

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ISOFORMAS DE
CADEIA PESADA DE MIOSINA E MACIEZ DA CARNE DE
BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS.**

Eduardo Paulino Castan

Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

FEVEREIRO - 2010

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

EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ISOFORMAS DE
CADEIA PESADA DE MIOSINA E MACIEZ DA CARNE DE
BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS.

Eduardo Paulino Castan

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes De Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

FEVEREIRO - 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDUARDO PAULINO CASTAN - nasceu em 03 de janeiro de 1985, na cidade de Recife - PE, filho de José Milton Castan Júnior e Celene Carvalho Paulino Fontenla. Em dezembro de 2007 obteve o título de zootecnista pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) e em março de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal - SP como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, obtendo o grau de mestre em 23 de fevereiro de 2010, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira e co-orientação da Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva.

*Para quem visa a excelência,
mudança é a única coisa
permanente*

Uma pequena mistura de dois autores

*Nem tudo na vida é genético...
mas quase tudo*

Uma pequena verdade

Dedico este trabalho...

*Ao meu pai Castan que sempre me
mostrou o caminho,
a minha mãe Celene que me ajudou a
andar por este caminho
e ao meu amor Renata por caminhar
comigo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu avô Fábio por me apresentar à natureza, principalmente aos animais e por ser carinhoso e amoroso quase incondicionalmente.

A minha avó Carmem pelos primeiros ensinamentos acadêmicos e pelo amor, bondade e carinho gigantescos.

A minha avó Malvi por me incentivar a escrever e por me ajudar em momentos que só ela sabe.

A minha família dupla que me construiu do jeito que eu sou: Felipe, Marcelo, Fernando, Carol, Orlando, Cinira, Gu, Ibis, Ana e Gaby.

À Dona Lúcia que me acolheu como um filho durante todo o meu mestrado.

Aos meus amigos Vitor, Jaque, Tojal e Abutre por serem, simplesmente, amigos.

Ao Robson por confiar em mim, por me acolher no laboratório em um momento crítico e por me apresentar a Renata.

À Professora Maeli pela enorme confiança, por me deixar crescer livremente como geneticista, pelos ensinamentos acadêmicos e por me deixar usar o laboratório.

Ao Professor Henrique por dividir parte de sua enorme sabedoria comigo, pela confiança e liberdade.

Aos meus novos amigos do departamento: Rodrigo pela “eletroforever” e pela paciência; Andreo pelas grandes pequenas ajudas; Ludimila por confiar no meu trabalho.

À República Pau da Goiaba por sempre me acolher como um membro da grande fraternidade que ela forma.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo fornecimento de parte da bolsa de mestrado processo 134380/2008-8.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo Auxílio Financeiro, processo 2009/03650-0, e pelo fornecimento da bolsa de mestrado processo 2007/06768-7.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	01
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
Características gerais das fibras do músculo esquelético.....	02
Fatores que influenciam os tipos de fibras e a maciez da carne.....	09
Miosina de cadeia pesada.....	10
Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	12
CAPÍTULO 2.....	14
EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ISOFORMAS DE CADEIA PESADA DE MIOSINA E MACIEZ DA CARNE DO MÚSCULO <i>LONGISSIMUS DORSI</i> DE BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS.....	14
Resumo.....	14
Introdução.....	15
Material e métodos.....	17
Produção dos animais.....	17
Maciez da carne.....	18
Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real.....	18
Eletoforese.....	20
Análise estatística dos dados.....	21
Resultados.....	21
Maciez da carne.....	22
Extração de RNA.....	23

PCR em tempo real.....	24
Expressão gênica.....	25
Eletroforese.....	26
Expressão gênica vs expressão protéica.....	27
Discussão.....	30
Conclusões.....	35
Referências.....	35
CAPÍTULO 3.....	43
Implicações.....	43

EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ISOFORMAS DE CADEIA PESADA DE MIOSINA E MACIEZ DA CARNE DE BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

RESUMO - Sabendo que o processo de transformação do músculo em carne no estágio *postmortem* é largamente governado pela proporção de distintos tipos de fibras, e tendo em vista a necessidade de suprir as demandas do setor da pecuária bem como as exigências do consumidor por um produto de maior qualidade, inclusive da carne, o presente projeto objetivou relacionar a maciez da carne do músculo *Longissimus dorsi* (LD) com a expressão gênica e protéica das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) em dois grupos genéticos de bovinos. Foram analisados 28 bovinos jovens de dois grupos genéticos, 14 Nelores e 14 Canchins. Os animais receberam a mesma dieta, o mesmo manejo no mesmo ambiente, com a finalidade de mantê-los no mesmo estado fisiológico. Atingindo o tempo pré-estabelecido de confinamento de 140 dias, os animais foram abatidos e amostras do músculo LD foram coletadas para análise da maciez da carne e também para a quantificação das expressões gênicas e protéicas das isoformas de MHC através das técnicas de RT-qPCR e de separação eletroforética (SDS-PAGE) respectivamente. O grupo Canchim apresentou maior maciez da carne em relação ao grupo Nelore em ambas as metodologias utilizadas, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar, bem como uma menor expressão gênica da isoforma de MHC 2X. Foi verificada uma correlação negativa da expressão das isoformas 2A e 2X e uma correlação positiva da expressão da isoforma de MHC Slow com a maciez da carne nos dois grupos genéticos. Os resultados sugerem que a menor maciez da carne do grupo Nelore em relação ao grupo Canchim possa estar relacionada com a maior expressão gênica da isoforma de MHC 2X no grupo Nelore.

Palavras chave: Expressão gênica, MHC, Qualidade da carne, PCR quantitativo

GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF MYOSIN HEAVY CHAIN ISOFORMS AND MEAT TENDERNESS OF BOVINES OF DIFFERENT GENETIC GROUPS

SUMMARY - Knowing that the meat tenderness process that turns muscle in meat on *postmortem* are largely governed by the proportion of different fiber types, and in view of the need to supply the needs of livestock industry and consumer demands for a higher quality product, including meat, this project aimed to relate meat tenderness of Longissimus dorsi muscle (LD) with gene and protein expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms in two genetic groups of cattle. Twenty-eight steers of two genetic groups, 14 Nellores and 14 Canchins were used. The animals received the same feed, the same management in the same environment, in order to keep them in the same physiological state. After 140 days of feedlot, the animals were slaughtered and LD muscle samples were collected for meat tenderness analysis and also for gene and protein expression quantification of MHC isoforms using RT-qPCR and electrophoretic separation (SDS-PAGE) technique, respectively. The Canchim group had better meat tenderness in relation to Nellore group in both methodologies used, shear force and myofibrillar fragmentation index and lower MHC 2X isoform gene expression. It was observed a negative correlation between 2A and 2X isoforms expression and a positive correlation of MHC Slow isoform expression to meat tenderness in the two genetic groups. The results suggest that lower meat tenderness of Nellore group in relation to Canchim group may be related to higher gene expression of MHC 2X isoform in Nellore group.

Keywords: Gene expression, MyHC, Meat quality, Real time PCR

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil, à semelhança de muitos países do mundo, passa por um período de transformação que afeta todos os setores da economia, inclusive o da pecuária. Com a finalidade de tornar sua atividade rentável e competitiva, os pecuaristas necessitam reduzir custos, agregar valores ao produto e se engajar em uma cadeia produtiva de qualidade total. Paralelo a essa transformação o consumidor passa a ser mais exigente quanto à qualidade dos produtos consumidos. Deste modo, cada vez mais, tornam-se necessários a inovação e intensificação dos sistemas de produção visando a melhoria da qualidade da carne produzida aliada a maior retorno econômico.

A terminação de bovinos de corte em confinamento é uma prática que vem crescendo no Brasil (SILVEIRA et al. 2004). Segundo LUCHIARI FILHO (1998), a utilização de bovinos jovens e não castrados é uma alternativa viável para a produção de carne neste sistema de produção, dada a atual demanda de mercado por um produto mais magro e saudável. Entretanto, faz-se necessário o uso de raças ou cruzamentos e manejo alimentar que possibilitem nível mínimo de gordura de cobertura, para que o resfriamento e o processamento da carne se tornem adequados, além de assegurar ao consumidor um produto saboroso (CERVIERI et al., 2001).

Um dos principais fatores que afeta a maciez da carne é idade com que o animal é abatido. Animais abatidos mais jovens têm carne mais macia e com maior suculência em relação àqueles com mais idade. Entretanto, segundo HADLICH (2007), a maciez da carne tem maior relação com a fase de crescimento do que com a idade cronológica. Quanto maior a taxa de crescimento de um animal, maior a taxa de turnover protéico e maior, portanto, a taxa de degradação protéica. Estes fatos estariam diretamente relacionados com a ação do complexo enzimático responsável pelo processo de maturação e com a maciez da carne. Segundo PICARD et al. (1999) o processo de amaciamento da carne da carne no *postmortem* envolve mecanismos enzimáticos e físico-químicos, que são dependentes da proporção de distintos tipos de fibras.

Desse modo deve-se levar em conta a fisiologia de crescimento de diferentes raças ou grupos genéticos que apresentam diferentes tamanhos à maturidade. O tamanho ou peso à maturidade geralmente é considerado o ponto no qual a massa muscular atinge o máximo de crescimento. Quanto maior o tamanho corporal de um grupo genético, maior será o ganho diário e o período de alimentação para atingir o grau de acabamento determinado (FERRIANI, 2004). O conhecimento sobre o desenvolvimento dos diferentes tipos de fibras musculares em grupos genético com diferentes padrões de crescimento pode permitir um maior controle sobre o processo de maturação e sobre a maciez da carne.

Características gerais das fibras do músculo esquelético

O músculo estriado esquelético é constituído por células especializadas, as fibras musculares, que são multinucleadas e os núcleos estão localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (Figura 1). O diâmetro das fibras varia, em média, de 10 a 100 μm e o comprimento pode chegar até 10 cm, sendo variável, na dependência da arquitetura do músculo (DAL PAI-SILVA et al., 2005). A disposição altamente organizada dos diferentes tipos de fibras musculares confere a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1994; PETTE & STARON, 2000).

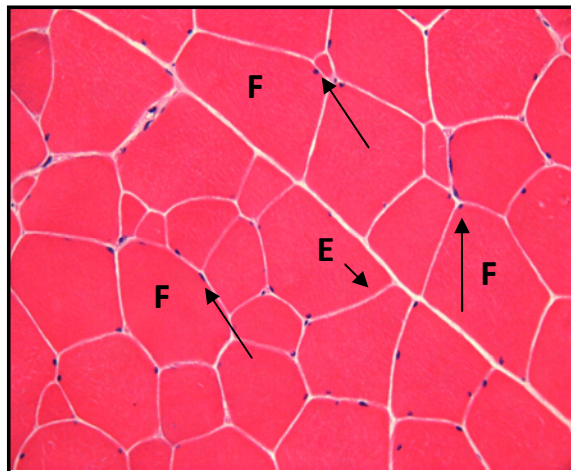


Figura 1 – Corte transversal das fibras do músculo semitendinoso de bovino. Fibras musculares (F). Endomísio (E). Núcleos das fibras (setas). Coloração HE.

