UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTINA TSCHORNY MONCAU

Perfil proteômico muscular de bovinos inteiros da raça Nelore

Pirassununga
2012

CRISTINA TSCHORNY MONCAU

Perfil proteômico muscular de bovinos inteiros da raça Nelore

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: Zootecnia (Qualidade e Produtividade Animal)

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

M737p Moncau, Cristina Tschorny
Perfil proteômico muscular de bovinos inteiros da
raça Nelore / Cristina Tschorny Moncau. -- Pirassununga,
2012.
84 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 César de Carvalho
Balieiro.

1. Zebuínos 2. Maciez da carne 3. Proteólise
4. Marcador molecular. I. Título.

Dedico...

A minha adorável mãe, Elvira Tschorny Moncau, que me ensinou a ser forte o suficiente para continuar sempre em frente. Amo!

Aos meus queridos irmãos, Jorge, Betinho e Regina, que me apoiaram durante todo esse árduo percurso.

E em especial, ao meu inesquecível pai, José de Barros Moncau (in memoriam). Palavras não serão capazes de expressar tudo o que sinto... A certeza de tê-lo eternamente ao meu lado, me faz continuar caminhando e superando cada obstáculo imposto pela vida. Te amo sempre!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e me amparando nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro, pela oportunidade e confiança.

À Universidade de São Paulo, em especial a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela formação profissional que me foi proporcionada.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Trindade, pela oportunidade de dividir o espaço físico de seu laboratório, permitindo a realização de nossas pesquisas.

Ao Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, pela parceria e fornecimento dos animais usados na pesquisa.

Ao Cláudio Pereira da Silva, pela companhia, compreensão e principalmente, pela paciência.

À Alessandra Fernandes Rosa, pela confiança, oportunidade e ensinamentos.

À Mirele Daiana Poleti, pelos ensinamentos laboratoriais, pelo grande auxílio no meu crescimento profissional e pessoal, pela convivência diária e principalmente pela amizade.

Ao Fábio Mateus de Moraes, pelo grande auxílio na trabalhosa análise dos géis.

A todas as pessoas que me acompanharam durante algum período desta jornada, principalmente a Priscila, Bárbara, Vanessa, André, Vinícius, Gabi, Laís, Davi e Valéria; obrigada pela paciência.

Aos funcionários do Matadouro Escola, Maurício, Dori, Dito, Mário, Scharlack e Elso pela paciência durante os abates e desossas, e das boas risadas entre as coletas.

Aos meus filhotes, Logan, Milly e Barney, pela companhia e carinho em todos os momentos desta maratona.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

MONCAU, C.T. Perfil proteômico muscular de bovinos inteiros da raça Nelore. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a qualidade de carne (*Longissimus dorsi*) de machos inteiros da raça Nelore através de análise proteômica bidimensional. Para tanto, dois objetivos específicos foram propostos: (i) estudar a proteólise das carnes em diferentes tempos de maturação, no caso um, sete e 14 dias, e (ii) estudar o perfil protéico das carnes de bovinos machos inteiros Nelore com genótipos contrastantes para maciez, em diferentes tempos de maturação (um, sete e 14 dias), associados aos marcadores moleculares CAPN4751 (μ -calpaína) e UOGCAST1 (calpastatina). Amostras de sangue foram coletadas para realização de análises genotípicas. Para as análises eletroforéticas e de maciez, amostras maturadas por um, sete e 14 dias foram coletadas. A caracterização e determinação dos genótipos polimórficos (SNP) para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 foram realizadas por meio de PCR em tempo real. Seis *pools* de amostras de animais foram preparados para a realização de eletroforese bidimensional. As análises estatísticas foram realizadas no pacote *Statistical Analysis System* (SAS). Foram encontrados 256 *spots* em comum na análise de proteólise, sendo 25 significativos ($P < 0,05$). Na análise de regressão múltipla, sendo maciez a variável dependente e os *spots* significativos a variável independente, foi possível verificar que 13 *spots* explicaram em 73% a variação de maciez durante a maturação. As análises de variância da intensidade para os volumes de expressão normalizados (IVEN) indicaram 21 *spots* significativos ($P < 0,05$) para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1. Análises de regressão múltipla para os *spots* significativos mostraram que alguns *spots*, além dos marcadores estudados, podem prever a maciez da carne aos 14 dias de maturação. Portanto, as avaliações de *spots* permitirão identificar as proteínas diferencialmente expressas, auxiliando no melhor entendimento do complexo mecanismo que determina a maciez da carne.

Palavras-chave: zebuínos, maciez da carne, proteólise, marcador molecular

ABSTRACT

MONCAU, C.T. Muscle proteomic profile of Nellore bulls. 2012. 86f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The present work aimed to study beef quality (*Longissimus dorsi*) from Nellore bull through two-dimensional proteomic analysis. For this purpose, two specific objectives were proposed: (i) to study the proteolysis of meat at different aging times, if 24 hours, seven and 14 days, and (ii) to study the protein profile of meat from Nellore bull with contrasting genotypes for tenderness at different aging times (24 hours, seven and 14 days), associated with molecular markers CAPN4751 (μ -calpain) and UOGCAST1 (calpastatin). Blood samples were collected for genomic analyses. For electrophoretic analysis and tenderness, samples aged for 24 hours, seven and 14 days were collected. The characterization and determination of genotypes polymorphic (SNP) markers for CAPN4751 and UOGCAST1 were performed using real time PCR. Six samples of animals pools were set up to carry out two-dimensional electrophoresis. Statistical analyzes were performed in the package Statistical Analysis System (SAS). 256 spots were found in common in the analysis of proteolysis, with 25 spots significant. We found that 13 spots accounted for 73% of the variation in tenderness during aging. Analyses of variance of the intensity of expression for the normalized volumes (IENV), 21 spots indicated significant ($P<0,05$) for the markers CAPN4751 and UOGCAST1. Multiple regressions analysis to significant spots showed to some spots, in addition to the markers studied may predict meat tenderness at 14 days of aging. Therefore, the assessments will identify the spots differentially expressed proteins, aiding in better understanding the complex mechanism that determines the softness of the meat.

