
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATANI IRIS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BOVINOS DE
ORIGEM *Bos indicus* E SEUS CRUZADOS PARA A
MACIEZ DE CARNE**

NATANI IRIS PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BOVINOS DE ORIGEM *Bos indicus* E SEUS CRUZADOS PARA MACIEZ DE CARNE

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA CASSIANO LARA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de bacharela em ciências biológicas.

Rio Claro
2015

574.88 Pereira, Natani Iris
P436c Caracterização molecular de bovinos de origem Bos indicus e seus cruzados para maciez de carne / Natani Iris Pereira. - Rio Claro, 2015
82 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Cassiano Lara

1. Biologia molecular. 2. Marcador molecular. 3. Calpaína. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, que sempre me deram tanto apoio e suporte. Ensinarão-me a ser tudo o que sou hoje, e vejo o quanto isso foi essencial para que eu chegasse tão bem até aqui. Agradeço também à minha irmã, Bruna e minha prima Giovana por todos os momentos juntas.

À minha orientadora Dra. Lara, que gentilmente me abriu as portas de seu laboratório e me deu seu voto de confiança, agradeço por toda a paciência e pela grande ajuda concedida, sem contar os ótimos momentos de descontração, é sem dúvidas uma grande pessoa que admiro imensamente.

Aos colegas de laboratório, os que permanecem e aos que tomaram novos rumos, os quais sempre foram amigos com quem compartilhei muitas experiências e muitas risadas, Jeniffer, Sinara e Ana Carolina, muito obrigada pelos momentos juntas.

Agradeço à Gunta e Weber por todo aprendizado que me passaram e a paciência que tiveram. São muito importantes em toda bagagem que levo.

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa por me receber e ao PIBIC pelo auxílio.

À todos os meus colegas de graduação, sem exceções, mantenho boas recordações que certamente serão levadas pelo resto de minha vida. Foi realmente muito bom tê-los conhecido.

Agradeço em especial às minhas grandes amigas Ayumi e Daniela. São pessoas muito queridas e serão sempre guardadas com um carinho especial. Foi simplesmente excepcional conviver com vocês. Muito obrigada por tudo! Agradeço também ao Caio e Kenny.

E por último agradeço ao meu amor, Luiz, além de ser um noivo sem igual, é meu melhor amigo e confidente. Agradeço por todo suporte e amparo que tem me dado nesse último ano, à calma que me passa em momentos turbulentos, e as grandes risadas juntos, obrigada por estar sempre ao meu lado, seja qual for o momento. Amo você!!

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

(John Ruskin)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi conhecer a variabilidade genética da calpaína e seu potencial como marcador molecular para programas de melhoramento genético, visando auxiliar na seleção de genótipos superiores para maciez de carne zebuína.

Para tanto foram analisados 55 animais da raça Nelore, proveniente de outros projetos de pesquisa conduzidos pela equipe técnica do Laboratório de Genética do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa. Os animais foram abatidos ao atingirem o acabamento de 4 mm de espessura de gordura e a amostra de carne foi coletada entre a 12^a e 13^a costelas no músculo *Longissimus dorsi*.

A maciez de carne foi avaliada empregando-se a técnica de *Warner Bratzler Shear Force* em 0 e 14 dias de maturação. O DNA foi extraído a partir das amostras de carne, em seguida foi quantificado e diluído para ser amplificado por PCR. Três polimorfismos foram investigados pelas técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP, localizados no exon 9, exon 14 e intron 17 do gene calpaína, sendo denominados CPN316, CAPN530, CAPN4751, respectivamente.

Os resultados da análise de associação entre os dados de força de cisalhamento (FC) e marcadores moleculares revelaram efeito significativo apenas para o marcador CAPN4751. O alelo C, considerado favorável para maciez de carne, apresentou relação significativa ($P > 0,05$) com valores menores de FC, sugerindo o seu emprego na seleção de genótipos superiores para maciez de carne de bovinos da raça Nelore.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Localização genômica dos marcadores SNP do gene da calpaína.....	23
Figura 2: Sítio de restrição de BsaJI.....	34
Figura 3: Sítio de restrição de BtgI.....	34
Figura 4: Sítio de restrição da enzima Ava II.....	34
Figura 5: Aparelho tipo <i>Warner-Bratzler Shear</i> fabricado por <i>G-R Electrical Manufacturing Company</i> e os cortes feitos por ele.	37
Figura 6: Carnes antes do cozimento com termômetro	37
Figura 7: Fragmentação da amostra e representativo da incubação overnight.....	38
Figura 8: Espectrofotômetro.....	40
Figura 9: Ilustrativo de gel de RFLP referente à CAPN530.....	50
Figura 10: Ilustrativo de Gel de SSCP referente à CAPN 4751.....	51
Figura 11: Representativo da fragmentação dos alelos G e C pela atuação da enzima BtgI	52
Figura 12: Padrões de bandas da eletroforese referente à CAPN 316.....	53
Figura 13: Gel de RFLP ilustrando o SNP (C/G) no exon 9 do gene Calpaina (CAPN316);.....	54
Figura 14: Representativo da fragmentação dos alelos A e G pela atuação da enzima Ava II.	55
Figura 15: Padrões de bandas da eletroforese referente à CAPN 530.....	55

Figura 16: Gel de RFLP referente às análises de padrão de migração para o marcador 530	56
Figura 17: Representativo da fragmentação dos alelos C e T pela atuação da enzima BsaJ1.....	57
Figura 18: Padrões de bandas da eletroforese referente à CAPN 4751.....	57
Figura 19: Gel de RFLP referente às análises de padrão de migração para o marcador 4751.	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Referência de cada marcador e acesso no GenBank.....	27
TABELA 2- Caracterização dos marcadores de interesse.....	28
TABELA 3- Sequência dos <i>primers</i> forward e reverse de cada marcador.....	28
TABELA 4- Equivalências da absorvância de 260 nm.....	39
TABELA 5- Equivalência de cada absorvância.....	40
TABELA 6- Quantidades de reagentes e <i>primers</i> empregados para a amplificação do fragmento de 839 pb, referente ao SNP no exon 9 do gene Calpaína - CAPN316.....	43
TABELA 7 – Programa de PCR para CAPN 316.....	43
TABELA 8- Quantidades de reagentes e <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR do fragmento de 318 pb, referente ao SNP localizado no exon 14 do gene Calpaína – CAPN530.....	44
TABELA 9- Programa de PCR para CAPN 530.....	44
TABELA 10- Quantidades de reagentes e <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR do fragmento de 359 pb, referente ao SNP no intron 17 do gene Calpaína- CAPN45.....	45
TABELA 11- Programa de PCR para CAPN 4571.....	45
TABELA 12- Especificações para o preparo do gel de agarose a 1% e condições eletroforéticas.....	46

TABELA 13- Produtos e quantidades necessárias para reação de hidrólise para a identificação do SNP (C/G) no nucleotídeo 5709, localizado no exon 9 do gene Calpaína (CAPN316)..	47
TABELA 14- Produtos e quantidades necessárias para a reação de hidrólise para a identificação do SNP (G/A) no nucleotídeo 4558, localizado no exon 14 do gene Calpaína (CAPN530).....	48
TABELA 15- Produtos e quantidades necessárias para a reação de hidrólise para a identificação do SNP (C/T) no nucleotídeo 6545 localizado no intron 17 do gene Calpaína (CAPN4751).....	48
TABELA 16- Estimativa de frequências genótípicas para cada marcador.....	59
TABELA 17- Estimativa de frequências alélicas para cada marcador.....	59
TABELA 18- Valores médios da força de cisalhamento na carne não maturada e com maturação de 14 dias, valores máximos e mínimos observados	61
TABELA 19- Resultados referentes à genotipagem de todas as amostras estudadas	74
TABELA 20- Resultados das forças de cisalhamento médias para cada amostra	76
TABELA 21- Todos os seis valores encontrados para força de cisalhamento na carne maturada aos 14 dias.....	78
TABELA 22 - Todos os seis valores encontrados para força de cisalhamento na carne não maturada	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO LITERÁRIA	12
2.1. Histórico Nacional e Perspectivas de Consumo.....	12
2.2. Comparativo entre <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	13
2.3. Composição da carcaça	15
2.4. Maciez.....	16
2.5. Melhoramento genético.....	18
2.6. Marcadores moleculares.....	19
2.7. Calpaína.....	21
2.8. Marcador molecular no gene da calpaína.....	22
2.8.1. Polimorfismo em μ -calapína e em m-calpaína	22
2.8.2. CAPN 316	24
2.8.3. CAPN 530	24
2.8.4. CAPN 4751	24
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Material	27
4.1.1. Material de estudo	27
4.1.2. Genes investigados.....	27
4.1.3. Reagentes e soluções.....	29
4.2. Métodos.....	36
4.2.1. Coleta do material	36
4.2.2. Avaliação de carcaça.....	36
4.2.3. Extração de material genético	37
4.2.4. Quantificação e diluição.....	39
4.2.5. PCR	41
4.2.6. Eletroforese em gel de agarose	46
4.2.7. Hidrólise.....	47
4.2.8. A técnica de RFLP	48
4.2.9. A técnica de SSCP	50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Caracterização de informações genóticas avaliadas	52
5.1.1. CAPN 316	52
5.1.2. CAPN 530	54
5.1.3. CAPN 4751	56
5.1.4. Estrutura genética da população para marcadores de interesse	58
5.2. Caracterização de informações fenotípicas da população.....	60
5.3. Avaliação dos marcadores de interesse sobre a maciez da carne.....	61
5.3.1. CAPN 316	61
5.3.2. CAPN 530	62
5.3.3. CAPN 4751	62
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. ANEXOS	74
8.1. Anexo 1- Resultados da genotipagem.....	74
8.2. Anexo 2- Resultados relativos à força de cisalhamento média.....	76
8.3. Anexo 3- Resultados da força de cisalhamento da carne maturada	78
8.4. Anexo 4- Resultados da força de cisalhamento para carne não maturada	80

1. INTRODUÇÃO

A principal característica observada pelo consumidor no momento de avaliar a qualidade da carne é a sua maciez. Com isso e com a crescente necessidade de aumentar a qualidade do produto, a maciez é o foco de diversas pesquisas que já identificaram genes diretamente ligados a ela.

Quando do abate do animal inicia-se na musculatura estriada, uma série de transformações químicas e físicas, que culminam na rigidez da carcaça (*rigor mortis*). Este processo, denominado conversão do músculo em carne, prossegue com degradações enzimáticas e desnaturação protéica, causando uma pseudo resolução do *rigor mortis*, que tornará menos rígida a carcaça. Um sistema com essa finalidade é a proteinase dependente de cálcio (calpaína).

A compreensão de como estes genes podem interagir tanto com o ambiente como com outros genes ao longo da proteólise *post mortem*, pode ser importante para o entendimento do processo responsável pelo amaciamento da carne, especialmente em *Bos indicus taurus* que possuem uma carne mais dura que *Bos taurus taurus*.

Segundo a literatura, não há marcadores eficientes para *Bos indicus* já que aqueles úteis para *Bos taurus*, em geral, não apresentam variabilidade genética. Com base nisso, o foco deste trabalho foi investigar três regiões do gene codificador da enzima proteolítica calpaína, que influencia o *rigor mortis*, e a sua relação com a maciez de carne em bovinos da raça Nelore.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. Histórico Nacional e perspectivas de consumo

Nas últimas décadas houve um extraordinário aumento no consumo de produtos de origem animal. Com o crescimento econômico e contínuo aumento na afluência em vários países, nos próximos anos haverá uma explosão no consumo de carne e leite. Estas mudanças terão impacto mais significativo nos países em desenvolvimento. As previsões dos modelos econômicos indicam que a demanda por produtos animais continuará a aumentar, em ritmo acelerado, pelo menos até 2025. As previsões são de uma taxa de aumento crescente no consumo de carne e leite, particularmente em países com a maior proporção da população mundial (DELGADO, 2000).

Segundo dados da FAO e IFPRI, o consumo mundial de carnes (bovina, ovina, suína e frangos) em 1980 foi 94 milhões de toneladas, em 2000 esse consumo cresceu para 227 milhões (BANSBACK, 2001) e no ano de 2020 a demanda será de pelo menos 303 milhões de toneladas (DELGADO et al., 2001). Se a participação da carne bovina nesse total se mantiver inalterada, aproximadamente 23%, 70 milhões de toneladas produzidas serão de carne bovina. Se o Brasil continuar com os 15% do mercado mundial e o consumo interno estabilizado, na pior hipótese, será necessário que o país produza ao menos 10,5 milhões de toneladas de carne bovina, somente para atender a sua fatia do mercado, segundo IBGE (2010).

A pecuária brasileira mostrou avanços nos últimos anos e tem importante papel na evolução da economia e do desenvolvimento do País. Em 2007, do total de R\$ 2,5 trilhões do produto interno bruto do Brasil, cerca de 7% (R\$ 185 bilhões) resultou do agronegócio pecuário (CEPEA, 2008), demonstrando que a pecuária bovina participou com parcela importante nesses números.

Quando se trata de agronegócio, o Brasil tem destaque no cenário mundial por sua cultura de bovinos, já que é líder em exportações desde o ano de 2004 com um quinto da carne comercializada internacionalmente, segundo dados do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). Quanto às vendas, o Brasil fornece carne para 104 países atualmente, enquanto que em 2002 exportava para 80 países (MORAES, 2004 apud BeefPoint).

O crescimento do Brasil no mercado mundial de produção de carne bovina mostrou um aumento de 251% do tamanho de seu rebanho em 50 anos, entre os anos de 1960 até 2010, segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2010). Além disso, hoje o Brasil se encontra em segundo lugar no que se trata do tamanho de rebanho efetivo mundial, com cerca de 204 milhões de cabeças de gado, conforme dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010).

O desafio atual da cadeia de produção é oferecer um produto de exímia qualidade, aumentando o consumo da mesma e padronizando a alta qualidade do produto final, pois o que mantém o consumo é a qualidade do produto.

O sucesso das exportações brasileiras se deve justamente à melhora da qualidade da carne. Segundo Yassu (2004), o avanço da exportação se deve aos ganhos da pecuária em melhoramento genético, ganhos de produtividade, redução da idade do abate e também pelo reconhecimento do status sanitário brasileiro por muitos países.

Dadas as exigências do mercado e sua relação com o aumento da produção, torna-se cada vez mais crescente a demanda por carnes macias, suculentas e saudáveis, favorecendo o estudo de novas tecnologias para suprir tal demanda. Com isso, para o país aumentar a produção e manter os mercados ou conquistar novos, inclusive de melhor remuneração, é necessário ter competitividade, ou seja, é preciso que o setor tenha bom desempenho e seja eficiente, para disponibilizar produtos de qualidade a preços acessíveis. Nesse contexto, melhorias do potencial genético dos animais e sua adequação ao ambiente e ao manejo continuam sendo pontos importantes para se alcançar maior eficiência dos sistemas (ALENCAR, 2004).

2.2.Comparativo entre *Bos taurus* e *Bos indicus*

A introdução de bovinos no Brasil teve sua origem concomitante à colonização do país, com a introdução de bovinos de raça europeia, *Bos primigenius taurus*, que, acostumados com clima europeu, tiveram que se adaptar ao clima tropical o que gerou uma grande seleção natural. Atualmente, podemos encontrar a herança desses rebanhos nas raças típicas ou nativas, como Caracu, Crioulo Lageano, Curraleiro, Malabar, Junqueira, Mocho Nacional, Pantaneiro, (GIANNONI e GIANNONI, 1987; OLIVEIRA et al., 2012; STEIGLEDER et al., 2004; LARA et al, 2011; EGITO et al., 2014).

No início do século XIX, iniciaram-se as importações de gado Zebu, importado em maior escala mais tarde, primeiramente como fonte de energia para os transportes da época (MARIANTE & CAVALCANTE, 2000). Mas foi no início do século XX que houve, provavelmente, a introdução definitiva do Zebu indiano no Brasil (EUCLIDES FILHO & FIGUEIREDO, 2003). Por se tratar de uma raça rústica e de forte adaptação climática em ambientes tropicais, o zebu, como é conhecido, levou ao desaparecimento de diversas raças nativas, principalmente por competição por espaço (GIANNONI e GIANNONI, 1987).

Atualmente, a pecuária nacional se baseia em sua plenitude em animais da raça Nelore, 80% de origem *Bos indicus* (CARVALHO, 2008). Os *Bos indicus* são animais indianos e africanos, possuidores de cupim, que é uma corcova dorsal utilizada como reserva energética pelos animais enquanto que os *Bos taurus* são animais europeus e não apresentam cupim (DEL LAMA, 1991).

De maneira geral, os zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como a algumas doenças infectocontagiosas (TURNER, 1980). Os taurinos, por sua vez são menos adaptados ao clima tropical e apresentam maior suscetibilidade às doenças e infestações parasitárias, porém, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos. Animais *Bos taurus* iniciam a vida reprodutiva antes dos *Bos indicus* (SENGUER, 1999). Taurinos apresentam, também, carne com maior maciez e marmorização em comparação com *Bos indicus* (WHEELER et al., 1996).

