chinese Red Steppes cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 134-135, 2018.

FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat science**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 12-19, 2008.

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

FLISIKOWSKI, K. *et al.* Nucleotide sequence and variation of IGF2 gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Animal Biotechnology**, New York, v. 16, n. 2, p. 203-208, 2005.

FONSECA, L. F. S. *et al.* Expression of genes related to mitochondrial function in Nellore cattle divergently ranked on residual feed intake. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 559-565, 2015.

FONSECA, L. F. S. *et al.* Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 945, 2017.

FOSCHINI, R. M. S. A.; RAMALHO, F. S.; BICAS, H. Células satélites musculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, Itapetinga, v. 67, n. 4, p. 681-687, 2004.

GERBENS, F. Genetic control of intramuscular fat accretion. *In*: PAS, M. F. W. te; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. (Ed.). **Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Wallingford: CABI, 2004. p. 343-361.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GREENBAUM, D. *et al.* Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome biology**, v. 4, n. 9, p. 117, 2003.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 6, p. 381-391, 2009.

GOLL, D. E. *et al.* Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, Savoy, v. 44, p. 25-33, 1991.

GOLL, D. E. *et al.* The calpain system. **Physiological Reviews**, Rockville, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003.

GOMES, R. C. *et al.* Protein synthesis and degradation gene SNPs related to feed intake, feed efficiency, growth, and ultrasound carcass traits in Nellore Cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 2329-2936, 2013.

GONÇALVES, T. M. *et al.* Gene Co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in Nellore cattle. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 441, 2018.

GOODALL, J. J.; SCHMUTZ, S. M. IGF2 gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. **Animal Genetics**, Chichester, v. 38, n. 2, p. 154-161, 2007.

GROBET, L. *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 1, p. 71, 1997.

GUILLEMIN, N. *et al.* Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 352-365, 2011.

GUO, B. *et al.* Transcriptome analysis of cattle muscle identifies potential markers for skeletal muscle growth rate and major cell types. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 177, 2015.

HAGIWARA, M. K. *et al.* **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Amsterdam: Elsevier, 2014.

HEGDE, P. *et al.* A concise guide to cDNA microarray analysis. **Biotechniques**, Boca Raton, v. 29, n. 3, p. 548-563, 2000.

HEINEMEYER, W.; RAMOS, P. C.; DOHMEN, R. J. Ubiquitin-proteasome system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 13, p. 1562-1578, 2004.

HENCHION, M. M.; MCCARTHY, M.; RESCONI, V. C. Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. **Meat science**, Amsterdam, v. 128, p. 1-7, 2017.

HORODYSKA, J. *et al.* Analysis of meat quality traits and gene expression profiling of pigs divergent in residual feed intake. **Meat science**, v. 137, p. 265-274, 2018.

HORVAT, S.; MEDRANO, J. F. Interval mapping of high growth (hg), a major locus that increases weight gain in mice. **Genetics**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1737-1748, 1995.

ISSAQ, H. J.; VEENSTRA, T. D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 697-700, 2008.

KAIKAUS, R. M.; BASS, N. M.; OCKNER, R. K. Functions of fatty acid binding proteins. **Experientia**, Basel, v. 46, n. 6, p. 617-630, 1990.

KANFER, J. N.; HAKOMORI, S. **Sphingolipid biochemistry**. Springer Science & Business Media, 2012.

KAMBADUR, R. *et al.* Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 7, n. 9, p. 910-915, 1997.

KEMP, C. M. *et al.* Tenderness—An enzymatic view. **Meat Science**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 248-256, 2010.

KIM, N. K. *et al.* Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 1068-1073, 2008.

KOOHMARAIE, M. *et al.* The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 74, n. 3, p. 239-245, 1992.

KOOHMARAIE, M. *et al.* Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 345-352, 2002.

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**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 34-43, 2006.

LANA, A.; ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: a proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 147, p. 85-97, 2016.

LEE, S. H. *et al.* Genetic polymorphisms of the bovine fatty acid binding protein 4 gene are significantly associated with marbling and carcass weight in Hanwoo (Korean Cattle). **Animal Genetics**, Chichester, v. 41, n. 4, p. 442-444, 2010.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.

LEHNERT, S. A. *et al.* Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. **BMC Developmental Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 95, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

LIFE TECHNOLOGIES. **Real Time Handbook**. Foster, 2016. Disponível em: http://find.thermofisher.com/Global/FileLib/qPCR/2016-Real-Time-qPCR-Handbook_branding.pdf. Acesso em: 15 out. 2018.

LI, C. M. *et al.* Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. **Genomics**, v. 79, n. 2, p. 218-224, 2002.

LI, X. J. *et al.* Identification of genes in longissimus dorsi muscle differentially expressed between Wannanhu and Yorkshire pigs using RNA-sequencing. **Animal genetics**, v. 47, n. 3, p. 324-333, 2016.

LIU, J. *et al.* Differentially-expressed genes in pig Longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, n. 9, p. 3808-3817, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. **Methods**, Maryland Heights, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOMIWES, D. *et al.* Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 26-40, 2014.

LOPES, L. S. *et al.* Características de carcaça e cortes comerciais de tourinhos Red Norte e Nelore terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 4, p. 970-977, 2011.

LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: Binlife, 2000. 134 p.

LUCKI, N. C.; SEWER, M. B. Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (*ASAH1*) gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M110. 195826, 2011.

LUND-LARSEN, T. R. *et al.* Relation between growth rate, serum somatomedin and plasma testosterone in young bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 189-194, 1977.

LUNDGREN, D. H. *et al.* Role of spectral counting in quantitative proteomics. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 1, p. 39-53, 2010.

MACHADO, M. Atualidades em fisiologia do músculo esquelético-célula satélite e hipertrofia. **Perspectivas OnLine**, [S.l.], v. 2, n. 5, 2008.

MAGALHÃES, A. F. B. *et al.* Genome-wide association study of meat quality traits in Nelore cattle. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. 15-45, 2016.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS letters**, v. 583, n. 24, p. 3966-3973, 2009.

MALHEIROS, J. M. *et al.* Association of *CAST2*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes with meat tenderness in Nellore cattle. **Meat Science**, Amsterdam, v. 138, p. 49-52, 2018.

MALTIN, C. *et al.* Determinants of meat quality: tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, Palmerston North, v. 62, n. 2, p. 337-347, 2003.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. Jin. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, London, v. 387, n. 6628, p. 83, 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. *In*: KING, J. W. D; MÉNISSIER, F. (Ed.). **Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production**. Netherlands: Springer, 1982. p. 23-53.