Key-words: zebu, tenderness, proteolysis, molecular marker

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Animais da raça Nelore utilizados no experimento.....	27
Figura 2.2 – Gel bidimensional com os 25 <i>spots</i> significativos ($P<0,05$) na análise de proteólise.....	34
Figura 2.3 – Comportamento dos <i>spots</i> com efeitos lineares crescente das intensidades de expressão no decorrer da maturação (um, sete e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.)	36
Figura 2.4 – Comportamento dos <i>spots</i> com efeitos lineares decrescentes de intensidades de expressão no decorrer da maturação (um, sete e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.)	37
Figura 2.5 – Comportamentos dos <i>spots</i> com efeitos lineares de segundo grau no decorrer do período de maturação (um, sete e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.) (continua)	38
Figura 3.1 – Animais utilizados no experimento	51
Figura 3.2 – Gel bidimensional com os 21 <i>spots</i> significativos ($P<0,05$), sendo cinco <i>spots</i> (em preto) para um dia, nove <i>spots</i> (em roxo) para sete dias e sete <i>spots</i> (em vermelho) para 14 dias.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Número de observações (N), média (MED), erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) para as características de qualidade de carne em bovinos Nelore inteiros.....	33
Tabela 2.2. Estimativas de médias (MED) e erros-padrão (EP) do volume de expressão dos <i>spots</i> significativos ($P < 0,05$) com relação aos tempos de maturação das carnes.....	35
Tabela 3.1. Seqüência dos <i>primers</i> e das sondas utilizadas para cada marcador estudado	55
Tabela 3.2. Marcadores investigados, número de acesso no <i>GenBank</i> , bem como as respectivas referências	55
Tabela 3.3. Descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos, introns, substituição de nucleotídeos, bem como suas posições	55
Tabela 3.4. Número de observações (N), média (MED), erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) para as características de qualidade de carne em bovinos Nelore inteiros.....	61
Tabela 3.5. Frequência gênica e genotípica dos marcadores utilizados	62
Tabela 3.6. Valores médios da força de cisalhamento (maciez) e erro padrão de acordo com o marcador molecular e o tempo de maturação	63
Tabela 3.7. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e CAPN4751 e <i>spots</i> significativos obtidos nas análises das amostras com um dia <i>post mortem</i>	66
Tabela 3.8. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e CAPN4751 e <i>spots</i> significativos obtidos nas análises das amostras com sete dias <i>post mortem</i>	67
Tabela 3.9. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e	

CAPN4751 e <i>spots</i> significativos obtidos nas análises das amostras com 14 dias <i>post mortem</i>	68
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
REFERÊNCIAS.....	18
2 PERFIL PROTÉICO DA CARNE MATURADA DE MACHOS INTEIROS DA RAÇA NELORE.....	22
Resumo.....	22
Abstract	23
2.1 Introdução	24
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Local	26
2.2.2 Animais	27
2.2.3 Coleta de Amostras	27
2.2.4 Análises Físico-Químicas	28
2.2.5 Análise Proteômica	29
2.2.6 Análise Estatística.....	31
2.3 Resultados e Discussão.....	32
2.3.1 Análises Físico-Químicas	32
2.3.2 Análise Proteômica	33
2.4 Conclusão	42
Referências	43
3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA NA PROTEÓLISE DA CARNE	46
Resumo.....	46
Abstract	47
3.1 Introdução	48
3.2 Material e Métodos.....	50
3.2.1 Local	50

3.2.2 Animais	51
3.2.3 Coleta de Amostras	51
3.2.4 Análises Físico-Químicas	52
3.2.5 Avaliação Genética	53
3.2.6 Análise Proteômica	56
3.2.7 Análise Estatística.....	58
3.3 Resultados e Discussão.....	60
3.3.1 Análises Físico-Químicas	60
3.3.2 Análise Genômica.....	61
3.3.3 Análise Proteômica	63
3.4 Conclusão	70
Referências	71
APÊNDICES.....	75

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte brasileira consolidou-se no cenário mundial nos últimos anos como importante produtora de alimentos. Desde 2004 o Brasil é considerado o maior exportador de carne bovina do mundo, porém com índices de queda contínua nos últimos quatro anos (ANUALPEC, 2010). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2012), o país vem se recuperando desta queda na produção, tendo um aumento de 23% nas exportações em janeiro de 2012, quando comparado com o mesmo período de 2011. Dados preliminares apresentados por José (2012) afirmam que o país necessita de uma recuperação rápida nas exportações, haja vista que importantes países produtores de carne bovina, como Austrália, Estados Unidos da América (EUA) e Índia, mostram um incremento em suas exportações a cada ano. De acordo com levantamentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a Índia deverá superar as exportações dos EUA neste ano de 2012, o que a deixaria a apenas algumas poucas toneladas a capacidade de exportações do Brasil (JOSÉ, 2012).

Com o segundo maior rebanho efetivo bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (BRASIL, 2011), o Brasil possui aproximadamente 176 milhões de bovinos de corte, representados na sua maioria por animais *Bos indicus* (ANUALPEC, 2010). Segundo Carvalho (2008), os zebuínos têm sido preferidos nas regiões tropicais devido à resistência as doenças e tolerância ao calor. A raça Nelore, originária da Índia, foi introduzida no Brasil no século XIX, sendo a raça mais utilizada na pecuária de corte brasileira. Essa escolha se deve a sua rusticidade, prolificidade e precocidade, além da alta produção em condições mínimas de manejo.

Em estudos feitos por Crouse et al. (1989) verifica-se que animais *Bos indicus* possuem uma desvantagem quanto à maciez de carne quando comparado com *Bos taurus*. Na década de 90, estudos pioneiros correlacionaram a maciez com a presença de gene zebu ou taurino nos animais (OLIVEIRA, 2000). Whipple et al. (1990a, b) e Shackelford et al. (1991a, b) indicaram em suas pesquisas que carnes provindas de cruzamentos com mais de 50% de sangue zebuínio tendiam a ser menos macias que as oriundas de animais com menos de 50%. Diversos estudos mostram que a participação crescente de genes *Bos indicus* nos animais diminui

consideravelmente a maciez das carnes. Isso acontece devido a maior atividade enzimática da calpastatina em animais zebus quando comparados à animais taurinos (RUBENSAM; FELÍCIO; TERMIGNONI, 1998).