O cruzamento entre as espécies zebuínas e taurinas é utilizado como forma rápida de melhorar a eficiência de características de produção, tanto pela otimização do mérito genético aditivo de diferentes raças, explorando a variação genética existente entre elas, como também pela complementaridade entre as diferentes raças promovendo a heterose (PEREIRA, 2004). Assim, o conhecimento de que as características fenotípicas são herdáveis, possibilitou o controle de acasalamentos, seleção dos melhores reprodutores para determinadas características (FORTES, 2007).

A seleção clássica, no entanto, é baseada no fenótipo do indivíduo e, em muitas situações, o fenótipo não se expressa no indivíduo para características ligadas ao sexo, como leite, ou em características de difícil mensuração como eficiência alimentar, resistência a doenças e adaptação (MARTINEZ & MACHADO, 2002), maciez de carne (LARA et al., 2012).

A utilização de testes de DNA que identificam o potencial genético dos indivíduos pelo uso de biotecnologia, mesmo em idades muito jovens, apresenta uma alternativa cada vez mais promissora para auxílio em programas de melhoramento genético de bovinos de corte.

2.3. Composição de carcaça

Historicamente, a carne dos bovinos de origem zebuína (*Bos taurus indicus*) é considerada dura, principalmente pela justificativa de que esses animais são criados extensivamente e, em geral, abatidos em idades mais avançadas, quando comparados com raças europeias mais precoces (*Bos taurus taurus*) ou cruzados (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*) (LARA et al, 2012). Justifica-se também essa menor maciez pela relação entre a idade do abate, aumento do número de ligações cruzadas termoestáveis do colágeno dos músculos, a menor deposição de gordura nas carcaças e por não apresentar gordura intramuscular (marmorização), o que favorece o resfriamento mais rápido das massas musculares, causando o encurtamento dos sarcômeros e, conseqüentemente, o endurecimento da carne. Diante desse diagnóstico, foi preconizado que com modificações no sistema de produção, visando obter carcaças com maior cobertura de gordura e oriundas de gado mais jovem, resolveria a maioria dos problemas da carne zebuína. Entretanto, essa expectativa praticamente não se confirmou e os zebuínos, mesmo quando abatidos mais cedo e com boa cobertura de gordura, não têm sido capazes de produzir carne com maciez aceitável, sendo definida como aquela que apresenta força de cisalhamento (FC) inferior a 4,5Kg (OLIVEIRA, 2000).

Assim, embora os zebuínos sejam os animais que melhor se adaptem às condições tropicais, principalmente naquelas regiões onde o estresse térmico e presença de parasitas (ectos e endo) limitam a produtividade das raças taurinas, estes tiveram que ceder espaço e compor um genótipo com as raças taurinas na produção dos cruzamentos industriais.

Um dos estudos pioneiros correlacionando a maciez com a presença de genes zebuínos e taurinos foi realizado por Whipple et al. (1990). Esses autores concluíram que carnes oriundas de bovinos com mais de 50% de sangue zebu tendiam a ser mais duras que aquelas provenientes de cruzamentos com menos de 50%. O fator apontado como principal causa envolvida era a elevada atividade da calpastatina, principalmente no período 24

horas *post-mortem*, a qual inibe a ação das calpaínas, sendo indicadas como responsáveis por até 44% da variação na maciez observada na carne desses dois grupos de bovinos.

2.4.Maciez

Maciez pode ser atribuída à percepção sensorial (paladar) que o consumidor tem da carne, como: resistência à língua, à pressão do dente, aderência e resíduo pós-mastigatório, ou seja, uma diversidade de fatores fortemente subjetivos (BELCHER et al. 2007; MUCHENJE et al. 2009).

A maciez da carne pode ser medida por meio subjetivo ou objetivo. O método subjetivo se utiliza de painel sensorial em que um grupo de pessoas treinadas classifica a carne em relação à maciez após ter provado suas amostras. O método objetivo utiliza o texturômetro, que mede a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal de carne e, quanto maior a força dispensada, menor é a maciez apresentada pelo corte de carne (ALVES et al. 2005; RAMOS & GOMIDE, 2007). Segundo Bouton *et al.* (1971), os dois métodos possuem alta correlação entre si ($r=0,82$, $P<0,001$). Boleman et al. (1997) determinaram a capacidade de percepção, por parte dos consumidores de carne nos Estados Unidos, para diferentes níveis de maciez medidos por força de cisalhamento e concluíram que esses consumidores não só foram capazes de detectar as diferenças em maciez, como estariam dispostos a pagar mais pelas carnes mais macias.

Dentre os fatores que influenciam a maciez da carne, destacam-se: genética, raça, idade ao abate, sexo, alimentação, uso de agentes hormonais (agentes b-adrenérgicos) e tratamentos *post-mortem* (OLIVEIRA, 2000; LUCHIARI-FILHO, 2000). Dentre os fatores *ante-mortem*, a raça está altamente correlacionada com a maciez de carne (ALVES et al. 2005; MUCHENJE et al. 2008). Koohmaraie (1992) e Koohmaraie & Geesink (2006) atribuíram 15% da variabilidade na maciez da carne bovina às diferenças em marmoreio e colágeno, já maior parte dos 85% restantes, às variações nas alterações *post-mortem*, ou seja, no processo enzimático que leva ao amaciamento da carne, conhecido como maturação.

Existem três sistemas enzimáticos responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas: o sistema das catepsinas, o complexo multicatalítico de proteases (MCP) e o sistema enzimático das “calpaínas” (ALVES & MANCIO, 2007).

As catepsinas são as proteases ácidas presentes nos lisossomas, tendo como substratos a actina, a miosina e a linha Z (KOOHMARIE, 1994). Uma importante característica dessas catepsinas é que elas atuam até em pH mais baixo ($pH<6,0$) do que as calpaínas, e degradam

não só proteínas miofibrilares (como as calpaínas fazem) como também exercem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), o que pode indicar um sinergismo com o sistema enzimático das calpaínas.

O complexo multicatalítico de proteases (MCP) atua preferencialmente em peptídeos, em pH neutro ou alcalino, e em temperaturas de 45°C, apresentando por esta razão pouca importância (ALVES & MANCIO, 2007).

Gollet *al.* (1992), com base em algumas evidências, ressaltaram que as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais da tenderização *post-mortem* da carne. O sistema enzimático das “calpaínas” é formado por duas calpaínas (proteínase ativada por concentração micro molar de cálcio, ou m-calpaína, ou calpaína tipo I e, proteínase ativada por concentração milimolar de cálcio ou m-calpaína ou calpaína tipo II). Essas calpaínas são ativadas pelo cálcio livre (não retido no retículo sarcoplasmático ou nas mitocôndrias) e inibidas por uma enzima denominada calpastatina (KOOHMARAIE, 1992).

Algumas das evidências de Gollet *al.* (1992) de que as calpaínas sejam as principais responsáveis pelo amaciamento *post-mortem* foram transcritas e relacionadas por Taylor *et al.* (1995), a saber:

- 1) Mínima degradação da actina e miosina ocorre durante as primeiras 72 horas de estocagem a 2-4°C. A maior parte do amaciamento, no entanto, ocorre neste período. Sabe-se que as calpaínas são as únicas enzimas proteolíticas que não degradam actina e miosina;
- 2) Mínima degradação da α -actinina, a principal proteína da linha Z, ocorre durante as primeiras 72 horas de maturação. Sabe-se que as calpaínas são as únicas enzimas que degradam a estrutura da linha Z e liberam a α -actinina desta estrutura sem degradá-la;
- 3) Importantes estudos têm mostrado que aumentar a concentração de cálcio no músculo resulta em aumento da maciez. Sabe-se que nenhuma das catepsinas nem as proteases multicatalíticas são ativadas por cálcio;
- 4) Muitos estudos têm mostrado que um maior amaciamento, por um grande período de maturação, ocorre em músculos que contêm grandes quantidades de calpaínas (principalmente, m-calpaína) ou baixa atividade de calpastatina. Baixa atividade de calpastatina está diretamente associada com maior maciez *post-mortem*.

Polimorfismos associados a esses genes são marcadores de grande interesse e já disponíveis comercialmente em painéis para *Bos taurus*, que estão relacionados entre outros, à maciez da carne, ao crescimento muscular, à deposição de gordura subcutânea, à marmorização da carne, à biossíntese e ao metabolismo lipídico e ao perfil de ácidos graxos (THALLER *et al.*, 2003; TANIGUCHI *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2005; WHITE *ET AL.*,

2005; MICHAL et al., 2006). Todavia, a aplicabilidade desses marcadores em populações de *Bos indicus* necessita de validação (HOCQUETTEET al., 2007).

2.5. Melhoramento genético

O melhoramento de bovinos de corte no Brasil mudou e vem mudando significativamente nos últimos anos. O melhoramento científico-tecnológico vem substituindo gradativamente aquele realizado de forma empírica. Isto tem ocorrido por uma série de razões, das quais se pode listar a popularização do conhecimento científico na área de melhoramento genético, o aumento do número de pesquisadores na área e de melhoristas em atividade (SCHENKEL, 2000).

A demanda por sistemas de produção mais eficientes e competitivos vem incentivando o emprego da biotecnologia no melhoramento animal, visando maximizar o ganho genético. Isso porque, as estratégias tradicionais nas quais se utiliza o cruzamento de animais com características comercialmente interessantes, em geral, resultam mudanças lentas no progresso genético. No caso dos bovinos, que têm um intervalo de geração de três a quatro anos, um programa de melhoramento tradicional pode envolver anos de trabalho e, não atingir os seus objetivos. Neste contexto, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico ocorrido na última década, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio das ferramentas da biologia molecular (LARA, 2010).

A principal vantagem da utilização de ferramentas moleculares é a precocidade de avaliação dos animais para as características específicas, uma vez que esta tecnologia permite análises dos indivíduos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante as fases embrionárias, podendo inclusive ser incorporada a programas de produção *in vitro* e de transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética e produção animal (GARCIA, 2001; GARCIA E PORTO-NETO, 2006).

Existem diferenças genéticas, por exemplo, quanto ao grau de marmoreio e a atividade da calpastatina, características que, entre outras, estão ligadas à maciez da carne. Os custos na obtenção dessas informações, entretanto, limitam sua utilização em programas de melhoramento. A determinação de critérios de seleção diretos ou indiretos para maciez de carne, de aplicação mais fácil, é um desafio a ser vencido pela pesquisa. No Brasil, existem projetos de pesquisa em que está sendo avaliada a possibilidade de seleção (quantitativa e molecular) para maciez da carne no Nelore. (ALENCAR, 2004, LARA et al, 2012)

Segundo Packer & Paz (2001), as perspectivas para o melhoramento genético das diferentes espécies animais têm sido continuamente influenciadas pelos avanços de várias áreas das ciências afins e a era da biotecnologia tem despertado grandes expectativas quanto aos seus efeitos na teoria e na prática do melhoramento genético animal. Ainda segundo os mesmos autores, a biotecnologia, no sentido de aplicação dos conhecimentos biológicos às necessidades práticas, tem e terá impacto no melhoramento genético animal sob dois grandes enfoques, o primeiro compreendendo as tecnologias da reprodução animal, as quais operam ao nível das células (espermatozoides e óvulos), ovo e embrião, e o segundo, as técnicas moleculares, que podem ser usadas para localizar, identificar, comparar e eventualmente manipular os genes, operando, portanto, ao nível do DNA.

As avaliações genéticas de bovinos de corte no Brasil deverão considerar as informações adicionais disponibilizadas por marcadores genéticos, incorporando-as nos planos de acasalamentos (ALENCAR, 2004).

Portanto, para que a genética molecular possa ser definitivamente incorporada nos programas de melhoramento de bovinos de corte no Brasil, é essencial que se realizem estudos da associação entre marcadores moleculares e características de produção, de maneira a se definirem estratégias de seleção. Segundo Alencar (2004) parte do progresso alcançado pelo setor produtivo de carne bovina do país foi consequência do melhoramento genético dos rebanhos. As pressões de mercado e de competitividade impostas sobre o setor continuam a exigir melhorias do potencial genético dos animais e sua adequação ao ambiente e ao manejo. A definição mais clara de objetivos de seleção facilitará o desenvolvimento de critérios de seleção mais adequados aos sistemas de produção e às exigências de mercado. As informações disponibilizadas por marcadores genéticos poderão ser utilizadas nos programas de melhoramento genético e biotecnologias da reprodução poderão contribuir para aumentar a intensidade de seleção.

2.6.Marcadores moleculares

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou segmentos específicos de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998). Um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético (FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998), quando é segregado na geração seguinte, o que significa que é herdável.

Estas marcas são alterações na sequência de bases ou de nucleotídeos na molécula de DNA denominadas de polimorfismos (SALMAN, 2006). Polimorfismos pontuais ou SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou não codificadoras do genoma. Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na sequência proteica, são denominados polimorfismos não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora SNPs sinônimos (ou silenciosos) não alterem a sequência proteica, podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida (SALMAN, 2006).

Além disso, SNPs podem alterar o processamento (*splicing*) alternativo de RNA-m; o padrão de expressão de genes através de alterações em sequências promotoras; os códons de iniciação ou de terminação da tradução e a poliadenilação da molécula de RNA mensageiro (GUIMARÃES E COSTA, 2002).

As substituições mais frequentes que ocorrem no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) e são denominadas transições. As transversões, por sua vez, são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice versa. Essas alterações, algumas vezes, têm origem em erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA (GUIMARÃES & COSTA, 2002). Caso essas mutações em células germinativas sejam transmitidas às gerações seguintes e se fixem na população em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismos (KWOK&GU, 1999).

Entre as vantagens atribuídas aos marcadores moleculares, destaca-se o grande polimorfismo, o fato de não sofrerem influência do meio ambiente, de serem geralmente codominantes, de poderem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo e de poderem caracterizar um indivíduo a partir de suas células ou tecidos (FORTES, 2007).

Com o surgimento da técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase tem sido possível utilizar em grande escala as informações dos marcadores moleculares em programas de melhoramento genético.

Para garantir o seu uso correto na seleção é importante que o efeito do marcador seja avaliado na população na qual se tem a intenção de ser selecionada, cujos efeitos, frequências

alélicas e variância explicada pelo marcador, sejam conhecidos (JOHNSTON E GRASER, 2010).

Os avanços da biologia molecular aplicada à seleção e melhoramento em animais possibilitaram a descoberta, em bovinos, de polimorfismos em genes de diversos hormônios e receptores hormonais (PRINGLE et al., 1997; CAMPAGNARI, 2002; LIEFERS et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2002; ALMEIDA, 2003; LI et al., 2004; CURI et al., 2005; DI STASIO et al., 2005; DUARTE et al. 2005; WEIMER et al. 2007) e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas, como por exemplo, as da calpaína e a calpastatina relacionadas à maciez da carne. Em bovinos de raças zebuínas e seus mestiços (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*), no entanto, estes polimorfismos têm sido ainda pouco investigados, necessitando de estudos adicionais para validação de possíveis efeitos na maciez de carne (LARA et al, 2012).

2.7. Calpaína

Testes baseados na análise de DNA podem fornecer informações importantes para a indústria da carne e programas de melhoramento, principalmente em relação às características de difícil avaliação, como é o caso da maciez de carne. Com a descoberta dos marcadores genéticos que têm explicado uma quantidade significativa da variação na maciez da carne tem sido possível avaliar precocemente o potencial genético do animal, permitindo aumentar o progresso genético (JOHNSTON & GRASER, 2010).

Calpaínas são proteases neutras ativadas por íons de cálcio, são parcialmente responsáveis pela proteólise *post mortem*, conduzindo ao processo de amaciamento de carne (GESSINK & KOOHMARAIE, 1999), são classificadas como proteases de cisteína. Podem ser divididas em μ -calpaína (CAPN1) e m-calpaína (CAPN2). As calpaínas de várias espécies apresentam homologias próximas a 90% (GOLL et al., 2003).

As calpaínas possuem duas subunidades, subunidade regulatória ou menor (28 kDa), idêntica nas duas calpaínas, e possui dois domínios; as subunidades de 80 kDa das μ -calpaína e m-calpaínas são produtos de genes diferentes e são divididas em seis domínios, preditos por cristalografia, ou em quatro domínios, preditos por sequência de aminoácidos (PAGE et al., 2002; GOLL et al., 2003).

Essas calpaínas participam da proteólise *post mortem*, que conduz a um aumento de maciez na carne e são inibidas pela calpastatina (KOOHMARIE, 1994). Diferente da m-calpaína, a μ -calpaína varia suas concentrações na carne no período de *post mortem*, com isso,

a μ -calpaína é implicada como a maior causa do amaciamento no músculo esquelético. Ela age degradando importantes proteínas miofibrilares, sendo responsável por 90% do amaciamento proteolítico observado durante os primeiros 7-10 dias de estocagem a 2-4°C (BOEHM et al., 1998).

Alguns polimorfismos no gene da subunidade maior da μ -calpaína já foram reportados por Page et al. (2004), Casas et al. (2005), White et al. (2005), Casas et al. (2006), por sua significativa influência na maciez da carne bovina de raças taurinas. Em bovinos de raças zebuínas e seus mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), no entanto, estes polimorfismos têm sido ainda pouco investigados, necessitando de estudos adicionais para validação de possíveis efeitos na maciez de carne (LARA et al, 2012). Sendo de suma importância estudos adicionais para validação de possíveis efeitos na maciez de carne.