MICHAL, J. J. *et al.* The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, Chichester, v. 37, n. 4, p. 400-402, 2006.

MICKE, G. C. *et al.* Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Shannon, v. 332, n. 1-2, p. 234-241, 2011.

MILAN, Denis *et al.* A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. **Science**, v. 288, n. 5469, p. 1248-1251, 2000.

MISZTAL, I. *et al.* **Manual for BLUPF90 family of programs**. Athens: University of Georgia, 2014.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C.; VAN DOLAH, F. M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biological procedures online**, v. 8, n. 1, p. 175, 2006.

NAGAI, L. A. E. **Identificação de genes relacionados à maciez da carne de bovinos das raças Angus e Nelore por análise de expressão diferencial**. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

NATTRASS, G. S. *et al.* A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 443-455, 2014.

NTAMBI, J. M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **Journal of Lipid Research**, Rockville, v. 40, n. 9, p. 1549-1558, 1999.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OKSBJERG, N.; GONDRET, F.; VESTERGAARD, M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 219-240, 2004.

OSTROWSKA, E. *et al.* Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. **The Journal of Nutrition**, New York, v. 129, n. 11, p. 2037-2042, 1999.

OUALI, A. *et al.* Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 44-58, 2006.

PAGE, B. T. *et al.* Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.

PAN, P. W. *et al.* Identification of differentially expressed genes in the Longissimus Dorsi muscle tissue between Duroc and Erhualian pig by mRNA differential display. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 16, n. 7, p. 1066-1070, 2003.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837, 2000.

PANNIER, L. *et al.* Association analysis of single nucleotide polymorphisms in *DGAT1*, *TG* and *FABP4* genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. **Meat Science**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 515-518, 2010.

PAZ, C. C. P.; LUCHIARI FILHO, A. Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. **Pecuária de Corte**, n. 101, p. 58-63, 2000.

PICARD, B. *et al.* Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 259-278, 2010.

PINTO, L. F. B. *et al.* Association of SNPs on *CAPN1* and *CAST* genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1431-1442, 2010.

PIÓRKOWSKA, K. *et al.* Genome-wide RNA-Seq analysis of breast muscles of two broiler chicken groups differing in shear force. **Animal genetics**, v. 47, n. 1, p. 68-80, 2016.

PLATH-GABLER, A. *et al.* The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. **Journal of Endocrinology**, Woodlands, Bristol, v. 168, n. 1, p. 39-48, 2001.

RADONIĆ, A. *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

RAUCH, A. *et al.* Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 1, p. 112-121, 2006.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; QUADROS, A. R. B.; MULLER, L. Característica de carcaça e da carne de novilhos de diferentes genótipos de Hereford x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 6, p. 1245-1251, 1999.

ROBINSON, T. L.; SUTHERLAND, I. A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 160-165, 2007.

ROGERS, S. *et al.* Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2894-2900, 2008.

ROUX, M. *et al.* Characterization of the bovine *PRKAG3* gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts. **Mammalian genome**, v. 17, n. 1, p. 83-92, 2006.

SACCÀ, E. *et al.* Comparison of longissimus thoracis physical quality traits and the expression of tenderness-related genes between Goudali zebu breed and Italian Simmental× Goudali crossbreed. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, p. 1-8, 2018.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. D. C. G. Methods and strategies in proteomics and their applications in plants. **Ciência Rural**, v.40, n. 3, p. 727-734, 2010.

SANCHES, A. C. **Relação entre eficiência de crescimento, concentrações plasmáticas de leptina e IGF-1, características de carcaça e consumo alimentar residual em novilhos de corte.** 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2006.

SCHMID, C. Insulin: like growth factors. **Cell Biology International**, Garsington, Oxford, v. 19, n. 5, p. 445-457, 1995.

SCHROEDER, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 3, 2006.

SADKOWSKI, T. *et al.* Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. **Journal of Applied Genetics**, Heidelberg, v. 50, n. 2, p. 109-123, 2009.

SILVA, D.B.S. **Expressão diferencial de genes relacionados com características de carcaça e carne de bovinos da raça Nelore**. 2019. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. 2019.

SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 21-31, 2007. Suplemento.

SIQUEIRA, F. Musculatura dupla em bovinos. *In*: MENEZES, G. R. de O. *et al.* (Ed.). **Sumário Senepol 2015**: Sumário de touros Senepol Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2015. p. 28-29, 2015.

SMITH, T. P. *et al.* Myostatin mutations cause double muscling in cattle. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, Savoy, v. 51, p. 112-117, 1998.

SMITH, T. P. L. *et al.* Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.

STEEN, D. *et al.* Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscling beef. **Meat Science**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 307-319, 1997.

STEIBEL, J. P. *et al.* 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.

THOMAS, M. *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.

TIAN, Q. *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 960-969, 2004.

TIZIOTO, P. C. *et al.* Candidate genes for production traits in Nelore beef cattle. **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4138-4144, 2012.

TIZIOTO, P. C. *et al.* Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, Rockville, v. 45, n. 21, p. 1012-1020, 2013.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE); AGRICULTURAL MARKETING SERVICE; LIVESTOCK POULTRY AND SEED

PROGRAM. **United States standards for grades of carcass beef**. Washington, DC, 1989. 16 p.

VANDESOMPELE, J.; *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, 2002.

VIGNATO, B.S. *et al.* Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nellore cattle. **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 1, p. 506, 2017.

WALTERS, K. J. *et al.* Ubiquitin family proteins and their relationship to the proteasome: a structural perspective. **Biochimica et Biophysica**, Amsterdam, v. 1695, n. 1-3, p. 73-87, 2004.

WANG, Y. H. *et al.* Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 3, p. 201-210, 2005.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WESTERLING, D. B.; HEDRICK, H. B. Fatty acid composition of bovine lipids as influenced by diet, sex and anatomical location and relationship to sensory characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, n. 6, p. 1343-1348, 1979.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 12, p. 3145-3151, 1994.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Manhattan: G-R Manufacturing Company, 1995. Available: http://192.133.74.26/MRU_WWW/protocol/WBS.html. 1995. Access on: outubro de 2018.

WHIPPLE, G. *et al.* Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, 1990.

WHITE, S. N. *et al.* A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 2001-2008, 2005.

ZHANG, H. M.; DENISE, S. K.; AX, R. L. Rapid communication: a novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 1441-1441, 1996.

ZHANG, Y. Y.; ZAN, L.; WANG, H. Screening candidate genes related to tenderness trait in Qinchuan cattle by genome array. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 2007-2014, 2011.