As fibras musculares são constituídas por estruturas repetidas, os sarcômeros, unidade contrátil fundamental da fibra muscular (HUXLEY, 1969) (Figura 2A). Cada sarcômero é formado por várias proteínas: as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero. O filamento fino é formado pela actina e duas proteínas reguladoras, a troponina e tropomiosina (McCOMAS, 1996). O filamento grosso é formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II (DAL PAI-SILVA et al., 2005) (Figura 2B).

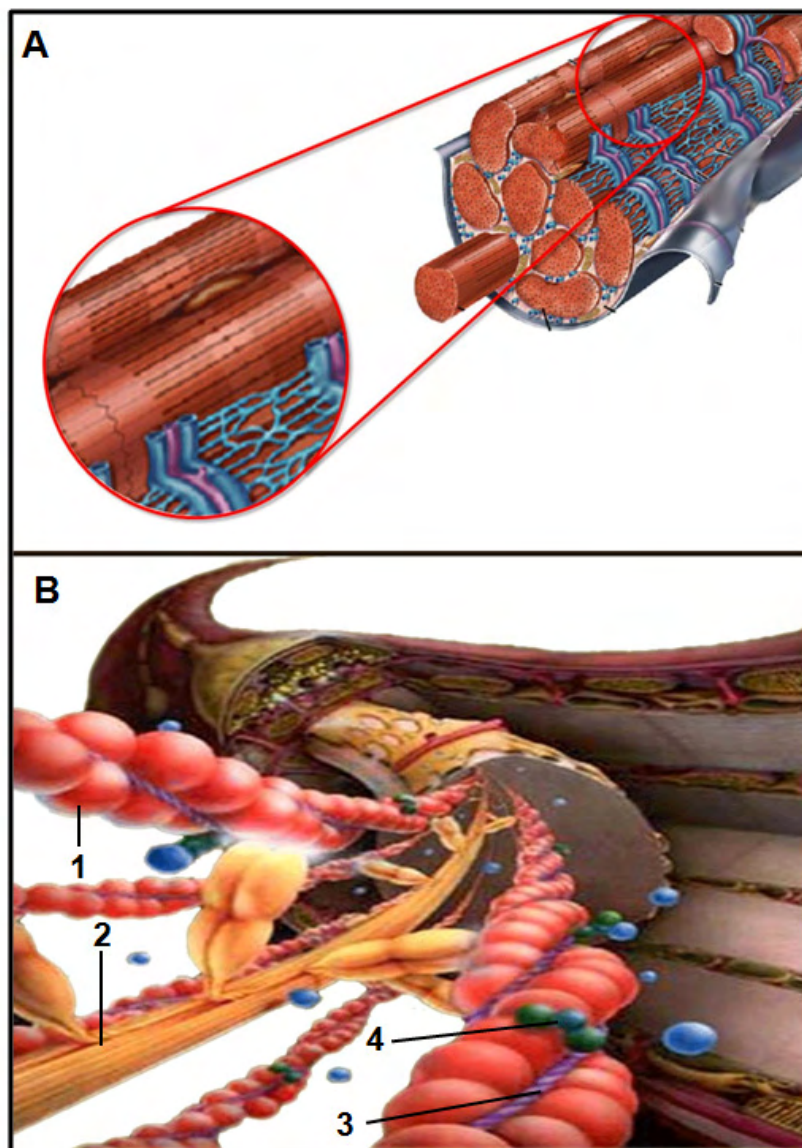


Figura 2 – Unidade contrátil fundamental da fibra, sarcômero. A: Esquema representativo do sarcômero. B: Esquema detalhado do sarcômero. Filamento fino, actina (1); Filamento espesso, miosina (2); Tropomiosina (3) e Troponina (4).

Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (RANVIER, 1873). A cor vermelha está relacionada com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (DUBOWITZ

& PEARSE, 1960). Inicialmente as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (OGATA, 1958). Posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da miosina (mATPase) (BROOKE & KAISER, 1970). ASHMORE & DOERR (1971), utilizando a combinação das reações para a mATPase e para a enzima Succinato Desidrogenase (SDH), classificaram as fibras musculares como β R, α R e α W. PETER et al., (1972), classificaram as fibras musculares em SO (*slow oxidative*), FOG (*Fast oxidative glycolytic*) e FG (*Fast glycolytic*), baseando-se na combinação das reações mATPase e NADH-TR. As fibras musculares do tipo II podem ser subdivididas em fibras dos tipos IIA, IIX (ou IID) e IIB (Tabela 1).

Tabela 1 - Características estruturais, bioquímicas e morfofuncionais das fibras musculares esqueléticas Tipo I, IIA e IIB.

CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES			
Características	Tipos de Fibras		
	Contração Rápida		Contração Lenta
	Tipo IIB (FG)	Tipo IIA (FOG)	Tipo I (SO)
Morfologia			
Cor	Branca	Branca/Vermelha	Vermelha
Área da fibra	Grande	Intermediária	Pequena
Capilares/mm ²	Baixo	Intermediário	Alto
Densidade mitocondrial	Baixa	Intermediária	Alta
Substratos Energéticos			
Reserva de fosfocreatina	Alta	Alta	Baixa
Reserva de glicogênio	Alta	Alta	Baixa
Reserva de triglicerídeos	Baixa	Média	Alta
Histoquímica e Bioquímica			
Atividade da mATPase	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas glicolíticas	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas oxidativas	Baixa	Média/Alta	Alta
Capacidade Glicolítica	Alta	Alta	Baixa
Capacidade Oxidativa	Baixa	Média/alta	Alta
Função e Contratilidade			
Velocidade de contração	Rápida	Rápida	Lenta
Velocidade de relaxamento	Rápida	Rápida	Lenta
Resistência à fadiga	Baixa	Moderada/alta	Alta
Produção de força	Alta	Intermediária	Baixa
Elasticidade	Alta	Alta	Baixa

Adaptado de KRAUS et al. (1994) Skeletal muscle adaptation low frequency motor nerve stimulations. Exerc Sport Sci Rev 22:313-60.

As fibras do tipo I IIA, IIX (ou IID) e IIB são denominadas de fibras puras. Essa subdivisão é baseada na presença de diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (ou MHC, *myosin heavy chain*), na fibra muscular. As fibras do tipo I contêm MHCI ou Solw, enquanto as fibras dos tipos IIX, IIA e IIB contêm MHCIIx, MHCIIa e MHC IIb, respectivamente (STARON, 1991; STARON & PETTE, 1993; MACCATROZZO et al., 2004) (Figura 3).

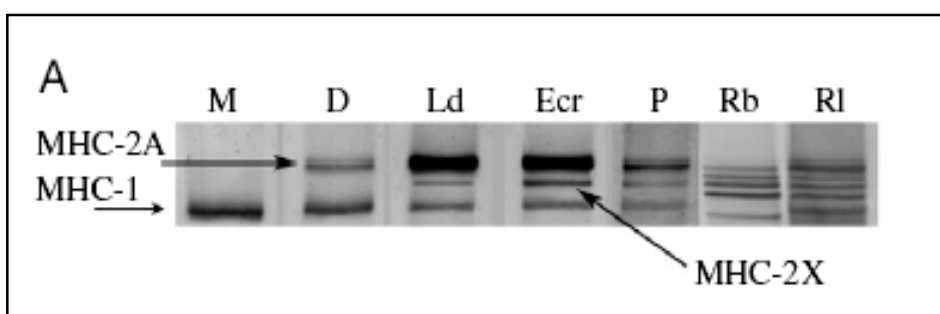


Figura 3 - Separação eletroforética das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) em diferentes músculos de bovinos adultos: M, masseter; D, diafragma; Ld, longissimus dorsi; Ecr, extensor radial do carpo; P, peitoral; Rb, retrator do bulbo; RI, reto lateral. (Adaptado de MACCATROZZO et al., 2004)

Entre esses três tipos também podem ser identificadas fibras musculares com intensidade de reação intermediária. Essas fibras são denominadas de fibras híbridas, contendo mais de um tipo de MHC, sendo classificadas de acordo com o tipo de MHC predominante (BIRAL et al., 1988; STARON, 1991; STARON et al., 1999).

A natureza dinâmica dos tipos de fibras nos músculos de mamíferos demonstra que cada tipo de fibra apresenta diferentes atividades das enzimas metabólicas. A análise histoquímica do músculo para as atividades de enzimas mitocondriais e mATPase permite a identificação das fibras como de contração lenta e metabolismo oxidativo; de contração rápida e metabolismo glicolítico e de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico (PETER et al., 1972).

As fibras com metabolismo oxidativo geralmente apresentam diâmetro pequeno, muitas mitocôndrias, pouco glicogênio e maior número de capilares por fibra. Recebem

maior teor de oxigênio e metabólitos, possuem elevada atividade de fosforilação oxidativa e a remoção dos produtos do metabolismo é mais rápida. As fibras com metabolismo glicolítico apresentam área maior, poucas mitocôndrias, muito glicogênio e o número de capilares por fibras é menor, sendo o aporte de oxigênio e metabólitos mais reduzido (SILAU & BRANCHERO, 1978; GRAY et al., 1983; SANGER & STOIBER, 2001).

Além das fibras puras (Tipo I, Tipo IIA, Tipo IID/X e Tipo IIB), existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de miosina. Estas fibras foram classificadas em Tipo IC (MHC I > MHC IIa), tipo IIC (MHC IIa > MHC I), tipo IIAD (MHC IIa > MHC IId), tipo IIDA (MHC IId > MHC IIa), tipo IIDB (MHC IId > MHC IIb) e tipo IIBD (MHC IIb > MHC IId) (PETTE & STARON, 2000; PETTE & STARON, 2001). A associação entre as fibras puras e híbridas constitui um contínuo de fibras lentas em direção as fibras rápidas: tipo I – tipo I/IIA – tipo IIA/I – tipo IIA – tipo IIA/D – tipo IID/A – tipo IID – tipo IID/B – tipo IIB/D – tipo IIB (PETTE et al., 1999). Deste modo, assume-se uma organização sequencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (PETTE & STARON, 2000) (Figura 4).

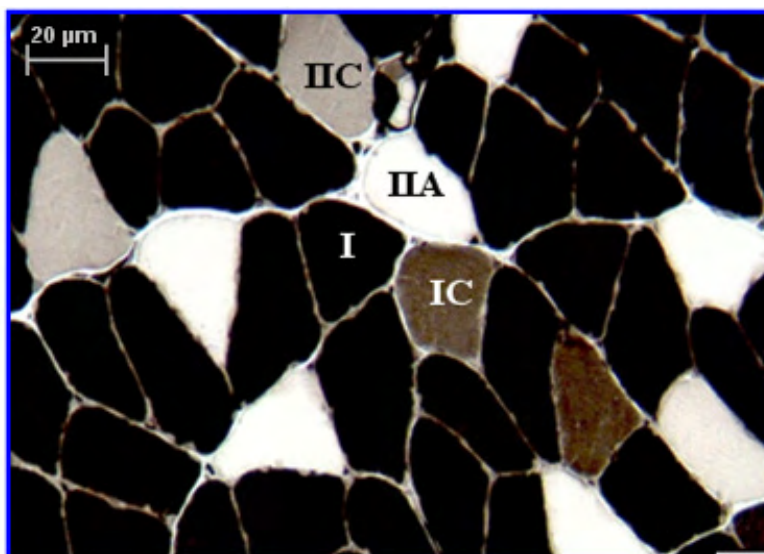


Figura 4 – Corte transversal do músculo sóleo de rato. Fibras musculares puras (I e IIA) e híbridas (IC e IIC).