2.8. Marcador molecular no gene da calpaína

2.8.1. Polimorfismos em μ -calpaína e m-calpaína

Vários polimorfismos nos genes calpaínas foram descritos. Na subunidade regulatória (menor) do gene das calpaínas (CAPNS1) foi identificado por PCR-RFLP um polimorfismo para a enzima de restrição *HhaI* (ZHANG et al., 1996). Anteriormente, pensava-se que essa subunidade era exclusiva da m-calpaína (CAPN2), e, por isso, o polimorfismo no domínio IV dessa subunidade foi denominado de CAPN24S (Genbank J05065; ZHANG et al., 1996). No entanto, a subunidade regulatória é comum as duas calpaínas (GOLL et al., 2003), sendo atualmente denominada de CAPNS1 (Genbank NM_174261).

Lara et al. (2005), estudando o referido loco em 283 bovinos de raças europeias e zebuínas, detectaram duas formas alélicas (*CAPN2^A* e *CAPN2^B*), cujas frequências foram distintas ($P < 0,05$) entre os grupos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, sendo aventada a hipótese de que o alelo A possa ser considerado marcador para maciez de carne. Em estudos posteriores, Lara et al (2012) estudando duas populações bovinas cruzadas, detectaram efeito significativo ($P < 0,001$) do CAPNIS nos valores de força de cisalhamento. Os resultados obtidos revelaram que a carne de bovinos cruzados de genótipo AA é mais macia em relação à carne produzida pelos heterozigotos AB (FC= -1,344Kg) e homozigotos AA (-2,6882kg), em relação aos homozigotos BB, sendo que a presença do alelo A pode reduzir em -1,3441 Kg no valor médio de FC.

Page et al. (2002) estudando a subunidade maior da μ -calpaína (CAPN1L; produto de 22 exons no cromossomo bovino 29), demonstraram, após sequenciamento, que a substituição de C por G, no exon 9 (CAPN1L9), levou à modificação do aminoácido alanina por glicina, na posição 316 (A316G); e que a substituição de G por A, no exon 14 (CAPN1L14), levou à substituição de valina por isoleucina, na posição 530 (V530I). Ambas as substituições foram relacionadas à diminuição da maciez da carne, avaliada pelo aumento da força cisalhamento de *Warner-Bratzler* no músculo *Longissimus dorsi*. No entanto, os estudos mais recentes demonstram que esses SNPs não segregam em frequências apreciáveis no gado Brahma (CASAS et al., 2005). Assim sendo, os SNP316 e SNP530 não revelam toda a variação do CAPN1 na maciez de carne. Contudo, o SNP 4751 localizado entre o exon 17 e 18, como pode ser visto na Figura 1, tem sido amplamente usado para prever a variação na maciez de em bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*, incluindo os descendentes do cruzamento *Bos taurus* x *Bos indicus* (WHITE et al., 2005).

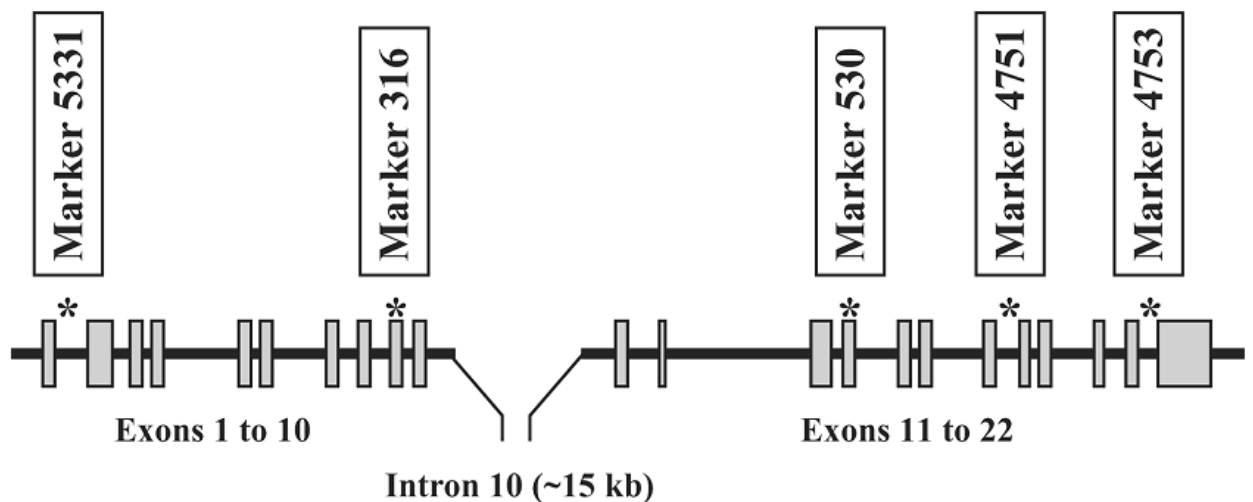


Figura 1: Localização genômica dos marcadores SNP do gene da calpaína. O marcador 316, no exon9, o marcador 530, no exon 14 e o 4751, no intron 17 mostrados na figura são alvos do presente estudo (WHITE et al, 2005).

2.8.2. CAPN316

Conforme reportado por Page et al (2002), o SNP CAPN 316 do gene já havia sido analisado e associado com a maciez, o qual produz substituição dos aminoácidos Glicina/Alanina na posição 316 do exon 9. O alelo G tem sido relacionado com a alanina na posição 316 da proteína, associado com aumento na força de cisalhamento e, conseqüentemente, com diminuição na maciez da carne (Page et al., 2002, 2004).

Casas et al (2005) avaliaram o a segregação do alelo C, associado a pequenos valores de força de cisalhamento em populações de raça Brahman, verificando baixa frequência desse alelo, porém relacionado significativamente ($P= 0,023$) com maciez. White et al (2005) também avaliaram o uso desse marcador, porém não somente em populações de raça Brahman, como também em populações cruzadas de *Bos taurus* e *Bos indicus*, corroborando com Casas et al, sobre a segregação não apreciável do alelo C em Brahman, com isso os autores sugerem e sua utilização em populações com pouca influência de genótipos *Bos indicus*.

Baredse et al (2007) avaliaram a redução dos efeitos do *shear force* (em Kg) entre os genótipos avaliados foras $C/C = -0,16$, $C/G = -0,04$ e $G/C = 0,05$.

2.8.3. CAPN530

O marcador CAPN 530 produz substituição dos aminoácidos Valina/Leucina na posição 530 do éxon 14 em populações de *Bos taurus* (PAGE et al, 2002). Nesse caso, o alelo A relacionado à leucina se associa ao aumento na força de cisalhamento e, conseqüentemente, com diminuição na maciez da carne, quando comparado com o alelo G que codifica valina (PAGE ET AL., 2002, 2004).

Por sua vez, Carvalho et al. (2007) também avaliaram os polimorfismos em 292 animais da raça Nelore, onde puderam verificar baixas frequências para algumas formas genóticas no marcador CAPN 530, sendo que não foram observados animais homozigotos, com o genótipo AA.

2.8.4. CAPN4751

O marcador 4751 se associa significativamente com a força de cisalhamento de *Warner Bratzler* (FCWB). O seu polimorfismo é caracterizado pela substituição de citocina por timina

na posição 6545 do intron 17 do gene (WHITE et al. 2005). A presença do alelo C em forma homozigótica ou heterozigótica pra esse marcador tem demonstrado que diminui a FCWB (CASAS et al, 2005; PAGE et al, 2004; PARRA-BRACAMONTE et al, 2009; WHITE et al, 2005).

Corva et al (2007) relatam em seu estudo resultados significativos para CAPN4751 relacionado à maciez ($P= 0,0015$). Na posição equivalente a 6545 (C/T), autores descrevem segregação em animais de origem *taurus* e seus cruzados. Resultados significativos foram detectados para *shear force*, como alelo C sendo favorável à essa característica. Barendse et al (2007) em seu estudo com diferentes raças de bovinos de corte, obteve os seguintes efeitos na redução do *shear force* (em Kg) C/C= - 0,08 , C/T= - 0,02 e T/T= 0,14.

No estudo com 292 animais da raça Nelore, Carvalho et al. (2007) constataram a presença do alelo “C” como favorável, assim a medida que as combinações genóticas incluíam as formas alélicas favoráveis, no caso o alelo “C”, havia diminuição nos valores de força de cisalhamento indicando assim aumento da maciez.

3. OBJETIVOS

Este trabalho objetivou:

- Investigar três polimorfismos no gene calpaína, localizados nos exons 9 e 14 e intron 17;
- Estimar as frequências alélicas e genóticas para os loci CAPN316, CAPN530 e CAPN4751;
- Associar os genótipos encontrados com os valores de força de cisalhamento, visando verificar uma possível relação com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Material de estudo

O DNA foi extraído de bovinos da raça Nelore. Todos os 55 animais estudados já haviam passado pelo abate e sua coleta, antes do início do presente estudo, já que os mesmos pertencem a outros projetos de pesquisa conduzidos pela equipe técnica em Nova Odessa e Pirassununga, cujas amostras de carne encontravam-se congeladas.

Os animais foram abatidos ao atingirem o acabamento de 4 mm de espessura de gordura, avaliada por meio de ultra-sonografia da área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea, no sítio anatômico entre a 12^a e 13^a costelas.

4.1.2. Genes investigados

Os marcadores investigados são apresentados na tabela abaixo, os quais foram escolhidos previamente visto relatos de Casas et al (2005), Scheckel et al (2006), White et al (2005) e Lara et al (2012). A caracterização dos marcadores e suas respectivas sequências de *primers* estão apresentadas nas tabelas seguintes (Tabelas 2 e 3).

TABELA 1- Referência de cada marcador e acesso no GenBank.

Marcadores	Nº de acesso no GenBank	Referências
CAPN 316	AF252504	Casas et al (2005)
CAPN 530	AF248054	Casas et al (2005)
CAPN 4751	AF248054	White et al (2005)

TABELA 2- Caracterização dos marcadores de interesse.

Marcadores	Cromossomo	Éxons/introns	Substituição de nucleotídeo	Posição do nucleotídeo
CAPN 316	29	Exon 9	G/C	5709
CAPN 530	29	Exon 14	A/G	4558
CAPN 4751	29	Intron 17	C/T	6545

TABELA 3- Sequência dos *primers* forward e reverse de cada marcador.

Macador	<i>Primer</i>
CAPN 316	F: TAGAGCTGCCTCTCTCAGCAGTTT R:TACAGGAAGGCTCTGAAGTACGCA
CAPN 530	F:GGAAGGTGACTTTGTGCTGCGTTT R:GTATGTGTAGGGAGAACGGTTCGTGAAA
CAPN 4751	F:ATAGGAAGGGCTTGGGTTGGGAT R:AAACTCCACAGCGTAAACCAGACG

4.1.3. Reagentes e soluções

Álcool 70%

Etanol 100% (Merck ®)	70ml
Água ultra pura, qualidade Milliq®	30ml

Medir com proveta a quantidade de álcool e de água ultra pura, misturar ambos dentro de um recipiente até a homogeneização. Manter à 4°C.

Tampão de lise TP1

Tris 0,5M Amersham Biosciences® (PM 121,14)	6,057g
EDTA Ácido etileno diamino tetra-acético 0,1 M Amersham Biosciences® (PM 372,24)	1,861g
Água ultra pura, qualidade Milliq®	Volume
suficiente pra completar 50ml	
SDS Dodecil sulfato de sódio (PlusOne-Pharmacia® PM288,38)	1g

Transferir para um Becker o Tris e o EDTA, e adicionar a água em volume inferior ao final. Homogeneizar a solução sob agitação magnética. Acertar o pH 8,0 com HCl concentrado ou NaOH, conforme necessidade. Completar o volume com água ultrapura até que este seja igual à 50 ml, transferir a solução para um frasco e em seguida autoclavar. O SDS deve ser adicionado e a solução homogeneizada lentamente. Manter a temperatura ambiente.

Proteinase K (10mg/ml)

Proteinase K (Fungal) – Invitrogen®	100mg
Água ultra pura, qualidade Milliq®	10ml

Adicionar 10 ml de água ultra pura em um frasco contendo 100 mg de proteinase K. Homogeneizar e aliquotar 1 mL em 10 microtubos de 1500 uL de capacidade. Manter à -20°C.

Acetato de amônio (7M)

Acetato de Amônio(Merck ® PM = 77,08)	53,956g
Água ultra pura, qualidade Milliq® para completar 100ml	Volume suficiente

Transferir para um Becker o Acetato de Amônio, e adicionar a água em volume inferior ao final. Homogeneizar a solução sob agitação magnética. Acertar o pH 8.0. Completar com água ultrapura até que o volume atinja 100 ml. Transferir a solução para um frasco e autoclavar. Manter à temperatura ambiente.

NaOH (2M)

NaOH(Merck ® PM = 40)	8g
Água ultra pura, qualidade Milliq®	100 ml

Transferir para um Becker o NaOH e adicionar a água ultra pura, homogeneizar. Seu uso deve ser feito para acertar o pH do tampão de lise TP1 e do acetato de amônio.

Isopropanol 100%

Isopropanol Merck®. Pronto para uso.

Gel de agarose 1%

Agarose (BioAmerica Inc.®)	1,0 g
TBE 0,5x	100,0 ml

Pesar a agarose e transferir para um Erlenmeyer de 250 ml. Adicionar TBE 0,5x e homogeneizar. Em seguida, aquecer a solução até total homogeneização. Deixar a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C e transferir para a cuba apropriada de eletroforese.

Gel de agarose 0,8%

Agarose (BioAmerica Inc.®)	0,8 g
TBE 0,5x	100,0 ml

Pesar a agarose e adicionar a um Erlenmeyer de 250 ml, juntamente com TBE 0,5x e homogeneizar. Em seguida, aquecer até tornar-se completamente límpida. Deixar a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x

TBE 10x (solução estoque)	50 mL
Água ultra pura, qualidade Milliq®	950 mL

Misturar os dois volumes. Não é necessário esterilizar.

Acrilamida 40%

Acrilamida 40%GE health care Plus One ®. Pronto para uso.

Bisacrilamida 2%

Bisacrilamida 2% GE health care Plus One ®. Pronto para uso.

Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)

Tris 0,89 M	108,0 g
Ácido bórico 0,89M	55,0 g
EDTA 0,025M	8,3 g
Água ultra pura, qualidade Milliq®	volume suficiente para completar 1000 ml.

Pesar tris, ácido bórico e EDTA e dissolver em aproximadamente 600mL de água ultra pura. Ajustar o pH da solução para 8 (ajuste realizado com NaOH 1,0 M, quando necessário). Completar o volume para 1000 ml.

Glicerol 80%

PlusOne Glicerol 87% Amersham Biosciences®. Pronto para uso.

Persulfato de sódio 10%

Persulfato de sódio (PA Synth)	1,0g
Água ultra pura, qualidade Milliq®	1ml

Pesar o persulfato e transferir à um microtubo de 1,5µL. No momento do uso, adicionara água ultra pura, qualidade Milliq® ao microtubo e homogeneizar.

Temed

PlusOne Temed 99% Amersham Biosciences®. Pronto para uso.

Etanol 10%

Etanol 99,5% (Nuclear®)	50ml
Água ultra pura, qualidade Milliq®	450ml

Medir com proveta a quantidade de álcool e de água ultra pura, misturar ambos para sua homogeneização. Manter à temperatura ambiente.

Ácido nítrico 1%

Ácido nítrico P.A.-ACS 68% (Ecibra®)	5ml
Água ultra pura, qualidade Milliq®	495ml

Medir com proveta a quantidade de agua ultra pura e adicionar o ácido nítrico, misturar ambos até a homogeneização. Manter à temperatura ambiente.

Nitrato de prata 30%

Nitrato de prata PA Platlab® PM 169,87	3g
Água ultra pura, qualidade Milliq®	10ml

Adicionar o nitrato de prata à um frasco âmbar contendo água ultra pura. Agitar até completa homogeneização.

Formaldeído 36%

Formaldeído 36% Merck® PM 30,03. Pronto para uso.

Carbonato de sódio 3%

Carbonato de sódio 100% Merck	30gr
Água ultra pura, qualidade Milliq®	100 ml

Dissolver o carbonato de sódio em aproximadamente 70 ml de água. Completar o volume de água para 100 ml. Manter em refrigeração (10°C).

Ácido acético 10%

Ácido acético 99,7% (Dinâmica Química Contemporânea®)	100 ml
Água ultra pura, qualidade Milliq®	900 ml

Medir com a ajuda de uma pipeta a quantidade e de água ultra pura, adicionar 100 ml de ácido acético e misturar ambos até a homogeneização. Manter à temperatura ambiente.

BsaJI 10U/μL

Enzima BsaJI do kit BioLabs®, pronto para uso. Acompanha tampão Tango.