ZHAO, C. *et al.* Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4185-4193, 2012.

12. MATERIAL SUPLEMENTAR

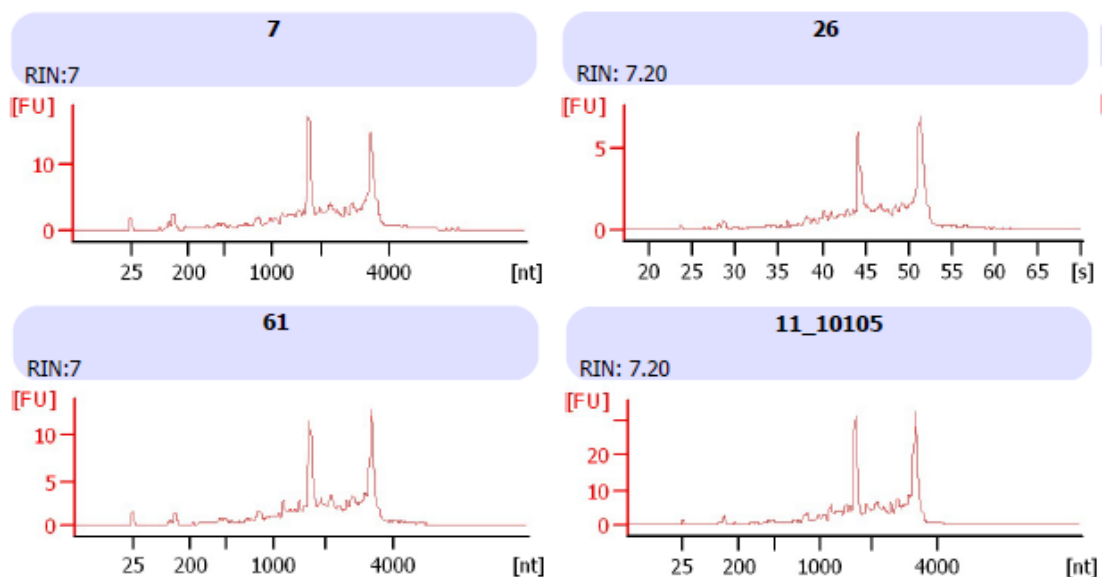


Figura 1: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas para a característica de maciez da carne

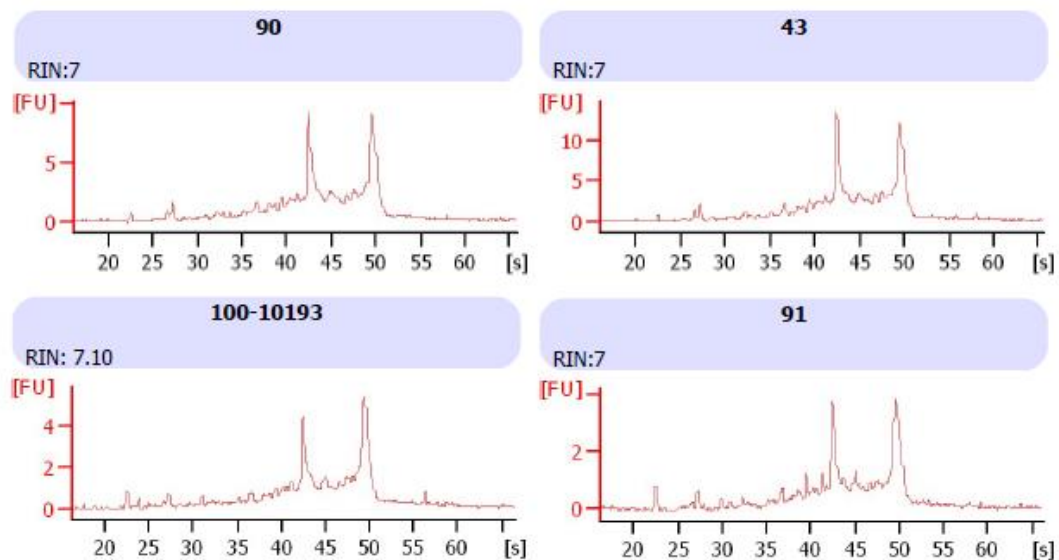


Figura 2: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas para a característica de Área de olho de Lombo.