Por outro lado, segundo SPANGENBURG & BOOTH (2003) a classificação das fibras musculares baseando-se somente na análise das MHCs, não é adequada, pois a funcionalidade de cada tipo de fibra muscular individual é determinada por muitos grupos de genes, o que não é levado em conta na classificação atual. E devido a esses grupos de genes serem ainda, em parte, desconhecidos, será levada em consideração a principal maneira de se estudar os tipos de fibras, atualmente, que é de acordo, pelos menos em parte, com o polimorfismo das MHCs.

Fatores que influenciam os tipos de fibras e a maciez da carne.

A distribuição e a frequência dos tipos de fibras nos músculos podem ser influenciados por fatores intrínsecos (genética) e extrínsecos (ambientais). A idade, o peso, a raça, a nutrição e o exercício também podem influenciar a distribuição e a frequência dos tipos de fibras (CASSES & COOPER, 1971; ESSÉN-GUSTAVSSON, 1995). Existem diferenças nessas características considerando-se as diferentes espécies animais, a localização dos músculos e as diferentes regiões de um mesmo músculo. Os músculos envolvidos com postura são mais oxidativos do que aqueles envolvidos com movimentos (TOTLAND & KRYVI, 1991; HENCKEL, 1995). Em suínos, foi demonstrado que os músculos mais profundos dos membros geralmente possuem maior porcentagem de fibras do tipo I (oxidativas), enquanto que nos músculos mais superficiais a porcentagem de fibras do tipo 2B (glicolíticas) é maior (ARMSTRONG et al. 1987). Essa característica também foi observada no músculo semitendinosus de suínos (BRANDSTETTER et al., 1997).

XIONG (1994) e TANABE et al. (1998) afirmam que a composição das isoformas de MHCs é o fator mais importante de todos os determinantes na maciez da carne e seus produtos. Segundo KLONT et al. (1998), a distribuição, a frequência, a área dos tipos de fibras e a densidade capilar são fatores importantes que podem influenciar a maciez da carne.

O processo de amaciamento da carne que transforma o músculo em carne no *postmortem* envolve mecanismos enzimáticos e físico-químicos, que em intensidade e amplitude são largamente governados pela proporção de distintos tipos de fibras (PICARD et al., 1999). A composição do tipo de fibra pode ter profunda influência nas mudanças que ocorrem no *postmortem* e na conversão do músculo em carne e posterior efeito na qualidade do produto (CHANG et al., 2003). A composição dos tipos de fibras musculares pode ser um dos mais importantes fatores que influenciam os eventos bioquímicos associados com a conversão do músculo em carne (SAZILI et al., 2005).

Cadeia pesada da miosina

A miosina é um hexâmero formado por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas de miosina (Myosin Heavy Chain, MHC), enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves de miosina (Myosin Light Chain, MLC) (LOWEY et al., 1969; WEEDS & LOWEY, 1971; ELLIOT & OFFER, 1978; SCOTT et al., 2001). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve (light meromyosin, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (heavy meromyosin, HMM), conhecida como porção globosa (globular) da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região capaz de ligar-se à molécula de ATP e hidrolisá-la (atividade ATPásica) (HUXLEY 1969; LOWEY et al., 1969). As HMM podem ser subdivididas nas porções S1 (parte globular com atividade ATPásica) e S2 (pequeno fragmento também em forma de bastão). As cadeias leves estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (DAL PAI-SILVA et al., 2005) (Figura 5).

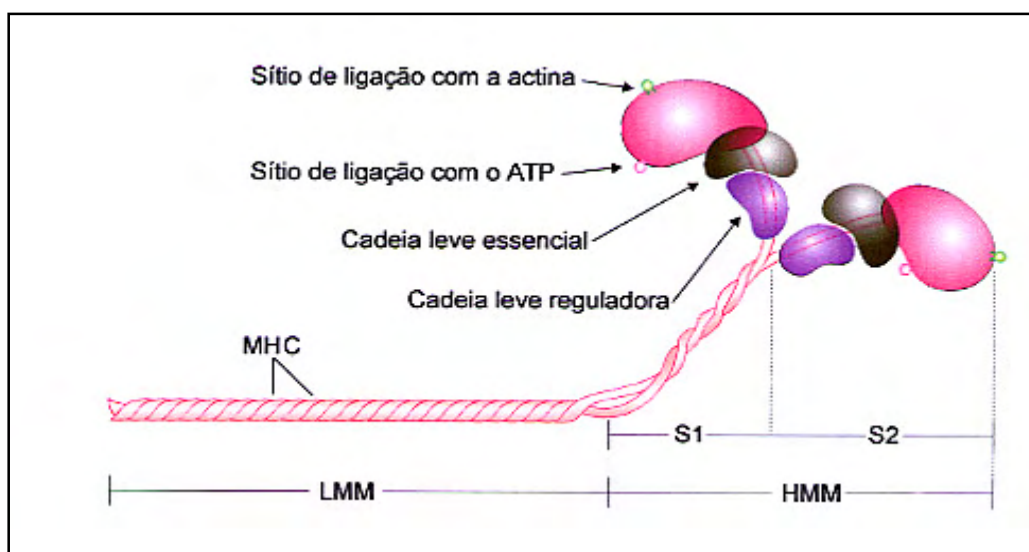


Figura 5 – Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas e gerar as meromiosina leves (LMM) e meromiosina pesadas (HMM). As HMM são compostas pela porção globosa S1 e pela porção α hélice em forma de bastão, S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (DAL PAI-SILVA et al., 2005).

As miosinas são as maiores proteínas estruturais dos filamentos espessos do sarcômero, constituem 40% das proteínas miofibrilares e as diferentes isoformas da proteína são codificadas por genes distintos (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996). Através da análise genômica, foram caracterizados os genes de quatro isoformas de MHC em músculos de mamíferos adultos: uma isoforma lenta (tipo Slow) e três isoformas rápidas 2A, 2X e 2B (TONIOLO et al., 2005). Em pequenos roedores como ratos e camundongos, coelhos e marsupiais (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; ZHONG et al. 2001), as quatro isoformas de MHC são expressas dando origem a quatro diferentes tipos de fibras. Por outro lado, em humanos o gene da MHC 2B que é encontrado no genoma não é expresso, e somente as MHC Slow, 2A e 2X são expressas no músculo esquelético.

Segundo TONIOLO et al. (2005), a diversidade da expressão de isoformas de MHC-2B entre humanos e animais de laboratório contribuiu para maiores estudos para avaliar a expressão das isoformas de miosina em vários animais de interesse

veterinário, experimental e zootécnico; macacos, cachorros, ovinos, suínos e bovinos. Nessas espécies, três tipos de fibras e três isoformas de MHC foram identificados no músculo esquelético: tipos Slow e 2A, semelhantes entre ratos e camundongos, e uma isoforma semelhante à 2X. A expressão do tipo de fibra 2B é mais específica para pequenos mamíferos e marsupiais.

Em bovinos, os três tipos de fibras identificados pela reação m-ATPase: Slow, 2A e 2X, expressam mRNA das isoformas de MHC Slow, 2A e 2X, respectivamente, o que demonstra uma adaptação dos músculos de bovinos para uma contração mais lenta e maior resistência à fadiga. Essas características podem estar relacionadas ao um rigor mortis mais lento quando comparado aos músculos de outras espécies animais (CHIKUNI et al., 2004). As diferenças quanto à composição das isoformas de MHC, as quais estão envolvidas com o desenvolvimento do rigor podem explicar as diferenças na maciez da carne nos diferentes músculos e espécies animais de interesse zootécnico.

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

A transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) é um método poderoso para quantificação da expressão gênica (HEID et al., 1996; WINER et al., 1999). Um dos métodos de análise de expressão gênica por qRT-PCR é a quantificação relativa que descreve a mudança da expressão de um gene alvo relativo a algum grupo de referência (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Quantificar as mudanças relativas da expressão gênica usando PCR em tempo real requer certas equações, suposições e testes destas suposições para uma correta análise dos dados. O método do $\Delta\Delta C_q$ pode ser utilizado para calcular mudanças relativas na expressão gênica por meio de experimentos com PCR em tempo real.

A hipótese do presente trabalho é que ocorra uma expressão gênica e protéica diferencial das isoformas de miosina de cadeia pesada no músculo *Longissimus dorsi*

em dois diferentes grupos genéticos de bovinos, Nelore e Canchim, e que esta expressão esteja relacionada com o tipo de fibra e com a maciez da carne.

CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ISOFORMAS DE CADEIA PESADA DE MIOSINA E MACIEZ DA CARNE DO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

Expressão Gênica E Protéica de Isoformas de Cadeia Pesada de Miosina e Maciez da Carne do Músculo *Longissimus Dorsi* de Bovinos de Diferentes Grupos Genéticos

RESUMO

Sabendo que o processo de transformação do músculo em carne no estágio *postmortem* é largamente governado pela proporção de distintos tipos de fibras, e tendo em vista a necessidade de suprir as demandas do setor da pecuária bem como as exigências do consumidor por um produto de maior qualidade, inclusive da carne, o presente projeto objetivou relacionar a maciez da carne do músculo *Longissimus dorsi* (LD) com a expressão gênica e protéica das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) em dois grupos genéticos de bovinos. Foram analisados 28 bovinos jovens de dois grupos genéticos, 14 Nelores e 14 Canchins. Os animais receberam a mesma dieta, o mesmo manejo no mesmo ambiente, com a finalidade de mantê-los no mesmo estado fisiológico. Atingindo o tempo pré-estabelecido de confinamento de 140 dias, os animais foram abatidos e amostras do músculo LD foram coletadas para análise da maciez da carne e também para a quantificação das expressões gênicas e protéicas das isoformas de MHC através das técnicas de RT-qPCR e de separação eletroforética (SDS-PAGE) respectivamente. O grupo Canchim apresentou maior maciez da carne em relação ao grupo Nelore em ambas as metodologias utilizadas, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar, bem como uma menor expressão gênica da isoforma de MHC 2X. Foi verificada uma correlação negativa da expressão das isoformas 2A e 2X e uma correlação positiva da expressão da isoforma de MHC Slow com a maciez da carne nos dois grupos genéticos. Os resultados sugerem que a menor

maciez da carne do grupo Nelore em relação ao grupo Canchim possa estar relacionada com a maior expressão gênica da isoforma de MHC 2X no grupo Nelore.

Palavras chave: Expressão gênica, MHC, Qualidade da carne, PCR quantitativo

Introdução

O Brasil, à semelhança de muitos países do mundo, passa por um período de transformação que afeta todos os setores da economia, inclusive o da pecuária. Paralelo a essa transformação o consumidor passa a ser mais exigente quanto à qualidade dos produtos consumidos, como a carne bovina.