A maciez é um dos principais atributos relacionado à qualidade de carne, haja vista que esta diretamente relacionada à satisfação do consumidor. Conhecer a estrutura, composição e bioquímica da carne e de seus componentes é fundamental para obtenção de produtos com qualidade. A carne é resultado de diversas transformações químicas e bioquímicas ocorridas no músculo após o abate. O músculo vivo é altamente especializado e capaz de reverter energia química em mecânica durante os movimentos de contração e relaxamento muscular. Esta característica deixa de existir quando o músculo se transforma em carne. Porém, alguns mecanismos de contração e relaxamento do músculo vivo estão diretamente relacionados com o encurtamento das fibras e a perda de maciez após o abate. Modificações químicas e físicas ocorrem no músculo nas primeira 24 horas *post mortem*, determinando características e propriedades da carne (TRINDADE; GRESSONI JÚNIOR, 2008). Essas modificações são decorrentes de inúmeros fatores que contribuem para as características qualitativas finais da carne. Dentre esses fatores, podem ser citados: raça, alimentação, idade ao abate, sexo, manejo pré-abate, procedimentos durante o abate e de resfriamento das carcaças.

Quando se relaciona maciez de carne com sexo dos animais, é possível observar diferenças importantes entre animais inteiros e castrados. Isso se deve a influência do sexo no ganho de peso e na composição da carcaça, bem como características sexuais secundárias masculinas atribuídas à ação hormonal. Como consequência, animais de sexos diferentes podem ter o mesmo grau de acabamento de carcaça em pesos ou idades diferentes (ALVES; GOES; MANCIO, 2005). Fêmeas atingem o ponto de abate mais precocemente e mais leve que os machos castrados. Estes, por sua vez, atingem grau de acabamento mais precoce e mais leve que machos inteiros.

Morgan et al. (1993) estudando maciez em diferentes sexos, observaram maiores valores de força de cisalhamento em animais inteiros, quando comparados com animais castrados. Uma das explicações para este fato está relacionada com as características do tecido conjuntivo, onde animais inteiros teriam mais colágeno insolúvel do que castrados (BURSON; HUNT; UNRUH, 1986; GERRARD; JONES;

ABERLE, 1987). Outro aspecto importante é a diferença no grau de marmoreio das carcaças. Animais castrados possuem um teor de gordura entremeada maior que animais inteiros, gerando, dessa forma, uma carne aparentemente mais macia (SEIDEMAN; CROSS; OLTJEN, 1982). Porém, Wheeler; Savekk e Cross (1990), e Morgan; Wheeler e Koohmaraie (1993) argumentam que a diferença na maciez da carne entre inteiros e castrados se deve a uma maior atividade das calpastatinas nos músculos de animais inteiros, inibindo a atividade das enzimas proteolíticas das calpaínas.

O principal sistema relacionado à maciez é o complexo das calpaínas, que são tiolproteases (contêm cisteína) produzidas pelos músculos como proenzimas ativadas pelo íon cálcio (Ca^{2+}), sendo um sistema totalmente dependente de cálcio para ser ativado (OLIVEIRA, 2000). O complexo é composto por três componentes principais: μ -calpaína (calpaína I), m-calpaína (calpaína II) e calpastatina. Cada um destes componentes age em momentos diferentes no processo de amaciamento da carne, sendo a calpastatina a responsável em inibir a atividade das calpaínas I e II. A μ -calpaína exerce sua função em seis a dez horas após o abate, exigindo baixos níveis de Ca^{2+} e pH em torno de 6,1 para ser ativada. Já a m-calpaína requer níveis mais altos de íons cálcio, entrando em atividade em pH próximo de 5,7-5,5, em torno de 16 horas *post mortem*, dando continuidade ao processo de amaciamento. Segundo Dransfield (1993), as calpaínas inativas estão livres no sarcoplasma e imediatamente após o abate, os níveis de cálcio, oriundos do retículo endoplasmático, começam a aumentar. Dessa forma, os Ca^{2+} promovem a ativação das calpaínas, fazendo com que o sistema enzimático apresente diferentes comportamentos. Dransfield, Etherington e Taylor (1992) e Dransfield (1993) postularam que os baixos níveis de Ca^{2+} livres, logo após o abate, poderiam ser insuficientes para que a calpaína I fosse ativada. Porém, com a queda do pH para próximo de 6,1, este cálcio estaria suficientemente disponível para a ativação desta enzima. O mesmo aconteceria com a calpaína II, só que em níveis de Ca^{2+} mais elevados. Então, com o pH em torno de 6,1, as calpaínas estariam ligadas ao seu inibidor, a calpastatina, inibindo a ação das calpaínas ao longo da queda do pH. Ao atingir pH em torno de 5,5, as calpaínas ativadas realizariam a hidrólise da calpastatina, dando continuidade ao amaciamento da carne, sendo este processo interrompido à medida que as calpaínas entrassem em autólise.

Por muitos anos, pesquisadores buscaram melhorar a qualidade da carne utilizando fatores genéticos e ambientais e, mais recentemente, com aplicações de novas técnicas de genética molecular. Dekkers; Rothschild e Malek (2002) identificaram genes ou regiões genômicas de qualidade de carne por meio do mapeamento dos *Quantitative Trait Loci* (QTL), mostrando que o uso desta ferramenta no fornecimento de informações para seleção e cruzamento de raças poderia potencializar a produção com melhor qualidade de carcaça.

A principal classe de marcadores empregados para verificar genes de qualidade da carne são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). São as formas mais freqüentes de variação de DNA em mamíferos e possuem características favoráveis em relação à sua determinação, já que são mais abundantes e geralmente envolvem dois alelos, além de serem facilmente detectáveis por método automático adequado (CARVALHO, 2008).

Diversos pesquisadores têm avaliado genes relacionados à qualidade de carne em bovinos, dentre eles o gene CAST, que codifica a enzima calpastatina e o CAPN1, que codifica as enzimas calpaínas. Os marcadores CAPN316 e o CAPN530 já foram analisados e associados com maciez em populações de origem *Bos taurus* (PAGE et al., 2002). Os marcadores CAPN316, CAPN4753 e CAPN5331 foram analisados por Casas et al. (2005) em animais da raça Brahman, onde verificou-se que os dois últimos marcadores apresentaram resultados não significativos. Porém, para o CAPN316, apesar de apresentar baixa segregação, foram observados resultados positivos para maciez.

Schenkel et al. (2006) associaram genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOGCAST1) com uma maior maciez de carne. Como a calpastatina é o inibidor específico das calpaínas, o aumento de sua atividade é correlacionado com a redução da maciez da carne.

Carvalho (2008), estudando os marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1 em bovinos Nelore, encontrou efeitos significativos para o marcador CAPN4751 para maciez aos 7 e 14 dias de maturação, bem como para maciez aos 21 dias de maturação. Para o CAPN4753, os efeitos só foram significativos para maciez aos 21 dias de maturação. Em relação ao UOGCAST1, os resultados significativos foram verificados para maciez aos 14 e 21 dias de maturação.

