UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VANESSA AUGUSTO DE MELLO E SILVA

**Estudo proteômico da carne de bovinos castrados da
raça Nelore com genótipos contrastantes para CAPN e
UOGCAST em diferentes períodos de maturação**

Pirassununga

2012

VANESSA AUGUSTO DE MELLO E SILVA

**Estudo proteômico da carne de bovinos castrados da raça
Nelore com genótipos contrastantes para CAPN e UOGCAST
em diferentes períodos de maturação**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de
Carvalho Balieiro

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S586e Silva, Vanessa Augusto de Mello e
 Estudo proteômico da carne de bovinos castrados da
 raça Nelore com genótipos contrastantes para CAPN e
 UOGCAST em diferentes períodos de maturação / Vanessa
 Augusto de Mello e Silva. -- Pirassununga, 2012.
 116 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Ciências Básicas.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
 Animal.
 Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de C. Balieiro.

 1. Gado zebuino 2. Carne, maciez 3. Proteólise
 4. Força de cisalhamento I. Título.

Dedico

Aos meus pais Boaz e Valéria, fonte das minhas forças, por todo amor e incentivo e por todos os ensinamentos e valores que palavras não podem expressar.

Ao Geraldo, por todo amor, carinho, paciência, companheirismo e, acima de tudo, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus avós, por sempre me incentivarem e se orgulharem das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro pela grande honra de ter sido sua orientada, por compartilhar comigo seus conhecimentos, pelos incentivos a cada etapa, por acreditar na minha capacidade e no meu empenho e por, além de orientador, se mostrar um amigo nos momentos de necessidade.

Ao Professor Dr. Joanir Pereira Eler por me aceitar no programa PAE, que me permitiu, além das aulas do Mestrado, absorver ainda mais conhecimento.

Ao Professor Dr. Saulo da Luz e Silva pela grande contribuição e colaboração para que o experimento fosse realizado.

À Dra. Alessandra Rosa por executar tantas tarefas importantes para o grupo, compartilhar seu conhecimento e também por seus conselhos e sua preocupação com meu bem estar.

À Mirele por toda a inestimável ajuda e atenção, por estar sempre presente e por ser uma pessoa tão doce.

À Cristina e a Bárbara por compartilharem esta jornada.

Ao Adalfredo pela amizade, descontração e companheirismo.

Aos estagiários Vinícius, André, Davi, Gabi, Valéria e Laís pela ajuda com o projeto e por sempre conseguirem descontrair o ambiente.

A todos do abatedouro-escola pelo carinho e apoio durante as coletas das amostras.

Ao pessoal da Seção da Pós-Graduação pela paciência e atenção.

À Sônia e Carmo, da cantina, pelas conversas, risadas e pela constante preocupação comigo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

*“O começo de todas as
ciências é o espanto de as
coisas serem o que são”*

Arístóteles

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Herdabilidades para atividade da calpastatina (24h *post mortem*) **22**

TABELA 2. Herdabilidades para força de cisalhamento **23**

TABELA 3. Herdabilidades para maciez (painel sensorial) **26**

CAPÍTULO 1

TABELA 4. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para as intensidades dos volumes de expressão nos *spots* significativos para amostras avaliadas com um, sete e 14 dias de maturação **46**

TABELA 5. Estimativas da constante de regressão, o coeficiente de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, para as amostras avaliadas ao longo do período de maturação da carne **47**

CAPÍTULO 2

TABELA 6. Marcadores investigados, número de acesso no GenBank, seus respectivos cromossomos, exons e introns, substituição de nucleotídeos, bem como suas posições..... **61**

TABELA 7. Sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada marcador estudado **62**

TABELA 8. Divisão de *pools* para a extração das proteínas de acordo com o genótipo dos animais e quantidade de animais por *pool* **64**

TABELA 9. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para intensidade de expressão dos *spots* significativos para efeito principal da interação CAPN4751(UOGCAST) com um dia de maturação. **70**

TABELA 10. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com um dia de maturação..... **72**

TABELA 11. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para intensidade de expressão dos *spots* com efeitos principais significativos para interação CAPN4751(UOGCAST) com sete dias de maturação **74**

TABELA 12. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com um dia de maturação..... **75**

TABELA 13. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para intensidade de expressão dos *spots* com efeitos principais significativos para interação CAPN4751(UOGCAST) com 14 dias de maturação **77**

TABELA 14. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com 14 dias de maturação **78**

TABELA 15. Média da Força de cisalhamento e quantidade de alelos favoráveis à maciez para cada grupo genético **79**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Determinação do pH e da temperatura da carcaça	34
FIGURA 2. Pesagem do exsudado do interior da embalagem	35
FIGURA 3. Forno elétrico	36
FIGURA 4. Bifes assados sendo resfriados	37
FIGURA 5. Bifes identificados e embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C.....	37
FIGURA 6. Retirada dos cilindros paralelos à fibra muscular	38
FIGURA 7. Determinação da Força de Cisalhamento (“ <i>shear force</i> ”)	38
FIGURA 8. Reidratação das “ <i>strips</i> ” (a) e Focalização Isoelétrica (b)	40
FIGURA 9. Corrida eletroforética da segunda dimensão	41
FIGURA 10. Digitalização da imagem do gel	42
FIGURA 11. Imagem 2DE de músculo <i>Longissimus dorsi</i> destacando os <i>spots</i> com mudanças significativas entre os tempos de um, sete e 14 dias de maturação.....	44

CAPÍTULO 2

FIGURA 12. Determinação do pH e da temperatura da carcaça	55
FIGURA 13. Pesagem do exsudado do interior da embalagem	56
FIGURA 14. Forno elétrico	57
FIGURA 15. Bifes assados sendo resfriados	58

FIGURA 16. Bifes identificados e embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C	58
FIGURA 17. Retirada dos cilindros paralelos à fibra muscular	59
FIGURA 18. Determinação da Força de Cisalhamento (<i>“shear force”</i>)	59
FIGURA 19. Coleta de sangue	60
FIGURA 20. Extração do DNA	60
FIGURA 21. Equipamento utilizado para PCR em tempo real	62
FIGURA 22. Resultado de discriminação alélica por classificação automática. Os pontos verdes representam indivíduos heterozigotos para o polimorfismo em questão, o ponto vermelho e os pontos azuis representam os indivíduos homozigotos para ambas as formas alélicas. Os sinais em X representam amostras que não amplificaram o suficiente	63
FIGURA 23. Reidratação das <i>“strips”</i> (a) e Focalização Isoelétrica (b)	66
FIGURA 24. Corrida eletroforética da segunda dimensão	67
FIGURA 25. Digitalização da imagem do gel.....	67
FIGURA 26. Gel 2DE de amostras com maturação de um dia, em evidência o único <i>spot</i> (73) com efeito significativo para os marcadores para calpaína e calpastatina	71
FIGURA 27. Gel 2DE de amostras com maturação de sete dias, em evidência os <i>spots</i> com efeito significativo para os marcadores para calpaína e calpastatina	73
FIGURA 28. Gel 2DE de amostras com maturação de sete dias, em evidência os <i>spots</i> com efeito significativo para os marcadores para calpaína e calpastatina	76

RESUMO

SILVA, V.A.M. **Estudo proteômico da carne de bovinos castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes para CAPN e UOGCAST em diferentes períodos de maturação.** 2012.116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O Brasil dedica-se em grande parte à criação de animais *Bos indicus*, principalmente da raça Nelore e seus cruzamentos, já que são animais resistentes a doenças e adaptados ao clima tropical. Entretanto, em relação à característica de maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal. Particularmente neste aspecto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à carne mais macia e com redução na variação da maciez da carne. Durante o período de maturação da carne, a proteólise é o fator que mais contribui com o aumento da maciez. As proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *post mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez da carne. Entretanto, existe dificuldade em obter dados fenotípicos relacionados à maciez. Assim, a Seleção Assistida por Marcadores (MAS) pode ter grande impacto para melhorar estas características de difícil mensuração. Marcadores do gene da calpaína (CAPN) e da calpastatina (CAST), denominados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), já foram analisados e polimorfismos foram associados favoravelmente com maciez da carne bovina. Entretanto, pouco se conhece sobre a expressão gênica da calpaína e da calpastatina, particularmente em bovinos castrados da raça Nelore com diferentes combinações genóticas para os marcadores moleculares SNP associados a essas proteases. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica da calpaína e da calpastatina em animais castrados da raça Nelore, com genótipos contrastantes identificados previamente por marcadores SNPs para um, sete e 14 dias de maturação. Foram genotipados 16 animais castrados da raça Nelore e dois marcadores foram utilizados, sendo um associado ao gene da μ -calpaína e outro associado à calpastatina (CAPN4751 e UOGCAST). Através da eletroforese bidimensional (2DE) as intensidades de expressão dos *spots* foram determinadas. As análises estatísticas foram

realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), utilizando o procedimento PROC MIXED. A proteólise *post mortem* entre os tempos determinados de maturação foi avaliada e foram observados que 41 *spots* apresentaram efeitos significativos entre os tempos de maturação. Seis *spots* explicaram 57% da variabilidade da maciez aos 14 dias de maturação. Com o objetivo de verificar a existência de possíveis diferenças de expressão gênica entre amostras com genótipos distintos, avaliações proteômicas foram realizadas visando avaliar as diferenças no perfil proteico e foram baseadas no estudo comparativo (*match*) dos géis *inter* e *intra* combinações genotípicas. Dois *spots* explicaram 69% da variabilidade da maciez aos sete dias de maturação. Para o período de 14 dias de maturação 19 *spots* apresentaram efeito principal significativo para a fonte de variação de interação CAPN4751(UOGCAST) e, neste caso, a análise de regressão apresentou um *spot* que explica 70% da variabilidade da maciez aos 14 dias de maturação.

PALAVRAS-CHAVE: maciez da carne bovina; força de cisalhamento; proteólise.

ABSTRACT

SILVA, V.A.M. **Proteomic study of beef from castrated Nellore with contrasting genotypes for CAPN and UOGCAST at different stages of aging.** 2012.116f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Brazil is largely devoted to the breeding of *Bos indicus*, especially Nellore and their intersections, because these animals are resistant to diseases and adapted to tropical climate. However, in relation to beef tenderness, restrictions have been assigned to this breed. Particularly in this respect, there is great interest in the genetic selection of animals with more tender beef and reduced variation in meat tenderness. During the aging of the meat, proteolysis is the major factor that contributes to the increased tenderness. The neutral proteases activated by calcium ions, called calpains, are partially responsible for postmortem proteolysis, leading to a progressive increase in meat tenderness. However, there is difficulty in obtaining phenotypic data related to tenderness, in this way, Marker Assisted Selection (MAS) may have great impact to improve these characteristics. Gene markers of calpain (Capn) and calpastatin (CAST), called SNPs (single nucleotide polymorphisms) have been studied and polymorphisms were associated positively with beef tenderness. However, not much is known about the gene expression of calpain and calpastatin, particularly in Nellore steers with different genotype combinations for the SNP markers associated with these proteases. This study aimed to evaluate the gene expression of calpain and calpastatin in castrated Nellore, with contrasting genotypes previously identified by SNPs marker for one, seven and 14 days of aging. We genotyped 16 castrated Nellore, and two markers were used, one being associated with the μ -calpain gene and the other associated with calpastatin (CAPN4751 and UOGCAST). Through two-dimensional electrophoresis (2DE) the intensities of the spots were determined. Statistical analyzes were performed using the Statistical Analysis System (SAS) using the PROC MIXED. The postmortem proteolysis among the times of aging was evaluated and it was observed that 41 spots showed significant effects between different times of aging. Six spots explained up to 57% of the variability of tenderness at 14 days of aging. In order to verify the existence of possible

differences in expression among samples with different genotypes, proteomics aimed to evaluate the differences in protein profile, based on comparative study (match) of the gels inter and intra genotype combinations. Two spots explained up to 69% of the variability of tenderness to seven days of maturation. For the period of 14 days of aging 19 spots showed significant main effect for interaction CAPN4751(UOGCAST), in this case regression analysis showed a spot that explains 70% of the variability of tenderness to 14 days of aging.

KEYWORDS: beef tenderness, shear force, proteolysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Maciez da carne bovina	17
2.2. Parâmetros genéticos relacionados à maciez	18
2.3. Marcadores Moleculares relacionados à maciez	27
3. HIPÓTESES.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo Geral.....	31
4.2. Objetivos Específicos.....	31
5. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÓLISE EM AMOSTRAS DE LONGISSIMUS DORSI DE BOVINOS CASTRADOS DA RAÇA NELORE AVALIADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE MATURAÇÃO	32
5.1. Resumo	32
5.2. Introdução	32
5.3. Materiais e Métodos.....	33
5.3.1. Obtenção dos dados e amostras	34
5.3.2. Força de cisalhamento	38
5.3.3. Extração das proteínas da carne	39
5.3.4. Reidratação das tiras de IPG	39
5.3.5. Focalização Isoelétrica	39
5.3.6. Corrida Eletroforética ou Segunda Dimensão	40
5.3.7 Avaliação da expressão gênica sobre os genótipos dos marcadores SNP	42
5.4. Resultados e Discussão	43
5.5. Conclusão	51
6. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES PARA CALPASTATINA E CALPAÍNA EM AMOSTRAS DE LONGISSIMUS DORSI DE BOVINOS CASTRADOS DA RAÇA NELORE COM UM, SETE E 14 DIAS DE MATURAÇÃO	52
6.1. Resumo	52
6.2. Introdução	53
6.3. Materiais e Métodos.....	54
6.3.1. Obtenção dos dados e amostras	55

6.3.2. Força de cisalhamento	59
6.3.3. Extração do DNA.....	60
6.3.4. Descrição dos genes investigados.....	61
6.3.5. Amplificação e identificação dos polimorfismos	62
6.3.6. Extração das proteínas da carne	64
6.3.7. Reidratação das tiras de IPG	65
6.3.8. Focalização Isoelétrica	65
6.3.9. Corrida Eletroforética ou Segunda Dimensão	66
6.3.10. Avaliação da expressão gênica sobre os genótipos dos marcadores SNP	68
6.4. Resultados e Discussão	69
6.4.1. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM UM DIA DE MATURAÇÃO ..	69
6.4.2. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM SETE DIAS DE MATURAÇÃO	72
6.4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM 14 DIAS DE MATURAÇÃO ..	75
6.5. Conclusão.....	83
7. CONCLUSÕES.....	85
8. REFERÊNCIAS	86
9. ANEXOS.....	98

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, apresentando no ano de 2010 efetivo bovino da ordem de 174 milhões de cabeças, sendo 139 milhões de bovinos de corte (ANUALPEC, 2011). Em razão do clima tropical predominante no Brasil, os criatórios do país dedicam-se, principalmente, à criação de zebuínos, que reconhecidamente produzem carne menos macia do que os taurinos. Este impasse provoca impacto nas exportações para países desenvolvidos, uma vez que, dos fatores determinantes para a qualidade da carne, a maciez é o mais valorizado pelo consumidor.

Deve-se considerar que existe um grande número de fatores que afetam as características de qualidade da carne e entre esses uma grande importância é atribuída à genética dos animais. Assim, dentre os fatores *ante mortem* que atuam sobre a maciez da carne destaca-se o genótipo do animal.

Os animais *Bos indicus* têm sido preferidos nas regiões tropicais devido à sua resistência às doenças e tolerância ao calor. Entretanto, em relação à característica de maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal. A questão da pior textura da carne dos animais de origem *Bos indicus*, quando comparados com animais *Bos taurus*, já é sabida, porém pouco entendida sob o ponto de vista de expressão gênica.

A genética animal pode ser definida como o estudo dos princípios da herança dos animais e está baseada em dois pilares: a seleção e os sistemas de acasalamento. Geneticamente, a maciez assim como outras características que definem a qualidade da carne pode ser melhorada por meio de estratégias do melhoramento animal, entre elas a seleção. Dessa forma, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à redução da variação da maciez da carne. No entanto, as atuais metodologias para a determinação destas características requerem amostras após o abate do animal, o que constitui a principal dificuldade para a seleção. Assim a Seleção Assistida por Marcadores (MAS) aparece como uma ferramenta auxiliar

promissora, já que possui grande potencial para melhorar características difíceis de serem mensuradas.

A proteólise *post mortem* é um fator muito importante no processo de amaciamento da carne e estudos indicam que as calpaínas, proteases neutras ativadas por íons de cálcio, são parcialmente responsáveis por este processo.

Marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) para o gene da calpaína e da calpastatina foram recentemente estudados, apresentando resultados favoráveis e foram significativamente associados com maciez.

Entretanto, faltam na literatura trabalhos avaliando informações relacionadas à expressão gênica da calpaína e da calpastatina para os diferentes genótipos identificados por meio de marcadores moleculares SNPs para essas proteases. Neste sentido, a análise proteômica é uma ferramenta importante e já vem sendo aplicada para descrever modificações do perfil proteico durante o *post mortem* (LAMETSCH et al., 2003; MORZEL et al., 2008, BJARNADÓTTIR et al., 2010). Porém, mesmo com estudos focados na degradação de proteínas, ainda falta estabelecer quais são as possíveis proteínas que estão diretamente relacionadas com o processo de amaciamento da carne.

Particularmente neste aspecto, a eletroforese bidimensional (2DE) se mostra como uma técnica relevante para identificar possíveis preditores em potencial para a maciez da carne.