Para uma carne de melhor qualidade, alguns fatores são levados em consideração, como suculência, sabor, cor e maciez, e este último tem se mostrado o mais variável e mais importante componente sensorial afetando a satisfação dos consumidores (SAVELL et al., 1987, 1989; SANDERS et al. 1997; MILLER et al., 2001). O processo de transformação do músculo em carne no estágio *postmortem* contribui para o amaciamento da carne e envolve mecanismos enzimáticos e físico-químicos, que em intensidade e amplitude são fortemente influenciados pela frequência dos tipos de fibras nos músculos (PICARD et al., 1999).

Os músculos são formados por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (DUBOWITZ & PEARSE, 1960). Em ratos, a utilização de técnicas histoquímicas associadas à análise por eletroforese permitiu a identificação e classificação das fibras em tipo Slow, 2A, 2X (ou 2D) e 2B, sendo estas denominadas de fibras puras. Essa classificação é baseada na presença de diferentes isoformas das cadeias pesadas de miosina (ou MHC, *myosin heavy chain*), na fibra muscular.

As miosinas são as maiores proteínas estruturais dos filamentos espessos do sarcômero e constituem 40% das proteínas miofibrilares. A subunidade de cadeia

pesada da miosina possui diferentes isoformas que são codificadas por genes distintos (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996). Segundo STARON, 1991; STARON & PETTE, 1993; SPANGENBURG & BOOTH 2003; MACCATROZZO et al., 2004, as fibras do tipo Slow contêm MHC Slow, enquanto as fibras dos tipos 2X, 2A e 2B contêm MHC 2X, MHC 2A e MHC 2B, respectivamente. WIMMERS et al. (2007) avaliaram a proporção de transcritos das isoformas de MHC, por meio de PCR quantitativo, e também avaliaram a proporção dos diferentes tipos de fibra, por meio de mATPase, e encontraram alta correlação entre as proporções.

Em bovinos, três tipos de fibras e três isoformas de MHC foram identificados no músculo esquelético: tipos Slow e 2A, semelhantes entre ratos e camundongos, e uma isoforma semelhante à 2X, o que demonstra uma adaptação dos músculos de bovinos para uma contração mais lenta e maior resistência à fadiga. Apesar da expressão do tipo de fibra 2B ser mais específica para pequenos mamíferos e marsupiais, PICARD & CASSAR-MALEK (2009), em estudo com bovinos da raça Blonde d'Aquitaine, observaram que dois dos animais utilizados no experimento apresentaram a isoforma MHC 2B, atribuindo tal evento ao fato desse gene estar ligado ao alto desenvolvimento muscular e que a seleção do gado para produção de carne pode ter favorecido a expressão da isoforma MHC 2B, como observado em suínos. Características como contração mais lenta e maior resistência à fadiga podem estar relacionadas ao um *rigor mortis* mais lento quando comparado aos músculos de outras espécies animais (CHIKUNI et al., 2004). As diferenças quanto à composição das isoformas de miosinas, as quais estão envolvidas com o desenvolvimento do *rigor* podem explicar as diferenças na maciez da carne nos diferentes músculos e espécies animais de interesse zootécnico. Segundo TANABE et al. (1998) a composição das isoformas de MHC é um dos fatores mais importantes entre os determinantes na maciez da carne e seus produtos.

A distribuição e a frequência dos tipos de fibras, bem como das isoformas de MHC nos músculos, podem ser influenciados por fatores intrínsecos (genética) e extrínsecos (ambientais), como idade, o peso, a nutrição, exercício físico e raça (CASSES & COOPER, 1971; ESSÉN-GUSTAVSSON, 1995). XIONG (1994). Segundo

KLONT et al.1998; CHANG et al., 2003; SAZILI et al., 2005, a distribuição, a frequência, a área dos tipos de fibras e a densidade capilar são fatores importantes que podem influenciar as mudanças que ocorrem no *postmortem* e nos eventos bioquímicos associados com a conversão do músculo em carne.

O objetivo do presente trabalho foi relacionar a maciez da carne do músculo *Longissimus dorsi* com a expressão gênica e protéica das isoformas de cadeia pesada da miosina em dois grupos genéticos de bovinos: Nelore e Canchim.

Material e Métodos

Produção dos Animais

O experimento foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu/SP, Brasil, sendo realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo n° 173/2008-CEEA) determinados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da referida instituição.

Foram utilizados 28 animais, 14 do grupo genético Nelore e 14 do grupo genético Canchim, não castrados, desmamados aos sete meses de idade criados em sistema *creep feeding*. Os dois grupos foram terminados nas instalações de confinamento experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na fazenda lajeado da UNESP Botucatu recebendo dietas com altas relações concentrado:volumoso (75:25), suficientes para ganhos de pesos diários de 1.3 a 1.6 kg/animal. Todos os animais foram submetidos à mesma dieta (*ad libitum*), tipo de alojamento e manejo.

Antes do início do experimento os animais foram todos desverminados, pesados e submetidos a um período de 21 dias de adaptação à dieta proposta. O crescimento e deposição do tecido adiposo dos animais foram monitorados por ultrassonografia a cada período de 28 dias, através de uma amostragem dos animais.

Quando os animais dos dois grupos atingiram o tempo de abate pré-estabelecido de 140 dias, foram abatidos em frigorífico comercial e foram coletadas amostras de carne para realização de análise laboratorial de maciez, e amostras de músculo para análise da expressão gênica e protéica. Durante o abate foram coletadas amostras do músculo LD na altura da 12-13^a costelas para a separação eletroforética das MHCs e para a extração de RNA, e outras três amostras para padronização das reações de qPCR. Após o resfriamento da carcaça foram coletadas duas amostras do músculo LD na altura da 12-13^a costelas para realização da análise de maciez da carne. Uma das amostras foi avaliada sem maturação e outra com sete dias de maturação.

Maciez da carne

Para a realização das análises da maciez da carne foi utilizado o Laboratório de Carnes da Universidade de São Paulo em Pirassununga/SP e o Laboratório de Qualidade da Carne do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Amostras do músculo LD entre as 12^a e 13^a costelas com cerca de uma polegada de espessura (2,54 cm) foram colhidas no abate, para a determinação da força de cisalhamento (FC) e do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) com zero e sete dias na câmara de maturação. Para análise da FC foi utilizada a metodologia descrita por WHEELER et. al. (1995) e para análise do MFI foi utilizada a metodologia proposta por CULLER et al. (1978), modificada no Laboratório de Bioquímica da Carne (LBC) do Departamento de Química do IBB, Unesp, Botucatu/SP (HADLICH, 2007).

Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

RNA total foi extraído a partir das amostras de músculo coletadas com TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), o qual é baseado no método do tiocianato de guanidina. Músculos congelados foram mecanicamente homogeneizados em 1 mL de TRIzol reagent. RNA total foi solubilizado em água livre de

RNase, tratado com DNase I (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para remover qualquer DNA presente na amostra, e quantificado pela mensuração da densidade óptica (OD) a 260nm. A pureza do RNA foi garantida quando razão da OD 260/280 foi por volta de 2,0. Para cada amostra, cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total utilizando os componentes do *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A amostra continha 10 µL de 10x Reverse Transcription Buffer, 4 µL 25X dNTPs, 10 µL 10X random primers, 100 unidades de RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 250 unidades de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, e o volume final foi ajustado para 100 µL com água livre de nuclease. Os primers se anelaram por 10 minutos a 25°C antes de proceder a reação por 2 horas a 37°C. Controles de reação “No RT” foram feitos por meio da omissão da enzima transcriptase reversa. Estas reações foram amplificadas por PCR para garantir que não houve contaminação das amostras por DNA. As amostras de cDNA resultantes foram aliquotadas e armazenadas a -20°C. 2µL de cDNA, correspondentes aos 20 ng de RNA total, da reação de RT, foram utilizados como *template* nas reações de PCR em tempo real subsequentes que foram feitas no 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com condições universais de termociclagem do equipamento: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, e então 60 °C por 1 min. As reações foram feitas em duplicatas utilizando 0,4 µM de cada primer e 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um volume final de 25 µL. Os primers para os genes alvos analisados foram obtidos através dos softwares *Primer Express*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e para os genes de referência, através do software Primer3, disponível no endereço eletrônico <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (Tabela 1), a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Curvas de dissociação e eletroforese com gel de agarose foram feitas para confirmar a amplificação apenas do sequência alvo. Controles de reação foram feitos com a ausência de cDNA *template* para verificar possíveis contaminações de reagentes. A expressão gênica foi comparada entre amostras individuais por meio do método do $\Delta\Delta C_q$ descrito no Applied Biosystems User Bulletin N° 2. Três genes foram utilizados como genes de referência para normalização

dos resultados: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) e TATA binding box protein (TBP) (Tabela 1).

Tabela 1: Genes que serão analisados pela reação de qRT-PCR.

Genes	N° de Acesso
MHC-slow	AB015857
MHC-2A	AB012849
MHC -2X	AB012850
TBP	NM_001075742
HPRT	NM_001034035
GAPDH	NM_001034034

N° Acesso: número de acesso às seqüências publicadas no GenBank;
pb: pares de bases

Eletroforese

A identificação das MHCs foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras de músculo destinados à eletroforese foram colocadas em 0,5ml de uma solução contendo glicerol 10% (w/vol), 2-mercaptoetanol 5% (vol/vol), SDS 2.3% (w/vol), Tris HCl 0.9% (w/vol) e mantidos por 10 minutos a 60°C. A eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (10µl) foi realizada em gel de poliacrilamida 7% (VESCOVO et al., 1998), com um gel de empacotamento a 4%, com 26 horas de corrida a 120 V. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Blue e fotografados por meio do aparelho Image Quanti 300TL v.2002.01 - Analysis Software (GE HealthCare). A quantificação das isoformas de MHC presentes nas amostras foi realizada por densitometria, por meio do equipamento de foto-documentação VDS (*Pharmacia - Biotech*) e no Software analisador de imagens

Image Master 1D Prime & Elite, com base na densidade óptica integrada (ODI). Como parâmetro para a classificação das isoformas da cadeia pesada de miosina foi utilizado o músculo *Plantaris* de rato.

Análise estatística dos dados

Os dados da maciez de carne foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM, utilizando-se o teste Tukey para verificação da significância. As médias dos dados da quantificação das expressões gênica e protéica foram comparadas pelo teste T.

Para comparação dos dados de expressão gênica entre os grupos genéticos foi utilizado o método $\Delta\Delta C_q$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). Foram feitas correlações de Pearson e Sperman para identificar as correlações entre as expressões gênicas e protéicas e os valores de maciez.

Resultados

Na Tabela 2 estão demonstradas as médias de peso ao abate dos dois grupos genéticos

Tabela 2: Média de peso ao abate dos animais nos diferentes grupos genéticos.

Média NE	Média CH	Média Geral
371,33	384,11	377,72

P: média de peso ao abate em kg; NE: Nelore; CH: Canchim

O peso médio a desmama ($209,36 \text{ kg} \pm 23,32$) foi abaixo do que preconizado por SILVEIRA et al. (2004) no sistema de produção superprecoce. Em aproximadamente 140 dias de confinamento os animais ganharam em média 168,36 Kg. O ganho de peso médio dos animais variou de 0,55 a 1,68 kg/dia/animal.