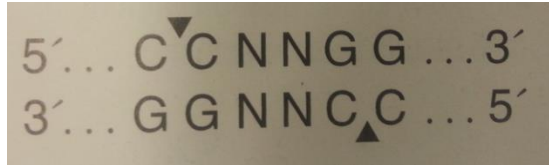


Figura 2: Sítio de restrição de BsaJI. Onde N pode ser A, C, G ou T. Imagem retirada do catálogo BioLabs 2011/12.

BtgI 10U/μL

Enzima BtgI do kit BioLabs®, pronto para uso. Acompanha Bsa 100x e tampão tp3.

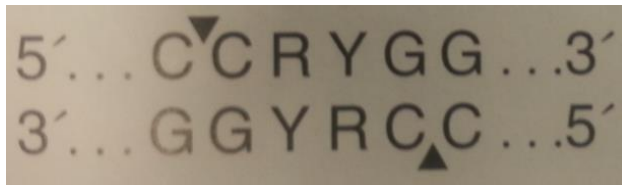


Figura 3: sítio de restrição de BtgI. Onde R pode ser A ou G, e Y pode ser C ou T. Imagem retirada do catálogo BioLabs 2011/12.

Ava II 10U/μL

Enzima Ava II do kit BioLabs®, pronto para uso. Acompanha tampão Tango.

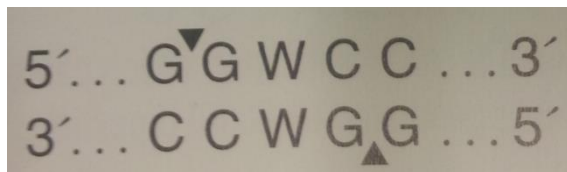


Figura 4: Indica o sítio de restrição da enzima Ava II, onde W pode ser A ou T. Imagem retirada do catálogo “New England BioLabs”, 2011/2012.

10X Buffer

Tampão do kit Taq-polimerase Ultrachem®, pronto para uso.

MgCl₂ [50 mM]

Cofator do kit Ultrachem®, pronto para uso.

Taq polimerase [5U/ µL]

Taq-polimerase Ultrachem®, pronto para uso.

dNTP [20nm]

Pipetar em microtubo de 1,5 mL, 20 µL de cada dNTP (100mM) do kit Eppendorf®. Adicionar 20µL de água ultra pura, qualidade Milliq®. Misturar em vortex e centrifugar por alguns segundos.

Marcador de massa molecular

DNA Ladder BioLabs 100 pb

DNA Ladder BioLabs 50 pb

DNA Ladder BioLabs 10 pb

Primers

Para a amplificação do DNA, utilizaram-se os seguintes *primers*:

CAPN17 F5' ATAGGAAGGGCTTGGGTTGGGAT 3' (LARA, 2012)
 R5'AAACTCCACAGCGTAAACCAGACG 3'

CAPN 9 F 5' TAGAGCTGCCTCTCTCAGCAGTTT 3' (LARA, 2009)
 R 5' TACAGGAAGGCTCTGAAGTACGCA 3'

CAPN 14 F 5'GGAAGGTGACTTTGTGCTGCGTTT 3' (LARA, 2009)
 R 5'GTATGTGTAGGGAGAACGGTTCGTGAAA 3'

4.2.MÉTODOS

4.2.1. Coleta de material

O material de estudo disponibilizado pelo Laboratório de Genética do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa faz parte de outras pesquisas em andamento na referida Instituição.

O abate dos animais ocorreu quando os mesmos atingiram o acabamento de 4 mm de espessura de gordura, avaliada por meio de ultra-sonografia da área do olho de lombo e espessura de gordura subcutânea, localizado entre a 12^a e 13^a costelas . Anterior ao abate, os animais passaram por jejum hídrico e alimentar, em média por 18 horas, foram pesados e encaminhados ao abatedouro. Os mesmos foram insensibilizados por concussão cerebral, sendo suspensos para sangria através de corte na veia jugular.

4.2.2. Avaliação da carcaça

As meias carcaças foram pesadas para obtenção dos pesos de carcaça quente, utilizados na determinação do rendimento de carcaça e armazenadas em câmara fria por 24 horas. Posteriormente, as carcaças foram novamente pesadas e a diferença de peso em relação ao peso quente, será considerada como perda por resfriamento. Na meia-carcaça esquerda, foi retirada na altura das 12^a e 13^a costelas, na porção do *Longissimus dorsi* (contrafilé) um bife com aproximadamente 2,5 cm de espessura, para determinação das medidas de maciez, e perdas por cozimento.

Para a análise de maciez da carne, as amostras de contra-filé, foram processadas conforme descrito no Manual de Cozimento e Avaliação Sensorial da Carne (CROSS et al., 1978). A força de cisalhamento e as perdas por evaporação e drenagem durante o cozimento foram obtidas a partir de amostras “*in natura*” e submetidas ao processo de maturação à temperatura de 0 a 2^oC por 0 e 14 dias. Para a determinação da força de cisalhamento foi utilizado o aparelho do tipo *Warner-Bratzler Shear* fabricado por *G-R Electrical Manufacturing Company*, com capacidade para 25 kg, ilustrado nas Figuras 5 e 6.



Figura 5: À esquerda encontra-se o aparelho tipo *Warner-Bratzler Shear* fabricado por *G-R Electrical Manufacturing Company*, que mede a força de cisalhamento das amostras previamente cozidas, à direita os cortes feitos por ele.



Figura 6: As imagens demonstram a carne antes do cozimento com o termômetro que mede sua temperatura durante o cozimento.

4.2.3. Extração de material genético

Foi retirado de 10 à 20mg de carne de cada amostra recebida utilizando o auxílio de uma balança de precisão. Elas foram fragmentadas com bisturi e uma pinça sobre uma placa de vidro asséptica. Entre cada amostra os instrumentos foram lavados com álcool 70% para não haver contaminação entre as mesmas (ver Figura 7).

Cada amostra dilacerada foi inserida em um microtubo, foi adicionado 300µl de tampão de lise1 ao microtubo e misturados com a amostra com auxílio de uma ponteira. Em seguida foi acrescido 5µl de proteinase k [10mg/ml] e incubado overnight à 55°C com uma leve agitação de 250rpm, conforma representado na Figura 7.

No dia seguinte, adicionou-se 350µl de acetato de amônio 7M e homogeneizou-se em vortex. As amostras foram centrifugadas à 14.000 rpm, à 4°C por 15 minutos. O sobrenadante (cerca de 500µl) foi transferido para um novo microtubo previamente identificado e contendo 700µl de isopropanol gelado (-20°C). O microtubo contendo o material foi mantido por 2 horas à temperatura de 4°C.

A amostra foi novamente levada à centrífuga à 14.000 rpm durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma micropipeta. Foi adicionado 200µl de etanol 70% à -20°C na amostra, em seguida foi levado para a centrifugação por 15 minutos, à 4°C e 14.000 rpm. O etanol foi descartado.

A amostra foi seca à 40°C até que não houvesse mais líquido dentro dos microtubos. O DNA foi ressuspendido em 50µl de água ultrapura.

Depois de extraído o material genético, cada amostra foi identificada com um número que a relaciona com seu material de origem, sendo que os mesmos variam de 1033 à 1087, sendo mantidos à temperatura -20 °C.



Figura 7: À esquerda, fragmentação da amostra. À direita: Representativo da incubação overnight à 55°C e com agitação de 250 rpm.

4.2.4. Quantificação e diluição

A quantificação do DNA após a sua extração é importante para o aperfeiçoamento da qualidade do produto de DNA resultante da PCR (INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS, 1992). O excesso de DNA em uma amostra de PCR poderá saturar a reação, fazendo com que apareçam artefatos de técnica e ampliações inespecíficas que podem dificultar a sua análise. Já a sua falta, poderá acarretar na perda de um dos alelos, quando o indivíduo é heterozigoto, ou mesmo na não amplificação dos mesmos (BUTLER, 2005).

As leituras foram feitas a 260nm, comprimento de onda correspondente aquele onde ocorre o pico de absorvância máxima do DNA puro. Assim a leitura da Abs260nm permitiu o cálculo da concentração dos ácidos nucleicos na amostra. Na análise espectrofotométrica, a absorvância a 260nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos, sendo a seguinte a proporcionalidade:

TABELA 4-Equivalências da absorvância de 260 nm.

Absorvância	Equivalência
260nm	~50µg/ml dsDNA
	~37µg/ml ssDNA
	~40µg/ml ssRNA
	~20µg/ml oligonucleótidos em cadeia simples

Para a determinação do grau de pureza, foi feita a leitura da absorvância à 280nm que é proporcional à quantidade de proteínas e a 325nm que é proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes", vide Tabela 5. O grau de pureza foi calculado através da relação A260/A280 que deve ser entre 1,8 e 2,0. Para valores inferiores a 1,8, a amostra foi caracterizada como contaminada com proteína e novas extrações foram feitas para a obtenção de amostras com qualidade.

TABELA 5- Equivalência de cada absorvância.

	Significado	Equivalências e intervalo de confiança
A_{260}	Proporcional à concentração de ácidos nucleicos	$A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 50\mu\text{g/ml dsDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 37\mu\text{g/ml ssDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 40\mu\text{g/ml ssRNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 20\mu\text{g/ml de oligonucleótidos em cadeia simples}$
A_{280}	Proporcional à concentração de fenol e proteínas	$1,8 < A_{260}/A_{280} < 2$; corresponde a DNA ou RNA puros
A_{325}	Proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes"	

Para a quantificação, identificou-se microtubos com os respectivos números das amostras de DNA extraídas dos 55 animais (no caso 1033 à 1087), acrescentou-se 990 μL de água ultra pura e 10 μL de DNA. Colocou-se a mistura no vortex por alguns segundos para se conseguir uma amostra mais homogênea. Levou-se a amostra para o espectrofotômetro (Figura 8) ajustado para A_{260}/A_{280} . Porém, antes foi feita a leitura do branco no aparelho, acrescentando 1mL de água ultra pura em uma pequena cubeta de quartzo, que objetiva obter como resultado zero de absorvância e concentração. Encontrando o resultado esperado, foram feitas as leituras do restante das amostras preparadas. A cubeta deve ser lavada com água destilada entre cada troca de amostra.



Figura 8: Espectrofotômetro utilizado para as medições.

Após a quantificação, para padronizar todas as “amostras trabalho” as mesmas foram diluídas para uma concentração de [50µg/ml] de material genômico. A diluição foi feita com água ultrapura na quantidade necessária para cada amostra, segundo a fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2,$$

Onde:

C1: Concentração de leitura no espectrofotômetro.

V1: Volume de DNA a ser colocado para o preparo da “amostra trabalho”

C2: Concentração desejada para a “amostra trabalho” 50 ng/µL

V2: Volume final esperado para a “amostra trabalho” 50µL

Em seguida, deve-se calcular o volume de água a ser usada na diluição da amostra para chegar da concentração desejada:

$$V \text{ H}_2\text{O} = 50 - V1$$

Onde,

V H₂O: Volume de água a ser acrescido em eppendorff com DNA

V1: Volume de DNA obtido pelo cálculo anterior

Com isso, tem-se V1 como o volume de DNA para a preparação da amostra e tem-se V H₂O como o volume de água ultra pura à ser adicionado ao DNA para o preparo da mesma.

Todas as amostras devem ser conservadas à temperatura de -20°C.

4.2.5. PCR

A PCR ou reação de polimerase em cadeia é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA de interesse na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (“*primers*”) que delimitam a sequência de DNA de dupla fita alvo da amplificação (FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998). Os *primers* são sintetizados de acordo com a região que interessa amplificar, assim sua sequência é flanqueadora da região alvo.

O ciclo da reação de polimerase em cadeia inclui três etapas, sendo uma de desnaturação, uma de anelamento e a última de extensão. Na primeira etapa faz-se necessário o uso de dois iniciadores (*primers*) para que haja a replicação de ambas as fitas. Cada iniciador é uma pequena sequência de DNA (cerca de 20 nucleotídeos) com a sequência idêntica, ou muito similar, a uma das fitas, ou seja, um em cada direção, e a região amplificada fica entre os dois iniciadores (MARQUES, 2012). Ainda nessa fase, a dupla fita é desnaturada com a elevação da temperatura (cerca de 94°C), tornando-se duas fitas simples.

Na etapa seguinte, na qual ocorre o anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida, o que possibilita a hibridização DNA-DNA de cada “*primer*” com as sequências complementares que flanqueiam a região de interesse. Este passo ocorre em temperaturas variáveis, dependendo da sequência e tamanho dos iniciadores escolhidos e do conteúdo de GG do molde, mas geralmente fica entre 40°C e 60°C (MARQUES, 2012)

Uma vez pareados, ocorre a última etapa onde há elevação da temperatura (cerca de 72°C) para que haja a extensão das fitas pela Taq DNA polimerase com a adição de nucleotídeos orientados pela sequência de interesse, a qual é usada como molde. O ciclo é repetido diversas vezes. A repetição desses três ciclos é feita com o auxílio de um termociclador, que pode ser programado em relação à temperatura e duração de cada ciclo.

A temperatura de cada etapa é específica para cada região a ser estudada, já as mesmas são dependentes do tamanho e da sequência do *primer* utilizado. No caso desse trabalho utilizaram-se três pares de *primers*.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA de interesse foram empregadas concentrações de reagentes e *primers* específicos, apresentados nas Tabelas 6, 8 e 10. As condições de tempo e temperatura empregadas para as amplificações dos fragmentos de 839 pb, 318 pb e 359 pb correspondentes aos *loci* CAPN316, CAP530 e CAPN4751, respectivamente, estão representadas nas Tabelas 7, 9 e 11, destacando-se os três ciclos distintos, que foram utilizados nas PCRs.

TABELA 6-Quantidades de reagentes e *primers* empregados para a amplificação do fragmento de 839pb, referente ao SNP no exon 9 do gene Calpaína - CAPN316.

Produto	Quantidade 1X em μL
H2O	16,5
Tampão	2,5
Mg	0,75
DNTP	0,25
<i>Primer C9</i>	1,5
Taq	1,0
DNA	2,5

TABELA 7- Programa de PCR para CAPN 316.

Tempo	Temperatura	Reação
3 minutos	95°C	Desnaturação
45 segundos	94°C	Amplificação
45 segundos	61,5°C	Amplificação
10 segundos	72°C	Amplificação
10 minutos	72°C	Extensão

O Ciclo do PCR para CAPN 316 inicia-se a PCR com uma desnaturação de 3 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos de amplificação: 45segundos a 94°C, 45 segundos a 61,5°C e 10 segundos a 72°C, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 10 minutos, conforme visto na Tabela 7.

TABELA 8- Quantidades de reagentes e *primers* utilizados na amplificação por PCR do fragmento de 318pb, referente ao SNP localizado no exon 14 do gene Calpaína – CAPN530.

Produto	Quantidade 1X em μL
H ₂ O	13,0
Tampão 10X	2,0
Mg (50mM)	0,6
DNTP (200mM)	0,2
<i>Primer</i> (2,5 μM)	1,2
Taq	1,0
DNA	2,0

TABELA 9- Programa de PCR para CAPN 530.

Tempo	Temperatura	Reação
3 minutos	95°C	Desnaturação
40 segundos	94°C	Amplificação
40 segundos	61°C	Amplificação
40 segundos	72°C	Amplificação
15 minutos	72°C	Extensão

O Ciclo do PCR para CAPN530 inicia-se a PCR com uma desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 61°C e 40 segundos a 72°C, finalizando-se com uma extensão de 15 minutos a 72°C, conforme demonstrado na Tabela 9.

TABELA 10- Quantidades de reagentes e *primers* utilizados na amplificação por PCR do fragmento de 359 pb, referente ao SNP no intron 17 do gene Calpaína- CAPN4571.

Produto	Quantidade 1X em μL
H ₂ O	16,5
Tampão	2,5
Mg	0,75
DNTP	0,25
<i>Primer</i>	2,0
Taq	1,0
DNA	2,0

TABELA 11 – Programa de PCR para CAPN 4571.

Tempo	Temperatura	Reação
3 minutos	95°C	Desnaturação
30 segundos	94°C	Amplificação
45 segundos	65°C	Amplificação
45 segundos	72°C	Amplificação
10 minutos	71°C	Extensão

O Ciclo do PCR para CAPN4751 inicia-se a PCR com uma desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando-se com uma extensão final a 71°C por 10 minutos, conforme descrito na tabela 11.

4.2.6. Eletroforese em gel de agarose

As análises de eletroforese em gel de agarose foram utilizadas para testar a qualidade da amostra de DNA extraída e dos produtos de amplificação por PCR dos fragmentos de interesse. As concentrações de agarose empregadas foram 0,8% e 1% em Tampão TBE 0,5x para conferir a qualidade dos procedimentos e certificar que o mesmo atingiu sua meta.

Para o preparo do gel, a agarose foi misturada ao TBE 0,5x em um Erlenmeyer, e aquecidos utilizando micro-ondas até torna-se transparente. Em seguida foi resfriada a mistura até atingir a temperatura próxima a 60°C e incorporado o corante Syber-Safe (Invitrogen) na proporção de 1:10000. O gel foi transferido para um molde específico contendo os pentes e deixado em temperatura ambiente até sua total solidificação.