Este estudo tem como objetivo geral: (i) avaliar o processo de proteólise ao longo do período de maturação da carne, visando contribuir para o melhor entendimento das alterações bioquímicas ocorridas no processo de transformação do músculo em carne; (ii) avaliar a expressão gênica da calpaína e da calpastatina em animais castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes (com diferentes combinações genotípicas para os marcadores moleculares), identificados previamente por marcadores SNPs, visando contribuir para o melhor entendimento das relações existentes entre o complexo calpaína/calpastatina e sua associação com a maciez da carne.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Maciez da carne bovina e fatores genéticos relacionados

Com o crescente e exigente mercado externo de carne bovina, o Brasil precisará trabalhar para oferecer um produto de melhor qualidade. Koohmaraie (1992) afirmou que dentre as características de qualidade de carne bovina, a maciez assume posição de destaque, sendo considerada a característica organoléptica de maior influência na aceitação da carne por parte dos consumidores. Em um estudo feito por Killinger et al. (2004), 65,4% dos consumidores citam a maciez como característica preferencial e estariam dispostos a pagar um preço mais elevado por uma carne mais macia e succulenta.

Os animais *Bos indicus*, principalmente o Nelore, têm sido preferidos na pecuária de corte nacional, porque são animais muito resistentes e adaptados ao clima do país. Entretanto, em relação à característica de maciez da carne, restrições têm sido atribuídas à raça Nelore quando comparada a outras raças taurinas (CROUSE et al., 1989). Isto ocorre, pois dentre os fatores *ante mortem* que atuam sobre a maciez da carne destaca-se o genótipo do animal, sendo que os de origem *Bos indicus*, quando comparados com os de origem *Bos taurus*, apresentam uma carne menos macia (RAMSEY et al., 1963; SHACKELFORD et al., 1991; GALLINGER et al., 1992; WHEELER et al., 1996).

Segundo Whipple et al. (1990), uma possível explicação para a menor maciez da carne dos animais zebuínos seria a atividade proteolítica reduzida associada à presença de alta atividade da calpastatina. No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (MORGAN et al., 1993). Observações da atividade da calpastatina realizadas por Pringle et al. (1997), detectaram aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos.

O sistema proteolítico das calpaínas e calpastatina tem sido relacionado com a degradação da estrutura miofibrilar. As calpaínas possuem duas formas: a μ -calpaína, que é uma enzima que requer baixa concentração de cálcio e a m-calpaína, que requer alta concentração de cálcio. A calpastatina é um

inibidor da atividade da μ -calpaína e m-calpaína, regulando a proteólise no *post mortem*. O aumento da atividade da calpastatina é correlacionado com a redução da maciez da carne (KOOHMARAIE et al., 1995; PRINGLE et al., 1997).

Segundo Riley et al. (2003b), diferenças na atividade da μ -calpaína no *post mortem* podem ser usadas como alternativa nos programas de melhoramento para característica de maciez da carne. Geesink et al. (2006) destaca a μ -calpaína como a principal enzima proteolítica responsável pela proteólise miofibrilar no *post mortem* e, juntamente com as demais proteínas, deveriam ser o foco de futuras pesquisas para o entendimento do processo de maciez da carne. Esta ação proteolítica da calpaína acontece em razão da sua ação no disco-Z, enfraquecendo a interação dos filamentos finos do disco-Z do sarcolema das fibras musculares. A ação das calpaínas no disco-Z concentra-se especificamente nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T. (DRANSFIELD, 1994).

Estudos constataram que as calpaínas são parcialmente responsáveis pela proteólise *post mortem* (KOOHMARAIE, 1996), porém, apesar deste papel na maturação, há o efeito inibidor da proteólise pela calpastatina. Segundo Whipple et al. (1990), a correlação entre a atividade da calpastatina com a força de cisalhamento é de moderada a alta magnitude (0,60).

A calpastatina, enzima inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *post mortem* (KOOHMARAIE, 1988). Segundo Mellgren et al. (1989), as calpastatinas possuem sequências helicoidais que impedem as calpaínas de se ligarem às membranas.

A identificação do gene da μ -calpaína (CAPN) no cromossomo 29 foi relatado por Smith et al. (2000) e o gene da calpastatina no cromossomo 7 relatado por Bishop et al. (1993).

2.2. Parâmetros genéticos relacionados com a maciez

O conhecimento das estimativas de herdabilidade é de extrema importância. No melhoramento genético ela pode ser definida como a proporção da variância total que é atribuível aos efeitos médios dos genes, ou seja, explicada pela variância genética aditiva. Portanto, é ela que determina se

uma característica é passível de seleção. Se a herdabilidade é alta a resposta à seleção será rápida, uma vez que os melhores fenótipos são os que possuem melhores genótipos para a característica em questão. Por outro lado, para as características que possuem herdabilidade baixa, a seleção deverá ser realizada com base nos valores genéticos aditivos (via DEP., p.ex.) e a resposta à seleção será mais lenta, porém acumulativa.

Outra forma de se obter melhores performances sob o ponto de vista genético é explorar as vantagens da heterose (ou vigor híbrido) por meio de cruzamento entre raças (ou linhagens) para as características de interesse.

Portanto, a estimação de parâmetros genéticos para as características relacionadas à maciez da carne torna possível avaliar a possibilidade de resposta à seleção, bem como desenvolver uma estratégia eficaz no melhoramento desta característica de interesse econômico.

Shackelford et al. (1994) utilizaram várias raças para estimar a herdabilidade e as correlações genéticas para atividade da calpastatina medida 24h *post mortem* e força de cisalhamento. Foram encontrados valores de herdabilidade relativamente altos para a atividade da calpastatina (0,65) e força de cisalhamento (0,53). Os autores concluíram que a seleção contra a atividade da calpastatina seria uma estratégia mais adequada para melhorar a maciez da carne do que a seleção para aumentar o conteúdo de gordura intramuscular. Este fato ocorre devido ao nível de antagonismo genético entre atividade da calpastatina e rendimento de carcaça ser menor que entre conteúdo de gordura intramuscular e rendimento. As herdabilidades estimadas para atividade da calpastatina foram mais altas que outras mensurações para a maciez. Wulf et al. (1996) relataram que a atividade da calpastatina 24h teve alta correlação genética com a força de cisalhamento entre o 1° e 35° dia *post mortem* ($>1,00$), mas fenotipicamente foi apenas moderadamente correlacionada com os valores de força de cisalhamento ($<0,31$). Shackelford et al. (1994) relataram menor correlação genética (0,50) e similar correlação fenotípica (0,27) entre a atividade da calpastatina e a força de cisalhamento. Ambos os estudos foram baseados em números relativamente baixos de animais (392 e 555, respectivamente). Entretanto, a herdabilidade relativamente alta observada nesses estudos ($>0,50$) e sua alta correlação com

força de cisalhamento sugere que a maciez da carne pode ser melhorada geneticamente por seleção de animais com reduzida atividade da calpastatina.

Gregory et al. (1994) avaliaram várias combinações genótípicas tanto compostos *Bos indicus*, como *Bos taurus*. Os autores relataram estimativas de herdabilidade baixas para os atributos de palatabilidade. Além de correlação genética baixa/moderada entre rendimento de carcaça e maciez (0,34). Whipple et al. (1990) concluíram que a atividade da calpastatina é uma importante característica na predição da maciez. Os autores reportaram coeficiente de correlação de 0,66 entre atividade de calpastatina e força de cisalhamento determinado no 1º dia *post mortem*. Em um estudo avaliando 7.179 animais descendentes de Angus, Brahman, Brangus, Charolais, Gelbvieh, Hereford, Limousin, Maine-Anjou, Red Angus, Salers, Shorthorn, Simbrah, Simmental, e South Devon, Dikeman et al. (2005), encontraram estimativas de herdabilidade para força de cisalhamento e painel sensorial para maciez de 0,40 e 0,37, respectivamente.

Nephawe et al. (2004) evidenciaram estimativas de herdabilidade do painel sensorial de 0,26 para maciez. Os autores encontram herdabilidade moderada para força de cisalhamento 0,29.

Riley et al. (2003), em um estudo com 504 bezerros Brahman, verificaram herdabilidade para força de cisalhamento aos sete, 14 e 21 dias, de 0,14, 0,14 e 0,06 respectivamente. Os autores concluíram que a melhoria destas características pela seleção seria lenta. A estimativa de herdabilidade do painel sensorial para maciez foi de 0,11. Já a estimativa de herdabilidade para atividade de calpastatina foi de 0,07. As correlações do painel sensorial com força de cisalhamento a sete, 14 e 21 dias de maturação foram de -0,72, -0,8 e -0,71. A atividade da calpastatina foi correlacionada positivamente com a força de cisalhamento a sete dias e com o painel sensorial para maciez 0,73 e 0,67 respectivamente.

Van Vleck et al. (1992) estimaram herdabilidade para força de cisalhamento e painel sensorial para maciez. Os dados foram obtidos a partir de 682 carcaças de bovinos provenientes e oriundos de cruzamento de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Estes autores relataram herdabilidades de 0,09 e 0,10 para força de cisalhamento e painel sensorial para maciez com correlação alta

e positiva observadas entre essas características (0,96). Smith et al. (2007) utilizaram em seu experimento 467 animais da raça Brahman. Os autores mediram a atividade de calpastatina e força de cisalhamento. Um modelo animal foi utilizado para estimar a herdabilidade e correlações genéticas. Estimativas de herdabilidade relativamente elevadas foram encontradas para atividade da enzima calpastatina ($0,45 \pm 0,17$). Herdabilidade de baixa a moderada magnitude foram encontradas para força de cisalhamento aos sete dias *post mortem* ($0,29 \pm 0,14$) e para força de cisalhamento aos 14 dias *post mortem* ($0,20 \pm 0,11$). As correlações genéticas foram altas, de $0,74 \pm 0,27$ entre atividade da calpastatina e força de cisalhamento aos sete dias de maturação e de $0,72 \pm 0,25$ entre atividade da calpastatina e força de cisalhamento aos 14 dias. As estimativas de herdabilidade e correlações genéticas para a maioria das características foram semelhantes às estimativas apresentadas na literatura. A magnitude das estimativas de herdabilidade encontradas por Smith et al. (2007) sugerem que a melhoria destas características podem ser feitas nos animais da raça Brahman.

Elzo et al. (1998), utilizando 486 animais, estimaram a herdabilidade de força de cisalhamento para animais Angus, Brahman, cruzados Angus x Brahman e $\frac{3}{4}$ Angus $\frac{1}{4}$ Brahman com cinco dias de maturação (0,58, 0,17, 0,25, 0,43 respectivamente). Wolcott et al. (2009) usou 2.180 animais Brahman (BRAH) e Tropical (Composite TCOMP) para investigar as influências genéticas e não genéticas sobre a força de cisalhamento e outras características relacionadas com a qualidade da carne. Correlações genéticas e fenotípicas foram estimadas entre as características de carcaça e qualidade da carne. As características de qualidade da carne e da carcaça apresentaram herdabilidade moderada com estimativas de força de cisalhamento de 0,33 para BRAH e 0,32 para TCOMP, respectivamente. Em um estudo com 854 carcaças, Wheeler et al. (2001) analisaram animais cruzados Hereford X Angus, Hereford, Angus, Tuli, Boran, Brahman, Piedmontese e Belgian Blue. As estimativas de herdabilidade foram medianas para maciez em painel sensorial e força de cisalhamento para sete e 14 dias (0,22, 0,29 e 0,24).

Como podem ser observadas, as estimativas de herdabilidade para a maioria das características variam, o que pode ser devido a diferenças nas

raças, nos métodos de estimação, nos efeitos fixos contemplados no modelo, no número de registros e até mesmo por erros na determinação dos valores fenotípicos.

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as estimativas de herdabilidade encontradas na literatura para atividade da calpastatina, força de cisalhamento e maciez respectivamente, evidenciando o número de animais usados para o estudo, tipo biológico dos animais e, caso tenham sido relatados na literatura, os dias de maturação.

Provavelmente a maior dificuldade encontrada pelos cientistas que estudam atributos de qualidade da carne é o uso de diferentes métodos de medição para uma mesma característica, a avaliação com diferentes tipos biológicos e, em relação à maciez, se as carcaças passaram ou não por processos como estimulação elétrica e/ou maturação por um determinado período. Em razão disso, em alguns casos, é difícil comparar resultados de um estudo com outros de forma confiável.

Tabela 1. Herdabilidades para atividade da calpastatina (24h *post mortem*)

Nº de animais Avaliados	Tipo Biológico e Dias de maturação	h²	Autores
555	Bos taurus e Bos indicus	0,53	Shackelford et al., 1994
392	Bos taurus mestiço 1-35 dias	0,52	Wulf et al., 1996
504	Bos indicus Brahman	0,07	Riley et al., 2003
467	Bos indicus Brahman	0,45	Smith et al., 2007

Tabela 2. Herdabilidades para força de cisalhamento (Continua)

N° de animais Avaliados	Tipo Biológico e Dias de maturação	h²	Autores
682	Bos taurus x Bos indicus	0,09	Van Vleck et al., 1992
1599	Bos taurus composto 9 dias	0,12	Gregory et al., 1994b
1153	Bos taurus 9 dias	0,05	Gregory et al., 1995
441	Bos taurus composto 9 dias	0,31	Gregory et al., 1995
1594	Bos taurus x Bos indicus 9 dias	0,12	Gregory et al., 1995
392	Bos taurus mestiço 1 dia	0,12	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 4 dias	0,28	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 7 dias	0,12	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 14 dias	0,29	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 21 dias	0,36	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 35 dias	0,14	Wulf et al., 1996
392	Bos taurus mestiço 1-35 dias	0,31	Wulf et al., 1996

Tabela 2. Herdabilidades para força de cisalhamento (Continua)

Nº de animais Avaliados	Tipo Biológico e Dias de maturação	h²	Autores
1431	Bos taurus e Bos indicus	0,02	Barkhouse et al., 1996
237	Bos taurus e Bos indicus	0,27	Barkhouse et al., 1996
1668	Bos taurus e Bos indicus	0,31	Barkhouse et al., 1996
888	Bos taurus e Bos indicus 7 dias	0,37	Wheeler et al., 1996
575	Bos taurus e Bos indicus 1 dia	0,20	O'Connor et al., 1997
575	Bos taurus e Bos indicus 4 dias	0,17	O'Connor et al., 1997
575	Bos taurus e Bos indicus 7 dias	0,47	O'Connor et al., 1997
575	Bos taurus e Bos indicus 14 dias	0,27	O'Connor et al., 1997
575	Bos taurus e Bos indicus 21 dias	0,36	O'Connor et al., 1997
575	Bos taurus e Bos indicus 35 dias	0,19	O'Connor et al., 1997
486	Angus 5 dias	0,58	Elzo et al., 1998
486	Brahman 5 dias	0,17	Elzo et al., 1998
486	Angus x Brahman 5 dias	0,25	Elzo et al., 1998
486	¾ Angus ¼ Brahman 5 dias	0,43	Elzo et al., 1998
854	Bos taurus x Bos indicus 7 dias	0,29	Wheeler et al., 2001
854	Bos taurus x Bos indicus 14 dias	0,24	Wheeler et al., 2001

Tabela 2. Herdabilidades para força de cisalhamento (Continuação)

Nº de animais Avaliados	Tipo Biológico e Dias de maturação	h²	Autores
610	Bos taurus x Bos indicus	0,13	Fernandes et al., 2002
504	Bos indicus Brahman 7 dias	0,14	Riley et al., 2003
504	Bos indicus Brahman 14 dias	0,14	Riley et al., 2003
504	Bos indicus Brahman 21 dias	0,06	Riley et al., 2003
4027	Bos taurus x Bos indicus	0,29	Nephawe et al., 2004
7179	Bos taurus x Bos indicus	0,40	Dikeman et al., 2005
467	Bos indicus Brahman 7 dias	0,29	Smith et al., 2007
467	Bos indicus Brahman 14 dias	0,20	Smith et al., 2007
2180	Bos indicus Brahman	0,33	Wolcott et al., 2009
2180	Bos indicus Compost	0,32	Wolcott et al., 2009

Tabela 3. Herdabilidades para maciez (painel sensorial)

N° de animais Avaliados	Tipo Biológico e Dias de maturação	h²	Autores
682	Bos taurus x Bos indicus	0,10	Van Vleck et al., 1992
1599	Bos taurus composto 9d	0,21	Gregory et al., 1994b
1594	Bos taurus e Bos indicus 9d	0,22	Gregory et al., 1995
1153	Bos taurus e Bos indicus 9d	0,12	Gregory et al., 1995
441	Bos taurus e Bos indicus 9d	0,51	Gregory et al., 1995
392	Bos taurus mestiço 1-35d	0,08	Wulf et al., 1996
1431	Bos taurus e Bos indicus	0,06	Barkhouse et al., 1996
237	Bos taurus e Bos indicus	0,03	Barkhouse et al., 1996
1668	Bos taurus e Bos indicus	0,02	Barkhouse et al., 1996
888	Bos taurus e Bos indicus 7d	0,50	Wheeler et al., 1996
575	Bos taurus e Bos indicus	0,31	O'Connor et al., 1997
854	Bos taurus x Bos indicus	0,22	Wheeler et al., 2001
504	Bos indicus Brahman	0,11	Riley et al., 2003
4027	Bos taurus x Bos indicus	0,26	Nephawe et al., 2004
7179	Bos taurus x Bos indicus	0,37	Dikeman et al., 2005

2.3. Marcadores Moleculares relacionados à maciez

O melhoramento genético animal está baseado em dois pilares: a seleção e os sistemas de acasalamento.

Geneticamente, a maciez, dentre outras características que definem a qualidade da carne, pode ser melhorada por meio de estratégias do melhoramento animal, entre elas a seleção. Entretanto, a determinação da maciez da carne requer amostras após o abate do animal, o que dificulta a obtenção de dados fenotípicos para que seja realizada a seleção. Por essa razão, o melhoramento genético para este tipo de características esta sendo pouco trabalhado. Neste sentido, a Seleção Assistida por Marcadores (MAS) se destaca por ser uma ferramenta auxiliar promissora, pois possui potencial para ajudar no melhoramento genético dessas características de difícil mensuração.