Maciez da carne

Na tabela 3 estão demonstradas as médias de FC e MFI de amostras dos dois grupos genéticos estudados. Foram observadas diferenças significativas entre os valores de FC nos dois grupos, mostrando maior maciez da carne do grupo Canchim e entre os tempos de maturação considerados, mostrando maior maciez para carnes com sete dias de maturação. Para o MFI observou-se que houve diferença estatística entre os dois grupos genéticos, no qual a média de MFI para a raça Canchim foi maior em relação à raça Nelore.

Tabela 3: Força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar sem maturação e com sete dias de maturação.

	Grupo Genético		Dias de Maturação		Interação
	NE	CH	Zero	Sete	GG e DM
FC	4,31±0,98	3,73±0,67 ^a	4,32±0,19	3,71±0,57 ^c	0,279
MFI	61,5±13,01	70,01±10,52 ^b	59,98±2,15	71,50±10,94 ^d	0,193

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. FC: Força de cisalhamento em kg; MFI: Índice de fragmentação miofibrilar; NE: Raça Nelore; CH: Raça Canchim (¾ Charolês, ¼ Nelore). Variação significativa no Teste de Tukey representado por ^a p<0,05 em relação ao “NE”; ^b p<0,05 em relação ao “CH”; ^c p<0,05 em relação ao “Zero” e ^d p<0,01 em relação ao “Sete”.

Extração de RNA

A tabela 4 mostra os valores referentes à quantificação e à qualidade do RNA total extraído. A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de razão $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 2,00$.

Tabela 4. Média do resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade do RNA total isolado do músculo LD.

Grupo	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	[ng/ μ L]
Nelore	22,29 $\pm$ 6,40	10,82 $\pm$ 3,09	2,06 $\pm$ 0,03	891,70 $\pm$ 256,12
Canchim	22,76 $\pm$ 5,96	11,14 $\pm$ 2,88	2,04 $\pm$ 0,04	910,76 $\pm$ 247,59

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $A_{260\text{ nm}}$: absorvância a 260 nm; $A_{280\text{ nm}}$: absorvância a 280 nm; $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$: razão entre as duas absorvâncias; concentração do RNA total extraído em ng/ μ L.

Após a eletroforese da solução contendo o RNA total, de cada amostra, em gel de agarose, a integridade do RNA foi constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S (Figura 1).

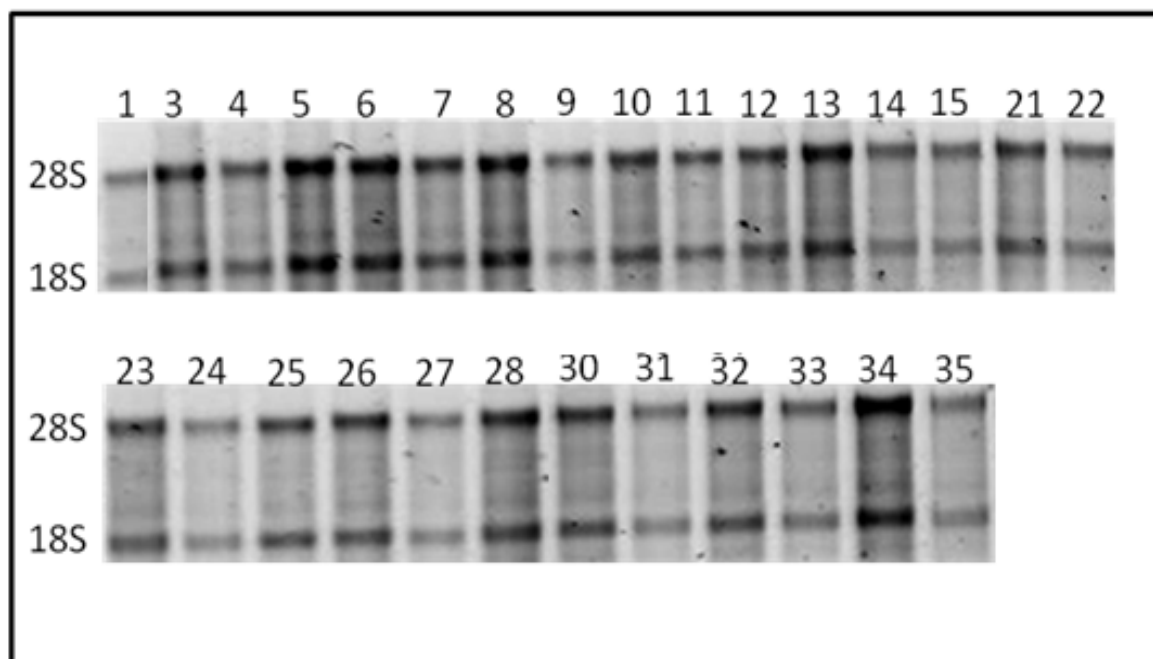


Figura 1. Gel de agarose a 1%, demonstrando a qualidade do RNA extraído de cada amostra de músculo, constatada pela integridade das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

PCR em tempo real

A exatidão da quantificação do RNA mensageiro depende da linearidade e eficiência da amplificação da PCR, a qual foi validada e determinada pelo método do C_T comparativo ou $\Delta\Delta C_q$ (WONG & MEDRANO, 2005; *Applied Biosystems User Bulletin N°2*).

Foi constituída uma série de seis diluições (10x) a partir do produto de PCR diluído 500 vezes, referente a cada gene, de uma mistura inicial contendo quantidades iguais de cDNA das três amostras de padronização, gerando assim seis pontos de uma curva padrão, para cada um dos conjuntos de primers escolhidos inicialmente para a RT-PCR em tempo real. A linearidade e a eficiência da PCR em tempo real foram deduzidas a partir da inclinação da curva-padrão gerada pelo software 7300 *System SDS* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) para cada um dos genes analisados. A análise de todas as curvas-padrão demonstrou uma alta linearidade ($r^2 = 0,99$). A eficiência da PCR (E_x) foi calculada a partir da equação $E_x = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$. Uma

inclinação de -3,32 implica numa eficiência de reação de 100%. Todos os genes apresentaram valores de inclinação próximos de -3,32 e as estimativas de eficiência ficaram entre 99,5 % e 100,5%.

Foi também necessário realizar a correção da variabilidade experimental entre as diferentes amostras, por exemplo, quantidade de RNA e eficiência da reação de transcrição reversa, antes da realização das análises finais. A normalização por, no mínimo, três genes de referência é o método mais aceito para evitar essas disparidades (VANDESOMPELE et al., 2002). A escolha de genes apropriados é crucial para confiabilidade dos resultados, porém o nível de expressão desses genes deve permanecer inalterado durante diferentes condições experimentais (ALWAY et al., 2002, SANCHEZ et al., 2006). Três genes referência (GAPDH, TBP e HPRT) foram utilizados na normalização dos resultados.

Foi realizada a validação do método $\Delta\Delta C_q$ para todos os genes, e todos foram validados. Analisamos a possibilidade de validação do método do C_T comparativo, de acordo com o *User Bulletin #2* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O método do $\Delta\Delta C_q$ é um método simples e fácil para quantificação do RNA mensageiro, o qual é baseado na eficiência de amplificação entre os genes alvo e o fator de normalização (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; VANDESOMPELE et al., 2002).

Expressão gênica

Com o objetivo de relacionar a expressão gênica com a maciez da carne, foi analisada a expressão dos mRNAs, por meio da PCR em tempo real, de três isoformas de MHC: MHC 2A, MHC 2X e MHC Slow. Os resultados indicaram uma diminuição significativa da expressão gênica da MHC 2X no grupo Canchim em relação ao grupo Nelore (Figura 2).

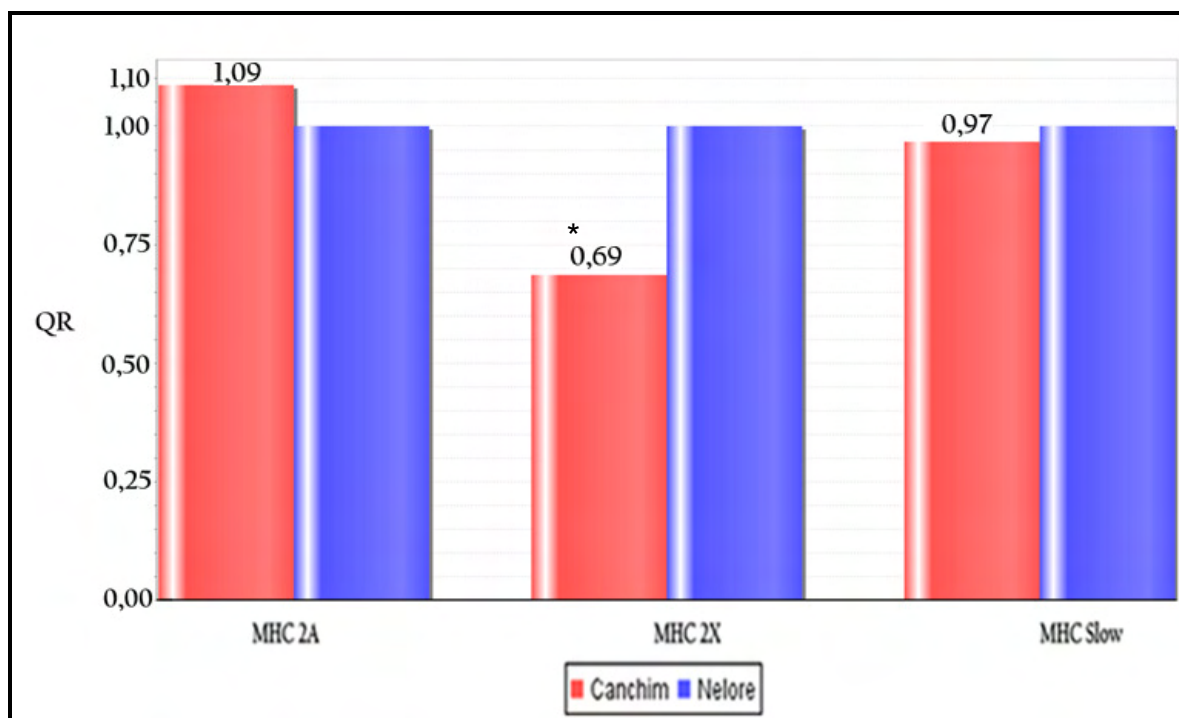


Figura 2. Quantificação relativa (QR) da expressão de mRNA das isoformas MHC 2A, MHC 2X e MHC Slow. estimada por PCR em tempo real no músculo *Longissimus dorsi* do grupo Nelore e do grupo Canchim. A expressão gênica foi normalizada por meio de três genes de referência (TBP, GAPDH e HPRT). Os valores da expressão gênica do grupo Canchim estão relativos aos valores do grupo Nelore (QR=1). Os valores acima da barra mostram a quantificação relativa. Os dados normalizados estão expressos em unidades arbitrárias. * $p < 0,5$.

Eletroforese

A eletroforese do músculo LD revelou, para ambas as raças, três bandas de intensidades variáveis que foram caracterizadas como isoformas da MHC a partir da comparação com o padrão utilizado (músculo *Plantaris* de rato). Desta maneira foi observada a presença das isoformas MHC 2A, MHC 2X e MHC Slow, respectivamente (Fig. 3), e a ausência da isoforma MHC 2B. Na figura 4 estão apresentadas as porcentagens relativas das três isoformas de MHC encontradas no músculo LD. A análise dos dados demonstra que a frequência de uma mesma isoforma não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre as raças.