As amostras a serem aplicadas no gel de agarose foram acrescidas de um tampão de carregamento, contendo azul de bromofenol xileno cyanol e sacarose, na proporção de 1:10, ou seja, 3µl do tampão de carregamento para 3,0µl do produto do PCR ou da amostra de DNA extraída.

Após a solidificação, o gel foi acoplado a uma cuba de eletroforese e adicionado tampão TBE 0,5x, em quantidade suficiente para cobri-lo. O gel foi carregado com 3,3µl de amostra previamente preparada e submetido à corrente elétrica, cujo tempo de migração eletroforética e voltagem empregados foram dependentes à concentração e tamanho do gel (Tabela 12).

TABELA 12- Especificações para o preparo do gel de agarose a 1% e condições eletroforéticas.

Volume da cubeta	Agarose (g)	Corante (µl)	TBE 0,5x (ml)	Voltagem	Tempo (minutos)
50 ml	0,5	5	50	70 V	20
100 ml	1,0	10	100	120 V	30
150 ml	1,5	15	150	170 V	30

A visualização das bandas de DNA no gel de agarose foi realizada utilizando-se transiluminador contendo luz UV. A intensidade de seu brilho e a largura da banda são indicativos de qualidade do produto inserido em cada poço. Caso a amostra não tenha apresentado nenhum brilho, devido a problemas na reação de amplificação ou na extração, a mesma foi refeita. Após a sua visualização, o gel foi encaminhado para registro fotográfico (Gel Doc – It² Imager) com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

4.2.7. Hidrólise

Os fragmentos amplificados por PCR foram submetidos à hidrólise visando a identificação dos polimorfismos dos fragmentos de restrição, utilizando-se enzimas de restrição específicas. Para as análises de RFLP do exon 9, exon 14 e intron 17 foram utilizadas as seguintes enzimas de restrição: *BtgI*, *AvaII* e *BsaI*, cujas concentrações utilizadas podem ser vistas nas Tabelas 13, 14 e 15. Os fragmentos amplificados para cada SNP foram incubados a 37°C por 16 horas, utilizando-se um termociclador, para reação de hidrólise.

TABELA 13- Produtos e quantidades necessárias para reação de hidrólise para a identificação do SNP (C/G) no nucleotídeo 5709, localizado no exon 9 do gene Calpaína (CAPN316).

Substância	Quantidade µl 1X
H ₂ O	3,4
Tampão tp3	1,0
Bsa 100x	0,1
BTgI 10u/µL	0,5
DNA	5,0

TABELA 14 - Produtos e quantidades necessárias para a reação de hidrólise para a identificação do SNP (G/A) no nucleotídeo 4558, localizado no exon 14 do gene Calpaína (CAPN530).

Substância	Quantidade μl 1X
H ₂ O	3,5
Tampão tango	1,0
AVA II 10u/ μl	0,5
DNA	5,0

TABELA 15 - Produtos e quantidades necessárias para a reação de hidrólise para a identificação do SNP (C/T) no nucleotídeo 6545 localizado no intron 17 do gene Calpaína (CAPN4751).

Substância	Quantidade μl 1X
H ₂ O	8,425
Tampão tango	1,5
BsaJ1 10u/ μl	0,075
DNA	5,0

4.2.8. A técnica de RFLP

PREPARO DO GEL

No preparo do gel de poliacrilamida não desnaturante para a técnica de RFLP foi usado o protocolo padrão do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa. Para tanto foi acrescentado em um pequeno béquer com agitação magnética branda, 8,157ml de água ultrapura seguido de

5,95ml de acrilamida, 6,25 ml de bisacrilamida, 2,5 ml de tampão de TBE 10x e 1,75ml de glicerol. Simultaneamente foi adicionado 375 μ l de persulfato de sódio 10% e 18,75 μ l de TEMED.

Em seguida, a mistura foi inserida entre duas placas de vidro previamente montadas, sendo uma delas lisa e a outra com o encaixe para o pente. Essas placas são separadas e presas entre si por meio de espaçadores e grampos. O pente foi colocado e a placa foi deixada em repouso por uma hora a temperatura ambiente para a polimerização do gel.

O pente foi retirado e os poços formados foram lavados com água destilada com auxílio de uma pisceta. As placas de vidro foram fixadas numa cuba específica de eletroforese vertical com ajuda de vaselina e grampos. O tampão TBE 0,5X foi inserido e uma pré-corrída foi realizada durante cerca de 20 a 30 minutos, empregando-se 40 mA.

PREPARO DA AMOSTRA

Após a pré-corrída as amostras previamente hidrolisadas foram acrescidas de tampão de carregamento (2 μ l) e aplicadas no gel (5 μ l). Após cerca de duas horas de migração eletroforética, nas mesmas condições da pré-corrída, a corrente foi desligada e o gel submetido a coloração com prata.

REVELAÇÃO DO GEL

O gel foi retirado das placas, colocado em imersão de etanol 10% por 10 minutos. O etanol foi descartado, seguido de uma imersão em ácido nítrico 1% por 5 minutos com agitação de 20rpm. O gel foi lavado com dois banhos de água ultrapura e, em seguida, foi incubado em solução de prata, contendo 200 ml de água ultrapura, 700 μ l de formaldeído e 700 μ l de nitrato de prata (3g/10mL) em local escuro durante 20 minutos com agitação de 20rpm. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes em água pura e, imerso em solução contendo 100 ml de carbonato de sódio 3% e 350 μ l de formaldeído, até o aparecimento das bandas. A solução foi descartada e o gel fixado em ácido acético 3%. Segue na Figura 9 um ilustrativo do gel revelado.

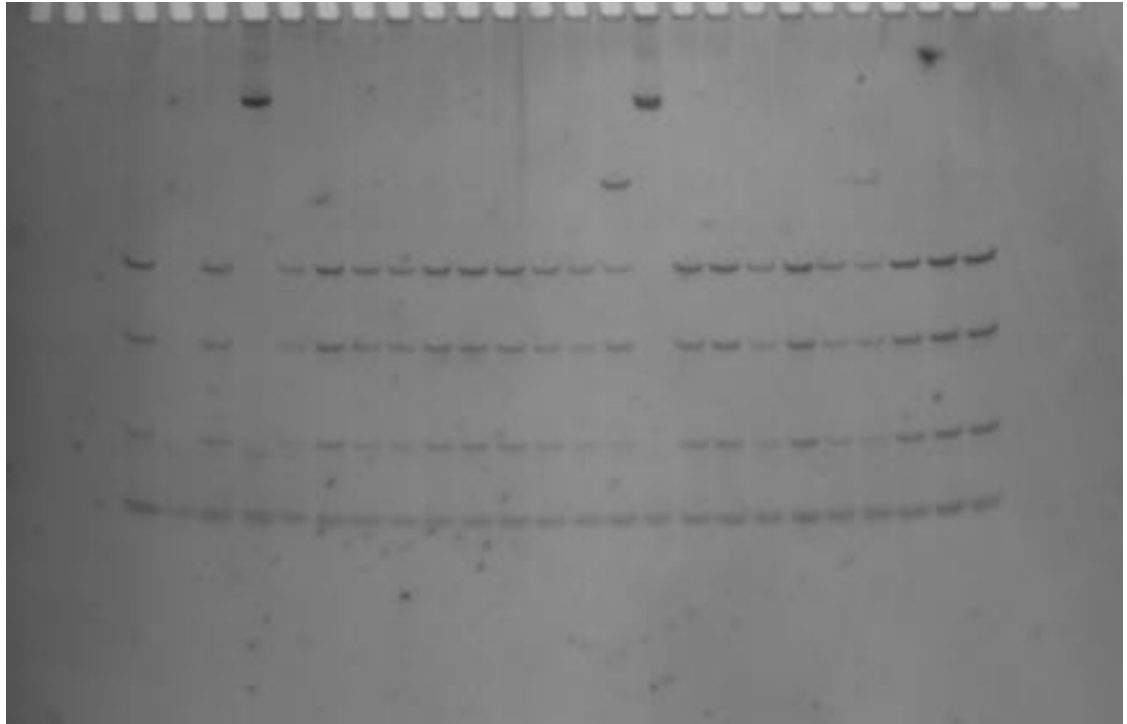


Figura 9: Ilustrativo de gel de RFLP referente à CAPN530.

4.2.9. A técnica de SSCP

PREPARO DO GEL

No preparo do gel de poliacrilamida para a técnica de SSCP foi usado o protocolo padrão do Laboratório de Genética do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa. Para tanto foi acrescentado em um pequeno béquer com agitação magnética branda 16,18 ml de água ultra pura seguido de 7,35ml de acrilamida e 3,00 ml de bisacrilamida, 3,00ml de tampão de TBE 10x. Simultaneamente, acrescentou-se 450 μ l de persulfato de sódio 10% e 22,50 μ l de TEMED.

Nessa fase a mistura foi inserida ao meio de duas placas de vidro previamente montadas, sendo uma delas lisa e a outra com o encaixe para o pente, as placas são separadas e presas entre si por meio de espaçadores e grampos. O pente foi colocado e a placa ficou uma hora a temperatura ambiente para polimerizar.

O pente foi retirado e os poços formados foram lavados com água destilada. As placas de vidro foram fixadas no aparelho de eletroforese vertical e o tampão de TBE 0,5X foi inserido. A partir de então iniciou-se a pré-corrída por 30 minutos com corrente de 70ma, 3400V, à temperatura de 10°C.

Após a pré-corrída, aplicou-se 4,5 μ L de amostra, previamente preparada, em cada poço e foi levado para a corrida por 16 horas sob as mesmas especificações da pré-corrída.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra foi diluída em tampão desnaturante contendo formamida e azul de bromofenol, na proporção de 18 μ L de formamida para 2 μ L de amostra amplificada por PCR. A amostra foi aquecida em termociclador por 10 minutos à temperatura de 95°C para a sua desnaturação (abrir as fitas de DNA), sofreu um choque térmico, incubando-a em gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, as amostras foram imediatamente aplicadas no gel de poliacrilamida 12%, sendo utilizados 4,5 μ l de amostra desnaturada por poço no gel de poliacrilamida.

REVELAÇÃO DO GEL

O gel foi retirado das placas, colocado em imersão de etanol 10% por 10 minutos. O etanol foi descartado, seguido de uma imersão em ácido nítrico 1% por 5 minutos com agitação de 20rpm. O gel foi levado com dois banhos de água pura e, em seguida, foi encubado em 200 ml solução de nitrato de prata, contendo 700 μ l de formaldeído, durante 20 minutos com agitação de 20rpm, na ausência de luz. Novamente, o gel passa por duas lavagens em água pura e imerso em solução com 100 ml carbonato de sódio 3% e 350 μ l de formaldeído, até boa visualização de bandas. A solução foi descartada e o gel fixado em 100 ml de ácido acético 10%. Segue na Figura 10 um ilustrativo do gel revelado.

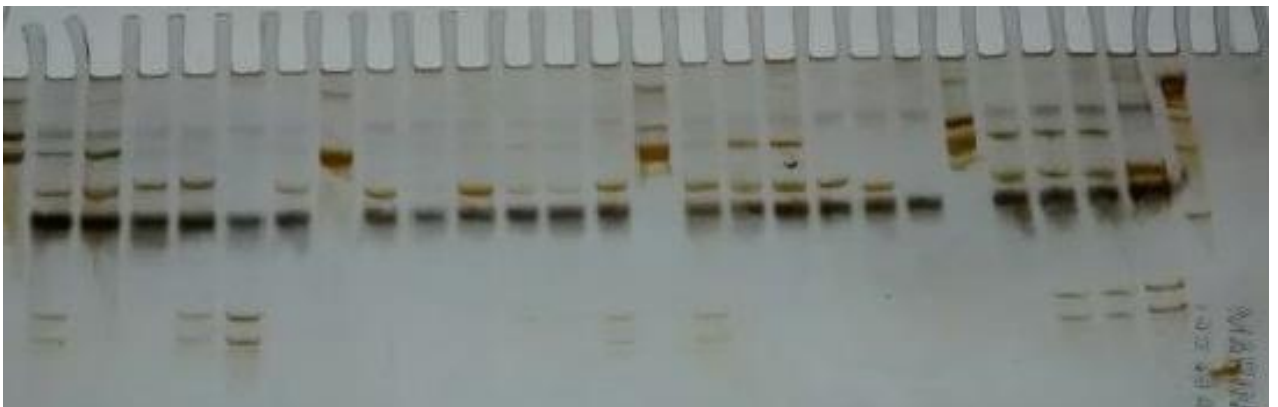


Figura 10: Ilustrativo de Gel de SSCP referente à CAPN 17.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização de informações genóticas avaliadas

5.1.1. CAPN 316

De acordo com Page et al. (2002), na posição 316 da enzima calpaína pode ocorrer substituição do aminoácido glicina por alanina, como resultado da mutação pontual no nucleotídeo 5709 do exon 9, decorrente da troca da citosina por guanina. Esse SNP está relacionado à maciez de carne em populações de *Bos taurus taurus*, em que o alelo G foi associado a carnes macias.

No presente estudo, o alelo C foi caracterizado, pela presença de um ou dois sítios de restrição para enzima *Btg1*, resultando dois ou três fragmentos. No primeiro caso, os fragmentos resultantes apresentaram tamanhos de 628 e 211 pb, no segundo caso, tamanhos de 257, 371 e 211 pb (ver Figura 11)

O alelo G foi caracterizado por não apresentar sítio de restrição para a enzima *Btg1*, resultando apenas o fragmento de 828 pb ou, por apresentar um sítio de restrição, apresentando os fragmentos de 257 e 582 pb, conforme demonstrado na Figura 11.

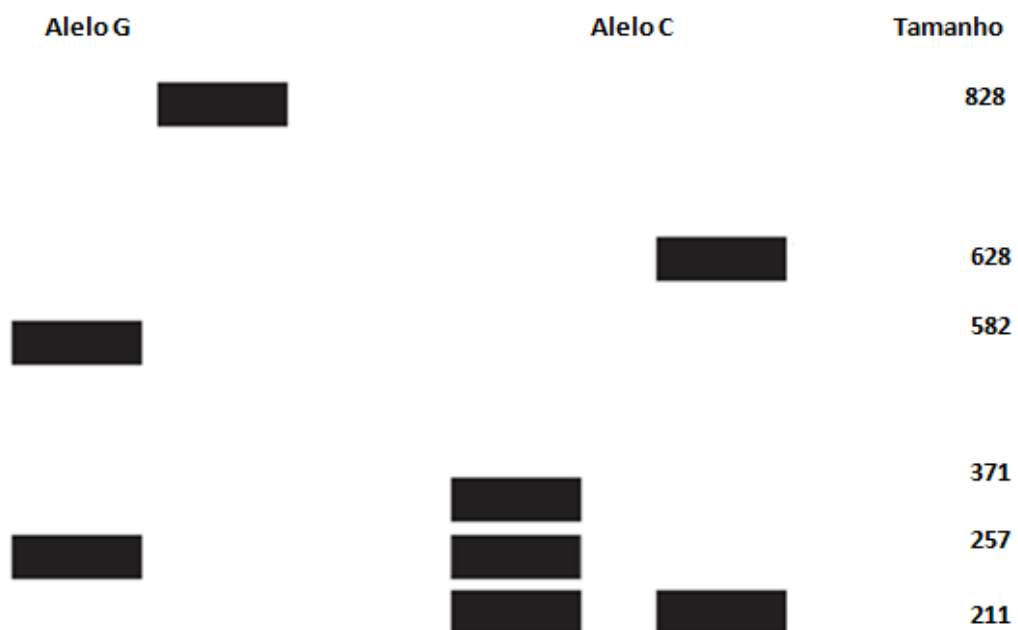


Figura 11: Representativo da fragmentação dos alelos G e C pela atuação da enzima *BtgI*. Tamanho em pares de bases.

Os animais homozigotos CC foram caracterizados pela presença de 2 ou 3 bandas, os homozigotos GG, com uma ou duas bandas e, os heterozigotos CG com três ou quatro bandas correspondentes aos seus alelos.