Como uma forma de complementar todas as metodologias descritas anteriormente, a proteômica surge como importante ferramenta para evidenciar se as diferenças encontradas nos genótipos dos animais avaliados, em nível molecular, são realmente transcritas e traduzidas. Neste caso, animais portadores de alelos favoráveis devem ter perfis protéicos diferentes, face à ação de proteínas enzimáticas mais ativas ou eficientes.

Wilkins et al. (1996) definiram proteoma como sendo a proteína complementar do genoma e que consiste na quantidade total das proteínas expressas. Então, a função da proteômica é obter informações sobre a expressão das proteínas celulares, revelando dessa forma as funções dos genes. Além disso, a proteômica vem sendo utilizada nos últimos anos para explicar como características hereditárias interagem com o meio no controle das funções fisiológicas e celulares dos organismos (BENDIXEN, 2005).

Com poucas décadas de estudo, a eletroforese bidimensional (2DE) tornou-se importante para a caracterização das vias de expressão das proteínas celulares. Esta técnica teve grande impulso a partir da década de 90, quando inúmeros projetos de pesquisa elucidaram o seqüenciamento do genoma humano e posteriormente o genoma de mais de 250 organismos vivos, dentre eles o de bovinos.

Segundo Lametsch e Bendixen (2001), o principal objetivo da 2DE é mostrar o comportamento das proteínas celulares, através de sua separação em frações individuais. Essa segregação acontece conforme o peso molecular (eixo Y) e ponto isoelétrico (eixo X) de cada proteína. Estudos realizados por Lametsch et al. (2003 e 2006) mostram que é possível relacionar mudanças *post mortem* com a maciez da carne, utilizando como ferramenta a eletroforese bidimensional.

Assim, para um melhor entendimento dos processos que estão envolvidos diretamente com a maciez da carne, a proteômica apresenta-se como ferramenta promissora, uma vez que pode auxiliar no esclarecimento de ligações do genoma, por meio da expressão das proteínas, bem como as possíveis relações com a qualidade da carne.

Neste contexto, objetivou-se no presente trabalho estudar a qualidade de carne (*Longissimus dorsi*) de macho inteiros da raça Nelore por meio de análise eletroforética bidimensional. Para tanto, dois objetivos específicos foram propostos:

1) estudar a proteólise das carnes em diferentes tempos de maturação, no caso um, 7 e 14 dias, e 2) estudar o perfil protéico das carnes de machos inteiros da raça Nelore com genótipos contrastantes para maciez, em diferentes tempos de maturação (um, 7 e 14 dias), associados aos marcadores moleculares CAPN4751 (μ -calpaína) e o UOGCAST1 (calpastatina).

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportação de carne bovina do Brasil subiu 23% e gerou receita de US\$400,8 milhões. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id={2252ED65-215E-4012-B854-18BB2976F9B7}#>. Acesso em: 24 fev. 2012.
- ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, BRA, v.6, n.3, p.135-149, jul./set. 2005.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Ed. FNP Consultoria & Comércio, São Paulo, 2010.
- BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, Barking, GBR, v.71, n.1, p.138-149, set. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 25 ago. 2011.
- BURSON, D.E.; HUNT, M.C.; UNRUH, J.A. Proportion of types I and III collagen in *Longissimus* collagen from bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.63, n.2, p.453-456, ago. 1986.
- CARVALHO, M.E. **Caracterização da frequência de polimorfismo em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.83, n.1, p.13-19, jan. 2005.
- CROUSE, J.D. et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.67, n.10, p.2661-2668, out. 1989.
- DEKKERS, J.C.M.; ROTHCHILD, M.F.; MALEK, M.M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. In: CONFERÊNCIA

INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. p.240-263.

DRANSFIELD, E. Modelling *post-mortem* tenderization-IV: role of calpains and calpastatin in conditining. **Meat Science**, Barking, GBR, v.34, n.2, p.217-239, 1993.

DRANSFIELD, E.; ETHERINGTON, D.J.; TAYLOR, M.A.J. Modelling *post-mortem* tenderisation – II: enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. **Meat Science**, Barking, GBR, v.31, n.1, p.75-84, 1992.

GERRARD, D.E.; JONES, S.J.; ABERLE, E.D. Collagen stability, testosterone secretion and meat tenderness in growing bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.65, n.5, p.1236-1242, nov. 1987.

JOSÉ, M. Liderança assediada: Austrália, EUA e Índia aproximam-se da posição do Brasil nas exportações. **Anuário DBO**, São Paulo, BRA, v.30, n.375, p.6-7, jan. 2012.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing *post mortem* changes in porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.49, n.10, p.4531-4537, set. 2001.

LAMETSCH, R.; et al. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.84, n.4, p.918-924, abr. 2006.

LAMETSCH, R. et al. *Post-mortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.51, n.24, p.6992-6997, out. 2003.

MORGAN, J.B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.71, n.6, p.1471-1476, jun. 1993.

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.71, n.2, p.408-414, fev. 1993.

OLIVEIRA, A.L. Maciez da carne bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, BRA, n.33, p.7-18, 2000.

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

RUBENSAM, J.M; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, BRA, v.18, n.4, p.405-409, 1998.

SEIDEMAN, S.C; CROSS, H.R; OLTJEN, R.R. Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.55, n.4, p.826-840, out. 1982.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatina gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.84, n.2, p.291-299, fev. 2006.

SHACKELFORD, S.D. et al. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.69, n.1, p.171-177, jan. 1991a.

SHACKELFORD, S.D. et al. Predictors of beef tenderness: development and verification. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v.56, n.5, p.1130-1135, set. 1991b.

TRINDADE, M.A.; GRESSONI JÚNIOR, I. Bioquímica da carne: bases científicas e implicações tecnológicas. In: KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 7, p.191-233.

WHEELER, T.L.; SAVEKK, J.W.; CROSS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4206-4220, dez. 1990.

WILKINS, M.R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino-acids analysis. **Biotechnology**, Frankfurt, DEU, v.14, p.61-65, 1996.

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

WHIPPLE, G. et al. Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4193-4199, dez. 1990a.