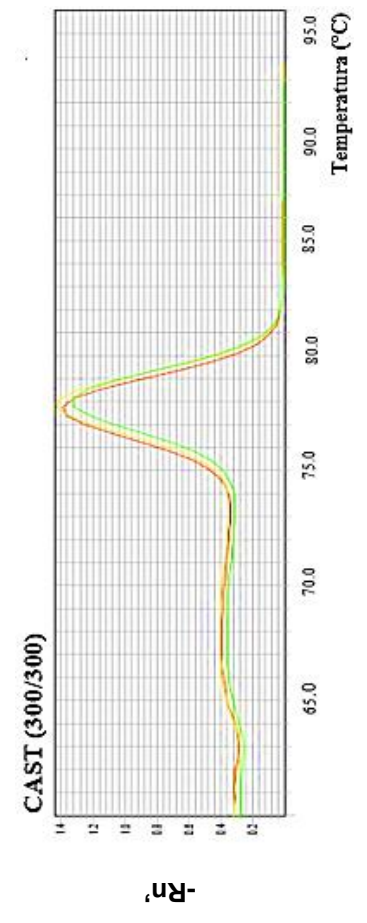
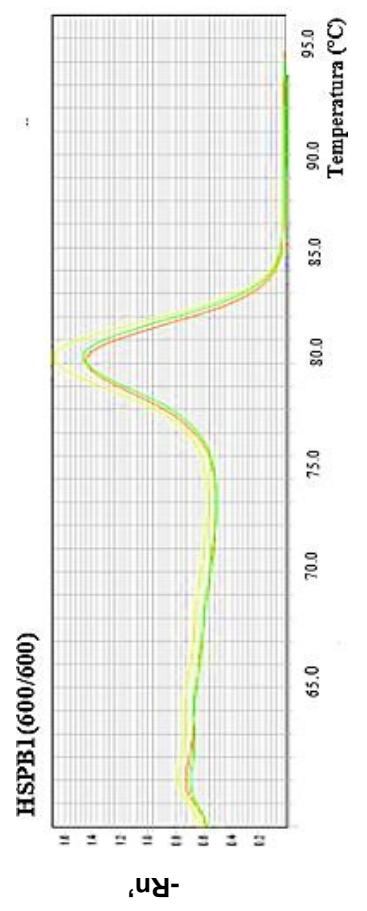
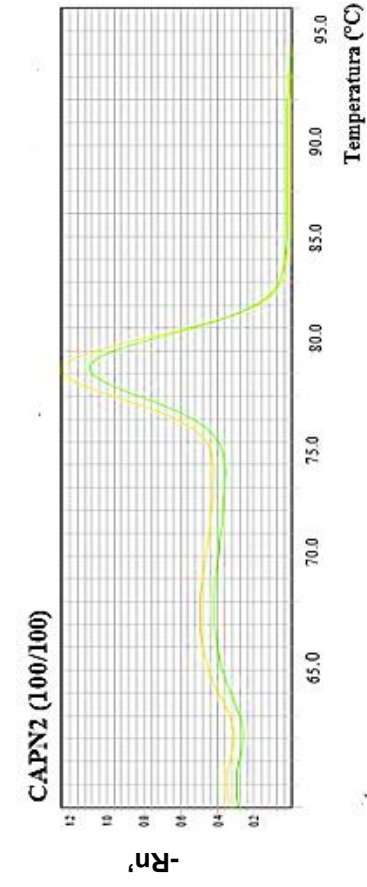
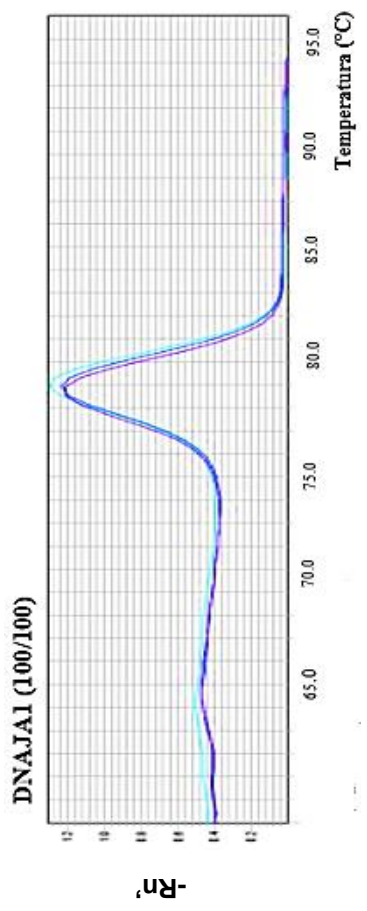
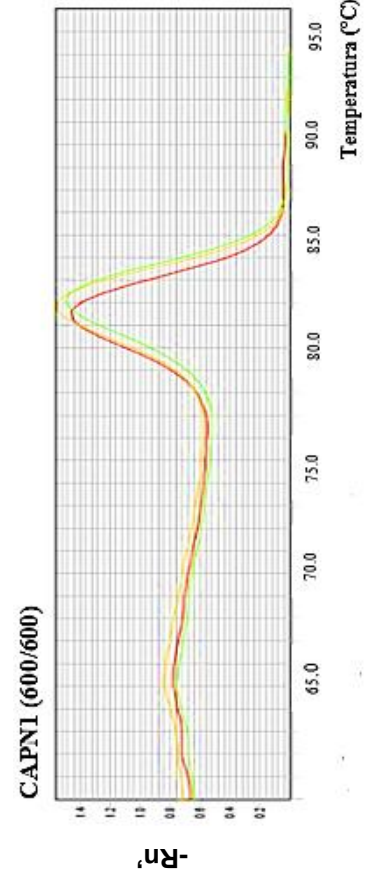
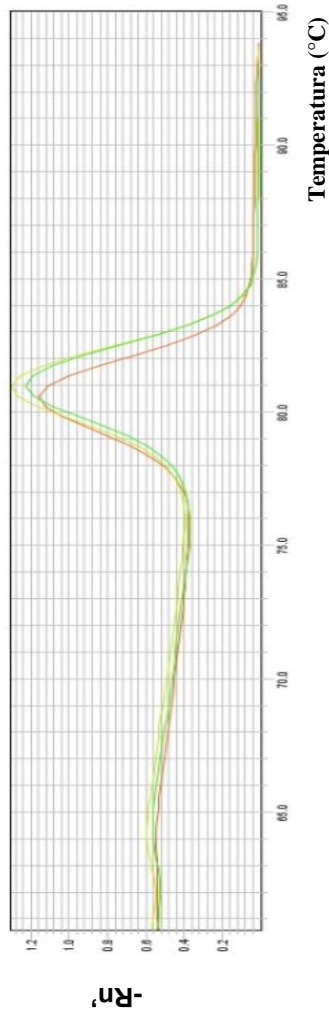
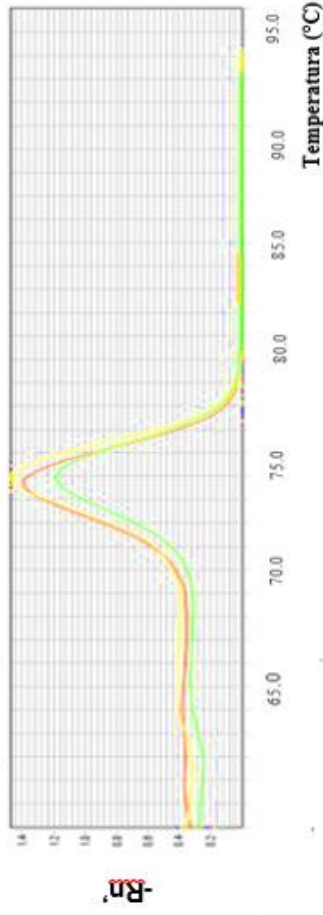


FIGURA 3: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes alvo relacionados a maciez: CAPN1, CAPN2, CAST, DNAJ1 e HSPB1. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores

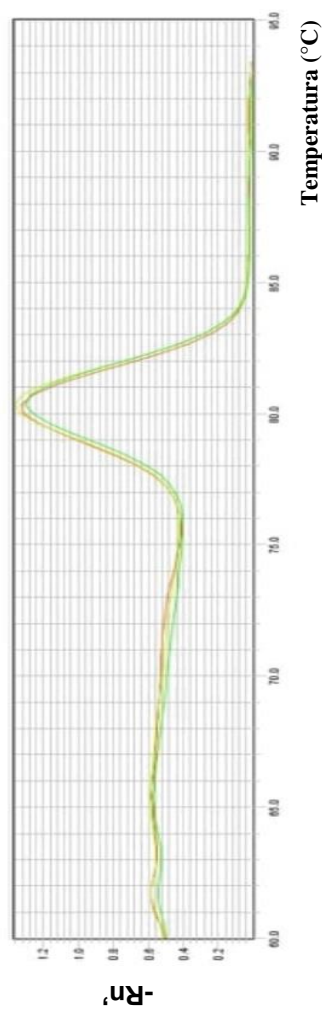
ASAH1 (100/100)