Os genes CAPN (μ -calpaína) e CAST (calpastatina) estão localizados nos cromossomos 29 (SMITH et al., 2000) e 7 (BISHOP et al., 1993) respectivamente. Estes são considerados genes candidatos para característica de qualidade de carne (SMITH et al., 2000). Hoje mais de 38 polimorfismos do tipo SNP foram encontrados no gene da calpaína (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; CASAS et al., 2005; WHITE et al., 2005).

Alguns marcadores SNP do gene CAPN foram analisados e associados à maciez em populações de origem *Bos taurus*, como o CAPN316 e CAPN530, que produzem substituições dos aminoácidos Glicina/Alanina posição 316 e Valina/Isoleucina na posição 530, localizados nos exons 9 e 14, respectivamente (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004).

Em um estudo com 504 *Bos indicus* (Brahman) e 554 animais cruzados White et al. (2005) avaliaram os polimorfismos CAPN1. Dentre os polimorfismos estudados, o CAPN4751, posição equivalente a 6545 (C/T), apresentou a melhor relação nas duas populações avaliadas com a força de cisalhamento, sendo o alelo C favorável para essa característica. Os autores concluíram que o uso simultâneo dos marcadores CAPN316, 530 e 4751 poderiam aumentar a capacidade de estimar a maciez da carne em bovinos e

destacaram que o uso do CAPN4751 seria especialmente importante em animais de origem *Bos indicus*.

Van Eenennaam et al. (2007), também trabalhando com animais *Bos indicus* da raça Brahman e animais *Bos taurus*, estudaram os marcadores CAST e CAPN1 (CAPN316 e 4751) dos painéis comerciais Igenity tenderGENE (Merial) e GeneSTAR *tenderness*. Os marcadores foram correlacionados com a maciez da carne. Estes autores também observaram resultados significativos ($P < 0,01$) com a maciez da carne para os marcadores da μ -calpaína CAPN316 e CAPN4751. Foram avaliadas populações oriundas do Projeto de Mérito de Carcaças americano, utilizando animais Brahman, Hereford, Angus, F1 Charolês-Angus, dentre outros.

Casas et al. (2005) estudaram os marcadores CAPN316, CAPN4753 e CAPN5331 em população de animais da raça Brahman e verificaram uma baixa frequência na segregação do CAPN316, porém associadas significativamente ($P = 0,023$) à maciez. Para os marcadores CAPN4753 e CAPN5331 os resultados não foram significativos ($P = 0,460$ e $P = 0,199$, respectivamente).

Smith et al. (2009), trabalhando com animais Brahman ($N = 467$), estudaram a associação de polimorfismos para μ -calpaína CAPN316 e CAPN4751 e para calpastatina CAST com características de carcaça e maciez. A atividade da calpastatina ($P < 0,01$) e o marcador CAPN316 ($P < 0,05$) foram associados significativamente à força de cisalhamento da carne aos 14 dias de maturação.

Schenkel et al. (2006) associaram genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOGCAST1) com a maior maciez da carne, quando o alelo favorável C substitui o alelo G.

Casas et al. (2006) relataram que trabalhos anteriores (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; CASAS et al., 2005; WHITE et al., 2005) evidenciaram apenas associações individuais dos marcadores CAST e CAPN1 com maciez da carne bovina e nenhuma avaliação simultânea para estes genes foi realizada. Neste sentido, Casas et al. (2006), embasados na relação calpaína/calpastatina, demonstraram a interação dos possíveis genótipos entre marcadores genéticos existentes no gene da calpaína (CAPN) e da

calpastatina (CAST), os quais tiveram influência significativa sobre a maciez da carne bovina. Os autores trabalharam com os mesmos dados fenotípicos de White et al. (2005), porém utilizando somente as populações dos Ciclos 7 e 8, além da população Brahman (STARS) referentes ao Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em *Clay Center/Nebraska*. O marcador para o gene da calpastatina foi associado significativamente ($P < 0,01$) com força de cisalhamento (*shear force*) aos 14 dias de maturação e com maciez, avaliada por análise sensorial. O marcador CAPN4751 foi associado significativamente ($P < 0,05$) com escores de maciez para as populações do ciclo 7 e 8. Nas análises de interação entre os genes da calpaína e calpastatina, resultados significativos foram observados apenas para a população do Ciclo 8 para a característica força de cisalhamento aos 14 dias de maturação.

No Brasil, Carvalho et al. (2007a) e Carvalho et al. (2007b), trabalhando com bovinos da raça Nelore, relataram associações significativas de marcadores para calpaína em análises individuais, bem como de marcadores para calpaína e calpastatina em análises conjuntas em relação à maciez da carne aos 14 e 21 dias de maturação. Os autores verificaram que a presença do alelo C, que é favorável para os dois marcadores, é relacionado com menores valores de força de cisalhamento. Estes achados indicam que a seleção assistida por marcadores (MAS) pode ser uma ferramenta poderosa para o progresso genético da característica maciez. Entretanto, maiores estudos são necessários, principalmente aqueles relacionados à expressão gênica, em qualquer nível de investigação, uma vez que permitirão inferir se as diferenças observadas nos genótipos dos animais avaliados, a nível molecular, são realmente traduzidas, resultando em animais portadores de proteínas enzimáticas mais ativas ou eficientes.

3. HIPÓTESES

- Existem diferenças na intensidade de expressão das proteínas degradadas no *post mortem* entre amostras de carne para um, sete e 14 dias de maturação.
- Existem diferenças na expressão gênica em animais castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes para marcadores associados ao complexo calpaína/calpastatina, identificados previamente por marcadores SNPs.
- Podem existir proteínas que expliquem a variabilidade da maciez da carne.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral caracterizar a proteólise em animais castrados da raça Nelore e avaliar a expressão gênica de animais com diferentes genótipos, identificados previamente por marcadores SNPs, visando contribuir para o melhor entendimento dos eventos resultantes do complexo calpaína/calpastatina e sua associação com a maciez da carne.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

- Identificar e caracterizar a proteólise *post mortem* por meio de eletroforese bi-dimensional em bovinos castrados da raça Nelore em diferentes tempos de maturação;

CAPÍTULO 2

- Avaliar a expressão gênica de marcadores para calpaína e calpastatina por meio da eletroforese bi-dimensional, para um melhor entendimento da ação calpaína/calpastatina em bovinos castrados da raça Nelore, visando detectar proteínas que possam predizer a maciez da carne.

5. CAPÍTULO - 1

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÓLISE EM AMOSTRAS DE *LONGISSIMUS DORSI* DE BOVINOS CASTRADOS DA RAÇA NELORE AVALIADAS EM DIFERENTES TEMPOS DE MATURAÇÃO.

5.1. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar diferenças na expressão de proteínas em amostras de carne de bovinos castrados da raça Nelore, com um, sete e 14 dias *post mortem*, através da eletroforese bidimensional (2DE), bem como avaliar as variações da maciez da carne em relação às intensidades de volume de expressão dos spots. A 2DE foi realizada em triplicata com um total de 18 géis para cada tempo de maturação. A análise dos 54 géis detectou 254 spots em comum aos três tempos. Foram retirados 43 spots não encontrados em todos os períodos analisados. Assim, 211 spots presentes em todos os tempos foram submetidos à análise de variância e foram observados 41 spots com efeitos significativos entre os tempos de maturação. Seis spots foram relacionados à maciez e explicaram 57% da variabilidade observada para maciez aos 14 dias de maturação.

Palavras-chave: maciez da carne; *Bos indicus*; eletroforese bidimensional.

5.2. INTRODUÇÃO

Os animais *Bos indicus* têm sido preferidos em regiões tropicais devido à sua resistência às doenças e tolerância ao calor. Entretanto, em relação à característica maciez da carne, restrições têm sido apontadas a animais zebuínos.

O Brasil é conhecido por exportar carne barata e de baixa qualidade, que não atende à exigência do mercado externo quanto à maciez, que é considerada a característica organoléptica mais importante. Em um estudo feito por Killinger et al. (2004), 65,4% dos consumidores citam a maciez como característica preferencial.

A degradação das proteínas miofibrilares é um importante fator no processo de maturação da carne. Neste sentido, a análise proteômica é uma ferramenta promissora e já vem sendo aplicada para descrever modificações de proteínas durante o *post mortem* (LAMETSCH et al., 2003; MORZEL et al., 2008, BJARNADÓTTIR et al., 2010). Porém, mesmo com estudos focados na degradação destas proteínas, ainda falta estabelecer quais são as possíveis proteínas que estão diretamente relacionadas com o processo de amaciamento da carne.

Este trabalho teve como objetivo verificar as existências de possíveis diferenças de expressão entre amostras das proteínas da carne de bovinos castrados da raça Nelore, com diferentes tempos de maturação, utilizando a eletroforese bidimensional (2DE), bem como investigar o comportamento das intensidades dos volumes de expressão ao longo do período de maturação da carne.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) de Pirassununga. Foram estudadas amostras de sangue e do músculo *Longissimus dorsi* de 16 animais castrados da raça Nelore, criados a pastos e terminados em confinamento (média de 107,4 dias confinados) e abatidos com uma média de 23,6 meses de idade. Os animais foram abatidos no Abatedouro-Escola (sem estimulação elétrica das carcaças) pertencente à Coordenadoria do Campus de Pirassununga (CCPS), de acordo com as técnicas de abate humanitário exigidas pela legislação brasileira.

Os animais foram insensibilizados por atordoamento com pistola pneumática penetrante e, em seguida, sangrados pela secção dos grandes vasos do pescoço. Após a morte do animal foi realizada a esfola, evisceração, divisão e lavagem das carcaças, conforme procedimento padrão do matadouro.

5.3.1. Obtenção dos dados e amostras

Logo após o abate o pH e a temperatura das carcaças foram determinados na altura da 12ª costela, com auxílio de um medidor digital portátil com sonda de perfuração de vidro e sonda metálica (mod. NT-PHP; marca Tecnal) (Figura1). Em seguida as carcaças foram refrigeradas em câmara fria com temperatura entre 0 e 2°C. O pH e a temperatura foram medidos novamente após uma, três e seis horas. As carcaças permaneceram na câmara fria por 24h.

Figura 1 – Determinação do pH e da temperatura da carcaça

Após esse período, foram determinados novamente o pH e a temperatura das carcaças e coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, que foram embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido para análises proteômicas. Em seguida, as carcaças foram seccionadas na região entre a 12ª e a 13ª costelas para a retirada de três amostras (bifes de 2,5 cm de largura) do músculo *Longissimus dorsi*. A cor objetiva das amostras foi determinada após 20 minutos de espera com auxílio de um colorímetro portátil (mod. MiniScan XE, marca HunterLab), através da escala L*, a*, b*, do sistema CIE Lab. As medidas foram feitas em três lugares distintos, na superfície da amostra, tomando-se a média como o valor determinado. Na tabela 1A em anexo podem ser observadas as médias, desvios padrão,

coeficiente de variação, mínimos e máximos dos dados coletados neste estudo para cada tempo de maturação. O pH, a temperatura e a cor foram medidos para verificação de normalidade das amostras.

Na sequência as amostras foram identificadas e embaladas individualmente a vácuo, em filme plástico e imediatamente acondicionadas em câmara fria à temperatura de 0 a 2°C, onde foram maturadas por um, sete e 14 dias.

Ao final de cada período predeterminado de maturação (um, sete e 14 dias), o exsudado do interior da embalagem foi pesado para posteriores cálculos da perda de água por exsudação (PAE) com o auxílio de balança analítica (mod. A2000, marca Marte) e descartado (Figura 2).

Figura 2 – Pesagem do exsudado do interior da embalagem

Na sequência, foram coletadas amostras de um grama de carne para as análises proteômicas, embaladas em papel alumínio, identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e em seguida transferidas para *freezer* -80°C até a realização das análises proteômicas.

Os bifes foram pesados e após a determinação das medidas de cor foram assados, para as determinações de força de cisalhamento, em forno

elétrico (mod. Luxo Classic 2.4; marca Lary) à 170°C (Figura 3), virados quando a temperatura atingiu os 41°C e mantidos no forno até que a temperatura interna (próxima ao eixo geométrico) dos bifes atingisse 71°C. A temperatura foi monitorada com equipamento Data Logger digital (mod. 700-10s; marca Gulterm) composto por 10 termopares de perfuração.

Quando a temperatura interna atingiu os 71°C, os bifes foram retirados do forno e deixados à temperatura ambiente (sala climatizada a $\pm 18^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 30 minutos, para a temperatura interna dos bifes chegar à temperatura ambiente (Figura 4). Em seguida, os bifes foram pesados novamente, identificados e embalados com filme plástico, e acondicionados em geladeira a 5°C, onde permaneceram até o dia seguinte para a determinação da força de cisalhamento (Figura 5).

Figura 3 – Forno elétrico

Figura 4 – Bifes assados sendo resfriados

Figura 5 – Bifes identificados e embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C

5.3.2. Força de cisalhamento

De cada bife assado no dia anterior foram retirados de quatro a seis cilindros de 13 mm de diâmetro, sempre no sentido paralelo às fibras musculares, com o auxílio de um vazador elétrico (Figura 6). A força de cisalhamento (kgf) foi determinada utilizando o aparelho *Warner Bratzler Shear Force*, com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500 mm/min (Figura 7) e foi calculada com a média de quatro a seis medidas.

Figura 6 – Retirada dos cilindros paralelos à fibra muscular

Figura 7 – Determinação da Força de Cisalhamento (“shear force”)

5.3.3. Extração das proteínas da carne

Para extração das proteínas as amostras de carne foram separadas em seis *pools*, contendo de dois a três animais por *pool*. As amostras compostas foram extraídas como descrito por LAMETSCH et al. (2003), com o extrato de carne obtido a partir da homogeneização em homogeneizador Turratrec (modelo TE-102 marca Tecnal) de 0,5g de músculo bovino (*Longissimus dorsi*) em 5 ml de tampão de extração (contendo Uréia 8M) no gelo por um minuto, a 14000 rpm. As amostras foram transferidas para erlenmeyer de 125 ml e agitadas em *shaker* por 2 horas em temperatura ambiente (25°C) e, logo em seguida, centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 10.000 g. As amostras foram transferidas para microtubos, para que a concentração das proteínas fosse determinada. A quantidade de proteínas totais foi determinada *pelo 2-d Quant Kit (GE Healthcare)*, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina.

A 2-DE foi realizada em triplicata, totalizando 18 géis para cada tempo de maturação.

5.3.4. Reidratação das tiras de IPG

Uma alíquota de extrato cárneo contendo 500 µg de proteína foi misturada com tampão de reidratação. O volume final obtido de 250 µl da solução proteica foi utilizada para a reidratação das strips de 13 cm com faixa de pH de 4-7 (*Immobiline DryStrip da marca GE Healthcare*) à temperatura ambiente por 14 horas.

5.3.5. Focalização Isoelétrica

Após a reidratação, as tiras foram colocadas no aparelho Ettan IPGphor (*GE Healthcare*) para a focalização isoeletrica das proteínas (Primeira Dimensão).

A focalização isoeletrica foi realizada à temperatura de 20°C, por aproximadamente 5 horas, com uma voltagem inicial baixa de 500 V, aplicando-se em seguida um gradiente de 1000 a 8000 V e por fim 8000 V,

com um limite de corrente de 75mA/tira (Figura 8). O produto total de tempo x voltagem aplicada foi de 19603 V/h para cada strip. Assim as proteínas foram separadas de acordo com seu Ponto Isoelétrico. Ao final da focalização isoelétrica as tiras foram colocadas em tubos de vidro com tampa e congeladas em freezer -80C até o dia seguinte, quando se procedeu a corrida eletroforética ou Segunda Dimensão.

Figura 8 – Reidratação das “strips” (a) e Focalização Isoelétrica (b)

5.3.6. Corrida Eletroforética ou Segunda Dimensão

Para a corrida da segunda dimensão, primeiramente as tiras foram equilibradas por 15 minutos em Tampão de Equilíbrio I sob leve agitação e por mais 15 minutos em Tampão de Equilíbrio II, também sob leve agitação. Em seguida, as tiras foram sobrepostas ao gel de acrilamida (SDS-PAGE -12,5 %), preparado no dia anterior, fixando-as com uma solução selante de agarose. O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli 1x concentrado para o anodo e 3x concentrado para o catodo. Para a corrida eletroforética foi mantida uma corrente de 15 mA/gel a uma voltagem inicial de 100V por 30 minutos para que as proteínas migrassem da tira para o gel e, após este tempo, a voltagem foi aumentada para 600V por 3:30 horas (Figura 9). Assim, as proteínas previamente separadas pelo Ponto Isoelétrico foram separadas em função de seu Peso Molecular.

Figura 9 – Corrida eletroforética da segunda dimensão

Ao final da corrida, os géis foram corados por 1 hora com solução corante e descorados por 1 hora em solução descorante. Em seguida, a solução descorante foi renovada e o gel foi então mantido em descoloração por mais 14 horas. Após o período de descoloração, os géis foram imersos em água destilada por aproximadamente 2 horas e em seguida suas imagens foram digitalizadas. Os géis foram escaneados (*ImageScanner III-GE Healthcare*) (Figura 10) e analisados por meio do programa *ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare)*. Os *spots* foram comparados entre os diferentes tempos, por meio dos valores de intensidade integrado do *spot*. Após escaneado os géis foram acondicionados em saco hermético e armazenados em geladeira.

Figura 10 – Digitalização da imagem do gel

5.3.7. Avaliação da intensidade dos volumes de expressão normalizados em função dos tempos de maturação da carne

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3, utilizando o procedimento PROC MIXED. Para testar os efeitos do tempo *post mortem*, foi adotado o modelo “1”, abaixo especificado:

Modelo 1:
$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + A_j + T_k + e_{ijkl}$$

em que,

Y_{ijklm} = é o valor observado para as intensidades dos volumes de expressão normalizados dos *spots* obtidos pela técnica de eletroforese bi-dimensional;

μ = é uma constante inerente a todas as observações;

S_i = efeito aleatório do reprodutor i associado à característica com média 0 e variância σ_s^2 ;

A_j = efeito fixo do ano (safra) j associado à característica Y_{ijkl} , com $j=1$ (2009) ou 2 (2010);

T_k = é o efeito fixo do tempo *post mortem*, com $k=1$ (um dia), 2 (sete dias) ou 3 (14 dias);

e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ_e^2 .