2 PERFIL PROTÉICO DA CARNE MATURADA DE MACHOS INTEIROS DA RAÇA NELORE

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil protéico da carne de machos inteiros da raça Nelore, submetida a diferentes tempos de maturação. Foram analisadas amostras de músculo (*Longissimus dorsi*) de machos inteiros terminados em confinamento. Os bifes foram cortados entre a 10ª e 12ª costelas, embalados a vácuo e maturados por um, 7 e 14 dias para determinação de força de cisalhamento. Para análise eletroforética foi coletado um grama de amostra em cada tempo de maturação. Seis *pools* de amostras de animais previamente escolhidos foram montados para a realização de eletroforese bidimensional. Os géis foram preparados em triplicata e analisados em *software* específico. As análises estatísticas foram realizadas no pacote *Statistical Analysis System* (SAS). Vinte e cinco *spots* de 256 estudados tiveram diferença significativa ($P < 0,05$) na proteólise dos tempos estudados. A análise de regressão mostrou que nove *spots* apresentaram comportamento linear de primeiro grau e 16 *spots* comportamento linear de segundo grau. A maciez foi considerada variável dependente e os *spots* significativos a variável independente. Foi possível verificar que 13 *spots* explicaram 73% a variação de maciez durante a maturação. Dessa forma, foi possível inferir que as proteínas continuam realizando atividades bioquímicas no processo *post mortem*, aumentando ou diminuindo sua intensidade de expressão, sugerindo uma possível relação com o processo de maturação.

Palavras-chave: zebuínos, força de cisalhamento, proteólise

Abstract

This work aimed to study the protein profile of bulls at different maturation times. We analyzed samples (*Longissimus dorsi*) of bull feedlot Nellore. The steaks were cut between the 12th and 13th ribs and vacuum packed for 24 hours, 7 and 14 days of maturation. One gram of samples was cut out from storage time in predetermined, and analysis of softness (Shear Force) was performed. Six pools from animals previously selected were assembled for performing two-dimensional electrophoresis. The gels were made triplicate and analyzed using specific software. Statistical analyzes were performed in Statistical Analysis System (SAS). Twenty-five spots of 256 studied had significant difference ($P < 0.05$) in the proteolysis of the times studied. Regression analysis showed that nine spots showed linear first-degree and 16 spots linear behavior of the second degree. In multiple regression analysis, the dependent variable was tenderness spots and the significant variable the significant spots, we found 13 spots accounted for 73% of the variation in the tenderness during aging. Thus, we can infer the proteins are still performing biochemical process in *post mortem*, increasing or decreasing its intensity of expression, suggesting a possible relationship with the maturation process.

Keywords: Nellore bull, tenderness, two-dimensional electrophoresis

2.1 Introdução

O Brasil vem se consolidando o maior exportador mundial de proteína animal, com o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (BRASIL, 2011). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2012), o país vem se recuperando de quedas na produção, tendo um aumento de 23% nas exportações em janeiro de 2012, quando comparado com o mesmo período de 2011.

O Brasil possui aproximadamente 176 milhões de bovinos de corte, representados na sua maioria por animais *Bos indicus* (ANUALPEC, 2010). Essa escolha é devido ao fato de zebuínos serem mais resistentes as doenças e possuírem uma maior tolerância ao calor, além da rusticidade, prolificidade e precocidade.

Apesar de todos esses pontos favoráveis a produção de zebuínos, estes possuem uma grande desvantagem quanto à maciez de carne, quando comparados aos taurinos. Estudos pioneiros correlacionaram a maciez com a presença de alelos zebu ou taurino nos animais (OLIVEIRA, 2000). Whipple et al. (1990a, b) e Shackelford et al. (1991a, b) indicaram em suas pesquisas que carnes provindas de cruzamentos com mais de 50% de sangue zebuínio tendiam a ser menos macias que as oriundas de animais com menos de 50%. Isso acontece devido à maior atividade enzimática da calpastatina em animais zebus do que em taurinos (RUBENSAM; FELÍCIO; TERMIGNONI, 1998).

Neste contexto, um problema muito importante enfrentado pelas indústrias de carnes, é atender às exigências dos consumidores no que diz respeito à maciez da carne. A obtenção de carne macia com qualidade é resultado de vários processos e mecanismos complexos influenciados por diversos fatores, como genótipo, sexo, idade, estresse pré-abate, *rigor mortis*, maturação, pH, dentre outros. Todavia, estes processos ainda não foram totalmente elucidados, gerando muitas controvérsias sobre seus particulares mecanismos de ação (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

Quando se relaciona maciez de carne com sexo, é possível observar diferenças importantes entre animais inteiros e castrados. Isso se deve a influência do sexo no ganho de peso e na composição da carcaça. Animais de sexos diferentes podem apresentar o mesmo grau de acabamento de carcaça em pesos

ou idades diferentes (ALVES; GOES; MANCIO, 2005). Fêmeas atingem grau de acabamento mais cedo e mais leve que os machos castrados, que por sua vez, atingem grau de acabamento mais cedo e mais leve que machos inteiros.

Em estudos de maciez de carne realizados por Morgan et al. (1993), maiores valores de força de cisalhamento foram observados em animais inteiros, quando comparados com animais castrados. Outro ponto importante é a diferença na quantidade de gordura intramuscular das carcaças, sendo que animais castrados possuem um teor de gordura entremeada maior que em animais inteiros, gerando, dessa forma, uma carne aparentemente mais macia (SEIDEMAN; CROSS; OLTJEN, 1982). Wheeler; Savekk e Cross (1990), e Morgan; Wheeler e Koohmaraie (1993) argumentam que a diferença na maciez da carne entre inteiros e castrados se deve a uma maior atividade das calpastatinas nos músculos de animais inteiros, inibindo a atividade das enzimas proteolíticas das calpaínas.

O principal sistema relacionado a maciez é o complexo das calpaínas, sendo um sistema totalmente dependente de íons cálcio (Ca^{2+}) para ser ativado (OLIVEIRA, 2000). O complexo é composto por três componentes principais: μ -calpaína (calpaína I), m -calpaína (calpaína II) e calpastatina. Cada um destes componentes age em momentos diferentes no processo de amaciamentos da carne, sendo a calpastatina a responsável em inibir a atividade das calpaínas I e II. Segundo Dransfield (1993), as calpaínas inativas estão livres no sarcoplasma e imediatamente após o abate os níveis de cálcio começam a aumentar, sendo estes provenientes do retículo endoplasmático. Dessa forma, os Ca^{2+} promovem a ativação das calpaínas, fazendo com que o sistema enzimático apresente diferentes comportamentos.

Para aumentar o conhecimento sobre o processo de amaciamento das carnes, a proteômica mostra-se como uma ferramenta muito interessante, pois permitiria confirmar com maior segurança, quais os principais peptídeos que exibem mudanças ao longo do processo proteolítico da carne.