SCD (300/300)



PRKAG3 (600/600)



FABP4 (300/300)

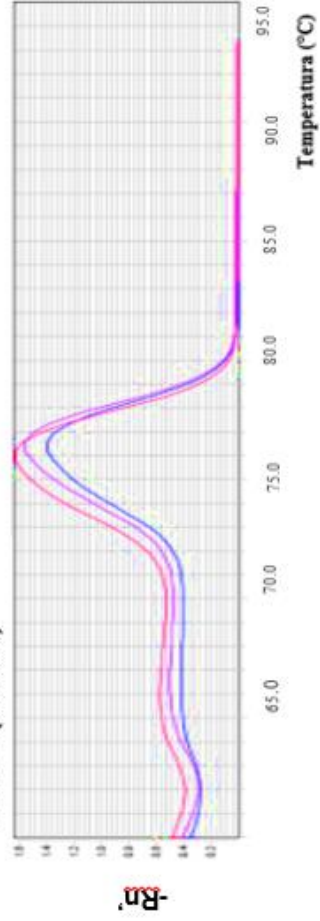


FIGURA 4: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes alvo relacionados a maciez: PRKAG3, ASAH1, FABP4 e SCD. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores

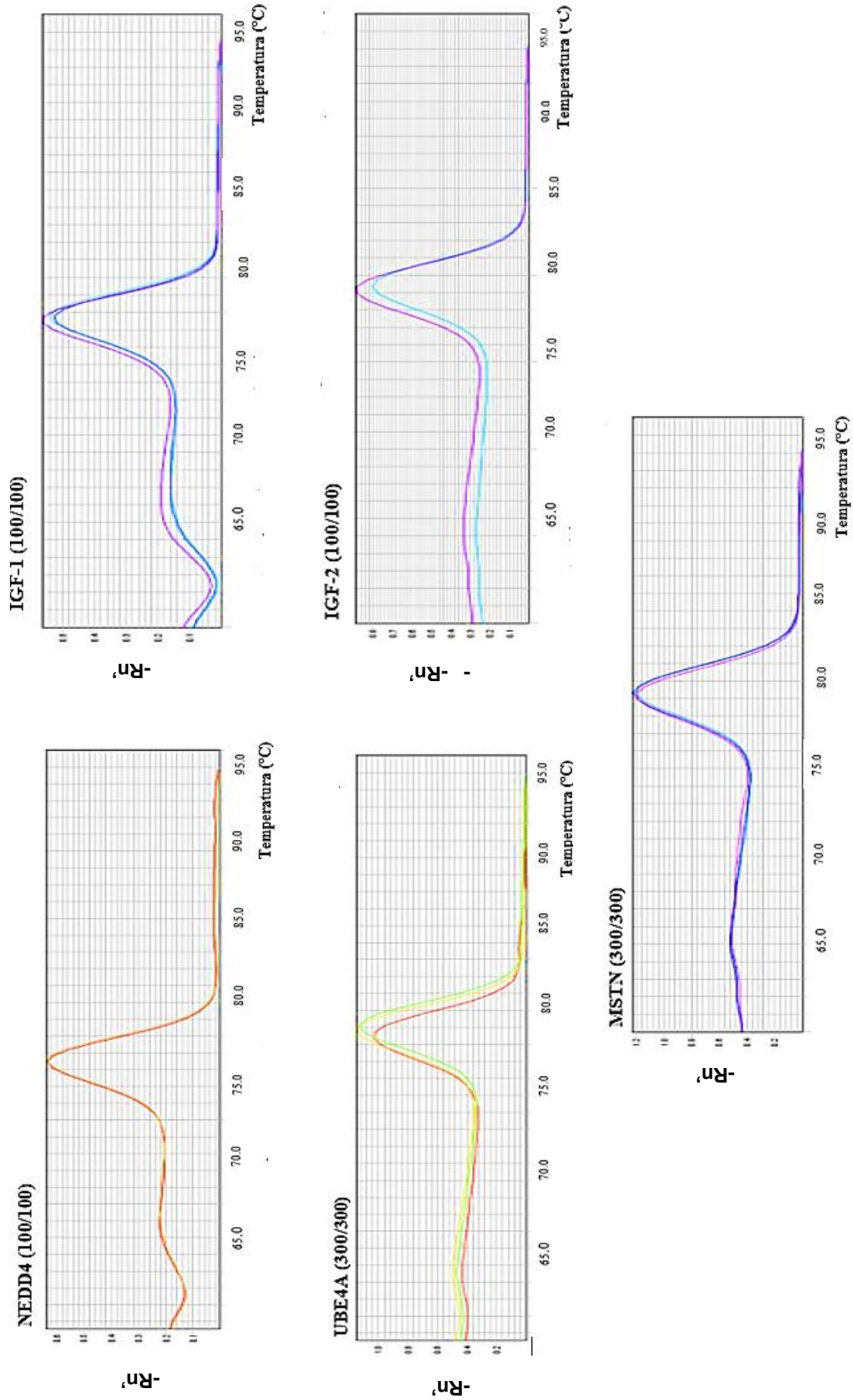


FIGURA 5: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes alvo relacionados a Área de Olho de Lombo: IGF-1, IGF-2, MSTN, NEDD4 e UBE4A. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores

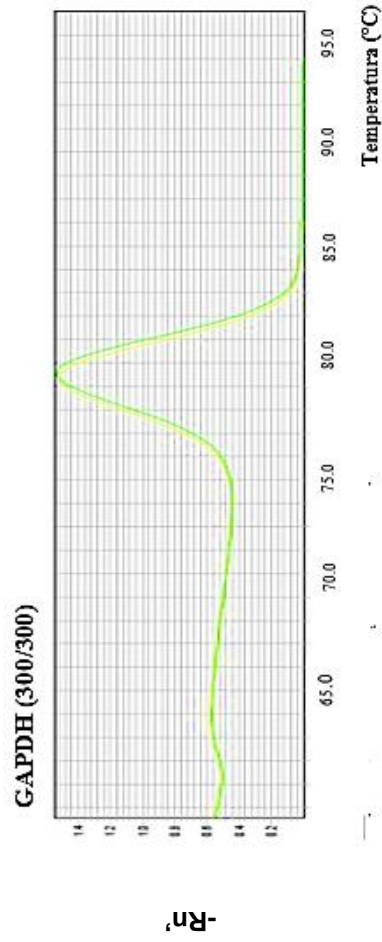
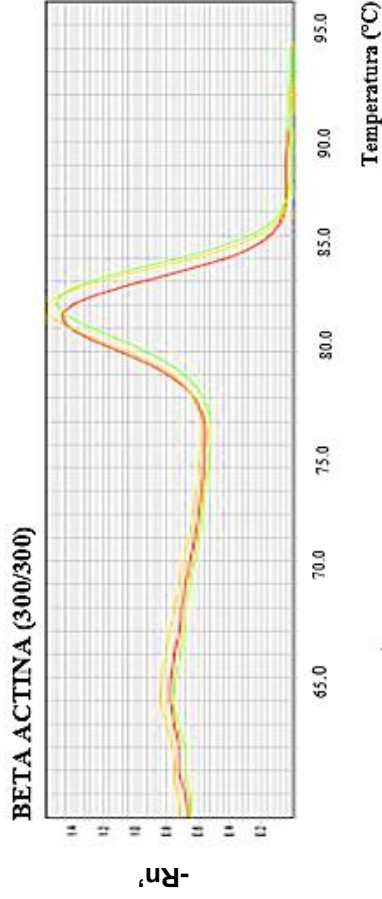
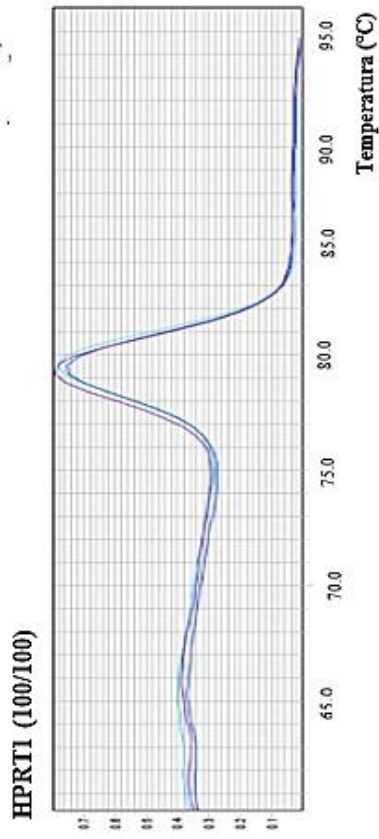


FIGURA 6: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de referência GAPDH, BETA ACTINA e HPR1. Entre parênteses estão as concentrações escolhidas para os iniciadores

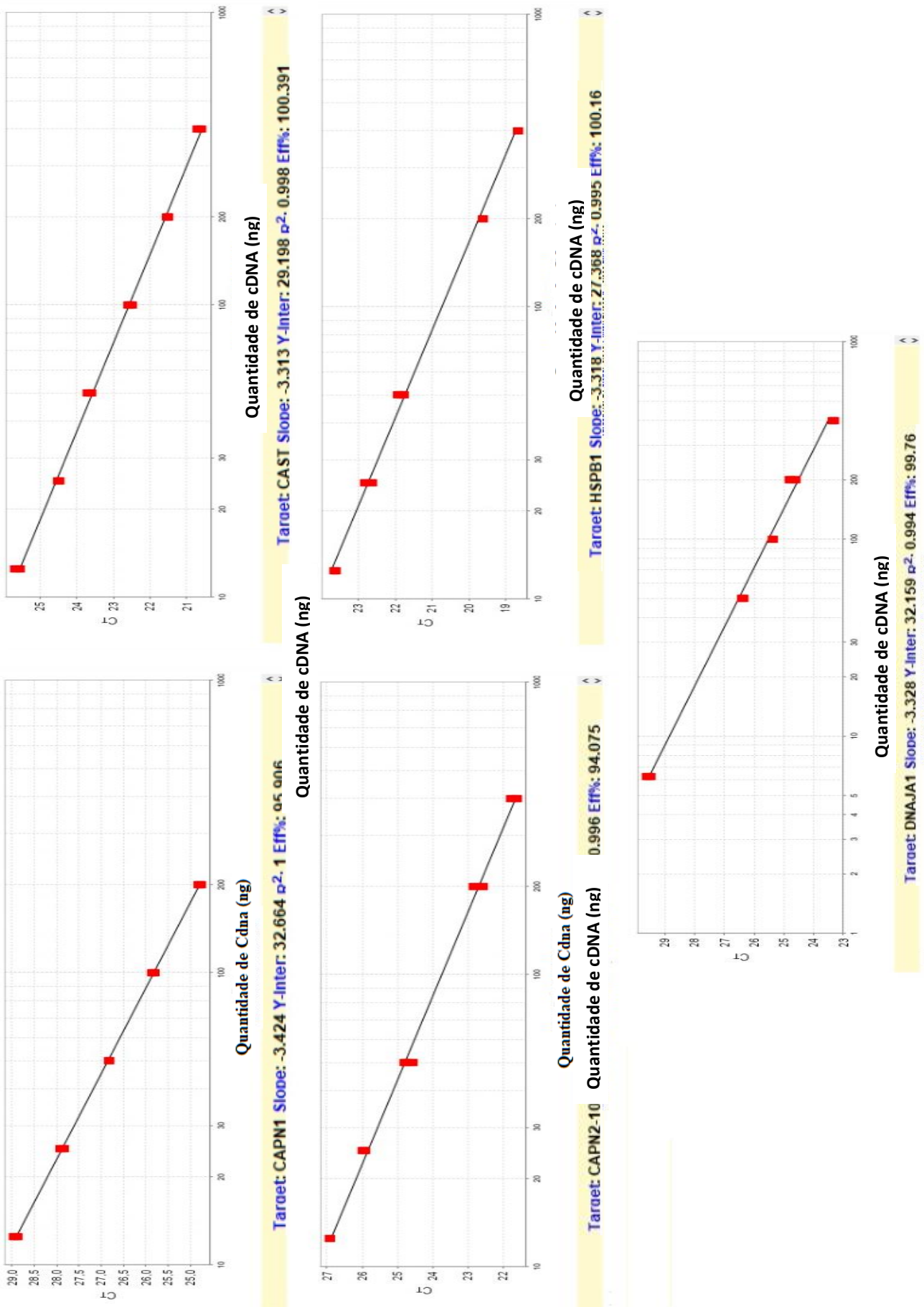


FIGURA 7: Curva padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r², e eficiência de amplificação, gerados para os genes CAPN1, CAPN2, CAST, HSPB1 E DNAJA1