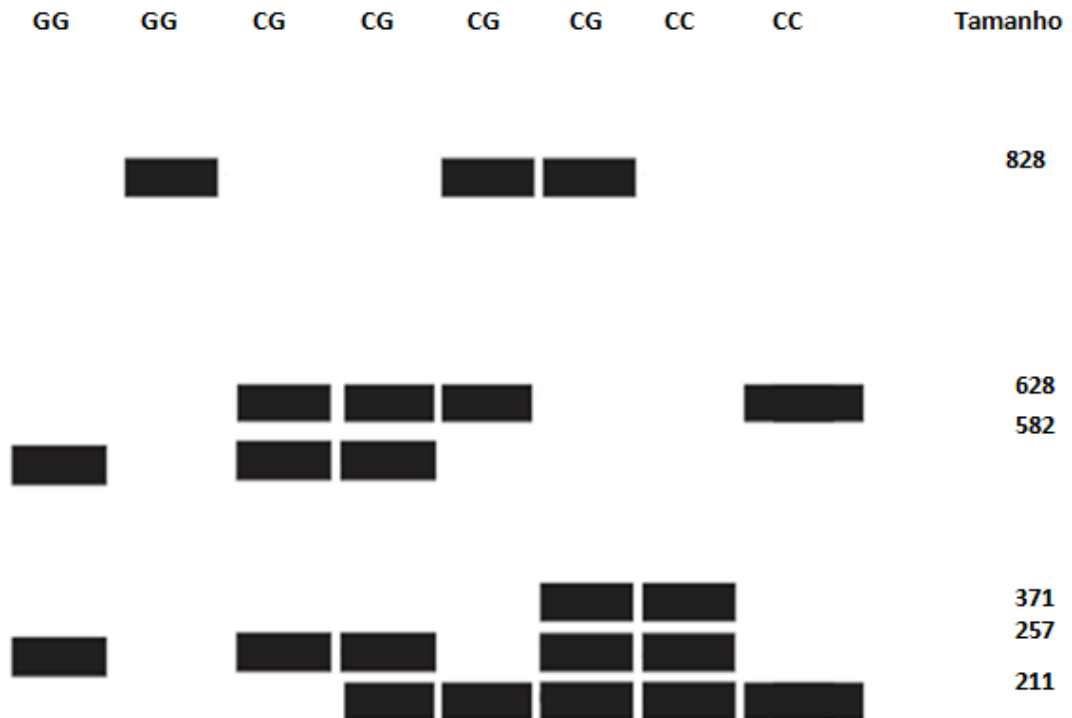


Figura 12: Representa os padrões de bandas encontrados como resultado da eletroforese para CAPN316. Todas as possibilidades de homozigotos e heterozigotos estão representadas na figura. O tamanho representado na imagem está em pares de bases.

Com base nos genótipos observados no gel, exemplificado na Figura 12 e 13, foram encontrados um total de 54 homozigotos GG (99,98%), nenhum homozigoto CC (0%) e 1 de heterozigotos CG (1,81%).

Os resultados obtidos revelam que o alelo G foi comum na população, sendo praticamente fixado na mesma, ao passo que o alelo C ocorreu em frequências muito baixas. A ocorrência de um heterozigoto, no entanto, reflete a possibilidade de se encontrar outros animais CG na raça Nelore e utilizá-los como reprodutor na tentativa de melhorar o potencial genético dessa raça para produção de carnes macias.

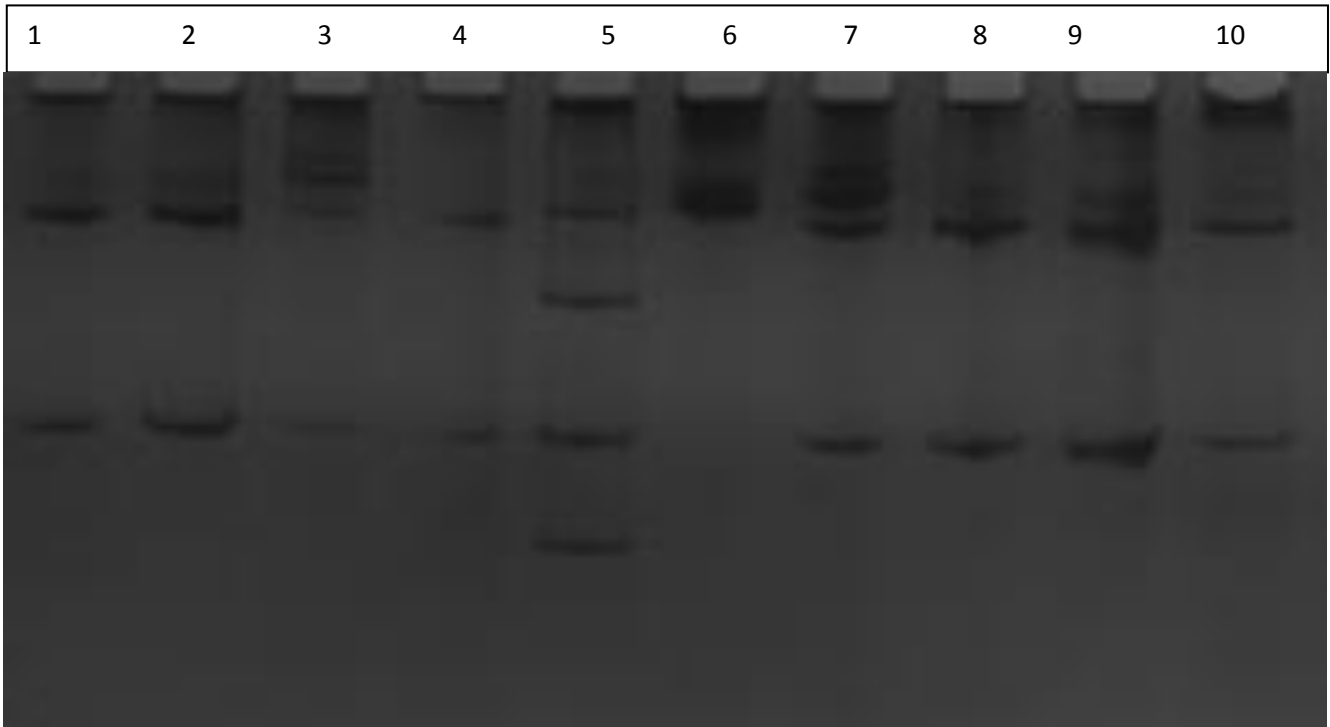


Figura 13: Gel de RFLP ilustrando o SNP (C/G) no exon 9 do gene Calpaina (CAPN316). Amostras 1,2,3,4,7,8,9 e 10 são homocigotos GG, 5 é um heterocigoto CG e a amostra 6 é uma não hidrolisada.

5.1.2. CAPN 530

O marcador CAPN 530 é caracterizado pela substituição dos aminoácidos valina/leucina na região 530 da enzima calpaína. Esse polimorfismo é resultante da substituição de guanina (G) por adenina (A) no nucleotídeo 4558 do exon 14.

O alelo A foi caracterizado pela presença de dois sítios de restrição para *Ava* II, resultando em três fragmentos de 182 pb, 91 pb e 45 pb e, o alelo G, por apresentar três sítios de restrição, resultando em quatro fragmentos com 122, 91, 60 e 45 pb, conforme demonstrado na Figura 14.

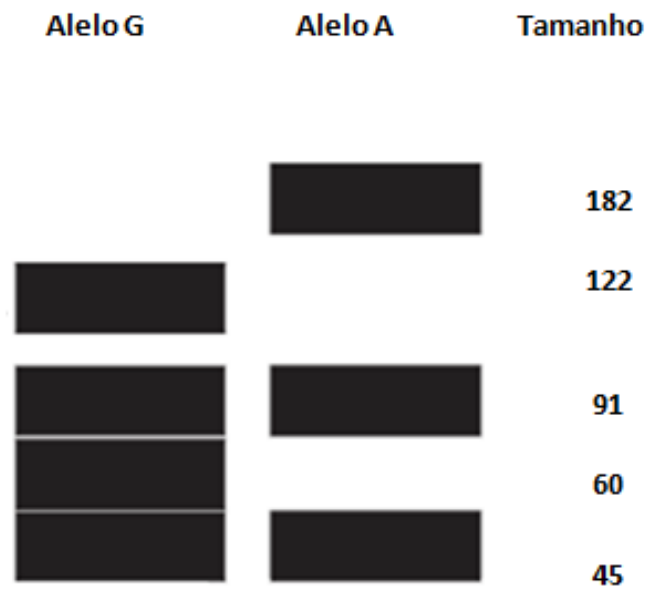


Figura 14: Representativo da fragmentação dos alelos A e G pela atuação da enzima *Ava* II. Tamanho em pares de bases.

Com base no padrão de restrição observado para *Ava* II, três genótipos foram caracterizados, sendo denominados por AA, AG, GG. Os animais homozigotos AA apresentaram três bandas, os homozigotos GG quatro bandas e os heterozigotos AG, cinco bandas correspondentes aos respectivos alelos (ver Figuras 15 e 16).

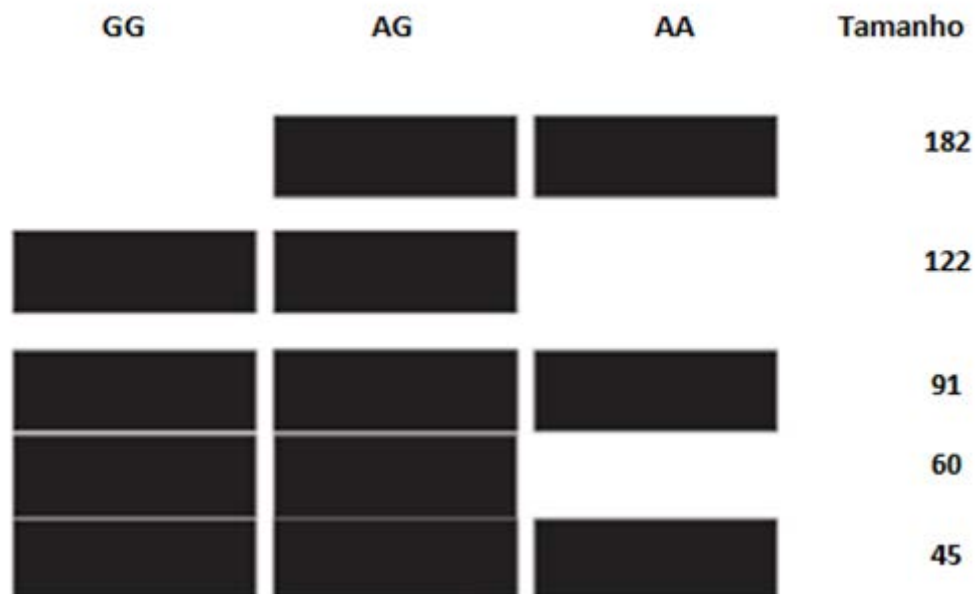


Figura 15: Representa os padrões de bandas encontrados como resultado da eletroforese para CAPN 530. Todas as possibilidades de homozigotos e heterozigotos estão representadas na figura. Tamanho em pares de bases.

Esse polimorfismo foi estudado em apenas 48 animais, sendo detectado 46 homozigotos GG (95,83%), 2 e heterozigotos AG (4,17%) e nenhum homozigoto AA.

Esse resultado também demonstra a pouca variabilidade do gado Nelore para essa mutação, considerada de grande aplicação para seleção de genótipos superiores em populações bovinas de origem *Bos taurus taurus*.



Figura 16: Gel de RFLP referente às análises de padrão de migração para o marcador 530. As amostras 1,2,3,6,7,8 e 9 são homozigotos GG, já a amostra 4 é um heterozigoto AG, e a 5 é uma amostra não hidrolisada.

5.1.3. CAPN 4751

O marcador 4751 é caracterizado pela substituição de citosina (C) por timina (T) na posição 6545 do intron 17 do gene calpaína (WHITE et al. 2005). O alelo C foi caracterizado pela presença de três sítios de restrição para enzima *BsaI*, resultando em 4 fragmentos de 130, 143, 14 e 72 pb. O alelo T foi caracterizado pela presença de 2 sítios de restrição para *BsaI*, resultando em 3 fragmentos de 273, 72 e 14 pb (ver Figura 17).

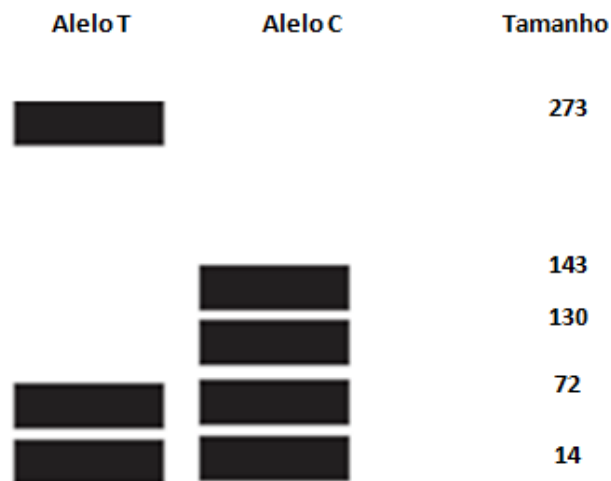


Figura 17: Representativo da fragmentação dos alelos C e T pela atuação da enzima BsaJ1. Tamanho em pares de bases.

Assim sendo, os homozigotos CC apresentaram quatro bandas, os homozigotos TT, três bandas e os heterozigotos CT, cinco bandas correspondentes aos respectivos alelos, conforme observado na Figura 18. No entanto, duas das bandas referidas não aparecem em gel devido ao seu tamanho diminuto (14 e 72 pb), como pode ser observado no gel da Figura 19.

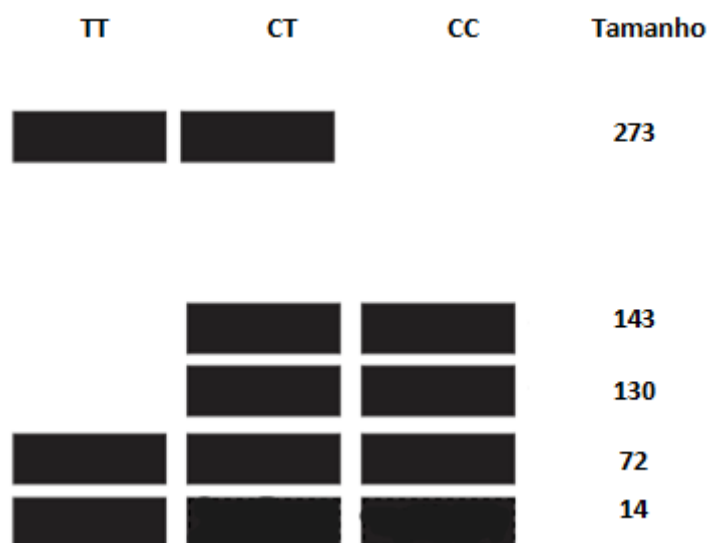


Figura 18: Representa os padrões de bandas encontrados como resultado da eletroforese para CAPN 4751. Todas as possibilidades de homozigotos e heterozigotos dão representadas na figura. Tamanho em pares de bases.

Com base nos genótipos observados foram calculadas as frequências genotípicas, cujas estimativas de CC, TT e CT foram 5,45%, 52,73% e 41,82%%, respectivamente. Com relação às frequências dos alelos T e C, as estimativas foram 0,7364 e 0,2636, respectivamente.

Os resultados obtidos revelam que o alelo T foi o mais frequente na população investigada, no alelo C ocorreu em frequências apreciáveis, que permitem o emprego desse marcador para a identificação genética do gado Nelore.

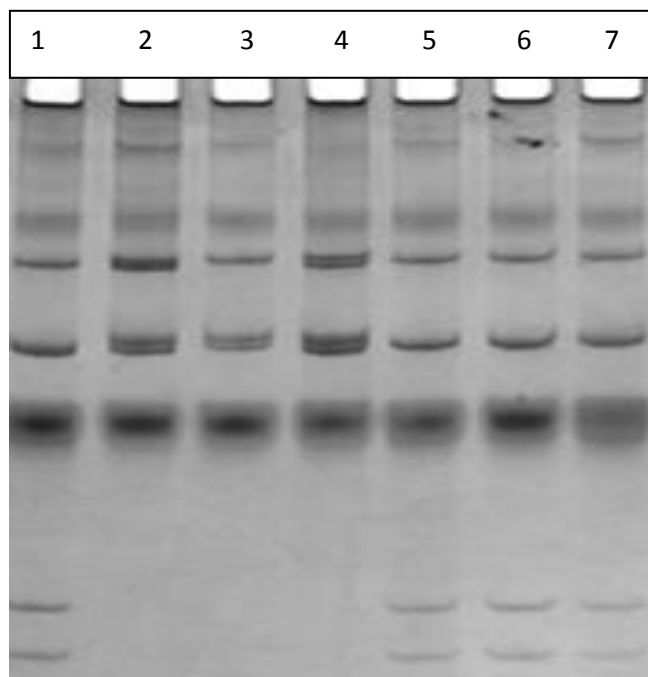


Figura 19: Gel de RFLP referente às análises de padrão de migração para o marcador 4751. As amostras 1,5,6,7 se caracterizam pelo genótipo heterozigoto CT, já as amostras 2,3e 4 são homozigotos TT.

5.1.4. Estrutura genética da população para os marcadores de interesse

As frequências genotípicas calculadas para cada marcador estão descritas na tabela a seguir:

TABELA 16 –Estimativa das frequências genótípicas para cada marcador.

Marcador	Genótipo	Frequência genotípica
CAPN 316	C/C	0
	C/G	0,02
	G/G	0,98
CAPN 530	A/A	0
	A/G	0,04
	G/G	0,96
CAPN 4751	C/C	0,05
	C/T	0,42
	T/T	0,53

Os marcadores CALPN 316 e CAPN 530 mostram frequência genotípica com distribuição irregular, ou seja, a frequência de homozigotos GG em ambos os casos foi maior em relação aos demais genótipos. Em ambos nos casos não houve a presença dos homozigotos para AA para CALPN 530 e, do homozigoto CC, para CALPN 316.

Em oposição, o marcador para CALPN 4751 apresentou uma distribuição de genótipos satisfatória para as análises de associação do marcador com a os valores de FC.

Na tabela 17, a distribuição das frequências alélicas para cada marcador investigado é apresentada.