Para os spots que apresentaram resultados significativos de acordo com o modelo “1”, as intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) de cada *spot* foram utilizadas como variáveis dependentes em análises de regressão em função do tempo maturação da carne (1, 7, e 14 dias de maturação). Este modelo foi denominado por modelo “2”.

As análises utilizando os modelos 1 e 2 foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED do programa do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995), considerando que as medidas foram avaliadas sobre os mesmos animais, caracterizando estrutura de medidas repetidas na mesmas unidades experimentais.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises verificaram as diferenças no perfil proteico e foram baseadas em estudo comparativo (*match*) dos géis *inter* e *intra* tempos.

A média do número de *spots* detectados entre os 54 géis referentes aos três tempos de maturação da carne foi de 384 *spots*, sendo 254 desses *spots* encontrados em comum nos tempos analisados. Destes, 43 *spots* foram encontrados em no máximo dois tempos analisados e, por esta razão, retirados da análise. Dessa forma, 211 *spots* presentes em todos os tempos, com no mínimo três informações de intensidades dos volumes de expressão dentro de cada tempo, foram submetidos à análise de variância.

Em virtude do elevado número de *spots* a serem avaliados, utilizou-se a correção de Bonferroni para controle de nível de significância conjunto em 5%, determinando o valor do nível de significância individual (α), que proporcionaria o nível de significância conjunto (α^*), como reportado por Silva e Vencovsky (2002).

A análise de variância das intensidades do volume de expressão dos *spots* revelou efeitos significativos ($P < 0.0002$) para 41 *spots* (Figuras 11). Na figura 1A, em anexo, podem ser observadas as expressões esquemáticas evidenciando as diferenças de expressão dos *spots* significativos. As estimativas de médias (MED) e erros-padrão (EP) associadas aos diferentes *spots* que apresentaram resultados significativos encontram-se na Tabela 4.

Figura 11. Imagem 2DE de músculo *Longissimus dorsi* destacando os *spots* com mudanças significativas entre os tempos de um, sete e 14 dias de maturação

Foram realizadas análises de regressão com a finalidade de investigar como as intensidades dos volumes de expressão se comportaram para os 41 *spots* que apresentaram efeitos significativos ao longo dos três períodos de maturação da carne.

Verificou-se comportamento linear de 1° grau (Figura 2A em anexo) para oito *spots* e comportamento linear de 2° grau (Figura 2B em anexo) para 33 *spots*.

Para os oito *spots* com comportamentos lineares de 1° grau (*spots* 7, 15, 18, 42, 50, 97, 103 e 137) foram verificados declínios das intensidades dos volumes de expressão com o decorrer do tempo de maturação. Por outro lado, dentre os 33 *spots* com comportamento quadrático, 18 *spots* demonstraram funções com pontos de máximo de intensidade de volumes de expressão. Neste caso, os pontos de máximo ocorreram com 8,81, 6,59, 8,37, 8,10, 1,24, 8,31, 4,55, 5,52, 8,28, 6,89, 8,25, 7,81, 1,08, 4,25, 7,67, 7,09, 8,03, 7,39, dias, respectivamente, para os *spots* 3, 5, 9, 11, 22, 25, 49, 60, 64, 77, 79, 93, 109, 132, 143, 166, 175, 182. Nos demais *spots* com efeitos lineares de 2° grau foram verificadas funções com pontos de mínimo de intensidade de volumes de expressão que ocorreram com 11,51, 10,34, 8,80, 13,61, 9,25, 10,58, 9,21, 11,25, 11,38, 9,98, 9,24, 10,34, 8,20, 11,03, 9,67 dias, respectivamente, para os *spots* 21, 40, 68, 82, 99, 112, 121, 130, 138, 147, 149, 153, 160, 173, 180.

Análises de regressão múltipla foram feitas para todos os *spots* significativos na análise de variância. Na Tabela 5 são apresentadas as constantes de regressão, os coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises das amostras avaliadas ao longo do tempo de maturação da carne

Tabela 4. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para as intensidades dos volumes de expressão nos *spots* significativos para amostras avaliadas com um, sete e 14 dias de maturação

SPOT	1 DIA			7 DIAS			14 DIAS		
	MED	EP		MED	EP		MED	EP	
3	0,634	0,045	B	0,936	0,045	A	0,813	0,045	A
5	1,242	0,056	B	1,493	0,056	A	1,052	0,056	C
7	0,498	0,018	A	0,421	0,018	B	0,282	0,018	C
9	0,111	0,008	C	0,177	0,008	A	0,140	0,008	B
11	0,141	0,010	B	0,209	0,010	A	0,162	0,010	B
15	0,444	0,024	A	0,298	0,024	B	0,157	0,024	C
18	0,835	0,049	A	0,607	0,049	B	0,333	0,049	C
21	0,421	0,021	A	0,290	0,021	B	0,269	0,021	B
22	0,345	0,022	A	0,302	0,022	A	0,133	0,022	B
25	2,210	0,114	C	3,320	0,114	A	2,663	0,114	B
40	0,419	0,018	A	0,087	0,019	B	0,096	0,018	B
42	0,232	0,013	A	0,132	0,013	B	0,072	0,013	C
49	0,105	0,008	A	0,108	0,008	A	0,062	0,008	B
50	0,351	0,016	A	0,282	0,015	B	0,204	0,015	C
60	0,233	0,017	A	0,268	0,016	A	0,132	0,017	B
64	0,352	0,018	C	0,479	0,017	A	0,403	0,017	B
68	0,113	0,007	A	0,054	0,008	C	0,078	0,007	B
77	0,140	0,008	B	0,195	0,008	A	0,114	0,008	C
79	2,861	0,258	B	4,633	0,265	A	3,542	0,273	B
82	0,484	0,019	A	0,360	0,018	B	0,313	0,018	B
93	0,120	0,011	B	0,217	0,010	A	0,138	0,010	B
97	0,550	0,034	A	0,335	0,035	B	0,199	0,037	C
99	0,453	0,027	A	0,187	0,030	B	0,261	0,027	B
103	0,387	0,023	A	0,354	0,021	A	0,205	0,021	B
109	0,198	0,015	A	0,167	0,014	A	0,052	0,016	B
112	0,124	0,007	A	0,084	0,006	B	0,084	0,006	B
121	0,444	0,019	A	0,267	0,021	B	0,318	0,018	B
130	1,382	0,081	A	0,562	0,104	B	0,464	0,081	B
132	0,227	0,016	A	0,231	0,016	A	0,096	0,019	B
137	0,109	0,008	A	0,066	0,011	B	0,048	0,009	B
138	0,356	0,016	A	0,098	0,018	B	0,062	0,019	B
143	0,057	0,007	B	0,094	0,005	A	0,061	0,005	B
147	0,707	0,040	A	0,251	0,065	B	0,297	0,040	B
149	0,323	0,014	A	0,178	0,018	B	0,219	0,013	B
153	0,226	0,016	A	0,123	0,023	B	0,126	0,015	B
160	1,524	0,058	A	0,228	0,094	C	1,055	0,054	B
166	0,103	0,014	B	0,213	0,019	A	0,071	0,014	B
173	0,141	0,011	A	0,053	0,013	B	0,046	0,011	B
175	0,043	0,006	B	0,080	0,004	A	0,053	0,004	B
180	0,311	0,021	A	0,120	0,030	B	0,153	0,020	B
182	0,223	0,037	B	0,543	0,061	A	0,201	0,040	B

Tabela 5. Estimativas da constante de regressão, o coeficiente de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, para as amostras avaliadas ao longo do período de maturação da carne

Coeficientes	Estimativa (bi)	EP	F Value	Pr > F
Intercept	-4,714	3,845	1,5	0,228
SPOT_5	5,367	2,105	6,5	0,015
SPOT_15	60,660	12,528	23,45	<.0001
SPOT_18	-15,487	5,709	7,36	0,010
SPOT_21	-12,594	4,141	9,25	0,004
SPOT_22	-21,477	5,680	14,3	0,001
SPOT_25	2,634	0,813	10,5	0,003

A equação descrita na Tabela 5 apresentou $R^2 = 0,5749$, indicando moderado ajuste da função em relação aos dados de maciez ao longo do período de maturação. Alguns spots que apresentaram significância coincidiram com o ponto isoelétrico e peso molecular de proteínas que foram relatadas na literatura, estes foram discutidos a seguir (Tabela 2A em anexo).

Depois da análise da literatura disponível (CHAZE et al., 2006; JIA et al., 2006b; JIA et al., 2007; BJARNADÓTTIR et al., 2010) o spot 182 possivelmente é o *Glycerol-3-phosphato dehydrogenase*, que é uma proteína que age como enzima metabólica envolvida em várias reações enzimáticas da glicólise. No presente trabalho, esta proteína primeiramente teve um aumento de intensidade até sete dias de maturação, seguido de diminuição até o 14º dia. Jia et al. (2007) relataram que essa proteína teve aumento de intensidade de expressão até 10 horas de maturação, seguido de decréscimo nas seguintes horas. Bjarnadóttir et al. (2010) relataram uma diminuição de intensidade dessa proteína, avaliada 48 horas *post mortem*. Esses autores trabalharam com 8 bovinos e avaliaram as mudanças de volume de expressão das proteínas em dois tempos, uma e 48 horas *post mortem*. A eletroforese bidimensional foi conduzida em duplicata totalizando 32 géis. Foram detectados 300 spots e, destes, 35 spots tiveram mudanças significativas durante as primeiras 48 horas

post mortem, sendo que 16 *spots* tiveram a intensidade de expressão aumentada ao longo do tempo e 10 *spots* diminuíram de intensidade.

O *spot* 50, segundo a literatura (JIA et al. 2006a; JIA et al. 2006b; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al. 2010), possivelmente é a *heat-shock protein* (HSP), proteína que previne a degradação e danos na estrutura das proteínas pelo processo de apoptose nas células musculares. Acredita-se que esta proteína (HSP) esteja envolvida na estabilização das proteínas miofibrilares e proteção dos filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto da fragmentação causada por condições de estresse. No presente estudo esta proteína esteve bem expressa nos primeiro dia de maturação, porém verificou-se uma diminuição da intensidade ao longo do tempo. Os resultados do presente trabalho foram similares aos encontrados por Laville et al. (2009), que verificaram um aumento de intensidade até cinco dias *post mortem* decorrido também de diminuição de expressão ao longo do tempo (até 21 dias *post mortem*). Jia et al. (2006b) constataram que nas primeiras horas esta proteína aumentou de expressão, Jia et al. (2006a) constataram que a *heat-shock protein* diminuiu de intensidade após 24 horas *post mortem*. Nesse trabalho os autores analisaram as mudanças no *post mortem* em dois músculos (*longissimus dorsi* e *semitendinosus*) avaliados em dois tempos (0 e 24 horas) de 12 bovinos. Um total de 24 géis foi comparado e os *spots* de cada músculo foram analisados individualmente. Para o músculo *longissimus dorsi* foram detectados 923 *spots*. Os autores verificaram 13 *spots* com mudanças significativas de intensidade, sendo que dois e 11 *spots* aumentaram e diminuíram de intensidade respectivamente ao longo do tempo. Para o músculo *semitendinosus* foram detectados 630 *spots*, dos quais 18 mudaram significativamente no *post mortem*, 17 *spots* tiveram aumento na intensidade de expressão e apenas um *spot* teve a intensidade diminuída ao longo do tempo. No mesmo ano, Jia et al. (2006b) estudaram mudanças na intensidade de expressão de proteínas presentes no músculo *longissimus thoracicus* de nove bovinos. As amostras foram obtidas através de biópsia do músculo do animal vivo e logo após o abate. A comparação entre 36 géis permitiram a detecção de 833 *spots*. Foram verificadas mudanças significativas para 24 *spots*, sendo

que 18 *spots* aumentaram de expressão e seis *spots* diminuíram a intensidade de expressão durante o período estudado.

O *spot* 153, possivelmente (BOULEY et al., 2004; CHAZE et al., 2006; JIA et al., 2007; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al., 2010) é a creatina kinase, que teve diminuição de intensidade seguido de ligeiro aumento aos 14 dias de maturação. No estudo de Laville et al. (2009), essa proteína teve aumento de expressão até cinco dias *post mortem*, seguido de decréscimo. Já nos estudos de Bjarnadóttir et al. (2010) e Jia et al. (2007), a creatina kinase aumentou de intensidade ao longo do tempo. Tem sido reportado em análises proteômicas que essa proteína está relacionada com mudanças no *post mortem* (LAMETSCH 2002), porém sem maiores detalhes do seu envolvimento no processo.

Jia et al. (2007) trabalhando com oito bovinos, avaliaram as mudanças proteômicas nas primeiras 24h *post mortem*. Esses autores detectaram 105 *spots* no total, sendo que 47 *spots* tiveram mudanças significativas e foram identificados 39 *spots*. As proteínas foram classificadas em cinco grupos distintos. Das proteínas metabólicas, três *spots* aumentaram de expressão ao longo do tempo e seis *spots* apresentaram diminuição. Das proteínas de defesa, cinco *spots* diminuíram de expressão e nove *spots* aumentaram ao longo do tempo. Entre as proteínas estruturais, todos os cinco *spots* diminuíram de expressão durante o *post mortem*. As proteases tiveram diminuição de expressão nas primeiras horas e um aumento de expressão até 24h *post mortem*. Para o grupo de proteínas sem classificação, quatro *spots* diminuíram de intensidade e dois *spots* tiveram a intensidade de expressão aumentada a partir de 10 horas *post mortem*.

Entre as proteínas de defesa identificadas por Jia et al. (2007), a *substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP22* provavelmente é o *spot* 109 detectado neste trabalho (JIA et al., 2006a; JIA et al., 2006b; JIA et al., 2007), proteína que pertence à família peroxiredoxina e tem uma atividade de proteção celular antioxidante pela *detoxifying peroxides*. No presente trabalho esta proteína teve diminuição de expressão ao longo do tempo, assim como encontrado nos estudos de Jia et al. (2006a) e Jia et al. (2007).

Os *spots* 121 e 149 deste trabalho são possivelmente a proteína *crystallina* (JIA et al. 2006b; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al. 2010). Esta proteína pertence à família das *heat-shock proteins*. Em nosso estudo esta proteína teve inicialmente um declínio seguido de ligeiro aumento na intensidade. No trabalho de Laville et al., (2009) essa proteína teve diminuição na expressão, entretanto Bjarnadóttir et al. (2010) e Jia et al. (2006b) verificaram um aumento na intensidade dessa proteína.

Lametsch et al. (2003), em um estudo com suínos, avaliaram as diferenças na intensidade de expressão de proteínas nos tempos zero e 72 horas *post mortem*. Foram identificados 345 *spots*, dos quais 103 *spots* mudaram significativamente. Os autores identificaram 11 *spots* como fragmentos de actina. Todos os 11 *spots* aumentaram de intensidade durante o *post mortem*. Foi identificada também a miosina de cadeia leve que teve sua intensidade diminuída durante o *post mortem*. Os autores relataram que 26 dos *spots* significativos tiveram relação com a maciez da carne.

Outra proteína bem mencionada na literatura foi o *spot* 3, que possivelmente corresponde à proteína HSP beta 6 (HSP20). Neste trabalho teve ligeiro aumento de intensidade de um dia para sete dias de maturação, seguido de diminuição até os 14 dias *post mortem*. Laville et al. (2009), relataram um aumento de intensidade dessa proteína a partir do quinto dia de maturação. Em concordância, Bjarnadóttir et al. (2010), reportaram aumento de intensidade após de 48 horas *post mortem*. Entretanto, Jia et al. (2006a) verificaram diminuição de expressão dessa proteína em 24 horas *post mortem*.

Kjaersgard et al. (2006) estudaram a proteólise em carne de peixe estocada por três, seis e 12 meses. Um total de 19 géis foram comparados e 89 *spots* de 504 *spots* estavam de forma consistente em todos os géis analisados. Os autores selecionaram 14 *spots* para representar o comportamento da intensidade ao longo dos três tempos. Destes, quatro *spots* tiveram a intensidade diminuída ao longo do tempo, três *spots* aumentaram de intensidade, quatro *spots* aumentaram de intensidade até o tempo de seis meses, seguido de diminuição na intensidade ao tempo de 12 meses. Por outro lado, três *spots* diminuíram na intensidade até o tempo de seis meses, seguido de aumento de expressão até o tempo de 12 meses.

Portanto, apesar dos autores não utilizarem análises de regressão visando identificar o comportamento das intensidades de volume normalizados dos *spots* em função do tempo de armazenamento, observa-se que comportamentos lineares de 2º grau também foram verificados, como no presente trabalho.

5.5. CONCLUSÃO

Houve diferenças significativas na intensidade de expressão entre um, sete e 14 dias de maturação. Os *spots* 5, 15, 18, 21, 22 e 25 explicaram 57% da variabilidade da maciez ao longo do período de maturação. Estes resultados indicam mudanças que podem refletir mecanismos relevantes relacionados ao processo de proteólise. Estudos avaliando os *spots* sugeridos em relação às demais características físico-químicas da carne bovina possibilitarão o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de maturação da carne.