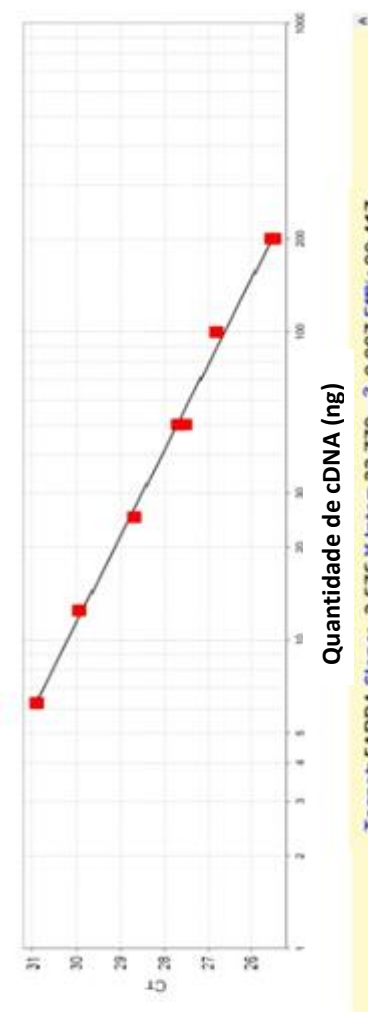
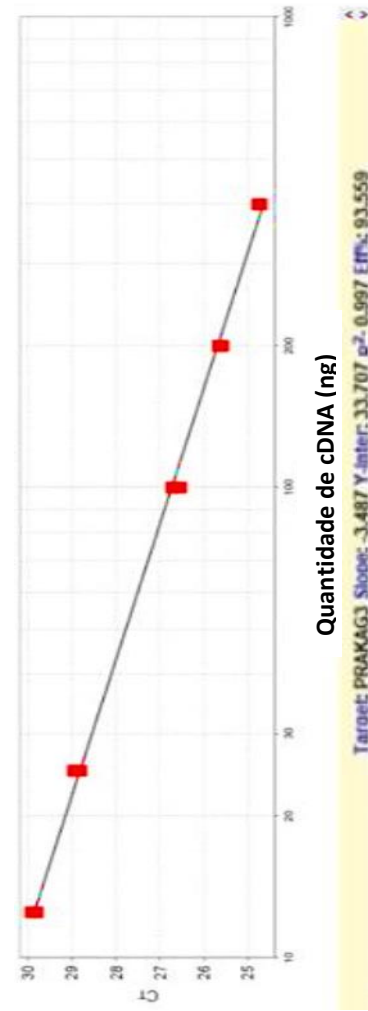
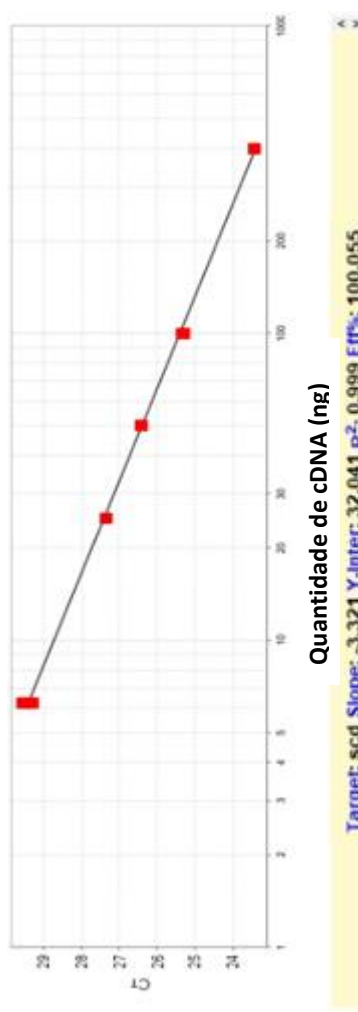
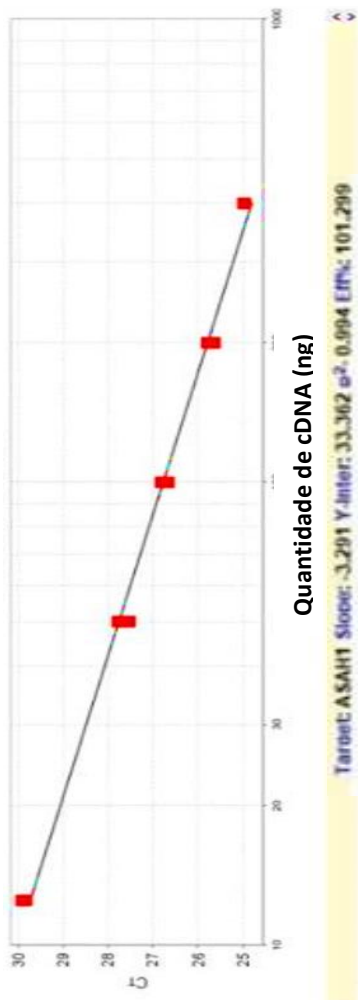


FIGURA 8: Curva padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação, gerados para os genes, SCD, FABP4.