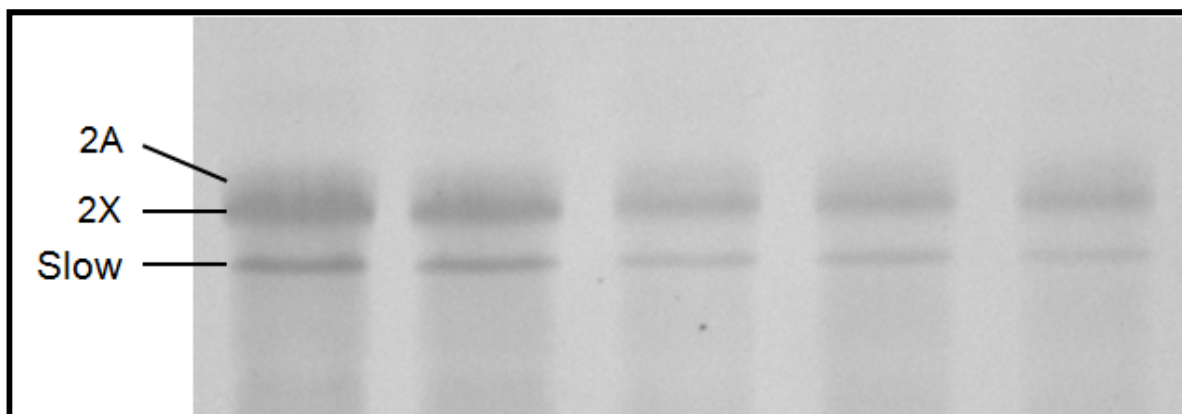


Figura 3. Gel representativo do padrão eletroforético das isoformas das cadeias pesadas da miosina (MHC) no músculo *Longissimus dorsi* (LD) de bovinos das raças Nelore e Canchim

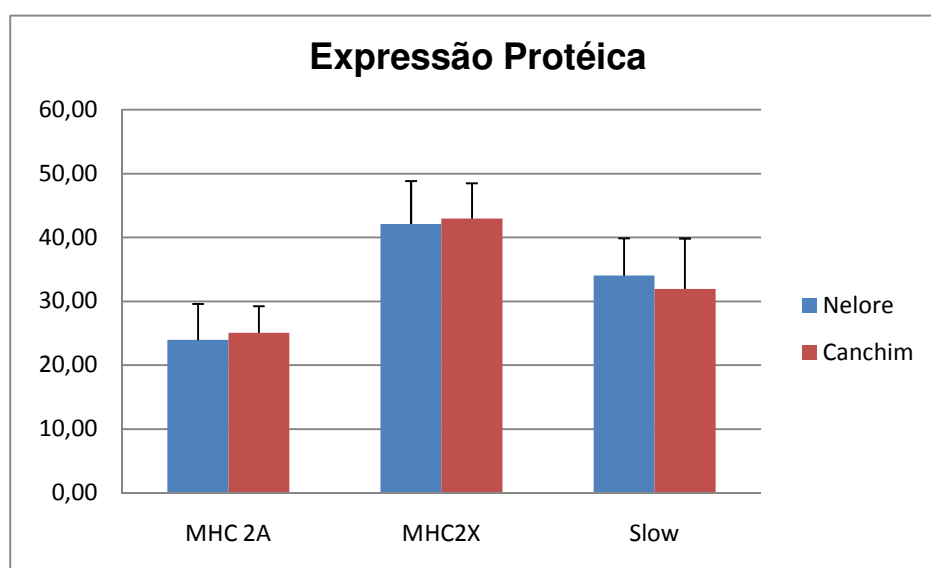


Figura 4. Porcentagem relativa (%) da expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina presentes no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos das raças Nelore e Canchim

Expressão gênica vs expressão protéica

Foi observada uma discrepância nos valores da quantificação da expressão gênica em relação aos valores quantificação da expressão protéica das isoformas de MHC. Na quantificação da expressão protéica foi verificada maior expressão da isoforma 2X seguida da expressão da isoforma Slow em ambas as raças, já na

quantificação da expressão gênica observou-se maior expressão da isoforma Slow seguida da expressão da isoforma 2X (figura 5).

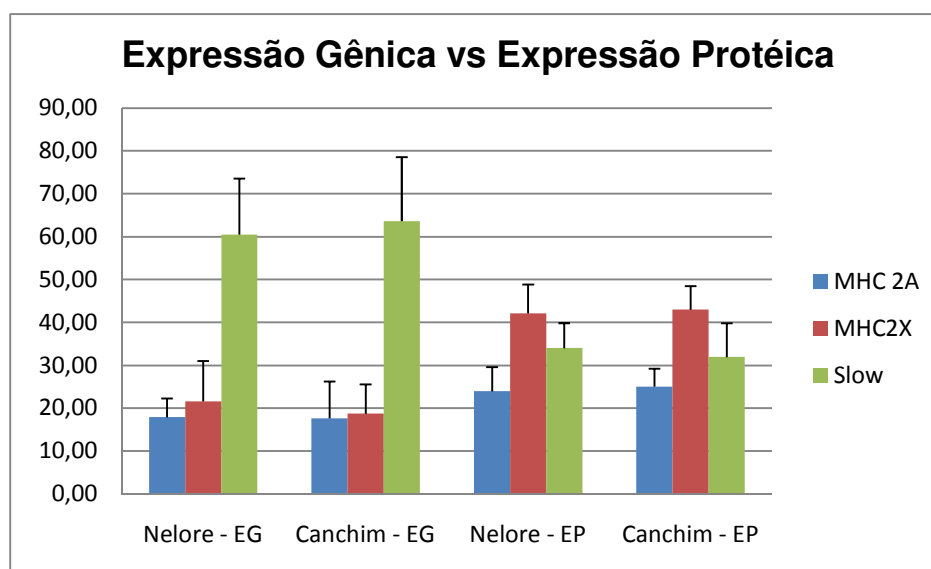


Figura 5. Porcentagem relativa (%) das expressões protéica e gênica das isoformas da cadeia pesada da miosina presentes no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos das raças Nelore e Canchim

A tabela 5 mostra os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman obtidos entre as quantificações da expressão gênica e os valores de maciez da carne nos dois grupos genéticos, Nelore e Canchim. Houve correlação negativa ($p < 0,05$) entre a expressão gênica da isoforma 2X e MFI com zero dia de maturação em ambos os grupos e no grupo Nelore; correlação negativa ($p < 0,05$) entre a expressão gênica da isoforma 2A e o MFI com zero dia de maturação e com sete dias de maturação em ambos os grupos e no grupo Nelore; correlação positiva ($p < 0,05$) entre a expressão gênica da isoforma Slow e o MFI com sete dias de maturação no grupo Nelore; correlação negativa ($p < 0,05$) entre a expressão gênica da isoforma Slow e a FC com zero dia de maturação em ambos os grupos.

Tabela 5: Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman obtidos entre as quantificações da expressão gênica e os valores de maciez da carne nos dois grupos genéticos, Nelore e Canchim

Expressão Gênica	FC(0)	FC(7)	MFI(0)	MFI(7)
Nelore				
MHC 2X	0,03	-0,08	-0,54*	-0,40
MHC 2A	-0,06	-0,22	-0,60*	-0,65*
MHC Slow	-0,52	-0,15	-0,20	0,54*
Canchim				
MHC 2X	0,24	0,03	-0,12	0,48
MHC 2A	0,31	0,01	0,02	0,34
MHC Slow	-0,41	-0,39	-0,27	-0,23
Nelore + Canchim				
MHC 2X	0,26	0,09	-0,45*	-0,24
MHC 2A	-0,06	-0,22	-0,60*	-0,65*
MHC Slow	-0,47*	-0,23	-0,22	0,24

FC(0): Força de cisalhamento com zero dia de maturação; MFI(0): Índice de fragmentação miofibrilar com zero dia de maturação; FC(7): Força de cisalhamento sete dias de maturação; MFI(7): Índice de fragmentação miofibrilar com sete dias de maturação. *p<0,05; **p<0,01

A tabela 6 mostra os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman obtidos entre as quantificações de expressão protéica e os valores de maciez da carne nos dois grupos genéticos, Nelore e Canchim. Houve correlação positiva ($p<0,05$) entre a expressão protéica da isoforma 2X e a FC com zero dia de maturação em ambos os grupos; correlação positiva ($p<0,05$) entre a expressão protéica da isoforma 2A e a FC com zero dia de maturação no grupo Canchim; correlação positiva ($p<0,05$) entre a expressão protéica da isoforma 2A e a FC com sete dias de maturação em ambos os

grupos; correlação negativa ($p < 0,01$) entre a expressão gênica da isoforma Slow e a FC com zero dia de maturação no grupo Canchim.

Tabela 6: Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman obtidos entre as quantificações da expressão protéica e os valores de maciez da carne nos dois grupos genéticos, Nelore e Canchim

Expressão Protéica	FC(0)	FC(7)	MFI(0)	MFI(7)
Nelore				
MHC 2X	0,43	-0,35	-0,20	-0,09
MHC 2A	-0,43	0,44	0,06	-0,10
MHC Slow	-0,19	-0,003	0,17	0,20
Canchim				
MHC 2X	0,50	0,17	-0,27	-0,03
MHC 2A	0,61*	0,49	0,48	0,09
MHC Slow	-0,67**	-0,37	0,45	-0,03
Nelore + Canchim				
MHC 2X	0,38*	-0,13	-0,15	-0,05
MHC 2A	0,04	0,39*	-0,11	-0,01
MHC Slow	-0,29	-0,15	0,21	0,05

FC(0): Força de cisalhamento com zero dia de maturação; MFI(0): Índice de fragmentação miofibrilar com zero dia de maturação; FC(7): Força de cisalhamento sete dias de maturação; MFI(7): Índice de fragmentação miofibrilar com sete dias de maturação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Discussão

O interesse em estudar a composição dos tipos de fibras nos músculos de bovinos está relacionado com a hipótese de que este parâmetro seja um importante

fator que influencia muitos dos processos bioquímicos nos períodos de pré e pós abate inclusive a maciez da carne. Os tipos de fibras musculares são caracterizados de acordo com os tipos de cadeia pesada de miosina (MHC) presentes na fibra: fibra tipo 2A (contendo MHC 2A), fibra tipo 2X (contendo MHC 2X), fibra tipo 2B (contendo MHC 2B) e fibra tipo 1 (contendo MHC 1) (PETTE & STARON, 1990). As fibras musculares podem conter apenas uma isoforma de MHC (fibras puras) ou duas ou mais isoformas (fibras híbridas) (RIVERO et al., 1996; ROSSER et al., 1996). Em bovinos, três tipos de fibras e três isoformas de MHC foram identificados no músculo esquelético: tipos Slow, 2A e 2X (CHIKUNI et al., 2003). Por outro lado, PICARD & CASSAR-MALEK (2009), em estudo com bovinos da raça Blonde d'Aquitaine, observaram a expressão da isoforma MHC 2B, atribuindo tal evento ao fato desse gene estar ligado ao alto desenvolvimento muscular e que a seleção do gado para produção de carne pode ter favorecido a expressão da isoforma MHC 2B, como observado em suínos.