6. CAPÍTULO – 2

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES PARA CALPASTATINA E CALPAÍNA EM AMOSTRAS DE *LONGISSIMUS DORSI* DE BOVINOS CASTRADOS DA RAÇA NELORE COM UM, SETE E 14 DIAS DE MATURAÇÃO

6.1. RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica de marcadores para genes da calpaína e da calpastatina em animais castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes (com diferentes combinações genotípicas para os marcadores moleculares), identificados previamente por marcadores SNPs (CAPN4751 e UOGBAST), durante o período de um, sete e 14 dias de maturação. Para verificar a existência de possíveis diferenças de expressão entre amostras com genótipos distintos, as intensidades de expressão dos *spots* foram determinadas através da eletroforese bidimensional (2DE). As diferenças no perfil proteico foram baseadas no estudo comparativo (*match*) dos 18 géis *inter* e *intra* combinações genotípicas e demonstraram que 115, 149 e 194 *spots* estavam presentes em todas as seis combinações genotípicas para o período de um, sete e 14 dias respectivamente, sendo que os mesmos foram submetidos à análise de variância. Para um dia de maturação apenas um *spot* apresentou efeitos significativos para a fonte de variação da interação CAPN4751(UOGBAST). Para sete dias de maturação 18 *spots* apresentaram efeito principal significativo para a fonte de variação UOGBAST e concomitantemente foram verificados efeitos significativos para a fonte de variação da interação CAPN4751(UOGBAST). Dois *spots* explicaram 69% da variabilidade da maciez aos sete dias de maturação. Para o período de 14 dias de maturação 19 *spots* apresentaram efeitos significativos. Todos os 19 *spots* apresentaram efeito principal significativo para a fonte de variação UOGBAST e, concomitantemente, para a fonte de variação da interação

CAPN4751(UOGCAST). Neste caso a análise de regressão apresentou um *spot* que explicou 70% da variabilidade da maciez aos 14 dias de maturação.

Palavras-chave: maciez da carne; *Bos indicus*; eletroforese bidimensional; proteólise; expressão gênica.

6.2. INTRODUÇÃO

Entre os inúmeros fatores que afetam as características de qualidade de carne, em relação à maciez se atribui uma grande influência à genética dos animais. Assim, dentre os fatores *ante mortem* que atuam sobre a maciez da carne destaca-se o genótipo do animal. O Brasil dedica-se em grande parte a criação de animais *Bos indicus* como o Nelore, que em relação à característica maciez da carne tem reconhecidamente uma carne mais dura quando comparada com animais de origem *Bos taurus*. Entretanto, esta questão é pouco entendida sob o ponto de vista molecular.

Durante o período de maturação da carne, a proteólise é o fator que mais contribui com o aumento da maciez (KOOHMARAIE, 1996). O sistema enzimático das calpaínas é responsável pelas mudanças que resultam no amaciamento da carne (KOOHMARAIE, 1988) e tem participação de destaque no processo de amaciamento da carne maturada. Genes como as calpaínas e a calpastatina têm sido identificados como genes candidatos e apresentam relação consistente com a maciez da carne bovina. (MULLEN et al., 2006; GAO et al., 2007; MORZEL et al., 2008). Cerca de 80 % da variação encontrada na maciez da carne está relacionada com o enfraquecimento da estrutura miofibrilar (KOOHMARAIE, 1992).

O genoma pode ser definido como o conjunto de genes ou todo o conjunto de DNA. A sequência de nucleotídeos destes genes determina a informação genética, que precisa ser transcrita para o RNAm e assim ser traduzida em proteínas. Portanto, o sequenciamento genômico trouxe contribuições importantes, mas essas informações não são suficientes para saber quais proteínas estão sendo realmente expressas a nível celular. Assim a proteômica pode ser utilizada na investigação do controle da expressão

gênica, gerando informações de quais proteínas são expressas, bem como seu nível de expressão, representando dessa forma a ligação entre o genótipo e o fenótipo de um organismo.

A análise proteômica é um método eficaz para identificar proteínas que desempenham um papel importante no mecanismo de controle de características de qualidade da carne e tem sido utilizada para avaliar mudanças no *post mortem* caracterizando a proteólise no músculo de suínos e bovinos (LAMETSCH et al., 2003; JIA et al., 2007; MORZEL et al., 2008).

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a expressão gênica da calpaína e da calpastatina em animais castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes, identificados previamente por marcadores SNPs, visando contribuir para o melhor entendimento das relações existentes entre o complexo calpaína/calpastatina e sua associação com a maciez da carne.

6.3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) de Pirassununga. Foram estudadas amostras de sangue e do músculo *Longissimus dorsi* de 16 animais castrados da raça Nelore, criados a pastos e terminados em confinamento (média de 107,4 dias confinados) e abatidos com uma média de 23,6 meses de idade. O abate foi realizado no Abatedouro-Escola pertencente à Coordenadoria do Campus de Pirassununga (CCPS), de acordo com as técnicas de abate humanitário exigidas pela legislação brasileira.

Os animais foram insensibilizados por atordoamento com pistola pneumática penetrante e em seguida sangrados pela secção dos grandes vasos do pescoço. Após a morte do animal foi realizada a esfolagem, evisceração, divisão e lavagem das carcaças, conforme procedimento padrão do abatedouro.

6.3.1. Obtenção dos dados e amostras

O pH e a temperatura das carcaças foram determinados na altura da 12ª costela, com auxílio de um medidor digital portátil, com sonda de perfuração de vidro e com sonda metálica (mod. NT-PHP; marca Tecnal) (Figura 12) e, em seguida, as carcaças foram refrigeradas em câmara fria com temperatura entre 0 e 2°C. O pH e a temperatura foram medidos novamente após uma, três e seis horas e as carcaças permaneceram na câmara fria por 24 horas.

Figura 12 – Determinação do pH e da temperatura da carcaça

Após esse período, foram determinados novamente o pH e a temperatura das carcaças e foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, as quais foram embaladas e congeladas em nitrogênio líquido para análises proteômicas. Em seguida, as carcaças foram seccionadas na região entre a 12ª e a 13ª costelas para a retirada de três amostras (bifes de 2,5 cm de largura) do músculo *Longissimus dorsi*. A cor objetiva das amostras foi determinada após 20 min de espera com auxílio de um colorímetro portátil (mod. MiniScan XE, marca HunterLab), através da escala L*, a*, b*, do sistema CIE Lab. As medidas foram feitas em três lugares distintos, na superfície da amostra, tomando-se a média como o valor determinado. O pH, a temperatura e a cor foram medidos para verificação de normalidade das amostras.

Na sequência as amostras foram identificadas e embaladas individualmente a vácuo em filme plástico de alta barreira e imediatamente

acondicionadas em câmara fria à temperatura de 0 a 2°C, onde foram maturadas por um, sete e 14.

Ao final de cada período predeterminado de maturação (um, sete e 14 dias), o exsudado do interior da embalagem foi pesado, para posteriores cálculos da perda de água por exsudação (PAE), com o auxílio de balança analítica (mod. A2000, marca Marte) e descartado (Figura 13).

Figura 13 – Pesagem do exsudado do interior da embalagem

Na sequência, foram coletadas amostras de um grama de carne para as análises proteômicas, embaladas em papel alumínio, identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e em seguida estocadas a -80°C até a realização das análises proteômicas.

Em seguida, os bifes foram pesados e após a determinação das medidas de cor foram assados, para as determinações de força de cisalhamento, em forno elétrico (mod. Luxo Classic 2.4; marca Lary) à 170°C (Figura14), virados quando a temperatura atingiu os 41°C e mantidos no forno até que a temperatura interna (próxima ao eixo geométrico) dos bifes atingisse 71°C, a qual foi monitorada com equipamento Data Logger digital (mod. 700-10s; marca Gulterm) composto por 10 termopares de perfuração. Quando a temperatura interna atingiu os 71°C, os bifes foram retirados do forno e

deixados à temperatura ambiente (sala climatizada a $\pm 18^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 30 minutos, para a temperatura interna dos bifes chegar à temperatura ambiente (Figura 15). Em seguida os bifes foram pesados novamente, identificados e embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C , onde permaneceram até o dia seguinte para a determinação da força de cisalhamento (Figura 16).

Figura 14 – Forno elétrico

Figura 15 – Bifes assados sendo resfriados

Figura 16 – Bifes identificados e embalados com filme plástico e acondicionados em geladeira a 5°C

6.3.2. Força de cisalhamento

Dos bifes assados no dia anterior foram retirados cilindros de 13 mm de diâmetro, sempre no sentido paralelo às fibras musculares, com auxílio de um vazador elétrico (Figura 17). A força de cisalhamento (kgf) foi determinada utilizando-se o aparelho *Warner Bratzler Shear Force*, com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500 mm/min (Figura 18) e foi calculada com a média de quatro a seis medidas.

Figura 17– Retirada dos cilindros paralelos à fibra muscular

Figura 18– Determinação da Força de Cisalhamento (“*shear force*”)

6.3.3. Extração do DNA

A coleta de sangue foi feita em tubos vacutainer com EDTA, por meio de punção na veia jugular (Figura 19) e dessas amostras foi extraído o DNA dos 16 Nelores machos castrados. Empregou-se o método de extração e precipitação em NaCl (Figura 20), seguindo o protocolo descrito por Olerup e Zetterquist (1992).

Figura 19 – Coleta de sangue

Figura 20 – Extração do DNA

6.3.4. Descrição dos genes investigados

Dois marcadores foram utilizados, sendo um associado ao gene da μ -calpaína e outro marcador associado à calpastatina (CAPN4751 e UOGCAST). Os marcadores utilizados foram previamente escolhidos em virtude dos relatos de Carvalho et al. (2007a) e Carvalho et al. (2007b), em bovinos da raça Nelore, e os reportados por White et al. (2005) e Schenkel et al. (2006), em animais composto e animais taurinos. Os marcadores utilizados nesse estudo, os números de acesso no GenBank, seus respectivos cromossomos, exons e introns, as substituições de nucleotídeos, bem como suas posições estão apresentados na Tabela 6. Os *primers* e sondas que foram utilizados na amplificação e discriminação alélica, respectivamente, estão na Tabela 7.

Tabela 6 – Marcadores investigados, número de acesso no GenBank, seus respectivos cromossomos, exons e introns, substituição de nucleotídeos, bem como suas posições

Marcadores	Nº de acesso no GenBank	Cromossomos	Exons / Introns	Substituição de Nucleotídeo	Posição do Nucleotídeo
CAPN 4751	AF248054	29	Intron 18	C/T	6545
UOGCAST	AY008267	7	Intron 5	C/G	282

Tabela 7 – Sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada marcador estudado

Marcador	Sequência	Sondas
CAPN4751	F: TGGCATCCTCCCCTTGACT	CTGCGCCTC G GTTT
	R:CCCCGTCACCTTGACACA	CTGCGCCTC A GTTT
UOCAST	F: GGAAGGAAGGAATTGCATTGTTTCA	CTTTGGGT A AAAATT
	R:CACTTGTGTTTTATGTAGTCAATTGTGAGAA	TTGGGT A CAAATT

6.3.5. Amplificação e identificação dos polimorfismos

A caracterização e determinação dos genótipos para os dois marcadores, dos dois polimorfismos SNP avaliados, foi realizada por meio de PCR em Tempo Real, utilizando-se o equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* da *Applied Biosystems* (Figura 21).

Figura 21 – Equipamento utilizado para PCR em tempo real

Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan™ em que *primers* e sonda que pareiam na região alvo do DNA permitem a identificação dos diferentes alelos.

Foram sintetizadas sondas de forma a parear seletivamente no DNA molde onde se encontra o polimorfismo de interesse. Os polimorfismos já descritos em outras populações por estudos anteriores são alvo das sondas, que possuem a sequência depositada no *GenBank*, junto de seus respectivos *primers*. A proporção de indivíduos heterozigotos e homozigotos para um de seus genótipos foi estimada por meio das leituras de fluorescências das sondas (Figura 22).

Figura 22 – Resultado de discriminação alélica por classificação automática. Os pontos verdes representam indivíduos heterozigotos para o polimorfismo em questão, o ponto vermelho e os pontos azuis representam os indivíduos homozigotos para ambas as formas alélicas. Os sinais em X representam amostras que não amplificaram suficientemente

Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 15 ng de DNA, para uma reação de 10 µl, contendo 0,25 µl de Assay Mix[®] (*Applied Biosystems*), 5,0 µl de Taqman[®] Master Mix Universal PCR (*Applied Biosystems*) em 10 minutos a 95° C e 45 ciclos de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C.

6.3.6. Extração das proteínas da carne

Inicialmente, as amostras foram separadas em seis *pools* contendo de dois a três animais por *pool*, de acordo com o genótipo dos animais (Tabela 8), sendo o alelo (C) favorável à maciez.

Tabela 8 – Divisão de *pools* para a extração das proteínas de acordo com o genótipo dos animais e quantidade de animais por *pool*

POOL	Quantidade de animais / pool	UOCAST	CAPN4751
POOL_1	3	CC	CT
		CC	CT
		CC	CT
POOL_2	3	CC	TT
		CC	TT
		CC	TT
POOL_3	2	CG	CC
		CG	CC
POOL_4	3	CG	CT
		CG	CT
		CG	CT
POOL_5	3	CG	TT
		CG	TT
		CG	TT
POOL_6	2	GG	TT
		GG	TT
		GG	TT

Para extração das proteínas as amostras de carne foram separadas em seis *pools*, contendo de dois a três animais por *pool*. As proteínas foram extraídas como descrito por Lametsch et al. (2003), onde o extrato de carne foi obtido a partir da homogeneização em homogeneizador Turratec (modelo TE-102 marca Tecnal) de 0,5g de músculo bovino (*Longissimus dorsi*) em 5 ml de tampão de extração no gelo por um minuto, a 14000 rpm. As amostras foram transferidas para erlenmeyer de 125 ml e agitadas em shaker por 2 horas a temperatura ambiente (25°C) e, logo em seguida, centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 10.000 g. As amostras foram transferidas para microtubos para que a concentração das proteínas fosse determinada. A quantidade de proteínas totais foi determinada pelo 2-d Quant Kit (*GE Healthcare*), utilizando como padrão uma solução de albumina bovina.

A 2-DE foi realizada em triplicata, totalizando 18 géis para cada tempo de maturação.

6.3.7. Reidratação das tiras de IPG

Uma alíquota de extrato cárneo contendo 500 µg de proteína foi misturada com tampão de reidratação. O volume final obtido de 250 µl da solução proteica foi utilizada para a reidratação das *strips* de 13 cm com faixa de pH de 4-7 (*Immobiline DryStrip da marca GE Healthcare*) à temperatura ambiente por 14 horas.

6.3.8. Focalização Isoelétrica

Após a reidratação, as tiras foram colocadas no aparelho *Ettan IPGphor* (*GE Healthcare*) para a focalização isoeletrica das proteínas (Primeira Dimensão). A focalização isoeletrica foi realizada à temperatura de 20°C, por aproximadamente 5 horas, com uma voltagem inicial baixa de 500 V, aplicando-se em seguida um gradiente de 1000 a 8000 V e por fim 8000 V, com um limite de corrente de 75mA/tira (Figura 23). O produto total de tempo x voltagem aplicada foi de 19.603 V/h para cada *strip*. Assim, as proteínas foram separadas de acordo com seu Ponto Isoeletrico. Ao final da focalização

isoelétrica as tiras foram colocadas em tubos de vidro com tampa e congeladas em freezer -80C até o dia seguinte, quando se procedeu a corrida eletroforética ou Segunda Dimensão.

Figura 23 – Reidratação das “strips” (a) e Focalização Isoelétrica (b)

6.3.9. Corrida Eletroforética ou Segunda Dimensão

Para a corrida da segunda dimensão, primeiramente as tiras foram equilibradas por 15 minutos em Tampão de Equilíbrio I sob leve agitação e por mais 15 minutos em Tampão de Equilíbrio II sob leve agitação. Em seguida, as tiras foram sobrepostas ao gel de acrilamida (SDS-PAGE -12,5 %), preparado no dia anterior, fixando-as com uma solução selante de agarose. O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli 1x concentrado para o anodo e 3x concentrado para o catodo. Para a corrida eletroforética foi mantida uma corrente de 15 mA/gel a uma voltagem inicial de 100V por 30 minutos, para que as proteínas migrassem da tira para o gel e, após este tempo, a voltagem foi aumentada para 600V por 3:30 horas (Figura 24). Dessa forma, as proteínas previamente separadas pelo Ponto Isoelétrico foram separadas em função de seu Peso Molecular.

Figura 24 – Corrida eletroforética da segunda dimensão

Ao final da corrida, os géis foram corados por 1 hora com solução corante e descorados por 1 h em solução descorante. Em seguida, a solução descorante foi renovada e o gel foi então mantido em descoloração por mais 14 horas. Após o período de descoloração, os géis foram imersos em água destilada por aproximadamente 2 horas e em seguida suas imagens foram digitalizadas. Os géis foram escaneados (*ImageScanner III-GE Healthcare*) (Figura 25) e analisados por meio do programa *ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare)*. Após escaneados, os géis foram acondicionados em saco contendo ácido acético 5% e armazenados em geladeira.

Figura 25 – Digitalização da imagem do gel

6.3.10. Avaliação da expressão gênica sobre os genótipos dos marcadores SNP

Para avaliar as implicações dos resultados associados à técnica de Eletroforese Bi-Dimensional, em relação aos genótipos contrastantes para a característica de maciez da carne maturada, as intensidades de volumes de expressão normalizados (IVEN) obtidas para cada *spot* foram utilizadas como variáveis dependentes.

Para testar os efeitos das combinações genotípicas, considerando dois *loci* simultaneamente, foi adotado o modelo “a”, abaixo especificado, para cada tempo de maturação da carne (um, sete e 14 dias):

Modelo 1:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + A_j + M_k + C_l(M_k) + e_{ijklm}$$

em que,

Y_{ijklm} = é o valor observado para as intensidades dos volumes de expressão normalizados dos *spots* obtidos pela técnica de eletroforese bi-dimensional;

μ = é uma constante inerente a todas as observações;

S_i = efeito aleatório do reprodutor i associado à característica, com média 0 e variância σ_s^2 ;

A_j = efeito fixo do ano (safra) j com $j=1$ (2009) ou 2 (2010);

M_k = é o efeito fixo do genótipo k para marcador UOGCAST1;

$C_l(M_k)$ = é o efeito fixo do genótipo l para marcador CAPN4751 dentro de cada genótipo do marcador UOGCAST1;

e_{ijklm} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijklm} , com média 0 e variância σ_e^2 .