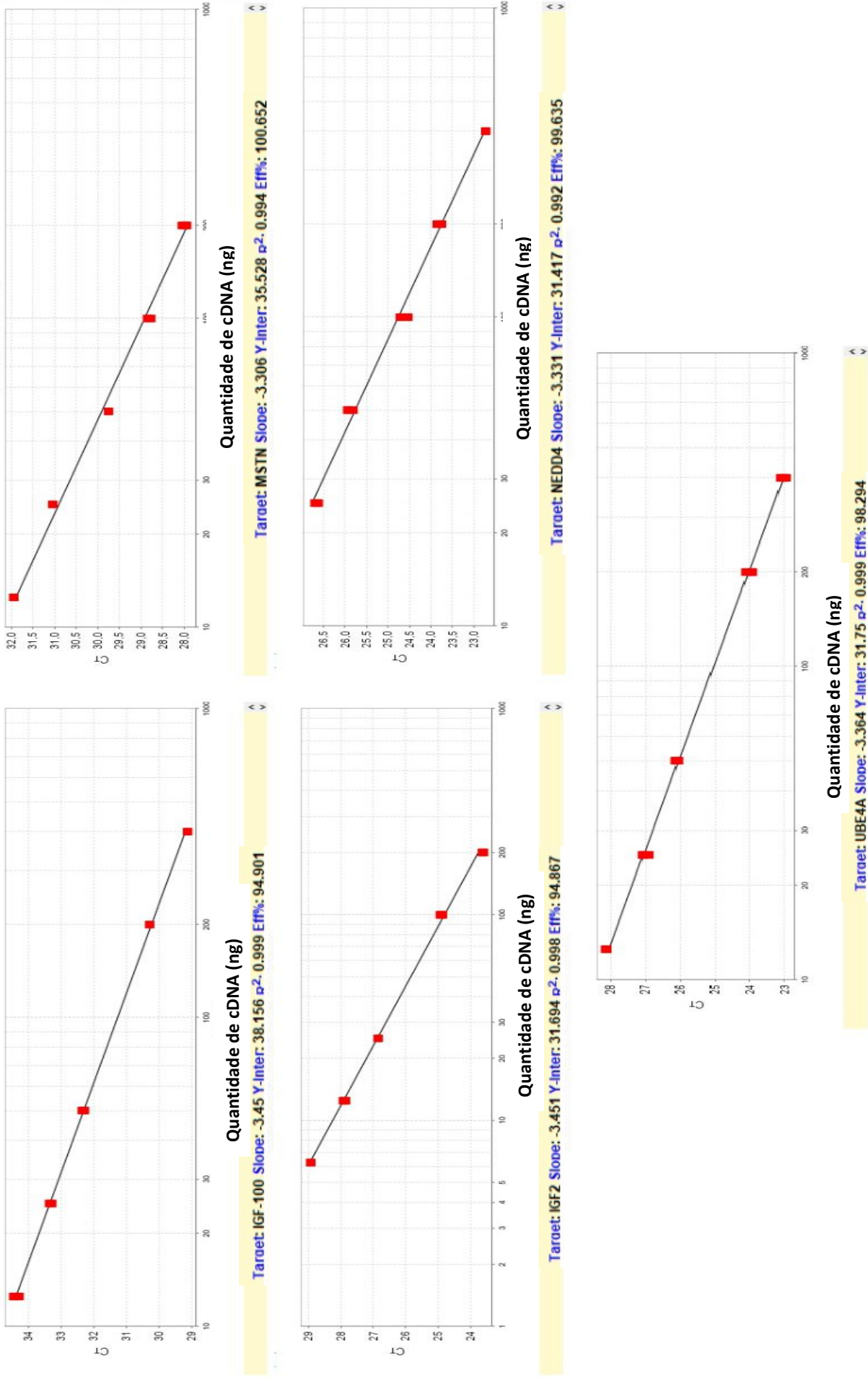


FIGURA 9: Curva padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação, gerados para os genes IGF-1, IGF2, MSTN, NEDD4, UBE4A

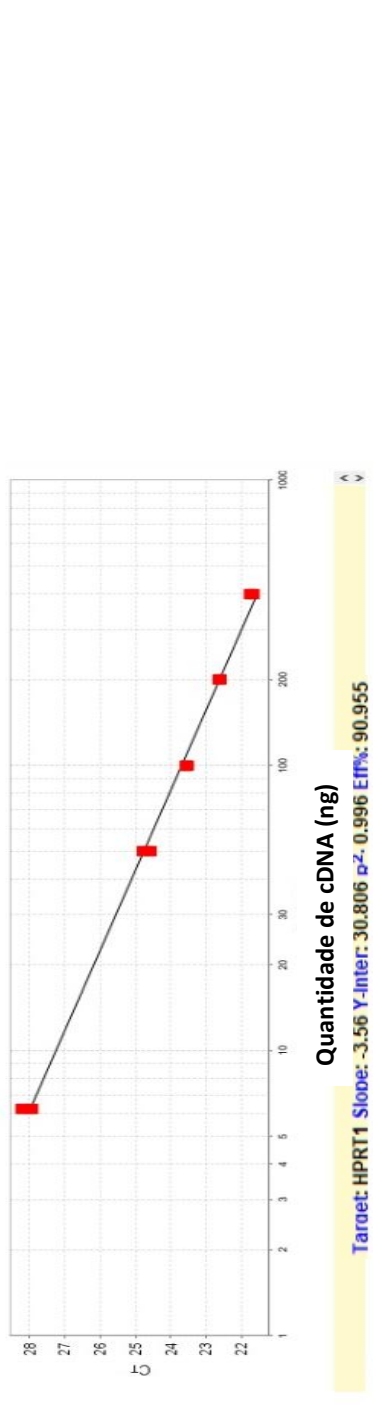
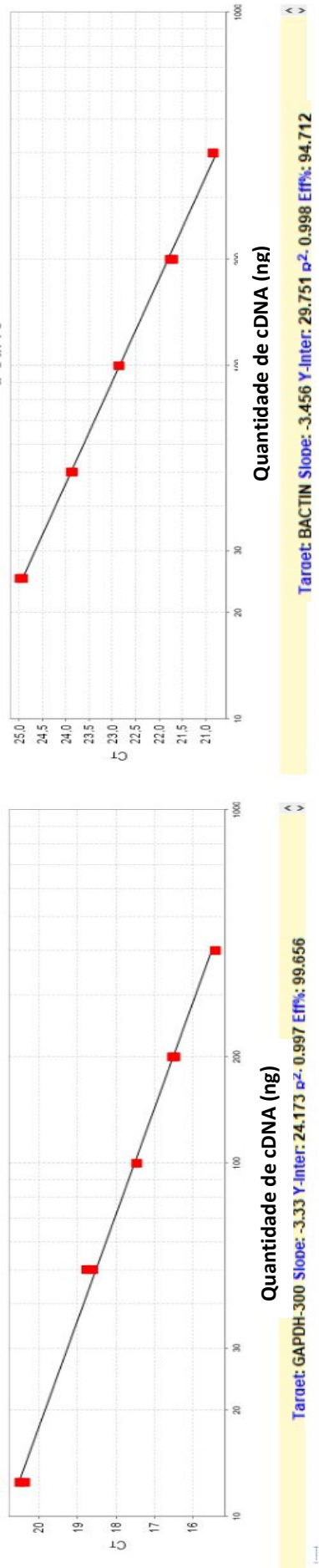


FIGURA 10 : Curva padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação, gerados para os genes GAPDH, BETA ACTINA, e HPRT1