TABELA 17- Estimativa de frequências alélicas para cada marcador.

Marcador	Frequências alélicas (p)	Frequências alélicas (Q)
CAPN 316	F(C)= 0,01	F (G)=0,99
CAPN 530	F (A)=0,02	F(G)=0,98
CAPN 4751	F (C)=0,26	F(T)=0,74

Os resultados obtidos revelam que, para o marcador CALPN 316, o alelo G está praticamente fixado na população investigada, cuja frequência foi de 0,99 enquanto que o alelo C ocorreu em frequência de 0,01. A baixa frequência do alelo C pode sugerir duas hipóteses, a primeira sugere que o polimorfismo tenha surgido apenas em animais de origem *Bos taurus* depois da separação das subespécies *Bos indicus* e *Bos taurus*. A segunda hipótese sugere que os alelos C dessa população possam ter sido introduzidos ao longo de acasalamentos durante a fase de formação do rebanho atual (CARVALHO, 2008).

O marcador CAPN 530 também apresentou pouca variabilidade, sendo que a menor frequência foi observada para o alelo A (0,02). Em oposição o alelo G foi o mais frequente (0,98).

Ambos os alelos C (CALPN 316) e A (CALPN 530), teriam dificuldades ao ser usado como marcadores para maciez de carnes, já que possuem frequências muito baixas, sendo pouco informativos para tal fim. Outros autores já citados também encontraram frequências extremamente baixas para esses alelos, corroborando a ideia de sua ineficácia como marcador para maciez de carne em populações zebuínas.

As distribuições alélicas para o marcador CALP 4751 foram mais regulares, apesar do alelo C se encontrar em frequências menores do que o alelo T. Tais resultados sugerem que o uso do marcador CALPN 4751 teria maior eficácia do que qualquer outro marcador desse estudo no quesito maciez, já que o mesmo ocorre com maior frequência no rebanho, sendo mais fácil de distingui-lo e selecionar animais com potencial genético superior.

5.2.Caracterização de informações fenotípicas da população

O valor médio estimado para a maciez de carne na população investigada, avaliada através da força de cisalhamento, foi de 4,79, para a carne não maturada, conforme observado na Tabela 18, com uma variação de 3,68 para mais e 2,16 para menos, o que caracteriza o padrão da carne zebuína, considerada dura em relação ao padrão da carne europeia.

Já em relação à carne maturada em 14 dias, os resultados médios da força de cisalhamento foi 3,00, variando 2,98 para mais e 1,05 para menos.

Com isso, a diferença entre a força de cisalhamento média encontrada na carne maturada e não maturada foi de 1,79, com uma diferença de 2,49 entre os valores máximos e uma diferença de 0,68 para os valores mínimos. O que mostra a melhora em relação à maciez durante a maturação, principalmente pela ação do sistema enzimático das calpaínas responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas no *post mortem*.

TABELA 18- Valores médios da força de cisalhamento na carne não maturada e com maturação de 14 dias, valores máximos e mínimos observados.

Tempo	Número De Amostras Avaliadas	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo
Maciez T0	53	4,79	2,63	8,47
Maciez T14	55	3,00	1,95	5,98

Os resultados encontrados para a maciez podem variar de acordo com a região do bife em que foi feita a medição da força de cisalhamento (FC). Isso porque regiões distintas do mesmo bife podem apresentar regiões com mais ou menos gordura, regiões com mais ou menos músculo dependendo da sua proximidade com músculos do traseiro, entre outras. Tal fato justifica a variância entre os valores encontrados para um mesmo bife. E para que os resultados fossem os mais reais possíveis foram feitas seis medições de força de cisalhamento por bife, na qual a maior e a menor delas foram descartados afim de se chegar ao valor real da força de cisalhamento.

5.3.Avaliação do efeito dos marcadores de interesse sobre a maciez da carne

5.3.1. CAPN 316

A força média de cisalhamento da carne maturada encontrada para o marcador CAPN 316 foi de 5,98 para o heterozigoto CG (não havendo variação, pois somente um individuo apresentou tal genótipo), e 2,95 para o homozigoto GG variando 2,46 para mais e 1,00 para menos), não havendo a presença do homozigoto CC para a caracterização de sua maciez.

Os dados obtidos para o marcador em questão são insuficientes para uma conclusão a respeito da maciez, visto que não há homozigotos CC, e somente um heterozigoto CG, não havendo material suficiente para resultados conclusivos.

Outros estudos encontraram resultados similares em relação à baixa frequência de alelos C (LARA, 2012; CASAS et al 2005; CARVALHO, 2008; CORVA et al, 2007). Assim, devido à sua baixa frequência na população investigada, CAPN 316 é um marcador ineficaz para maciez de carne bovina da raça Nelore.

Além disso, com os resultados obtidos nesse trabalho não foi possível conclusão sobre qual seria o alelo favorável.

5.3.2. CAPN 530

O resultado médio da força de cisalhamento para a carne maturada foi de 2,82 para homozigotos GG, variando 3,16 para mais e 0,87 para menos. Para o heterozigoto AG a média foi de 2,53 variando 0,18 para mais e para menos. Não houve casos de homozigotos AA.

Em toda a população estudada, apareceram somente dois animais heterozigotos e nenhum homozigoto para AA, o que indica que o alelo G está praticamente fixado nessa população. Visto isso, apesar de resultados menores de força de cisalhamento para os possuidores do alelo A, não há resposta conclusiva se o alelo A é realmente favorável para a maciez, já que o número de indivíduos amostrados com esse alelo foi pequeno.

No entanto, com base em outros trabalhos já citados, o alelo A é sim o alelo favorável para maciez nesse caso. Com isso, mesmo com o pequeno número de genótipos AG e ausência de AA, os resultados encontrados nesse trabalho podem ser conclusivos, desde que sejam baseados nos demais autores.

Mesmo com a corroboração do alelo A favorável para maciez, ele não pode ser considerado um marcador eficiente, uma vez que sua frequência é baixa aparecendo com distribuição insatisfatória na população Nelore.

5.3.3. CAPN 4751

A força de cisalhamento média na carne maturada encontrada para o homozigoto CC foi de 3,14. No entanto tal número não pode ser conclusivo, já que a frequência de CC na população não foi representativa (5,45%) e com um valor extremamente elevado de desvio padrão (61,33). No entanto, ao se excluir a amostra que se encontra extremamente fora do valor da média, consegue-se um valor mais real de força de cisalhamento, sendo esta 2,30.

Assim, ao tirar as amostras que fogem do padrão por algum motivo (medição da força de cisalhamento em região com mais gordura, mais próximo à musculatura da peça, etc.), nota-se que o homozigoto CC é favorável à maciez.

Já a força de cisalhamento média da carne maturada para o homozigoto TT foi em média de 3,18. Ao comparar tal valor com a média encontrada em heterozigotos, com valor de 2,89, percebemos que o C é de grande valia para a maciez, contrapondo-se ao T.

Além de descobrir o alelo C como favorável para maciez, ele aparece com uma distribuição satisfatória na população, conforme discutido anteriormente. Esses dois pontos são fundamentais para descrever um marcador para determinada característica. Visto isso, podemos considerar o CAPN 4751 um potencial marcador para seleção de animais superiores com relação à maciez de sua carne.

6. CONCLUSÃO

Os marcadores CAPN 316 e CAPN 530 apresentaram pouca variabilidade, na população Nelore investigada, sendo ineficazes como marcadores para maciez em população da raça nelore.

A análise de associação da maciez de carne, avaliada pela força de cisalhamento e o marcador CAPN 316 foi inconclusiva, devido ao pequeno número de animais investigados e a distribuição de seus genótipos. Para o marcador CAPN 530, o alelo A foi favorável, apesar do pequeno número de animais investigados, os resultados obtidos foram corroborados com estudos anteriores.

Para o marcador CAPN 4751 houve número suficiente de indivíduos por genótipos, para sugerir como favorável para maciez o alelo C. Para esse mesmo caso, houve uma distribuição satisfatória dos alelos entre a população, podendo o mesmo ser utilizado como um marcador eficiente para selecionar bovinos da raça Nelore com potencial genético superior para a maciez de carne.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Rebanho Bovino Brasileiro. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp> Acesso em: fevereiro de 2014.

ALENCAR, M.M. Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. In: Simpósio Sobre Melhoramento Animal, reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 41., 2004, campo grande. anais. campo grande: sbz, 2004. cd-rom

ALMEIDA, A.K.; MICHELS, I.L. O Brasil e a economia-mundo: o caso da carne bovina. Ensaios FEE, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 207-230, maio 2012

ALVES D.D., GOES R.H.T.B. & MANCIO A.B. 2005. Maciez da carne bovina. Ciência Animal Brasileira6, 135-49.

ALVES, D.D.; TONISSI, R.H.; GOES, B. Maciez da carne bovina. Ciência Animal Brasileira, v.6, n.3, p.135-149, 2005.

BANSBACK, B. World Markets for European Meat in The Future of the European Meat Industry. Bruxelas, Bélgica, Set 2001.

BARENDSE, W et al. Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. Genetics, Baltimore, v. 176, n.8, p.2601-2610, 2007.

BARENDSE, W. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248, Patent US6383751, Disponível em < <http://www.uspto.com>>, acesso em janeiro de 2014.

BEFFPOINT. Panorama mundial do setor da carne em 2003. Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/bn/especiais>. Acesso em janeiro de 2014.

BESSA, R.J.B.; ALVES, S.P.P. Composição lipídica de carne bovina de grupos genéticos taurinos e zebuínos terminados em confinamento. Revista Brasileira de Zootecnia, v.38, n.9,

p.1841-1846, 2009.

BIANCHINI, W.; SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.B. et al. Crescimento e características de carcaça de bovinos superprecoces Nelore e Simental e mestiços. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, n.3, p.554-564, 2008.

BIANCHINI, W.; SILVEIRA, A.C.; JORGE, A.M. et al. Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos superprecoces. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.6, p.2109-2117, 2007.

BOEHM M. L., KENDALL T. L., THOMPSON V. F. & GOLL D. E. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science* 76, 2415-34.

CARVALHO, M. E.; ELER, J. P.; AFAZ, A. L. M.; FERRAZ, J. B. S.; REGITANO, L. C. A.; MEIRELLES, F. V.; BALIEIRO, J. C. de C. A. Avaliação de diferentes combinações genóticas para polimorfismo no gene u-calpaína e calpastatina associados com a maciez da carne em animais da raça Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4., 2007, Campinas, SP. Mercado do Século XXI: qualidade, segurança alimentar, certificação e rastreabilidade - anais. Campinas: ITAL/CTC, 2007. 253 p.

CARVALHO, M.E. ; ELER, J.P. ; CUCCO, D. C. ; Resende, F.M. ; Ferraz, J.B.S. ; MEIRELLES, F.V. ; REGITANO, L.C.A. ; BALIEIRO, J. C. C. . Efeito médio desubstituição alélica para os polimorfismos CAPN4753 e UOGCAST no gene da calpaína e calpastatina. In: VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2008, São Carlos SP. Anais... VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2008. v. VII.

CARVALHO, M.E. Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados a maciez de carne da raça Nelore. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

CARVALHO, T.D.; SOARES, C.O.; SIQUEIRA F. Marcadores moleculares aplicados à bovinocultura de corte. Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, Campo Grande – MS, 2009.

CARVALHO, M. E. Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Pirassununga, 2008. Dissertação de mestrado-faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos- Universidade de São Paulo. 56p.

CASAS E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, Savoy, v 83, n.1., p 2661-2668, 2005.

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

CASAS E., WHITE S.N., RILEY D.G., SMITH P.L., BRENNEMAN R.A., OLSON T.A., JOHNSON D.D., COLEMAN S.W., BENNETT G.L. & CHASE C.C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 83, 2661-8.

CASAS E., WHITE S.N., WHEELER T.L., SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE, M., RILEY D.G., CHASE C.C., JOHNSON JR., D.D. & SMITH T.P.L. (2006). Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits.

CASAS E., WHITE S.N., WHEELER T.L., SHACKELFORO S.D., KOOHMARAIE M., RILEY D.G., CHASE-JUNIOR C.C., JOHNSON, D.D. & SMITH T.P.L. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beefcattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84, 520-525.

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

CORVA, P. et al. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle for Argentina. *Genetics and molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.30, n 4, p. 1064-1069, 2007.

CROUSE, J.D.; CUNDIFF, L.V.; KOC, R.M.; KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos Taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. *Journal of Animal Science*, v.67, p.2661-2668, 1989.

CURI, R. A., DE OLIVEIRA, H. N., SILVEIRA, A. C., LOPES, C. R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*, v. 36, p. 58-62, 2005.

DEL LAMA, S.N. Caracterização genética das raças zebuínas criadas 1 no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos. 1991. 207f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DELGADO, C. LIVESTOCK TO 2020: The Next Food Revolution, 2001. Delgado, C.L. Impact of the livestock revolution on food security and poverty alleviation in developing countries. Workshop on Sustainable Animal Production and World Food Supply to 2020. Hannover, August 4th, 2000.

EMBRAPA. Perspectivas de uso dos marcadores moleculares na bovinocultura de corte. ISSN 0103-9865, 2006.

EMBRAPA. Técnica de manejo reprodutivo em bovinos de corte. apud. CHAVES, R. M.; SOUZA, J. A. T.; NASCIMENTO, I. M. R.; LOPES, J. B.; et al. Avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Nelore através da classificação andrológica por pontos (CAP) e do teste da libido. *Medicina Veterinária*, Recife, v.1, n.1, p.26-32, 2007.

EUCLIDES FILHO, K.; FIGUEIREDO, G.R. Retrospectiva e perspectivas de cruzamentos no Brasil. In: Simpósio Brasileiro Sobre Cruzamento De Bovinos De Corte, 1., 2003, Londrina, PR. Anais... Londrina: IAPAR, 2003. 1 CD-ROM.

FERREIRA, M.E. , GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3° ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998.pp.220. (Embrapa-Cinargem documento 20)

FORTES, M.R.S. Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 comopossíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

FRIES, R., RUVINSKY, A. The genetics of cattle. New York: CABI Publishing, 1999. 710p.
GIANNONI, M. A., GIANNONI, M. L. Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos. Editora Nobel, São Paulo, 1987, 463p.

GOLL D.E., THOMPSON V.F., LI H., WEI W. & CONG J. 2003. The Calpain System. *Physiological Review* 83, 731-01; doi:10.1152/physrev.00029.2002

GRISART, B., FARNIR, F., KARIN, L., CAMBISANO, N., KM, J., KVASZ, A., MNI, M., SIMON, P., FRÈRE, J., COPPIETERS, W., GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *PNAS*, v. 101, p. 23982403, 2004.

IBGE. Pesquisa pecuária municipal. In: SIDRA. IBGE, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: fevereiro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Indicadores IBGE estatística da produção pecuária junho de 2012. 2012. 35p.

KOOHMARAIE, M. Nebraska:USA. Meat Animal Research Center, 11p.1994.

LARA, M A C ; PIVETTA, A. J. ; GUNTA GUTMANIS ; SOARES, W V B ; EDER PINATTI ; CAVALCANTE NETO, A. . Estudio de genes relacionados con caracteres de producción en la raza bovina Caracu. In: Simposio Internacional de Recursos Genéticos de

América Latina y el Caribe, 2011, Quito. Resúmenes de los Trabajos presentados. Quito: SIRGEALC, 2011. v. VIII. p. 269-271.

LARA, M A C ; FARIA, MARCELO HENRIQUE DE ; RESENDE, FLÁVIO DUTRA ; ANDREA JUDICE PIVETTA ; SIQUEIRA, GUSTAVO REZENDE ; EDER PINATTI ; CAVALCANTE NETO, A. . Associação do SNP2959 do gene Calpastatina com maciez de carne em cruzados (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). In: Simpósio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, 2010, João Pessoa. Memoriais. Campina Grande: UFPB; Instituto Nacional do Semiárido, 2010. v. XI. p. 586-589.

LARA, M. A. C. ; EDER PINATTI ; NARDON, R. F. ; FARIA, MARCELO H ; CAVALCANTE NETO, A. ; GUTMANIS, G. ; SOARES, W. V. B. ; FIGUEIREDO, LEOPOLDO ANDRADE DE ; MACHADO, J. P. ; DEMARCHI, JOÃO J A A ; RESENDE, F. D. . Polimorfismo de base única nos genes calpaína, calpastatina e leptina relacionados à maciez de carne em bovinos. In: XXIII ALPA, 2013, La Habana. XXIII de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, 2013. v. 13.

LARA, M.A.C., GUTMANIS, G., PINATTI , E., FARIA, M.H., CAVALCANTE-NETO A., RESENDE, F. D. . Detecção de polimorfismos no exon14 do gene CAPN1 em raças bovinas europeias, zebuínas e seus mestiços. Revista AICA, v. 2, p. 197-202, 2012.

LARA, M. A. C. ; CONTEL, E. P.B. . Genetic diversity of the Brazilian Creole cattle PÃ - duro assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. Revista Brasileira de Zootecnia (Online) v. 41, p. 2316-2322, 2012.