Para os *spots* que apresentaram resultados significativos de acordo com o modelo “a” descrito acima, as intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) de cada *spot* foram utilizadas como variáveis independentes em análises de regressão múltipla e a maciez em cada tempo de maturação da carne (um, sete, e 14 dias) foi utilizada como variável dependente.

As análises descritas acima foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED e do PROC REG do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995). Para avaliação das possíveis relações entre a maciez da carne maturada com um, sete e 14 dias e as intensidades dos volumes de expressão normalizados significativos foram utilizadas também análises de correlação Momento-Produto de *Pearson* (Tabelas 3A, 3B, 3C e 3D em anexo), por meio do procedimento PROC CORR do programa anteriormente citado.

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as análises de avaliação da expressão gênica dos marcadores para calpaína e calpastatina foram avaliadas as intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) dos *spots* para as amostras de carne coletadas com um, sete e 14 dias de maturação. O objetivo foi verificar a existência de possíveis diferenças de expressão entre amostras com genótipos distintos para os marcadores UOGCAST e CAPN4751. Nestas análises foram excluídas as amostras com combinação genotípica CG-CC (para os marcadores UOGCAST e CAPN4751, respectivamente), em virtude da não existência de amostras CC-CC e GG-CC (para os marcadores UOGCAST e CAPN4751, respectivamente), como observado na Tabela 8, no item Materiais e Métodos.

6.4.1. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM UM DIA DE MATURAÇÃO

Foram encontrados números de *spots* variando de 297 a 500 entre os 18 géis referentes às diferentes combinações genotípicas avaliadas com um dia

de maturação. As diferenças no perfil proteico, baseadas no estudo comparativo (*match*) dos géis *inter* e *intra* combinações genotípicas, demonstraram que ocorreram 115 *spots* em comum. Dessa forma, 115 *spots* presentes em todas as cinco combinações genotípicas foram submetidos à análise de variância.

Em virtude do elevado número de *spots* a serem avaliados, utilizou-se a correção de Bonferroni para o controle de nível de significância conjunto em 5%, determinando o valor do nível de significância individual (α), que proporcionaria o nível de significância conjunto (α^*), como reportado por Silva e Vencovsky (2002).

As análises de variância das intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) dos *spots* demonstraram que apenas um *spot* (Figura 28) apresentou efeito significativo ($P < 0,0004$). Este *spot* apresentou efeito principal significativo somente para a fonte de variação da interação CAPN4751(UOCAST).

A estimativa de média e respectivo erro-padrão para a intensidade do volume de expressão no *spot* que apresentou efeito significativo para um dia de maturação da carne encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9. Estimativas de média (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para intensidade de expressão dos spots significativos para efeito principal da interação CAPN4751(UOCAST) com um dia de maturação

SPOT	UOCAST	CAPN4751	MED	EP	
73	CC	CT	0,6887	0,0477	C
73	CG	CT	0,4363	0,0477	D
73	CC	TT	0,8476	0,0477	AB
73	CG	TT	1,0159	0,0584	A
73	GG	TT	0,7539	0,0584	BC

Figura 26. Gel 2DE de amostras de carne com um dia de maturação, em evidência o único *spot* (73) com efeito significativo para os marcadores avaliados

O *spot* significativo na análise de variância, bem como o número de alelos favoráveis para cada marcador avaliado foram submetidos a análises de regressão múltipla. Na Tabela 10 pode-se verificar a constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises das amostras avaliadas com um dia de maturação.

Tabela 10. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com um dia de maturação

Coeficientes	Estimativa (bi)	EP	Valor de F	Pr > F
Intercepto	7,67948	1,05008	53,48	<.0001
UOG_S	-1,6081	0,32775	24,07	0,0004
SPOT_73	2,42434	1,28415	3,56	0,0835

A equação descrita na Tabela 10 apresentou $R^2 = 0,6909$, sugerindo um moderado ajuste da função para descrever o comportamento da maciez da carne com um dia de maturação, em função da intensidade do volume de expressão do *spot* obtido em amostras de carne que sofreram um dia de maturação, bem como do genótipo para o marcador UOGCAST.

A quantidade de *spots* em comum a serem submetidos às análises varia consideravelmente em função do número de géis avaliados, bem como em função do número de grupos comparativos e tempo a serem analisados.

6.4.2. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM SETE DIAS DE MATURAÇÃO

Foram encontrados números de *spots* variando de 264 a 440 entre os 18 géis referentes às diferentes combinações genotípicas avaliadas com sete dias de maturação. As diferenças no perfil proteico, baseadas no estudo comparativo (*match*) dos géis *inter* e *intra* combinações genotípicas, demonstraram que ocorreram 149 *spots* em comum. Dessa forma, 149 *spots* presentes em todas as cinco combinações genotípicas foram submetidos à análise de variância.

Em virtude do elevado número de *spots* a serem avaliados, utilizou-se a correção de Bonferroni para controle de nível de significância conjunto em 5%, determinando o valor do nível de significância individual (α), que proporcionaria o nível de significância conjunto (α^*), como reportado por Silva e Vencovsky (2002).

As análises de variância das intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) dos *spots* demonstraram 18 *spots* (Figura 29) com efeitos significativos ($P < 0,0003$). Todos os 18 *spots* tiveram efeito principal significativo para a fonte de variação UOGCAST. Concomitantemente, para todos os 18 *spots* também foram verificados efeitos significativos para a fonte de variação da interação CAPN4751(UOGCAST) (Tabela 12).

Figura 27. Gel 2DE de amostras de carne com sete dias de maturação, em evidência os *spots* com efeito significativo para os marcadores avaliados

Os *spots* que apresentaram mudanças de expressão significativa nas análises de variância das amostras com sete dias de maturação, bem como o número de alelos favoráveis para cada marcador avaliado foram submetidos a análises de regressão múltipla.

Na Tabela 12 estão apresentados a constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com sete dias de maturação.

Tabela 11. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros-padrão (EP) para intensidade de expressão dos spots com efeitos principais significativos para interação CAPN4751(UOCAST) com sete dias de maturação

SPOT	CC/CT			CC/TT			CG/CT			CG/TT			GG/TT		
	MED	EP		MED	EP		MED	EP		MED	EP		MED	EP	
12	0,274	0,015	B	0,183	0,015	C	0,310	0,015	AB	0,340	0,015	A	-----		
15	0,119	0,005	D	0,138	0,005	C	0,143	0,005	BC	0,182	0,005	A	0,158	0,005	B
17	0,144	0,008	C	0,172	0,008	B	0,172	0,008	B	0,243	0,008	A	0,151	0,008	BC
28	0,374	0,017	CD	0,339	0,017	D	0,504	0,017	A	0,464	0,017	AB	0,423	0,017	BC
41	0,217	0,014	C	0,127	0,014	D	0,303	0,014	B	0,351	0,014	A	0,300	0,014	B
45	0,163	0,017	B	0,126	0,017	B	0,234	0,017	A	0,265	0,017	A	0,234	0,017	A
46	0,252	0,020	C	0,158	0,020	D	0,352	0,020	B	0,425	0,020	A	0,382	0,020	AB
47	0,333	0,026	C	0,240	0,026	D	0,450	0,026	B	0,540	0,026	A	0,510	0,026	AB
48	0,521	0,046	C	0,373	0,046	D	0,715	0,046	B	1,002	0,046	A	0,690	0,046	B
51	0,303	0,014	B	0,222	0,014	C	0,323	0,014	B	0,427	0,014	A	0,403	0,014	A
72	0,092	0,013	C	0,083	0,013	C	0,139	0,013	B	0,204	0,013	A	0,097	0,013	C
73	0,142	0,017	A	0,125	0,017	A	0,141	0,017	A	0,147	0,017	A	0,113	0,017	A
78	0,425	0,018	A	0,285	0,018	C	0,363	0,018	B	0,451	0,018	A	0,319	0,018	BC
80	1,273	0,062	A	0,551	0,062	C	0,933	0,062	B	1,452	0,062	A	0,788	0,062	B
82	0,379	0,017	B	0,321	0,017	C	0,438	0,017	A	0,427	0,017	AB	0,318	0,017	C
101	0,144	0,005	A	0,070	0,005	C	0,090	0,005	B	0,040	0,006	D	0,072	0,005	C
106	0,074	0,004	B	0,093	0,004	A	0,068	0,004	BC	0,038	0,005	D	0,059	0,004	C
178	0,235	0,011	A	0,047	0,014	C	0,055	0,014	C	0,189	0,014	B	0,067	0,014	C

Tabela 12. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com sete dias de maturação

Coeficiente	Estimativa (bi)	EP	Valor de F	Pr > F
Intercepto	4,63933	1,5185	9,33	0,0100
SPOT_51	20,16288	3,8852	26,93	0,0002
SPOT_78	-10,41853	4,5849	5,16	0,0423

A equação descrita na Tabela 12 apresentou $R^2 = 0,6939$, sugerindo um moderado ajuste da função para descrever o comportamento da maciez da carne com sete dias de maturação, em função das intensidades dos volumes de expressão dos *spots* obtidos em amostras de carne que sofreram sete dias de maturação.

6.4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA EM AMOSTRAS COM 14 DIAS DE MATURAÇÃO

Com o objetivo de verificar a existências de possíveis diferenças de expressão entre amostras com genótipos distintos para os marcadores UOGCAST e CAPN4751 aos 14 dias, fase em que normalmente encerra-se o período de maturação da carne, foram estudadas as diferenças no perfil proteico, baseadas no estudo comparativo (*match*) dos 18 géis *inter* e *intra* combinações genotípicas

Foram encontrados números de *spots* variando de 291 a 494 entre os 18 géis referentes às diferentes combinações genotípicas avaliadas com 14 dias de maturação, sendo observados 194 *spots* em comum. Dessa forma, 194 *spots* presentes em todas as cinco combinações genotípicas foram submetidos à análise de variância.

Em virtude do elevado número de *spots* a serem avaliados, utilizou-se a correção de Bonferroni para controle de nível de significância conjunto em 5%,

determinando o valor do nível de significância individual (α), que proporcionaria o nível de significância conjunto (α^*), como reportado por Silva e Vencovsky (2002).

As análises de variância das intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) dos *spots* demonstraram que 19 *spots* (Figura 30) apresentaram efeitos significativos ($P < 0,0003$). Todos os 19 *spots* apresentaram efeito principal significativo para a fonte de variação UOGCAST. Concomitantemente, para todos os 19 *spots* também foram verificados efeitos significativos para a fonte de variação da interação CAPN4751(UOGCAST) (Tabela 13).

Figura 28. Gel 2DE de amostras de carne com 14 dias de maturação, em evidência os *spots* com efeito significativo para os marcadores avaliados

Tabela 13. Estimativas de médias (MED) e respectivos erros padrão (EP) para intensidade de expressão dos spots com efeitos principais significativos para interação CAPN4751(UOGCAST) com 14 dias de maturação

SPOT	CC/CT			CC/TT			CG/CT			CG/TT			GG/TT		
	MED	EP		MED	EP		MED	EP		MED	EP		MED	EP	
3	1,386	0,048	C	1,428	0,048	C	2,255	0,048	A	1,147	0,048	D	1,704	0,048	B
4	2,393	0,129	B	2,263	0,129	B	1,516	0,129	C	3,278	0,129	A	1,831	0,129	C
7	0,408	0,017	B	0,274	0,017	C	0,479	0,017	A	0,319	0,017	C	0,455	0,017	AB
17	1,151	0,048	A	0,708	0,048	B	0,727	0,048	B	0,637	0,048	B	0,702	0,048	B
55	0,082	0,011	C	0,094	0,011	C	0,130	0,011	B	0,169	0,011	A	0,187	0,011	A
56	0,108	0,008	CD	0,095	0,008	D	0,126	0,008	C	0,250	0,008	A	0,199	0,008	B
57	0,191	0,019	B	0,189	0,019	B	0,249	0,019	B	0,331	0,019	A	0,387	0,019	A
58	0,209	0,015	D	0,204	0,015	D	0,276	0,015	C	0,531	0,015	A	0,430	0,015	B
67	0,077	0,013	B	0,089	0,013	B	0,149	0,013	A	0,159	0,013	A	0,180	0,013	A
69	0,156	0,025	D	0,249	0,025	C	0,537	0,025	B	0,585	0,025	AB	0,657	0,025	A
70	0,112	0,015	E	0,180	0,015	D	0,297	0,015	C	0,392	0,015	B	0,479	0,015	A
73	0,122	0,007	AB	0,133	0,007	A	0,131	0,007	A	0,085	0,007	C	0,104	0,007	BC
81	0,275	0,074	D	0,377	0,074	CD	0,963	0,074	A	0,578	0,074	BC	0,805	0,074	AB
107	0,388	0,055	C	1,250	0,055	A	1,029	0,055	B	1,103	0,055	AB	0,511	0,055	C
109	0,866	0,053	A	0,460	0,053	B	0,917	0,053	A	0,619	0,053	B	0,804	0,053	A
142	0,044	0,008	C	0,034	0,006	C	0,074	0,006	AB	0,067	0,006	B	0,090	0,006	A
154	0,152	0,010	CD	0,165	0,010	BC	0,196	0,010	B	0,122	0,010	D	0,263	0,010	A
169	0,182	0,011	A	0,160	0,011	AB	0,131	0,011	B	0,057	0,013	C	0,043	0,011	C
175	0,072	0,009	B	0,083	0,009	B	0,237	0,009	A	0,224	0,009	A	0,237	0,009	A

Os *spots* que apresentaram mudanças de expressão significativas nas análises de variância nas amostras com 14 dias de maturação, bem como o número de alelos favoráveis para cada marcador avaliado foram submetidos à análise de regressão múltipla.

Na Tabela 14 são apresentados a constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão obtidos nas análises avaliadas com 14 dias de maturação

Tabela 14. Estimativas da constante de regressão, os coeficientes de regressão, os valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão, obtidos nas análises para as amostras avaliadas com 14 dias de maturação

Coeficientes	Estimativa (bi)	EP	Valor de F	Pr > F
Intercept	3,17461	0,83149	14,58	0,0021
SPOT_57	16,30303	2,96527	30,23	0,0001

A equação descrita na Tabela 14 apresentou $R^2 = 0,6993$, sugerindo um moderado ajuste da função para descrever o comportamento da maciez da carne com 14 dias de maturação, em função das intensidades dos volumes de expressão dos *spots* obtidos em amostras de carne que sofreram 14 dias de maturação.

Outro aspecto interessante a ser observado é que em nenhum dos trabalhos consultados foram utilizados métodos de controle de nível de significância conjunto, geralmente utilizados em múltiplos testes, como por exemplo, a Correção de Bonferroni ou a Razão de Falsas Descobertas (FDR, *false discovery rate*). Possivelmente, por se tratar de avaliações prospectivas, a maximização do número de *spots* significativos talvez seja uma estratégia interessante no sentido de explorar quais possíveis peptídeos estão mais ou menos abundantes nas amostras.

Na tabela 15 podem ser observados os valores médios da força de cisalhamento para um, sete e 14 dias de maturação para cada grupo genético avaliado.

Tabela 15. Média da força de cisalhamento por grupo genético, bem como a quantidade de alelos favoráveis à maciez.

UOGCAST	CAPN4751	FC-1 dia de maturação	FC-7 dias de maturação	FC-14 dias de maturação	Alelos Favoráveis
CC	CT	9,219	7,289	6,302	3
CC	TT	10,142	8,097	6,269	2
CG	CT	11,051	9,102	7,142	2
CG	TT	9,693	8,293	8,681	1
GG	TT	11,097	10,321	9,428	0

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a diferença de expressão de proteínas entre animais genotipados para qualquer marcador relacionado com a maciez.

Foram considerados dois grupos de acordo com a força de cisalhamento aos 14 dias e com a quantidade de alelos favoráveis à maciez para a discussão. O grupo com maior força de cisalhamento e com menos alelos favoráveis à maciez foi correspondente às combinações genotípicas CG/CT, CG/TT e GG/TT e o grupo com menor força de cisalhamento e com mais alelos favoráveis à maciez foi correspondente às combinações genotípicas CC/CT e CC/TT.

Alguns *spots* que apresentaram significância coincidiram com o ponto isoelétrico e peso molecular de proteínas relatadas na literatura, estes *spots* são discutidos a seguir (Tabela 4A em anexo).