O principal achado do nosso estudo foi a expressão gênica diferencial da MHC 2X entre o grupo Nelore e o grupo Canchim e sua correlação negativa com o índice de fragmentação miofibrilar (MFI) com zero dia de maturação no grupo Nelore e em ambos os grupos. Também foi verificada uma correlação positiva das expressões gênica e protéica da isoforma de MHC Slow e uma correlação negativa das expressões gênica e protéica das isoformas 2A e 2X com a maciez da carne nos dois grupos genéticos. Ao analisar a correlação entre expressão gênica da isoforma 2X e os parâmetros de maciez da carne, observou-se uma correlação negativa com o MFI com zero dia de maturação no grupo Nelore e em ambos os grupos. A análise da correlação da expressão protéica da isoforma 2X com os parâmetros da maciez mostrou uma correlação positiva com a FC com zero dia de maturação em ambos os grupos. Os resultados das expressões gênicas e protéicas sugerem uma correlação negativa da isoforma 2X com a maciez do LD. Ao analisar a correlação entre expressão gênica da isoforma Slow e os parâmetros de maciez da carne, observou-se uma correlação positiva com o MFI com sete dias de maturação na raça Nelore e uma correlação negativa com a FC com zero dia de maturação nos dois grupos. Já em relação à expressão protéica, observou-se uma correlação negativa entre a MHC Slow e a FC

com zero dia de maturação no grupo Canchim. Os resultados das expressões gênicas e protéicas sugerem uma correlação positiva da isoforma Slow com a maciez do LD. Já a correlação entre expressão gênica da isoforma MHC 2A e os parâmetros de maciez da carne, foi observada uma correlação negativa com o MFI com zero e sete dias de maturação na raça Nelore e em ambas as raças. Em relação à expressão protéica, observou-se uma correlação positiva entre a MHC 2A e a FC com zero dia de maturação no grupo Canchim e uma correlação positiva entre a MHC 2A e a FC com sete dias de maturação em ambos os grupos. Desta forma os resultados das expressões gênicas e protéicas também sugerem uma correlação negativa da isoforma 2A com a maciez do LD.

Entre os mecanismos envolvidos no processo de transformação do músculo em carne, destacam-se alguns parâmetros morfofisiológicos dos tipos de fibras nos músculos (PICARD et al., 1999). A combinação dos parâmetros, área, capilarização e tipo de fibra é importante na relação entre o metabolismo muscular logo após o abate e a maciez da carne (CASSENS et al., 1975; HENCKEL, 1995). Alguns autores (FRANCK et al., 2007) afirmam que existe uma alta correlação entre fibras Slow e a quantidade de capilares, relacionando isso ao aumento da maciez da carne em músculos que apresentam maior proporção desse tipo de fibra, uma vez que a função do músculo depende do fornecimento de oxigênio e do potencial para remoção de produtos, como o lactato. Já as fibras 2X, que apresentam metabolismo oxidativo/glicolítico, teriam pequena participação na maciez, pois a quantidade de capilares é menor comparada à quantidade das fibras Slow. Desta maneira, a capilarização pode influenciar o estado metabólico dos músculos no momento do abate e, conseqüentemente, na maturação da carne no período pós-abate. Normalmente, a área das fibras Slow é menor que a da 2A e 2X (ROSSER et al., 1992) e WEGNER et al. (2000) relataram que há correlação negativa entre o tamanho da fibra muscular e a maciez da carne em suínos, porém afirmaram que a precisão deste tipo de correlação em bovino ainda não está definida. Embora em nosso estudo não tenham sido avaliadas a densidade capilar e área das fibras no músculo LD nas diferentes raças, a expressão gênica diferencial e correlação negativa das expressões gênicas e protéicas da isoforma de MHC 2X com a maciez,

bem como a correlação positiva das expressões gênicas e protéicas da isoforma de MHC Slow com a maciez da carne nos dois grupos genéticos, pode indicar que estas isoformas podem interferir diretamente nesta característica. Por outro lado SEIDEMAN & CROUSE (1986) verificaram que a maciez da carne está positivamente correlacionada com a área das fibras musculares. Desta forma, músculos com maior proporção de fibras Slow tenderiam a apresentar menor grau de maciez. Contudo, segundo MALTIN et al. (2001), outros fatores podem estar relacionados à maciez, como a degradação das proteínas no *post-mortem* e o conteúdo de colágeno ao redor e entre as fibras. Assim, ao se analisar parâmetros relacionados à maciez da carne, deve-se examinar o conjunto de fatores e acontecimentos que podem influenciar o resultado final.

No presente estudo foi observada maior maciez da carne do grupo Canchim em relação ao grupo Nelore nas duas medidas de avaliação: força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar. O tempo de maturação da carne também influenciou a maciez, sendo que carne com sete dias de maturação foi mais macia do que carne com zero dia de maturação. Com relação à maciez da carne medida por meio da FC, foi verificado que todos os valores mostram que a carne em questão é macia, visto que nenhum valor foi acima do limite aceito para que a carne seja considerada macia, ou seja, 4,5 kg (SHACKELFORD et al., 1991). É importante ressaltar que a FC é um dos métodos mais utilizados para a análise da maciez da carne, tem alta correlação com a satisfação de painelistas sensoriais e consumidores e tem grande potencial para prever a maciez do contrafilé (por volta de 80% da variação) (DELGADO, 2001; KOOHMARAIE et al., 1998). O MFI é também bastante utilizado, pois prediz mais de 50% da variação da maciez da carne (HOPKINS et al., 2000), além de ser altamente correlacionado com índices de maciez como FC e painel sensorial. Assim como mostrado por OLSON et al. (1976), em nossos resultados também foi observado que com o aumento do MFI houve a diminuição dos valores obtidos pela FC. Com exceção do tempo zero, todas as médias de MFI foram acima de 60, o que significa, de acordo com CULLER et al. (1978), alta maciez para o músculo LD. Houve diferença estatística entre os dois grupos genéticos, no qual a média de MFI para a raça Canchim foi maior

em relação à raça Nelore, ou seja, os valores de FC corroboram com os valores do MFI, indicando que o grupo Canchim apresentou carne mais macia que o grupo Nelore.

Nossos resultados estão de acordo com CHANG et al. (2003), que sugerem que variação da quantidade de isoformas de MHC pode ser pequena entre animais de raças diferentes, já que foi observado que somente a quantidade da expressão gênica da isoforma 2X variou significativamente entre os grupos. A análise da expressão gênica de isoformas de MHC do músculo LD por meio de PCR quantitativo mostrou em média uma maior porcentagem relativa da expressão da isoforma Slow (62,06), uma porcentagem intermediária da isoforma 2X (20,17) e menor porcentagem da isoforma 2A (17,77) em ambos os grupos. Estes resultados estão de acordo com TOTLAND & KRYVI, 1991 e HENCKEL, 1995 que mostraram que músculos posturais, como o LD, são mais oxidativos. Já a análise da expressão de isoformas de MHC do músculo LD por meio do perfil eletroforético mostrou três bandas de intensidade variada. Assim, nos bovinos deste experimento, quantificamos a expressão de três isoformas, no qual foi observada em média uma maior porcentagem relativa da isoforma 2X (42,54), uma porcentagem intermediária da isoforma Slow (32,99) e uma menor porcentagem da isoforma 2A (24,51) nas duas raças. A expressão protéica de nenhuma isoforma variou significativamente entre os grupos. Desta maneira observamos valores discrepantes referentes à proporção de isoformas de MHC presentes no músculo LD quando comparamos os resultados das duas metodologias. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que a quantificação da expressão gênica é feita por meio do RNAs mensageiros expressos no momento da coleta do tecido, o que não implica, necessariamente, na tradução destes mRNAs. A proporção de isoformas de MHC observadas por meio da eletroforese em nosso estudo, é similar à porcentagem de fibras no músculo LD descrita por SOLOMON et al. (1985) ao avaliarem bubalinos e bovinos, no qual os três tipos de fibras estavam presentes neste músculo nos bovinos e apresentaram em média a seguinte proporção: Slow 24,5%; 2A 22,5% e 2X 46,5.

Conclusões

A menor maciez da carne do grupo Nelore em relação ao grupo Canchim pode estar relacionada com a maior expressão da isoforma de MHC 2X no grupo Nelore. E a quantidade da isoforma de MHC Slow está relacionada com uma maior maciez da carne do músculo *Longissimus dorsi*.

Referências

ALWAYS, S.E.; DEGENS, H.; KRISHNAMURTHY, G.; SMITH, C.A. Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, v. 283, p. C66-C76, 2002.

ARMSTRONG, R.B.; DELP, M.D.; GOLJAN, E.F.; LAUGHLIN, M.H.; Distribution of blood flow in muscles of miniature swine during exercise. **Journal of Applied Physiology**. v. 62, n. 3, p. 1285-98, 1987.

ASHMORE, C.R.; DOER, L. Comparative aspects of muscle after types in different species. **Experimental Neurology**, v. 31, p. 408-18, 1971.

BIRAL, D.; BETTO, R.; DANIELI-BETTO, D.; SALVIATI, G. Myosin heavy chain composition of single fibers from normal human muscle. **Biochemistry Journal**. v. 250, p. 307-8, 1988.

BRANDSTETTER, A.M.; PICARD, B.; GEAY, Y. Regional variation of muscle fibre characteristics in m. semitendinosus of growing cattle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 18, p. 57-62, 1997.

BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Archives of Neurology**, v. 23, p. 369-79, 1970.

CASSENS, R. G.; MARPLE, D. N.; COOPER, C. C. Red and white muscle. **Advances in Food Research**, v. 19, p. 1-74, 1971.

CASSENS, R. G.; MARPLE, D. N.; EIKELENBOOM, G. Animal physiology and meat quality. In **Advances in Food Research**, v.. 21, p. 71-155, 1975.

CERVIERI, R. C.; ARRIGONI, M. D. B.; OLIVEIRA, H. N. et al. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p.1590-99, 2001.

CHANG, K. C.; COSTA, N.; BLACKLEY, R.; SOUTHWOOD, O.; EVANS, G.; PLASTOW, G.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I. Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat science**, v. 64, p. 93-103, 2003.

CHIKUNI, K., MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Absence of the unctinal myosin heavy chain 2b isoform in equine skeletal muscles. **Zoological Science**, v. 21 p. 589-596, 2004a

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

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

DAL PAI-SILVA, M.; DAL PAI, V.; CARVALHO, R.F.. Célula Muscular Estriada Esquelética. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. (Eds) Células: uma abordagem multidisciplinar. **Editora Manole, São Paulo**: p83-94, 2005

DELGADO, E. F.; Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. *1 ° Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia da carne*. Campinas: CTC/ITAL, 2001.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A.G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Histochemistry Cell Biology**, v. 2, p. 105-117, 1960.