Wilkins et al. (1996) definiram proteoma como sendo a proteína complementar do genoma e que consiste na quantidade total das proteínas expressas. Portanto, a função da proteômica é obter informações sobre a expressão das proteínas celulares, revelando dessa forma, as funções dos genes.

Com poucas décadas de estudo, a eletroforese bidimensional (2DE) tornou-se importante para a caracterização das vias de expressão das proteínas celulares. Esta técnica teve grande impulso a partir da década de 90, quando inúmeras pesquisas elucidaram o seqüenciamento do genoma humano, e posteriormente o genoma de mais de 250 organismos vivos, dentre eles o de bovinos.

Segundo Lametsch e Bendixen (2001), o principal objetivo da 2DE é verificar o comportamento das proteínas celulares, através de sua separação em frações individuais. Essa segregação acontece conforme o peso molecular (eixo Y) e ponto isoelétrico (eixo X) de cada proteína. Em estudos realizados por Lametsch et al. (2003 e 2006) há indicações de que é possível relacionar mudanças *post mortem* com a maciez da carne, utilizando como ferramenta a eletroforese bidimensional.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a qualidade de carne (*Longissimus dorsi*) de machos inteiros da raça Nelore, verificando o perfil protéico em diferentes tempos de maturação (um, 7 e 14 dias).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local

A presente pesquisa foi conduzida na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), na cidade de Pirassununga, São Paulo, sendo utilizado o Matadouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga (PUSP-P) para abate e processamento dos cortes. Foi utilizado o Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade de Carne (LAAQC) do Departamento de Zootecnia (ZAZ) para análise de maciez de carne; o Laboratório de Estudos Avançados em Ciência da Carne (LEACC), provisoriamente funcionando no Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) para as corridas eletroforéticas e o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Celular (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) para genotipagem.

2.2.2 Animais

Durante os anos de 2009 e 2010, foram criados a pasto e terminados em confinamento um total de 155 bovinos Nelore (Figura 2.1), sendo 75 animais inteiros. Aos 19 meses de idade os animais foram confinados por 56, 84, 112 e 140 dias. Ao final de cada período de confinamento, uma média de 20 animais foram abatidos no Matadouro Escola da PUSP-P, por meio de insensibilização com o uso de pistola pneumática de penetração e posterior sangria, seguindo as técnicas de abate humanitário.

Figura 2.1 – Animais da raça Nelore utilizados no experimento

2.2.3 Coleta de Amostras

Bifes de músculo *Longissimus dorsi* (LD), com 2,5cm de espessura, foram retirados entre a 10^a e 12^a costelas, para determinação da maciez. Foram realizadas medidas de cor objetiva (CM-2500d, Konica Minolta) dos bifes 15min após o corte. Em seguida, foram acondicionados em embalagens a vácuo e maturados em câmara fria com temperatura controlada (0°C a 2°C) pelo período de um, 7 e 14 dias.

Ao final de cada período de maturação, os bifes foram conduzidos ao LAAQC para a realização da maciez. As embalagens foram abertas, o exsudato retirado e pesado. Amostras de aproximadamente um grama foram coletadas de cada bife, para realização de análise eletroforética. Estas amostras foram colocadas em

nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C . Os bifes foram então pesados e assados para determinação de perdas por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC – kgf).

2.2.4 Análises Físico-Químicas

2.2.4.1 Cor

Os valores de cor foram determinados com auxílio de um colorímetro portátil (*CM-2500d, Konica Minolta*), por meio da escala L^* , a^* , b^* , do sistema *CIE Lab*, com fonte de luz de D_{65} , ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30mm. O aparelho foi sempre calibrado com um padrão branco ($L^* = 93,80$, $a^* = -0,89$, $b^* = 0,95$) e outro preto ($L^* = 1,19$, $a^* = 1,27$, $b^* = 1,92$). As medidas foram feitas em três lugares distintos, na superfície da amostra, tomando-se a média como o valor determinado.

2.2.4.2 Maciez

Após o período pré-determinado de maturação foi realizada a maciez dos bifes por meio da força de cisalhamento, conforme protocolo da AMSA (1995).

Os bifes foram retirados das embalagens e o exsudato pesado em balança semi-analítica (*A2000, Marte*) e descartado. Em seguida foram pesados e levados ao forno elétrico (*Luxo Classic 2.4, Lary*) com temperatura controlada (170°C). As temperaturas internas das amostras foram monitoradas através de termopares *Data Logger* digital (*700-10s, Gulterm*), sendo o bife virado ao atingir 42°C e retirado do forno aos 71°C . Após o cozimento, ao atingir 28°C , os bifes foram pesados, embaladas em filme plástico e armazenados em geladeira comum por 24 horas.

Foram retirados quatro a seis cilindros de carne de cada amostra, com diâmetro de 13mm cada, e cisalhados no aparelho *Warner Bratzler Shear Force* (WBSF), com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500mm/min. A força de cisalhamento foi calculada através da média dos cilindros.

2.2.5 Análise Proteômica

2.2.5.1 Preparo das amostras

Foram selecionados 17 amostras de bovinos inteiros. Estes animais foram divididos em seis *pools* distintos para cada tempo de maturação (um, 7 e 14 dias). Cada *pool* foi composto por 2 ou 3 animais para evitar o efeito do animal nas amostras.

Para realização da extração das proteínas da carne, foram pesadas de 200 a 300mg de cada amostra. Para *pools* com 2 animais, foram utilizados 300mg de cada amostra, e para *pools* com 3 animais, 200mg de cada amostra. Foram acrescentados 5mL de tampão de extração (LAMESTECH et al., 2003) e 50µL de inibidor de protease em cada tubo, seguindo de homogeneização por um minuto a 14.000rpm, com auxílio do homogeneizador *Turrtec (TE-102, Tecna)*. Os extratos obtidos foram transferidos para *erlenmeyers* e colocados no *shaker* sob agitação vigorosa por 2 horas, a temperatura ambiente (25°C). Após este período, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 4°C, 9.500rpm por 30min, em centrífuga refrigerada (*Allegra 64R, Beckman Coulter*). Finalizada a extração das proteínas, os sobrenadantes foram acondicionados em tubos criogênicos e armazenados a -80°C.