O *spot* 12, que foi significativo na comparação entre genótipos com sete dias de maturação, segundo a literatura (JIA et al., 2006a; JIA et al., 2006b; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al., 2010;), possivelmente é a *heat-shock protein beta 6 (HSP20)*. O *spot* 28, com base na literatura (BOULEY et al., 2004; JIA et al., 2006a; JIA et al., 2007; LAVILLE et al., 2009; KIM et al. 2008; BJARNADÓTTIR et al., 2010;), é provavelmente a *heat-shock protein beta 1 (HSP27)*. As proteínas da família *heat-shock* previnem a degradação e danos na estrutura das proteínas miofibrilares, pelo processo de apoptose nas células musculares e acredita-se estarem envolvidas na estabilização e regulação dessas proteínas e proteção dos filamentos de actina e outras proteínas do citoesqueleto da fragmentação causada por condições de stress. Blunt et al. (2007) relataram que a HSP27 protege a desmina da proteólise pela calpaína. No presente trabalho, ambas as proteínas (HSP20 e HSP27) foram mais expressas nos animais pertencentes aos grupos com maior força de cisalhamento e com menos alelos favoráveis (C) à maciez. Hwang et al. (2005) demonstraram que a proteína HSP27 foi correlacionada positivamente com a força de cisalhamento (+0,63), em concordância com este trabalho, que apresentou correlação desta proteína com a maciez aos 14 dias de maturação de $r_{xy} = 0,40$. Os autores estudaram a proteólise *post mortem* de 20 suínos, a análise 2DE foi feita em triplicata nos tempos de zero, um, três e sete dias *post mortem*. Assim, 133 *spots* foram identificados e 27 desses tiveram correlações significativas com características de qualidade da carne. Baseado na média do valor de intensidade relativo a cada *spot*, 17 *spots* tiveram consistente redução nesse valor durante a maturação, enquanto nove *spots* apenas variaram de intensidade. Zapata et al. (2009) reportaram que a HSP20 foi negativamente associada com a maciez aos 72 dias *post mortem*. Em bovinos da raça Charolês, a baixa expressão da proteína HSP27 foi associada com uma carne mais macia. A HSP40 quando encontrada em níveis baixos também foi relacionada com uma carne mais macia, podendo explicar, segundo Bernard et al. (2007), em termos de mRNA, mais de 65% da variabilidade da maciez. Kim et al. (2008) identificaram quatro *spots* diferentemente expressos entre o grupo classificado como amostras de carne macia e o grupo classificado como carne dura. Baixos níveis de HSP27 também foram observados em carne bovina com

maior maciez e maior conteúdo de gordura intramuscular. Esta proteína teve correlação positiva com força de cisalhamento (+0,65).

O mecanismo através da relação negativa entre alguns níveis de HSP e a maciez poderia estar relacionado com a ação antiapoptótica das HSP. As calpaínas são conhecidas por desempenhar um importante papel na proteólise *post mortem* e, conseqüentemente, no processo de amaciamento da carne, mas também no processo de apoptose. Várias proteínas da família HSP, como a HSP27 e HSP70, são conhecidas por ter uma função antiapoptótica (CRECGH et al., 2000).

Entretanto, resultados diferentes foram apresentados por Morzel et al. (2008), que observaram em seu estudo com bovinos Blond d'Áquitaine correlação positiva entre níveis de HSP27 com *scores* para maciez. Em outro experimento, baixos níveis de HSP27 e HSP20 foram encontrados em grupos com amostras de carne bovina que apresentaram maior maciez (BOULEY et al 2004b). Em suínos, baixos níveis de HSP27 também foram associados com carne de maciez superior (KWASIBORSK et al., 2009). D'alessandro et al. (2012) estudaram 15 bovinos divididos em dois grupos distintos: animais com carne macia e animais com carne dura. O Intuito foi o de verificar as proteínas expressas em 24 horas *post mortem* para cada grupo. Foram identificados 35 *spots*, destes, 26 *spots* foram mais abundantes no grupo de amostras de carne macia e nove *spots* no grupo de amostras de carne dura. Alguns *spots* identificados, como *heat-shock protein beta 1* e *troponina T*, *fast skeletal muscle* foram encontrados em ambos os grupos estudados. Entretanto a *heat-shock protein beta 6* foi diferencialmente encontrada no grupo de carne macia. D'alessandro et al. (2012b), estudando bovinos da raça Chianina, reportaram que o grupo de carne macia foi caracterizada por grande nível de proteínas glicolíticas. A HSP27, a HSP20 e o *Glycerol -3- phosphate dehydrogenase* foram mais abundantes no grupo de maior maciez, entretanto a HSP20 também foi encontrada em abundância no grupo de menor maciez. Guillemín et al. (2012) estudaram amostras de bovinos da raça Charolês em dois músculos: *Longissimus Thoracis* e *Semitendinosus*. As amostras foram separadas em três classes (inferior, média e superior) de acordo com a força de cisalhamento. No músculo *Semitendinosus* a expressão dos *spots* identificados como HSP27 e

HSP20 foram mais altas no grupo de maciez superior, enquanto a proteína identificada como HSP70 foi mais expressa no grupo de maciez inferior e média. Esses achados são contrários aos encontrados para o músculo *Longissimus Thoracis*, onde essas proteínas não foram relacionadas com o grupo de maciez superior. Os autores relataram que a quantificação das proteínas consideradas marcadores em potencial para maciez não permitiram discriminação para a maciez do músculo *Longissimus Thoracis* e, dentre as 24 proteínas estudadas, apenas 11 explicaram variação da maciez entre os grupos no músculo *Semitendinosus*. Bjarnadóttir et al. (2011) reportaram menor abundância da proteína HSP70 no grupo de bovinos com carne macia. Picard et al. (2010) relataram que esse contraste nos resultados pode ser relacionado com a variação na extração dessas proteínas. Além disso, as proteínas da família HSP agem em conjunto e têm funções múltiplas, envolvendo estabilização e reparação de proteínas, bem como ações antiapoptóticas e antioxidativas, e podem influenciar a qualidade da carne.

O *spot* 41, significativo no tempo de maturação de sete dias entre genótipos, possivelmente é a *troponina T, fast skeletal muscle (TnTf)* (BOULEY et al., 2004; HWANG et al., 2005; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al. 2010) . Esta proteína foi mais expressa nos animais pertencentes aos grupos com maior força de cisalhamento e com menos alelos favoráveis (C) à maciez. A troponina T (TnT) tem sido descrita como substrato da proteólise pela μ -calpaína nas condições de *post mortem* (LAMETSCH et al., 2004). MUROYA et al. (2007) reportaram que fragmentos da troponina T podem ser bons marcadores para examinar variações da maturação de carne bovina no *post mortem*. Segundo Choi et al. (2010), a troponina T apresenta correlação forte e positiva com força de cisalhamento, assim como foi observado no presente trabalho, onde esta correlação foi de $r_{xy}=0,64$.

O *spot* 51, identificado na comparação entre genótipos com sete dias de maturação, é provavelmente (BOULEY et al., 2004; JIA et al. 2007; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al. 2010;), o *Glycerol -3- phosphate dehydrogenase*, que é uma proteína que age como enzima metabólica envolvida em várias reações enzimáticas da glicólise. Os *spots* 70 e 142, identificados na comparação entre genótipos com 14 dias de maturação,

também podem ser (JIA et al., 2006b; Chaze et al., 2006; JIA et al., 2007; LAVILLE et al., 2009; BJARNADÓTTIR et al., 2010;) o *Glycerol –3- phosphate dehydrogenase*. Todos os *spots*, identificados como sendo esta proteína através da literatura, foram mais expressos nos animais pertencentes aos grupos com maior força de cisalhamento e com menos alelos favoráveis (C) à maciez e tiveram correlações altas e positivas com a força de cisalhamento aos 14 dias de maturação, sendo $r_{xy}=0,75$; 0,81 e 0,72 para os *spots* 51, 70 e 142, respectivamente.

Sierra et al. (2012) estudaram bovinos com diferentes graus de hipertrofia (mh / mh, mh / +, + / +). A presença de hipertrofia muscular produziu uma taxa mais rápida de declínio do pH, mais rápido esgotamento da atividade da μ -calpaína e ocorrência precoce das mudanças proteolíticas. As alterações no padrão de eletroforese de alguns peptídeos, como *Glycerol –3- phosphate dehydrogenase* e *troponina T*, *fast skeletal muscle*, dentro das primeiras 24 horas foi significativamente correlacionada com a carne mais dura e permitiu prever com acurácia a força de cisalhamento da carne obtida após sete dias de maturação. Já para Laville et al. (2009), as proteínas HSP27e *troponina T*, *fast skeletal muscle* foram mais abundantes no grupo correspondente a carne macia, enquanto a *Glycerol –3- phosphate dehydrogenase*, assim como em nosso estudo, foi mais abundante no grupo de carne dura, mesmo dois fragmentos desta proteína estando mais abundantes no grupo referente a amostras de carne macia. Esses autores avaliaram a diferença de expressão de proteínas do músculo *Longissimus Thoracis* de bovinos da raça Charolês divididos em dois grupos (carne macia e dura), de acordo com a força de cisalhamento em três tempos *post mortem* (zero, cinco e 21 dias). Para o tempo de zero dias *post mortem* foram identificados 15 *spots* diferentemente expressos entre os dois grupos. Para o tempo de cinco dias *post mortem* foram identificados 10 *spots*. Zapata et al. (2009) fizeram análise proteômica de 22 amostras de *Longissimus dorsi* provenientes de bovinos da raça Angus para 72 horas e 14 dias *post mortem*. Foram escolhidas três amostras com os valores mais altos e mais baixos de força de cisalhamento, para serem comparadas entre si dentro de cada tempo. A proteína *Glycerol –3- phosphate*

dehydrogenase foi correlacionada positivamente com a maciez aos 14 dias *post mortem*, em concordância com o presente trabalho.

6.5 CONCLUSÃO

Houve diferenças significativas na expressão das proteínas entre amostras com genótipos distintos para os marcadores UOGCAST e CAPN4751, em carne maturada com um, sete e 14 dias. Os *spots* 51 e 78 explicaram 69% da variabilidade da maciez aos sete dias de maturação e o *spot* 57 explicou 70% da variabilidade da maciez aos 14 dias de maturação. Estes resultados indicam que as mudanças observadas podem refletir mecanismos relevantes resultantes do processo de proteólise. A avaliação e identificação destas proteínas associadas à maciez da carne de animais Nelore apresentadas neste trabalho podem auxiliar no entendimento da proteólise da carne.

7. CONCLUSÕES

- Existem diferenças significativas na intensidade de expressão de proteínas musculares no *post mortem* entre um, sete e 14 dias de maturação. Estas mudanças podem refletir mecanismos relevantes relacionados ao processo de proteólise.
- Foram observadas diferenças significativas na intensidade de expressão dos *spots* entre amostras com genótipos distintos para os marcadores UOGCAST e CAPN4751 para um, sete e 14 dias de maturação.
- O estudo proteômico da carne bovina durante o *post mortem* permitiu identificar proteínas que explicam porções expressivas da variabilidade da maciez da carne.
- Estudos identificando os *spots* sugeridos em relação à maciez, bem como outras características físico-químicas da carne bovina, possibilitarão o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de maturação da carne e obtenção de uma carne com qualidade superior.

8. REFERÊNCIAS

- ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011.
- BARENDSE, W.; HARRISON, B. E.; HAWKEN, R. J.; FERGUSON, D.M.; THOMPSON, J. M.; THOMAS, M.B.; BUNCH, R. J. Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. **Genetics**, v. 176, n. 8, p.2601-2610, 2007.
- BARKHOUSE K. L., VAN VLECK L. D., CUNDIFF L. V., KOOHMARAIE M., LUNSTRA D. D., CROUSE J. D.. Prediction of Breeding Values for Tenderness of Market Animals from Measurements on Bulls. Journal Ser., Nebraska Agric.Res. Div., Univ. of Nebraska, Lincoln. 2612- 2621, 1996.
- BERNARD C.; CASAR -MALEK I.; LE CUNF M.; DUBROEUCQ H.; RENAND G.; HOCQUETE J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 5229-5237, 2007.
- BISHOP, M. D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatina gene. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 71, p. 2277, 1993.
- BJARNADÓTTIR S. G.; HOLLUNG K.; HØY M.; BENDIXEN E.; CODREA M. C.; VEISETH-KENT E. Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine Longissimus thoracis muscle assessed by iTRAQ and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. **Journal of Animal Science**, 90(6):2035-43, 2011.
- BJARNADOTTIR, S.G., HOLLUNG, K., FAERGESTAD, E.M., VEISETH-KENT, E. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. **J Agric Food Chem** v.58, 7408–14, 2010.

- BLUNT BC; CREEK AT; HENDERSON DC; HOFMANN PA. H₂O₂ activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293:H1518–25, 2007.
- BOULEY J., CHAMBON C., PICARD B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**. V4 1811-1824, 2004.
- BOULEY J.; MEUNIER B.; CULIOLI J.; PICARD B. Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. **Renc Rech Ruminants**;11: 87–9, 2004b.
- CARVALHO, M. E.; ELER, J. P.; AFAZ, A. L. M.; FERRAZ, J. B. S.; REGITANO, L. C. A.; MEIRELLES, F. V.; BALIEIRO, J. C. C. **Avaliação de diferentes combinações genóticas para polimorfismos no gene da μ -calpaína e calpastatina associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. Anais do IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. P. 253-255, 2007.
- CARVALHO, M. E.; ELER, J. P.; BALIEIRO, J. C. C.; REGITANO, L. C. A.; MEIRELLES, F. V.; FERRAZ, J. B. S. **Associação de polimorfismos no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em animais da raça Nelore**. Anais da 44^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Cd Rom. 2007
- 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. **Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle**. *Journal of Animal Science*, v. 83.n. 1, p. 2661-2668, 2005.

- CASAS, E., WHITE, S. N., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D. G., CHASE, C. C., JR., JOHNSON, D. D., SMITH, T. P. L. **Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* v. 84, p. 520-525, 2006.**
- CASAS, E.; SHACKELFORD, M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. ***Journal of Animal Science***, v.78, n. 3, p.560-569, 2000.
- CHAZE T., BOULEY J., CHAMBON C., BARBOIRON C., PICARD B. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. ***Proteomics*** v. 6, 2571–2575, 2006.
- CHOI Y. M., LEE S. H., CHOE J. H., RHEE M. S., LEE S. T., KIM B. C. Protein solubility is related to myosin isoform, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine. ***Livestock Science***. v.127 183-191, 2010.
- CREAGH EM.; SHEEHAN D.; COTTER TG. Heat shock proteins modulators of apoptosis in tumour cells. ***Leukemia*** v.14 n.7: 1161–73, 2000.
- CROUSE, J. D.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; KOOHMARAIE, M. ; SEIDEMAN, S. C. 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;
- D'ALESSANDRO A.; RINALDUCCI S.; MARROCCO C.; ZOLLA V.; NAPOLITANO F.; ZOLLA L. Love me tender: an omics window on cow meat tenderness. ***J Proteomics***, 2012.

- D'ALESSANDRO A.; MARROCO C.; RINALDUCCI S.; MIRASOLE C.; FAILLA S.; ZOLLA L. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. *J Proteomics*, 2012b.
- DIKEMAN, M. E., E. J. POLLAK, Z. ZHANG, D.W. MOSER, C. A GILL, AND E. A. DRESSLER. Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three cattle breeds. **Journal of Animal Science**. 83:2461-2467, 2005.
- DRANSFELD, E. Modelling postmortem tenderization. V. Inactivation of calpains. **Meat Science**, Nebraska, v. 37, p. 391-409, 1994.
- ELZO MA, WEST RL, JOHNSON DD, WAKEMAN DL Genetic variation and prediction of additive and nonadditive genetic effects for six carcass traits in an Angus–Brahman multibreed herd. **Journal of Animal Science** **76**, 1810–1823, 1998.
- FERNANDES T.L., WILTON J.W., MANDELL I.B., DEVITT C.J.B. Genetic parameter estimates for meat quality traits in beef Cattle managed under a constant finishing program. **7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 19-23, 2002**.
- GAO Y., ZHANG R., HU Z., LI N., Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat science**. V.77 1, 36-45, 2007
- GALLINGER, M.M.; MARCELIA, M.; GARCIA, P.T.; LASTA, J.; ZANELLI, M. & GONZALEZ, B. Meat quality of zebu crossbred: sensory and mechanical evaluation. In: **Proceedings of 38th ICoMST**, Clermont-Ferrand, França, 1992, p. 45-48.
- GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A. H., KOOHMARAIE, M. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2834-2840, 2006.

- GREGORY, K. E., L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, M. E. DIKEMAN, AND M. KOOHMARAIE. Breed effects and retained heterosis for growth, carcass, and meat traits in advanced generations of composite populations of beef cattle. **Journal of Animal Science**. 72:833, 1994.
- GREGORY, K. E., L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, M. E. DIKEMAN, AND M. KOOHMARAIE. Breed effects, retained heterosis, and estimates of genetic and phenotypic parameters for carcass and meat traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**. 72:1174, 1994b.
- GUILLEMIN N.; JURIE C.; RENAND G.; HOCQUETTE JF.; MICOL D.; LEPETIT J.; PICARD B. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. **International Journal of Biology**, v.4, n.2, 2012.
- HWANG I.H, PARK B. Y., KIM J. H., CHO H. S., LEE J. M. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. **Meat science**. V69 79-91, 2005.
- JIA X., HOLLUNG K., THERKILDSEN M., HILDRUM K., BENDIXEN E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and m. semitendinosus. **Proteomics** v.6 936-944, 2006a.
- JIA X., HILDRUM K., WSTAD F., KUMMEN E., AASS L., HOLLUNG K. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post-mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. **Journal of proteome research**, v 5, 1763-1769, 2006b.
- JIA, X., EKMAN, M., GROVE H. FAERGESTAD E. M., AASS, L., HILDRUM, K. L., HOLLUNG, K. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. **J Proteome Res** v.6, 2720–2731, 2007.
- KILLINGER K. M., CALKINS C. R., UMBERGER FEUZ W. J., D. M. AND ESKRIDGE K. M. (2004). Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. **J Anim Sci**. 82:3288-3293.