LUCHIARI FILHO, A. Pecuaria da carne bovina. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000. 134p

MACHUGH, D. E. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle.1996, 257p. Tese (Department of Genetics)- Trinity College, University of Dublin.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. Animais do descobrimento: Raças domésticas da história do Brasil. Brasília: Embrapa; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 232p.

MARQUUES, V.M. Biologia molecular e genética bacteriana.- Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348p.

MARTINEZ, M. L.; Machado M A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas.. In: Simpósio Nacional de Melhoramento animal, 2002, Campo Grande. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2002. p. 48-57.

Mestre em Genética e Toxicologia Aplicada. Universidade Luterana Do Brasil, Canoas, 2007.
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agronegócio brasileiro em números, 2010. 14p.

MONCAU, C.T.; POLETI, M .D.; MORAES, F. M. et al. Aplicação da proteômica na avaliação do efeito de marcadores moleculares para calpaína e calpastatina na maciez da carne bovina. X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2013.

MORELI, G. Realidade da Pecuária Brasileira. R. Tecn. Gest.Pec., n. 14, p. 22-27, nov., 2002.

MORRIS, C.A. et al. Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand and Australia. In: Association For the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 14, 2001. Queenstown. Proceeding...Queenstown, 2001.p. 17—22.
NEW ENGLAND BIOLABS INC. 12 Catalog & technical reference, 2011.384p.

OLIVEIRA, A.L. 2000. Maciez da carne bovina. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia 33, 7-18.

P. B. D., WEIMER, T. A. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. Ciência Rural, v. 37, p. 206-211, 2007.

PACKER, I. U.; PAZ, C. P. Impactos da biotecnologia no melhoramento animal. In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). A Produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.717-727.

PAGE B.T., CASAS E., HEATON M.P., CULLEN N.G., HYNDMAN D.L., MORRIS C.A., CRAWFORD A.M., WHEELER T.L., KOOHMARAIE M., KEELE J.W., SMITH T.P.L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness en cattle. *Journal Animal Science* 80, 3077-85.

PAGE B.T., CASAS E., QUAAS R.L., THALLMAN R.M., HEELER T.L., SHACKELFORO S.D., KOOHMARAIE M., WHITE S.N., BENNETT G.L., KELLE J.W., DIKEMAN M.E. & SMITH T.P. 2004. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal Animal Science* 82, 3474-81.

PAGE, B.T. et al. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science*, Savoy, v.82, n.12, p.3474-81, 2004.

PAGE, B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CPN for association with meat tenderness in cattle. *Journal of animal science*. Savoy, v.80, n.12, p.3077-3085, 2002.

PASSOS, D.T., HEPP, D., MORAES, J.F.C. AND WEIMER, T.A., 2007. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 124.

PEREIRA, J. C. C. *Melhoramento Aplicado à produção animal*. 3. ed., Belo Horizonte: FEPMVZ, 609f. 2004.

ROSSATO, L.V.; BRESSAN, M.C.; RODREIGUES, E.C.; CAROLINO, M.I.A.C.M.; SAS INSTITUTE. Cary: SAS Institute Inc., 1.464 p. (1999).

SCHENKEL, F. S. et al. *Journal of Animal Science*, 84 (2) 291, 2006.

SCHENKEL, F.S. 2000. Breeding Programs of Bos Taurus Breeds in Brazil. *Anais do III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal*. Belo Horizonte, MG. p. 69-75.

SENGUER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. USA, Current Conception Inc, 1999.

SILVEIRA, J.C. marcadores moleculares e associação com características reprodutivas em dois rebanhos bovinos do rio grande do sul. Dissertação para obtenção do Título de Doutor.

STEIGLEDER, C. S., ALMEIDA, E. A., WEIMER, T. A. Genetic diversity of Brazilian creole cattle based on fourteen microsatellite loci. Arch. Zoote. v. 53, p. 3-11, 2004.

SUGUISAWA, L ; SOUTELL, R.V.G.;SILVA, C.L.S.P; FONZAR, J.F.; OLIVEIRA, F.P.MARINI, A.; JÚNIOR, A.G.; FILHO, W.F. Utilização de marcadores moleculares para qualidade de carne em bovinos de corte. Ciên.Agr.Saúde. FEA, Andradina, v. 2, n. 2, p 43-46, 2002.

VAN EENENNAAM, A. L. et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. Journal of Animal Science, Savoy, v.85, p. 891, 2006.

WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M.; CROUSE, J.D. Characterization of biological types of cattle (Cycle VI). J. Anim. Sci., Nebraska, v.74, p. 1023 – 1035, 1996.

WHITE S.N., CASAS E., WHEELER T.L., SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE M., RILEY D.G, CHASE C.C., JOHNSON JR., D.D., KEELE J.W. E SMITH T.P.L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos taurus, and crossbred descente.J. Anim.Sci. 2005.83: 2001-2008.

YASSU, F.Brasil assume liderança mundias.DBO Rural, n.280, p.30, 2004

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Resultados da genotipagem

TABELA 19- Resultados referentes à genotipagem de todas as amostras estudadas.

Número da amostra	Identificação da amostra	Genótipo para CALPN4751	Genótipo para CALPN530	Genótipo para CALPN 316
1	1033	CC	GG	GG
2	1034	TT	GG	CG
3	1035	TT	-	GG
4	1036	CT	GG	GG
5	1037	CT	-	GG
6	1038	TT	-	GG
7	1039	TT	-	GG
8	1040	CT	GG	GG
9	1041	CT	-	GG
10	1042	TT	-	GG
11	1043	CT	-	GG
12	1044	CC	GG	GG
13	1045	TT	GG	GG
14	1046	TT	GG	GG
15	1047	CT	AG	GG
16	1048	TT	GG	GG
17	1049	CT	GG	GG
18	1050	CT	GG	GG
19	1051	TT	GG	GG
20	1052	TT	GG	GG
21	1053	CT	GG	GG
22	1054	TT	GG	GG
23	1055	TT	GG	GG
24	1056	TT	GG	GG
25	1057	CT	GG	GG
26	1058	TT	GG	GG

27	1059	CT	GG	GG
28	1060	CT	GG	GG
29	1061	TT	GG	GG
30	1062	CT	AG	GG
31	1063	TT	GG	GG
32	1064	TT	GG	GG
33	1065	TT	GG	GG
34	1066	CT	GG	GG
35	1067	TT	GG	GG
36	1068	CT	GG	GG
37	1069	CT	GG	GG
38	1070	TT	GG	GG
39	1071	TT	GG	GG
40	1072	CT	GG	GG
41	1073	TT	GG	GG
42	1074	CT	GG	GG
43	1075	TT	GG	GG
44	1076	CT	GG	GG
45	1077	TT	GG	GG
46	1078	CT	GG	GG
47	1079	TT	GG	GG
48	1080	CC	GG	GG
49	1081	CT	GG	GG
50	1082	CT	GG	GG
51	1083	TT	GG	GG
52	1084	CT	GG	GG
53	1085	TT	GG	GG
54	1086	TT	GG	GG
55	1087	TT	GG	GG

8.2. Anexo 2: Resultados relativos à força de cisalhamento média

TABELA 20-Resultados das forças de cisalhamento médias para cada amostra.

Número	Identificação da amostra	Força de cisalhamento média em T0	Força de cisalhamento média em T14
1	1033	6,31	4,82
2	1034	5,1	5,98
3	1035	5,08	5,03
4	1036	5,68	5,41
5	1037	6,83	4,63
6	1038	5,42	4,88
7	1039	8,47	4,37
8	1040	5,38	4,0
9	1041	5,12	3,36
10	1042	6,1	3,67
11	1043	6,45	4,12
12	1044	3,37	2,25
13	1045	3,38	2,40
14	1046	3,86	2,87
15	1047	3,31	2,35
16	1048	3,4	1,97
17	1049	4,68	2,07
18	1050	4,6	2,36
19	1051	4,7	2,62
20	1052	4,3	2,23
21	1053	4,61	3,15
22	1054	5,82	2,91
23	1055	5,2	4,21
24	1056	4,7	2,25
25	1057	4,02	2,13
226	1058	5,73	3,68
27	1059	4,96	2,31
28	1060	5,18	2,33

29	1061	3,6	2,10
30	1062	5,2	2,72
31	1063	4,21	3,11
32	1064	5,1	2,9
33	1065	4,05	2,05
34	1066	4,97	5,21
35	1067	5,21	2,08
36	1068	4,43	2,08
37	1069	5,45	2,13
38	1070	3,65	2,45
39	1071	3,13	1,95
40	1072	2,63	1,95
41	1073	5,06	3,26
42	1074	4,16	2,38
43	1075	3,38	2,21
44	1076	-	1,96
45	1077	4,9	2,62
46	1078	4,42	2,58
47	1079	5,02	2,43
48	1080	4,37	2,36
49	1081	4,67	2,50
50	1082	5,11	2,75
51	1083	5,06	4,28
52	1084	4,78	2,2
53	1085	-	2,76
54	1086	5,05	3,58
55	1087	4,9	2,37

8.3. Anexo 3 : Resultados da força de cisalhamento da carne maturada

TABELA 21- Todos os seis valores encontrados para força de cisalhamento na carne maturada aos 14 dias.

Número	Identificação da amostra	Maciez-1	Maciez-2	Maciez-3	Maciez-4	Maciez-5	Maciez-6
1	1033	4.45	4.80	6.85	3.80	4.50	5.55
2	1034	5.15	7.95	5.15	5.95	6.70	6.15
3	1035	4.90	6.10	4.50	3.25	4.90	5.85
4	1036	6.90	5.15	6.10	5.15	5.25	4.80
5	1037	4.85	4.60	4.30	5.30	4.80	3.90
6	1038	4.80	3.60	5.15	7.10	5.60	4.00
7	1039	4.90	4.60	5.35	3.95	3.75	4.05
8	1040	3.80	4.80	5.05	3.00	2.95	4.40
9	1041	4.15	4.95	3.55	2.60	2.80	2.95
10	1042	4.45	5.50	3.50	2.90	3.70	3.05
11	1043	5.80	4.95	4.50	3.05	3.50	3.55
12	1044	2.45	1.95	1.95	2.60	2.00	2.65
13	1045	2.55	2.25	2.35	2.45	2.25	2.60
14	1046	2.70	2.75	3.05	2.35	3.10	3.00
15	1047	3.35	2.40	2.30	2.30	2.40	2.25
16	1048	1.80	1.95	2.15	1.60	2.00	2.55
17	1049	1.80	2.35	2.20	1.90	2.10	2.10
18	1050	2.35	2.35	2.50	2.55	2.05	2.20
19	1051	3.00	2.20	3.10	2.20	2.45	2.85
20	1052	2.15	3.10	2.25	2.20	2.30	2.20
21	1053	2.60	3.20	3.35	3.45	2.95	3.10
22	1054	2.25	3.45	2.65	3.40	2.40	3.20
23	1055	4.50	3.85	3.60	4.40	4.25	4.35
24	1056	2.15	2.35	2.20	2.75	2.30	2.00
25	1057	1.95	2.10	2.00	2.40	2.40	2.05
226	1058	3.90	4.25	3.50	3.75	3.40	3.60
27	1059	2.25	1.95	2.15	2.60	2.50	2.35

28	1060	1.95	2.20	2.45	2.35	2.60	2.35
29	1061	2.00	2.10	1.90	2.20	2.10	2.30
30	1062	2.65	2.50	2.95	2.70	2.95	2.60
31	1063	2.80	2.90	3.25	3.30	3.00	3.45
32	1064	3.20	2.80	2.60	3.00	3.05	2.75
33	1065	2.00	1.90	2.00	2.30	2.15	2.05
34	1066	5.30	4.75	5.50	5.10	5.35	5.10
35	1067	2.35	2.20	1.85	2.20	1.95	2.00
36	1068	2.00	1.95	1.85	2.10	2.30	2.40
37	1069	2.45	2.20	2.15	2.20	2.00	1.85
38	1070	2.50	2.25	2.55	2.40	2.35	3.15
39	1071	1.80	1.95	2.00	2.15	1.75	2.05
40	1072	1.90	1.95	1.80	1.90	2.10	2.05
41	1073	3.60	3.30	2.75	4.25	3.00	3.15
42	1074	2.50	2.50	2.30	2.30	2.45	2.20
43	1075	2.50	2.10	2.00	2.75	2.20	2.05
44	1076	1.50	2.30	1.85	2.20	1.10	3.80
45	1077	2.25	2.45	2.80	2.35	2.90	4.65
46	1078	2.30	2.60	2.45	3.15	2.40	2.90
47	1079	2.85	2.00	2.90	2.30	2.10	2.50
48	1080	1.45	2.15	2.90	2.15	2.95	2.25
49	1081	2.50	3.85	2.35	2.40	2.35	2.75
50	1082	4.40	2.65	2.55	2.80	3.00	1.20
51	1083	2.50	4.55	5.25	4.15	3.85	4.60
N 52	1084	1.60	2.70	2.10	2.45	2.15	2.10
53	1085	3.35	2.55	2.55	3.05	2.90	2.40
54	1086	3.00	3.75	3.50	4.85	2.30	4.10
55	1087	2.45	2.30	2.60	4.45	2.15	1.30

8.4. Anexo 4: Resultados da força de cisalhamento para carne não maturada

TABELA 22- Todos os seis valores encontrados para força de cisalhamento na carne não maturada.

Número	Identificação da amostra	Maciez-1	Maciez-2	Maciez-3	Maciez-4	Maciez-5	Maciez-6
1	1033	6.10	6.25	6.65	5.75	6.60	.
2	1034	4.20	4.75	5.00	5.90	4.85	5.80
3	1035	4.10	6.10	4.40	5.50	5.50	4.95
4	1036	6.10	5.60	4.85	6.30	5.10	5.95
5	1037	8.05	8.00	9.05	5.40	3.50	5.90
6	1038	5.70	7.40	5.00	5.75	4.15	5.25
7	1039	8.10	7.95	5.80	9.25	10.05	8.60
8	1040	4.95	5.00	5.00	5.05	7.45	6.50
9	1041	5.00	5.15	5.80	4.85	4.90	5.45
10	1042	5.65	5.00	5.95	6.65	7.90	6.10
11	1043	6.85	8.05	6.75	6.00	6.00	6.20
12	1044	2.90	3.10	3.40	3.35	3.90	3.65
13	1045	2.85	4.15	3.35	3.65	3.65	2.90
14	1046	3.55	4.80	3.80	3.95	3.45	4.15
15	1047	2.80	3.40	3.05	4.75	3.60	3.20
16	1048	4.90	3.00	3.50	3.10	3.30	3.70
17	1049	4.85	4.95	4.90	4.60	4.40	4.35
18	1050	4.65	4.60	5.05	4.55	4.60	4.30
19	1051	4.20	4.85	5.25	5.00	4.35	4.60
20	1052	4.80	4.70	4.00	4.00	4.00	4.50
21	1053	3.60	3.75	5.25	4.60	4.95	5.15
22	1054	5.95	5.75	5.80	5.30	5.80	6.10
23	1055	5.50	5.50	4.85	5.45	4.75	5.05
24	1056	4.50	4.85	4.60	4.55	4.85	5.00
25	1057	4.70	4.00	3.85	3.95	4.10	4.05
226	1058	5.75	6.00	4.25	5.20	6.00	6.00
27	1059	4.95	5.00	6.70	4.80	4.80	5.10

28	1060	5.10	4.95	4.80	5.45	5.30	5.40
29	1061	3.50	3.75	3.60	3.75	3.15	3.55
30	1062	4.85	5.50	4.95	5.60	5.20	5.15
31	1063	4.25	3.95	3.80	4.30	4.35	4.40
32	1064	5.10	5.15	5.10	4.95	5.20	5.05
33	1065	4.10	3.80	4.30	4.50	3.90	3.90
34	1066	4.95	4.80	5.00	5.20	5.05	4.90
35	1067	5.30	5.00	5.60	4.95	5.45	5.10
36	1068	4.80	4.25	4.35	4.35	4.00	4.85
37	1069	4.60	5.65	5.20	5.60	5.65	5.35
38	1070	3.25	3.25	3.60	4.50	4.00	3.75
39	1071	2.95	3.00	3.50	3.25	3.15	3.15
40	1072	2.50	2.75	2.65	2.70	2.65	2.55
41	1073	4.50	4.75	5.50	5.00	5.00	5.50
42	1074	4.15	3.95	4.35	4.85	4.20	3.80
43	1075	2.90	3.15	4.50	3.60	3.55	3.25
44	1076	-	-	-	-	-	-
45	1077	5.15	4.85	4.70	4.95	5.10	4.55
46	1078	4.35	4.50	4.05	4.40	4.45	4.75
47	1079	5.15	5.05	4.80	5.15	4.90	5.00
48	1080	4.10	4.35	3.95	4.50	4.65	4.55
49	1081	4.65	5.00	4.50	4.80	4.75	4.50
50	1082	5.30	5.05	5.00	4.80	5.15	5.25
51	1083	5.20	4.95	5.15	4.95	5.10	5.05
52	1084	4.85	4.60	4.95	4.75	4.60	5.00
53	1085	-	-	-	-	-	-
54	1086	5.00	5.10	4.95	5.05	5.25	5.05
55	1087	5.10	4.70	4.95	5.00	4.85	4.80