Em seguida foram feitas as quantificações de proteínas totais dos sobrenadantes de cada *pool*, através do *2-D Quant Kit (GE Healthcare)*, onde foi utilizada como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA) para a elaboração da curva padrão. Para a formulação da curva foram utilizadas concentrações diversas de BSA, obtendo-se suas respectivas absorbâncias a 480nm. As leituras das amostras foram feitas, e estas interpoladas na curva padrão construída, obtendo-se a concentração de proteína no extrato protéico.

2.2.5.2 Focalização Isoelétrica - 1ª dimensão

Para a realização da 1ª dimensão, fez-se necessário a preparação das amostras no dia anterior, através da reidratação das tiras de *IPG (GE Healthcare)*, onde foram aplicadas as amostras. As tiras foram previamente selecionadas, sendo escolhidas tiras de 13cm e faixa de pH de 4 a 7. Para a reidratação das tiras, foi

utilizada solução de reidratação e uma alíquota do extrato cárneo de cada amostra, contendo este 500µg de proteína. Foram colocados 250µL de solução de reidratação em cada canaleta do *IPG Box* (GE Healthcare), e em seguida a tira foi sobreposta ao líquido, com o gel voltado para baixo para que este reidratasse com a solução. Todos os *pools*, em todos os tempos de maturação, foram feitos em triplicata, para uma resposta mais segura. Foram necessárias 14 horas para a etapa de reidratação e em seguida foi realizada a 1ª dimensão.

As tiras reidratadas foram colocadas no aparelho *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare) para a focalização isoeletrica das proteínas. Em cada uma das 12 canaletas foram inseridos 9mL de *Dry Strip Cover Fluid* (GE Healthcare). Cada tira foi acondicionada em uma canaleta, com o gel voltado para cima, fixadas nos extremos com *Paper Wicks* (GE Healthcare) umedecidos em água Milli-Q (*Direct Q-5*, Millipore), para que a corrente elétrica pudesse passar pela tira e efetivar a separação isoeletrica proteica. A 1ª dimensão foi realizada a temperatura de 20°C, com variação de voltagem de 500 a 8.000V e limite de corrente de 50µA por tira. Cada corrida foi realizada, em média, em 6 horas, até atingir 19.600Vh. Ao final da corrida, as tiras foram retiradas e colocadas em tubo de ensaio com o gel voltado para cima, e acondicionadas em *freezer* -80°C até o momento do uso.

2.2.5.3 SDS PAGE - 2ª dimensão

Para a realização da 2ª dimensão, foram previamente preparados dois géis de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), com concentração de 12,5%. Os géis foram vedados com butanol 80% e isolados com filme plástico.

As tiras a serem utilizadas foram retiradas do *freezer* e equilibradas, em leve agitação, em tampão de equilíbrio SDS I e tampão de equilíbrio SDS II, por 15min cada. O butanol 80% foi retirado e a extremidade do gel lavada com água Milli-Q. Cada tira equilibrada foi colocada sobre o gel previamente preparado e acomodada com ajuda de uma régua plástica. No pólo positivo foi colocado papel filtro para *Blotting* com 10µL de marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*, Fermentas), com 10 bandas distintas de peso molecular de 10 a 170kDa (quilo-Dalton). Em seguida, as tiras foram seladas ao gel com solução selante de agarose e as placas introduzidas na cuba eletroforética (*SE 600 Ruby*, Amersham

Biosciences). Foi utilizado tampão de corrida SDS *Laemmli* concentrado 1x no ânodo e 3x no cátodo.

A programação utilizada no *EPS 1001 (GE Healthcare)* para a corrida de 2ª dimensão foi dividida em duas etapas:

- 15mA/gel, a 100V por 30min: migração das proteínas da tira para o gel;
- 50mA/gel, a 600V por aproximadamente 3h30min: migração das proteínas no gel até o corante da tira atingir a base do gel.

Ao término da corrida, os géis foram cuidadosamente retirados das placas de vidro e adicionados solução corante, em agitação por 50min. Após este período, o gel foi colocado em solução descorante, também em agitação, por 30min, sendo esta trocada por uma nova logo em seguida, deixando o gel descorar *overnight*. No dia seguinte, a solução foi descartada e o gel foi mantido em água Milli-Q.

Foram realizadas 27 corridas eletroforéticas, gerando um total de 54 géis. Estes foram então escaneados (*Image Scanner III; GE Healthcare*) e as imagens digitalizadas para posterior análise.

2.2.5.4 Análise dos Géis

Os géis foram analisados no *Image Master 2D Platinum (GE Healthcare)* com o intuito de identificar *spots* de forma automática. Em seguida foi realizada uma vistoria minuciosa gel por gel, verificando se algum *spot* não havia sido capturado, sendo este inserido nas análises. As imagens foram então sobrepostas, para que proteínas expressas em todos os períodos de maturação fossem identificadas através do seu ponto isoeletrico e peso molecular.

2.2.6 Análise Estatística

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 bidimensional;

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^2_s ;

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 (7 dias) ou 3 (14 dias);

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

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 (um, 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* (SAS), versão 9.1.3, considerando que as medidas foram avaliadas sobre os mesmos animais, caracterizando estrutura de medidas repetidas na mesmas unidades experimentais.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análises Físico-Químicas

Na Tabela 2.1 está apresentada a estatística descritiva, com os números de observações (N), estimativas de médias (MED), erro padrão (EP), coeficientes de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características físico-químicas relacionadas à qualidade de carne.

Tabela 2.1. Número de observações (N), média (MED), erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) para as características de qualidade de carne em bovinos Nelore inteiros

VARIÁVEL	N	MED	EP	CV	MIN.	MAX.
L*	50	36,084	5,205	14,425	24,120	45,870
a*	50	15,852	3,096	19,531	11,660	22,400
b*	50	14,778	4,907	33,204	8,060	22,870
PPC	50	24,215	5,977	24,683	2,276	40,563
FC	51	8,545	1,969	23,043	4,333	12,492

L*, a* e b* foram mensurações de cor realizadas após 15min de exposição da carne ao ar realizadas no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; PPC = perda por cocção mensurados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; FC = valores de força de cisalhamento em quilogramas/força determinados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*

Os valores de maciez encontrados foram superiores ao descrito na literatura para uma carne macia, que é considerado de 4,5kgf. Estudos evidenciam a maciez desfavorável para animais *Bos indicus* quando comparado com *Bos taurus* (OLIVEIRA, 2000; WHIPPLE et al., 1990a, b; SHACKELFORD et al. 1991a, b).

Utilizando protocolo da AMSA (1995), bifes de *Longissimus dorsi* maturados por 14 dias e posteriormente congelados, tiveram valores médios de força de cisalhamento próximos de 7kgf (Pflanzer e Felício; 2009).