- KIM N. K., CHO S., LEE S. H, PARK H.R., LEE C. S., CHO Y. M., CHOY Y. H., YOON D., IM S.K., PARK E. W. Protein in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat science**. v.80 1068-1073, 2008.
- KIM N. K., LEE S. H, CHO Y. M., SON E. S.,KIM K. Y., LEE C. S., YOON D., IM S.K., OH S. J., PARK E. W. Proteome analysis of the m. longissimus dorsi between fattening stages in Hanwoo steer. **BMB reports**. 42:433-438, 2009.
- KJAERSGARD I. V. H., NORRELYKKE M. R., JESSEN F. Changes in cod muscle protein during frozen storage revealed by proteome analysis and multivariate data analysis. **Proteomics**. V6, 1606-1618, 2006.
- KOOHMARAIE, M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, 74 (3), 239–245, 1992.
- KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulations the toughening and tenderization process of meat. **Journal of Animal Science**, v. 43, S193-S 201, 1996.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p.93-104, 1994.
- KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Proceedings of Reciprocal Meat Conference**, p. 41-89, 1988.
- KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; BISHOP, M. D.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T.L.; ARBONA, J. R. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. In: Expression of Muscle proteinases and Regulation of Protein Degradation as Related to Meat Quality. OUALI, A; DEMEYER, D;

SMULDERS, F. ed. Audet Tijdschriften b.v., Nijmegen, The Netherlands.
p. 395-412. 1995.

KWASIBORSKI A, ROCHA D, TERLOUW C. Gene expression in Large White or Duroc-sired female and castrated male pigs and relationships with pork quality. **Anim Genet**; 40: 852–62, 2009.

LAMETSCH, R., KARLSSON, A., ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H. J., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, 6992–6997, 2003.

LAMETSCH, R., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, 5508–5512, 2002.

LAMETSCH R.; ROEPSTORFF P.; MOLLER H.S.; BENDIXEN E. Identification of myofibrillar substrates for I-calpain. **Meat Science**, 68, 515–521, 2004.

LAVILLE E., SAYD T., MORZEL M., BLINET S., CHAMBON C., LEPETIT J., RENAND G., HOCQUETTF J. R. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. **J. Agric. Food Chem.** V57 10755-10764, 2009.

MELLGREN, R. L; LANE, R. D; MERICLE, M. T. **Biochem. Biophys. Acta.** 999, p. 71, 1989.

MECKHAY S., TELTATHUM T., NAKASATHIEN S., PONGPAICHAN P. Proteomic analysis of tenderness trait in Thai Native and Commercial Broiler chicken muscle. **J. Poult. Sci.** 47 (1), 2010.

MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 71-1471, 1993.

- MORRIS, C. A., CULLEN, N. G.; HICKEY, S. M.; CRAWFORD, A. M.; HYNDMAN, D. L.; BOTTEMA, C. D. K.; PITCHFORD, W. S. Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand and Australia. **Proc. Assoc. Advancement Anim. Breed. Genet.**, Queenstown, NZ. 14:17–22, 2001.
- MORZEL, M., TERLOUW, C., CHAMBON, C., MICOL, D., PICARD, B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, v.78, 297–304, 2008.
- MULLEN A.M., STAPLETON P.C., CORCORAN D., HAMILL R.M., WHITE A. Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. **Meat Science** v.74 3–16, 2006.
- MUROYA S.; OHNISHI-KAMEYAMA M.; OE M.; NAKAJIMA I.; CHIKUNI K. Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: The limited fragmentation into basic polypeptides. **Meat Science**, 75, 506–514, 2007.
- NEPHAWE, K. A., L. V. CUNDIFF, M. E. DIKEMAN, J. D. CROUSE, AND L. D. VAN VLECK. Genetic relationships between sex-specific traits in beef cattle: Mature weight, weight adjusted for body condition score, height and body condition score measurement of cows and carcass traits of their steer relatives. **Journal of Animal Science**. 82:647–653, 2004.
- NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Relationship between degradation of proteoglycans and weakening of the intramuscular connective tissue during post-mortem ageing of beef. **Meat science**, v.42, p.251, 1996.
- O’CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; WULF, D.M. *et al.* Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.75, n.7, p.1822-1830, 1997.

- PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOMARAIE, M.; WHITE, S. N.; BENNETT, G. L.; KELLE, J. W.; DIKEMAN, M. E.; SMITH, T.P. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v. 82, n.12, p.3474-81, 2004.
- 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.; KELLE, J. W.; SMITH, T. P. L. Evalution of single-nucleotide polymorphisms in CAPN for association with meat tenderness in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 80, n. 12, p.3077-3085, 2002.
- PICARD B.; BERRI C.; LEFAUCHEUR L.; MOLETTE C.; SAYD T.; TERLOUW C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, v.9, n.3, 259-278, 2010.
- PRINGLE, T. D., WILLIAMS, S. E., LAMB, B. S., JOHNSON, D. D., WEST, R. L. **Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955-2961, 1997.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.
- RAMSEY, C.B.; COLE, J.W.; MEYER, B.H.; TEMPLE, R.S. Effects of type and breed of British, zebu and daity cattle on production, palatability and composition. II. Palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels. **Journal of Animal Science**, v. 22, n. 4, p.1001-1008, 1963.
- RILEY, D. G., CHASE, C. C., JR., PRINGLE, T. D., WEST, R. L., JOHNSON, D. D., OLSON, T. A., HAMMOND, A. C., COLEMAN, S. W. Effect of sire on {micro}- and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by

myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2440-2447, 2003b.

RILEY D. G., CHASE C. C., JR., HAMMOND A. C., WEST R. L., JOHNSON D. D., OLSON T. A., COLEMAN S. W.. Estimated genetic parameters for palatability traits of steaks from Brahman cattle **J Anim Sci.** 81:54-60, 2003.

SAS. 1995. USER'S GUIDE: **basic and statistic**. Cary: SAS. 1.686 p.

SCHENKEL, F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z., MANDELL, I. B., YE, X., LI, H., WILTON, J. W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 291-299, 2006.

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

SHACKELFORD, S.D.; KOOMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yeild, and growth rate. **Journal of Animal Science**. 72:857-863, 1994.

SIERRA V.; SUAREZ V.; CASTRO P.; OSORO K.; VEGA-NAREDO I.; GARCIA-MACIA M.; RODRIGUEZ-COLUNGA P.; COTO-MONTES A.; OLIVAN M. Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderizing meat. **J Sci Food Agric**, 2012.

SILVA H. D.; VENCOVSKY R. Poder de detecção de “quantitative trait loci”, da análise de marcas simples e da regressão linear múltipla **Scientia Agricola**, v.59, n.4, p.755-762, 2002

- SMITH, T. P.; CASAS, E.; REXROAS, C. E. 3rd.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. Bovine CAPN maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.
- SMITH T., THOMAS M.G., BIDNER, T.D.. PASCHAL J.C AND FRANKE D.E.. Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. **Genet. Mol. Res.** 8 (1): 39-46, 2009.
- SMITH T, DOMINGUE JD, PASCHAL JC, FRANKE DE, BIDNER TD, Whipple G. Genetic parameters for growth and carcass traits of Brahman steers. **Journal of Animal Science** 85, 1377–1384, 2007.
- VAN EENENNAAM, A. L., LI, J., THALLMAN, R. M., QUAAS, R. L., DIKEMAN, M. E., GILL, C. A., FRANKE, D. E., THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 1, jas. p. 512, 2007.
- VASCONCELLOS, L. P. M. K., TAMBASCO-TALHARI, D., PEREIRA, A. P. et al. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n. 2, p.133-137, 2003.
- VAN VLECK, L. D., A. F. HAKIM, L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, J. D. CROUSE, AND K. G. BOLDMAN. Estimated breeding values for meat characteristics of crossbred cattle with an animal model. **Journal of Animal Science**. 70:363, 1992.
- ZAPATA, I.; H. N. ZERBY; WICK M. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. **J Agric Food Chem** 57(11): 4956-4963, 2009.
- WHEELER, T. L., L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, AND J. D. CROUSE. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and longissimus palatability. **Journal of Animal Science**. 74:1023–1035, 1996.

- WHEELER, T. L., L. V. CUNDIFF, S. D. SHACKELFORD, AND M. KOOHMARAIE. Characterization of biological types of cattle (Cycle V): Carcass traits and longissimus palatability. **Journal of Animal Science**. 79:1209–1222, 2001.
- WHIPPLE, G.; KOOMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM, R. D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2394, 1990.
- WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, S. D.; SHACKELFORD, M.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in CAPN extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 9, p.2001-2008, 2005.
- WOLCOTT ML, JOHNSTON DJ, BARWICK SA, IKER CL, THOMPSON JM, BURROW HM 2009 Genetics of meat quality and carcass traits and the impact of tenderstretching in two tropical beef genotypes. **Animal Production Science** 49, 383–398, 2009.
- WULF D. M., TATUM J. D., GREEN R. D., MORGAN J. B., GOLDEN B. L., SMITH G. C. Genetic influences on beef longissimus palatability in charolais- and limousin-sired. **J Anim Science** 74:2394-2405, 1996.
- ZAPATA I.; ZERBY HN.; WICK M. Functional Proteomic Analysis Predicts Beef Tenderness and the Tenderness Differential. **J. Agric. Food Chem.** 57, 4956–4963, 2009.

ANEXOS

Tabela 1A. Médias, desvios padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos dos dados de pH, cor (escala L*, a*, b*, do sistema CIE Lab), perda de água por cocção (PAC) e força de cisalhamento (FC, kgf), coletados no experimento

Variável	N	Média	Desvio padrão	Coeficiente de Variação	Mínimo	Máximo
PH1H	15	6,565	0,215	3,280	6,150	6,890
PH24H	15	5,551	0,206	3,705	5,310	6,120
L1D	15	36,693	3,414	9,305	29,570	41,260
A1D	15	15,947	2,586	16,219	12,140	20,500
B1D	15	14,330	4,114	28,710	9,250	21,920
L7D	15	37,673	3,988	10,586	32,220	43,130
A7D	15	17,213	2,926	17,000	12,020	22,740
B7D	15	15,853	4,897	30,892	8,220	24,270
L14D	14	37,474	4,390	11,715	30,870	44,240
A14D	14	17,372	3,116	17,938	12,660	25,430
B14D	14	15,551	4,309	27,706	9,290	24,900
PAC1D	14	23,435	4,032	17,206	16,563	28,611
PAC7D	13	23,414	4,988	21,303	16,592	32,599
PAC14D	15	26,990	6,028	22,335	18,928	41,438
FC1D (kgf)	15	10,240	1,560	15,232	8,500	14,220
FC7D (kgf)	15	8,620	1,878	21,781	6,000	11,825
FC14D (kgf)	15	7,564	1,580	20,887	5,150	10,742

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 1A. Representação esquemática evidenciando a expressão dos *spots* que mudaram significativamente de intensidade no período de um, sete e 14 dias de maturação (Continuação)

Figura 2A. Representação gráfica do comportamento linear de 2° grau das intensidades dos *spots* significativos durante os tempos de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 2A. Representação gráfica do comportamento linear de 2º grau das intensidades dos *spots* significativos durante os tempos de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 2A. Representação gráfica do comportamento linear de 2º grau das intensidades dos *spots* significativos durante os tempos de um, sete e 14 dias de maturação (Continua)

Figura 2A. Representação gráfica do comportamento linear de 2º grau das intensidades dos *spots* significativos durante os tempos de um, sete e 14 dias de maturação (Continuação)

Figura 2B. Representação gráfica do comportamento linear de 1º grau das intensidades dos *spots* significativos durante os tempos de um, sete e 14 dias de maturação

Tabela 2A. Ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM) para cada *spot* significativo no capítulo 1 para os diferentes tempos de maturação

1 dia de maturação				7 dias de maturação				14 dias de maturação			
SPOT	pl	PM		SPOT	pl	PM		SPOT	pl	PM	
175	5,03	69		175	5,35	63		175	5,07	64	
50	6,23	16		50	6,52	16		50	6,27	17	
121	6,73	19		121	7,00	18		121	6,80	19	
3	5,75	19		3	6,05	19		3	5,75	19	
149	6,76	21		149	7,02	20		149	6,83	21	
5	4,96	21		5	5,24	21		5	4,96	21	
7	5,73	21		7	6,01	21		7	5,72	21	
109	5,42	22		109	5,70	21		109	5,47	22	
180	6,66	22		180	6,94	21		180	6,72	21	
9	4,64	22		9	4,89	22		9	4,62	22	
160	6,83	22		160	7,05	22		160	6,89	22	
11	4,69	24		11	4,95	24		11	4,67	24	
112	5,59	24		112	5,87	24		112	5,59	24	
93	4,80	25		93	5,08	24		93	4,80	25	
60	6,40	31		60	6,69	30		60	6,46	31	
15	5,80	33		15	6,08	32		15	5,80	33	
137	5,57	33		137	5,83	33		137	5,55	33	
18	5,90	33		18	6,18	32		18	5,91	33	
77	6,27	34		77	6,54	34		77	6,29	34	
40	6,21	35		40	6,48	34		40	6,23	35	
138	6,41	35		138	6,68	35		138	6,45	35	
182	6,85	35		182	7,14	35		182	6,92	35	
21	5,59	36		21	5,86	35		21	5,58	35	
97	6,52	36		97	6,80	35		97	6,59	36	
22	6,58	36		22	6,86	35		22	6,65	36	
130	6,70	36		130	6,97	35		130	6,78	36	
42	6,21	36		42	6,49	36		42	6,25	36	
147	6,76	36		147	7,01	36		147	6,84	36	
79	5,20	38		79	5,45	37		79	5,19	37	
25	5,36	38		25	5,63	37		25	5,35	38	
173	6,68	39		173	6,94	38		173	6,74	38	
99	6,75	39		99	6,99	38		99	6,81	39	
153	6,77	43		153	7,00	41		153	6,82	42	
64	5,07	44		64	5,33	44		64	5,05	45	
143	6,51	51		143	6,77	50		143	6,56	52	
49	6,38	61		49	6,65	59		49	6,42	60	
132	5,75	63		132	6,00	61		132	5,74	61	
103	5,85	63		103	6,12	61		103	5,84	62	
82	5,45	65		82	5,70	63		82	5,42	64	
68	6,75	78		68	6,96	72		68	6,78	73	
166	6,86	80		166	7,10	75		166	6,91	75	

Tabela 3A. Correlação entre os marcadores para calpaína e calpastatina com a força de cisalhamento para cada dia de maturação

Marcador	FC 1dia	FC 7dias	FC 14dias
UOG_S	-0,3506	-0,5237	-0,7740
CAPN_S	-0,0570	-0,1913	-0,4506

Tabela 3B. Correlação entre o *spot* significativo para um dia de maturação com a força de cisalhamento para cada dia de maturação

Spot significativo com um dia de maturação	FC 1dia	FC 7dias	FC 14dias
SPOT_73	-0,23878	-0,11597	0,26593

Tabela 3C. Correlação entre os *spots* significativos para sete dias de maturação com a força de cisalhamento para cada dia de maturação

Spots significativos com sete dias de maturação	FC 1dia	FC 7dias	FC 14dias
SPOT_12	0,0619	0,1827	0,5531
SPOT_15	0,1109	0,2540	0,6758
SPOT_17	-0,1046	-0,0669	0,2806
SPOT_28	0,2273	0,2497	0,3994
SPOT_41	0,1285	0,2593	0,6372
SPOT_45	0,1682	0,2989	0,6699
SPOT_46	0,1470	0,2994	0,6997
SPOT_47	0,1672	0,3309	0,7363
SPOT_48	0,0332	0,1570	0,5974
SPOT_51	0,0742	0,2705	0,7498
SPOT_72	-0,0520	-0,0001	0,3710
SPOT_73	-0,2837	-0,3745	-0,2741
SPOT_78	-0,3013	-0,2563	0,0835
SPOT_80	-0,2927	-0,2268	0,1506
SPOT_82	-0,0638	-0,1303	-0,0245
SPOT_101	-0,1583	-0,2418	-0,5007
SPOT_106	0,0000	-0,1627	-0,6542
SPOT_178	-0,4194	-0,3668	-0,0765

Tabela 3D. Correlação entre os *spots* significativos para 14 dias de maturação com a força de cisalhamento para cada dia de maturação

Spots significativos com 14 dias de maturação	FC 1dia	FC 7dias	FC 14dias
SPOT_3	0,3864	0,2954	-0,0328
SPOT_4	-0,3690	-0,2947	0,1048
SPOT_7	0,2686	0,2981	0,2190
SPOT_17	-0,2881	-0,3367	-0,4638
SPOT_55	0,2604	0,4512	0,8246
SPOT_56	0,0354	0,2292	0,7442
SPOT_57	0,2332	0,4442	0,8362
SPOT_58	0,0696	0,2600	0,7583
SPOT_67	0,3316	0,4819	0,7668
SPOT_69	0,3324	0,4731	0,7514
SPOT_70	0,3012	0,4816	0,8110
SPOT_73	0,0850	-0,1162	-0,6660
SPOT_81	0,4320	0,4636	0,4607
SPOT_107	0,0574	-0,0542	-0,1382
SPOT_109	0,1283	0,1385	0,0877
SPOT_142	0,3428	0,4922	0,7183
SPOT_154	0,4044	0,4900	0,3774
SPOT_169	-0,2164	-0,4158	-0,8248
SPOT_175	0,3323	0,4402	0,6750

Tabela 4A. Ponto isoeletrico (pI) e peso molecular (PM) para cada *spot* significativo no capítulo 2 para os diferentes tempos de maturação

1 dia de maturação			7 dias de maturação			14 dias de maturação		
<i>SPOT</i>	pI	PM	<i>SPOT</i>	pI	PM	<i>SPOT</i>	pI	PM
73	4,92	16	12	6,45	17	3	4,60	15
			15	6,23	19	4	4,87	15
			17	5,49	19	7	4,65	16
			28	5,94	22	17	5,78	19
			41	6,62	32	169	6,79	21
			45	6,16	34	55	5,98	34
			46	6,01	34	56	5,82	34
			47	6,27	34	57	6,11	34
			48	6,11	34	58	5,93	34
			101	6,41	36	175	6,62	36
			51	6,8	37	67	6,69	36
			106	6,06	38	142	6,27	37
			178	6,93	39	69	6,82	36
			72	6,38	54	70	6,89	37
			78	6,06	65	81	6,97	39
			82	5,64	66	154	5,95	64
			80	6,19	66	107	6,00	66
						109	5,91	66