ELLIOTT, A.; OFFER, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. **Journal of Molecular Biology**, v. 123, n. 4, p. 505-519, 1978.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Effects of physical stress on muscle fibre characteristics – Relation to meat quality. **Proceedings 2nd Dummerstorf Muscle Workshop Muscle Growth and Meat Quality, Rostock**. 17-19 May 1995. pp. 65-73

FERRIANI, B. A. Fisiologia do crescimento e composição corporal em bovinos, *In: Curso de gado em confinamento potensal*. **Potensal**, p. 1-19, 2004.

FRANCK, M.; FIGWER, P.; GODFRAIND, C.; POIREL, M. T.; KHAZZAHA, A.; RUCHOUX, M. M. Could the pale, soft, and exudative condition be explained by distinctive histological characteristics? **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 746-753, 2007

GRAY SD, MCDONAGH PF, GORE RW. Comparison of functional and total capillary densities in fast and slow muscles of the chicken. **Pflügers Arch**, v. 397, p. 209-13, 1983.

HADLICH, J. C. Características do crescimento animal, do tecido muscular esquelético e da maciez da carne de bovinos nelore e mestiços no modelo biológico superprecoce. Tese (Doutorado em Zootecnia - Nutrição e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., AND WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986–994, 1996.

HENCKEL, P. Perimortal metabolic events and consequences for meat quality. **Proceedings 2nd Dummerstorf muscle workshop muscle growth and meat quality**. Rostock, 17-19 May 1995. pp. 77-82, 1995.

HOPKINS, D. L.; LITTLEFIELD, P. J.; THOMPSON, J. M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v. 56, p.19-22, 2000.

HUXLEY, H.E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, n. 886, p.1356-1365, 1969

KLONT, R. E., BARNIER, V., BROCKSL., VAN CRUIJNINGEN, C., VAN DIJK, A., EIKELENBOOM, G., HOVING BOLINK, A. H. ADN OLIVER, A. (1998) Colour, colour stability and ageing rate of different veal muscles in relation to preslaughter blood hemoglobin content. ID-DLO report 98.011, ID-DLO, Lelystad.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Reciprocal. Meat Conference Proceedings**, v. 4, p. 89, 1998.

KRAUS, W.; TORGAN, C.E.; TAYLOR, D.A. Skeletal muscle adaptation low frequency motor nerve stimulations. **Exercise and Sport Science Review**, v. 22, p. 313-360, 1994.

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

LOWEY, S.; SLAYTER, H.S.; WEEDS, A.G.; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **Journal of Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 1-29, 1969.

LUCHIARI FILHO, A. Perspectivas da bovinocultura de corte no Brasil. *In*: Simpósio sobre produção intensiva de gado de corte, 1998, Campinas. Anais... Campinas: **CBNA**, p.1-10, 1998.

MACCATROZZO, L.; PATRUNO, M.; TONIOLO, L.; REGGIANI, C; MASCARELLO, F. Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle. **European Journal of Histochemistry**, v. 49, p. 357-366, 2004.

McCOMAS, A.J. Skeletal Muscle: Form and Function. Champaign, Ill: **Human Kinetics**; 1996.

MALTIN, C. A.; LOBLEY, G. E.; GRANT, C. M.; MILLER, L. A.; KYLE, D. J.; HORGAN, G. W.; MATTHEWS, K. R.; SINCLAIR, K. D. Factors influencing beef eating quality 2. Effects of nutritional regimen and genotype on muscle fibre characteristics. **Animal Science**, v. 72, p. 279-287, 2001.

MILLER, M.F.; CARR, M.A.; RAMSEY, C.B. et al. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**. v.79, p. 3062-3068, 2001.

OGATA, T.A. Histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. **Acta Medica Okayama**; v. 12, p. 233-40, 1958.

OLSON, D. G.; PARRISH, F. C. JR.; STROMER, M. H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 1036-41, 1976.

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

PETTE, D.; PEUKER, H.; STARON, R.S. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 166, p. 261–278, 1999

PETTE, D.; STARON, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres. **Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 116, p. 2-76, 1990b.

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

PETTE, D.; STARON, R.S.; Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry Cell Biology**, v. 115, p. 359-372, 2001.

PICARD, B.; CASSAR-MALEK, I. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. **Meat Science**, v. 82, n. 1, p. 30-36, 2009.

PICARD, B.; BARBOIRON, C.; DURIS, M.P.; GAGNIÉRE, H.; JURIE, C.; GEAY, Y. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. **Meat Science**, v. 53, p. 1-7, 1999.

RANVIER, L. Properties et structures differentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. CR **Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v. 7, p. 2062-2072, 1876.

RIVERO, J. L. L.; TALMADGE, R. J.; EDGERTON, V. R. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: An immuno-histochemical and electrophoretic study. **Anatomical Record**, v.246, n.2, p. 185-194, 1996.

ROSSER, B. W. C.; WICK, M.; WALDBILLIG, D. M.; BANDMAN, E. Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fibre types of mature avian pectoralis muscle. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, n. 5, p. 115-128, 1996.

ROSSER, B. W. C.; NORRIS, B. J.; NEMETH, P. M. Metabolic capacity of individual fibres from different anatomic locations. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 207-210, 1992.

SANCHEZ, H.; CHAPOT, R.; BANZET, S.; KOULMANN, N.; BIROT, O.; BIGARD, A. X.; PEINNEQUIN, A. Quantification by Real-Time PCR of Developmental and Adult Myosin mRNA in Rat Muscles. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n1, p. 165-174, 2006

SANDERS, S.K.; MORGAN, J.B.; WULF, D.M.; ET AL. Vitamin E supplementation of cattle and shelf-life of beef for the Japanese market. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2634-2640, 1997.

SANGER, A.M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston IA. Muscle Development and Growth. Fish Physiology Series. San Diego: Academic Press; p. 187- 250, 2001.

SAVELL, J.W.; BRANSON, R.E.; CROSS, H.R.; STIFFLER, D.M.; WISE, J. W.; GRIFFIN, D. B.; SMITH, G. C. National consumer retail beef study: Palatability evaluations of beef loin steaks that differed in marbling. **Journal Food Science**, v.52, p. 517–519, 532, 1987.

SAVELL, J.W.; CROSS, H.R.; FRANCIS, J.J.; WISE, J. W.; HALE, D. S.; WILKES, D. L.; SMITH, G. C. National consumer retail beef study: Interaction of trim level, price and grade on consumer acceptance of beef steaks and roasts. **Food Quality**. V.12, p. 251–274, 1989.

SAZILI, A.; PARR, T.; SENSKY, P.L.; JONES, S. W.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. **Meat science**, v. 69, p. 17 – 25, 2005.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiology Review**. V. 76, p. 371-423, 1996.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**, v. 77 n. 2. p. 493–501, 1994.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S.A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v. 81, n. 11, p.1810-1816, 2001.

SEIDEMAN, S. C.; CROUSE, J. D. The effects of sex condition, genotype and diet on bovine muscle fibre characteristics. **Journal of Animal Science** v.63, n. 6, p. 1824-1829, 1986.

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

SILAU AH, BRANCHERO, N. Skeletal muscle fiber size and capillarity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 158, p. 288-91, 1978.

SILVEIRA, A. C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.D.B. et al. Produção do novilho superprecoce. *In*: 5º Simpósio sobre bovinocultura de corte, Piracicaba. Anais Piracicaba: **FEALQ**, p.227-241, 2004.

SOLOMON, M. B.; WEST, R. L.; CARPENTER, J. W. Fiber types in the longissimus muscle from water buffalo and selected domestic beef breeds. **Meat Science**, v. 13, p. 129–135.

SPAGENBURG E. E.; BOOTH, F. W. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, p. 413–424, 2003.

STARON, R.S. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy Chain composition in single human muscle fibers. **Histochemistry**, v. 96, p. 21-4, 1991.

STARON, R.S.; PETTE, D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain based fibre types in rat skeletal muscle. **Histochemistry**, v. 100, p. 149-53, 1993.

STARON, R.S.; KRAEMER, W.J.; HIKIDA, R.S.; FRY, A. C.; MURRAY, J. D.; CAMPOS, G. E. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochem Cell Biology**, v. 111, p. 117-23, 1999.

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

TONIOLO, L.; MACCATROZZO, L.; PATRUNO, M.; CALIARO, F.; MASCARELLO, F.; REGGIANI, C. Expression of eight distinct MHC isoforms in bovine striated muscles: evidence for MHC-2B presence only in extraocular muscles. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 4243–4253, 2005.

TOTLAND, G. K.; KRYVI, H. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). **Anatomy and Embryology**, v. 184, p. 441-450, 1991.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 18, n. 7, research0034, 2002.

VESCOVO, G.; CECONI, C.; BERNOCCHI, P.; FERRARI, R.; CARRARO, U.; AMBROSIO, G.B.; LIBERA, L.D. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. **Cardiovascular Research**, v.39, n.1, p.233-41, 1998.

XIONG, Y.L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 293–320, 1994.

WEEDS, A.G.; LOWEY, S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. **Journal of Molecular Biology**, n. 3, p. 379-421, 1971.

WEGNER, J.; ALBRECHT, E.; FIEDLER, I.; TEUSCHER, F.; PAPSTEIN, H. J.; ENDER, K. Growth and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1485-1496, 2000.

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

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

WINER, J.; JUNG, C. K.; SHACKEL, I.; WILLIAMS, P. M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 41–9, 1999.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F.; Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

ZHONG, W. W.; LUCAS, C. A.; KANG, L. H.; HOH, J. F. Electrophoretic and immunochemical evidence showing that marsupial limb muscles express the same fast and slow myosin heavy chains as eutherians. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1016-1020, 2001.

CAPÍTULO 3 - IMPLICAÇÕES

A pecuária brasileira passa por um momento de grande importância, atravessa a barreira de uma pecuária produtora de commodities para uma pecuária que elabora produtos diferenciados, padronizados e com qualidade. O Brasil já possui o maior rebanho e já está entre os maiores exportadores. Agora o grande desafio é aliar a “quantidade” à “qualidade”, e para isso inúmeros são os caminhos a serem seguidos tanto pelos pecuaristas como pela indústria frigorífica. Dentre as principais exigências com relação à carne bovina, a maciez é a de maior destaque e é a que sofre intensa influência de muitos fatores, e entre eles, raça e idade. Isto se dá, principalmente, devido à idade de abate utilizada no Brasil ser um pouco avançada e o rebanho ser basicamente de animais azebuados

O desenvolvimento muscular do animal repercute nas características quantitativas e qualitativas da carcaça e, nesse contexto, as fibras musculares possuem grande importância. Entretanto, vários fatores precisam ser analisados em conjunto para que permitam o entendimento e a elucidação do fenômeno do crescimento e o seu reflexo nos aspectos qualitativos da carne. Assim como a determinação do melhor peso de abate de um animal está relacionada à razão custo/benefício da produção, onde fatores como tipo e objetivo da criação precisam ser considerados.

A quantificação das isoformas da MHC do presente trabalho demonstrou ser uma eficiente ferramenta para avaliar a maciez da carne bovina. Em bovinos a quantificação destas isoformas torna possível o estabelecimento de correlações das mesmas com métodos como força de cisalhamento e MFI, utilizados para a avaliação da maciez da

carne *postmortem*. O quanto e como cada isoforma da MHC influencia na maciez da carne ainda não é bem definido, porém futuros estudos podem contribuir para a relação de cada isoforma com a maciez da carne de bovinos.