A média dos valores de cor (L*, a* e b*) estão dentro do esperado, observando-se apenas alguns valores altos de a*, que está associado à cor vermelha da carne e possivelmente indicando a presença da anomalia DFD. O valor médio de PPC pode ser considerado normal, porém com algumas amostras apresentando valores mais altos. Entretanto, destaca-se que estas médias referem-se a todas as amostras nos três tempos de maturação.

2.3.2 Análise Proteômica

Na análise das imagens dos géis, foram observados médias de 382, 463 e 372 *spots*, nos tempos de um, 7 e 14 dias de maturação, respectivamente. Após estudo comparativo (*match*) entre os tempos, foram encontrados 256 *spots* em comum. Foram retirados da análise 77 *spots* por estarem presentes em apenas um ou no máximo dois tempos. Assim, 179 foram submetidos à análise de variância para avaliar os efeitos de intensidade de expressão protéica durante os períodos de

maturação (um, 7 e 14 dias). Foram encontrados então 25 *spots* (Figura 2.2) com diferença significativa ($P < 0,05$). As médias e erros padrões de cada *spot* significativo estão demonstrados na Tabela 2.2.

Figura 2.2 – Gel bidimensional com os 25 *spots* significativos ($P < 0,05$) na análise de proteólise

Tabela 2.2. Estimativas de médias (MED) e erros-padrão (EP) do volume de expressão dos *spots* significativos ($P < 0,05$) com relação aos tempos de maturação das carnes

SPOT	1 dia			7 dias			14 dias		
	MED	EP		MED	EP		MED	EP	
1	0,551	0,030	A	0,417	0,030	B	0,339	0,030	B
10	0,131	0,017	C	0,191	0,017	B	0,271	0,017	A
15	0,126	0,009	B	0,140	0,009	B	0,179	0,009	A
19	0,134	0,009	B	0,189	0,009	A	0,171	0,009	A
25	0,904	0,034	A	0,594	0,034	B	0,439	0,034	C
26	0,434	0,022	A	0,282	0,022	B	0,209	0,022	C
28	0,337	0,015	A	0,296	0,015	A	0,180	0,015	B
29	0,526	0,019	A	0,248	0,019	B	0,278	0,019	B
30	1,199	0,031	A	0,633	0,031	B	0,448	0,031	C
31	0,201	0,011	A	0,112	0,011	B	0,087	0,011	B
41	0,455	0,015	A	0,348	0,015	B	0,342	0,015	B
42	1,320	0,046	A	1,050	0,046	B	1,053	0,046	B
51	0,092	0,013	C	0,136	0,012	B	0,190	0,012	A
52	0,435	0,022	A	0,275	0,022	B	0,267	0,023	B
55	0,423	0,022	A	0,051	0,022	B	0,102	0,022	B
56	0,289	0,013	A	0,215	0,013	B	0,142	0,013	C
62	0,119	0,011	A	0,051	0,012	B	0,150	0,011	A
77	0,732	0,038	A	0,507	0,040	B	0,390	0,038	C
88	0,177	0,011	A	0,077	0,011	B	0,083	0,012	B
90	0,102	0,006	A	0,039	0,006	C	0,078	0,006	B
95	0,075	0,005	A	0,055	0,005	B	0,040	0,006	C
122	0,079	0,005	A	0,033	0,006	B	0,045	0,005	B
139	0,191	0,012	A	0,107	0,014	B	0,124	0,012	B
155	0,429	0,044	A	0,093	0,047	B	0,105	0,082	B
203	1,022	0,188	A	0,270	0,125	B	1,176	0,104	A

Ao analisar mais detalhadamente os resultados obtidos, é possível verificar que os *spots* estudados tiveram um aumento ou diminuição na intensidade de expressão. Porém, pode-se observar também, que em alguns casos, a intensidade de expressão dos *spots* sofreu variação. Dessa maneira, não seria possível informar se eles aumentaram ou diminuíram de intensidade durante o processo de maturação. Foi realizada análise de regressão para todos os 25 *spots* analisados, para uma melhor verificação do comportamento dos *spots* em questão. Nove *spots* mostraram comportamento linear de primeiro grau, sendo que três tiveram aumento de intensidade de expressão (Figura 2.3) e seis tiveram diminuição (Figura 2.4). Ao longo do processo de maturação, os 16 *spots* restantes mostraram comportamentos lineares de segundo grau (regressão quadrática), conforme exposto na Figuras 2.5.

Figura 2.3 – Comportamento dos *spots* com efeitos lineares crescente das intensidades de expressão no decorrer da maturação (um, 7 e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.)

Figura 2.4 – Comportamento dos *spots* com efeitos lineares decrescentes de intensidades de expressão no decorrer da maturação (um, 7 e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.)

Figura 2.5 – Comportamentos dos *spots* com efeitos lineares de segundo grau no decorrer do período de maturação (um, 7 e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.) (continua)

Figura 2.5 – Comportamentos dos spots com efeitos lineares de segundo grau no decorrer do período de maturação (um, 7 e 14 dias). Valores observados (obs.) e estimados (est.) (continuação)

Ao analisar os gráficos obtidos, pode-se observar que apenas um *spot* (19) teve ponto de máximo no dia 9,06 de maturação. Para os outros *spots*, as funções apresentaram pontos de mínimos variando entre 7,2 e 14 dias de maturação.

A maciez ainda foi avaliada como variável dependente e os 25 *spots* significativos como variável independente através de análise de regressão múltipla, considerando o modelo de medidas repetidas do mesmo animal. Há uma indicação que 13 *spots* explicam 73% da variação de maciez durante a maturação, com estatística $C(p) = 13,1$.

Por muitos anos a eletroforese bidimensional foi uma ferramenta pouco utilizada para caracterizar a mudança nas proteínas cárneas durante seu armazenamento. Lametsch e Bendixen (2001) se propuseram a realizar este tipo de estudo em carne suína. O objetivo do trabalho foi apenas verificar se a ferramenta utilizada poderia auxiliar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no amaciamento da carne. Sete animais tiveram amostras de *Longissimus dorsi* coletadas, em cinco períodos *post mortem* diferentes (0, 4, 8, 24 e 48 horas). A análise de 35 géis apontou que 15 *spots* se mantiveram expressos no decorrer da proteólise *post mortem*. Os autores afirmaram que a análise bidimensional poderia ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de proteólise nas carnes.

Lametsch et al. (2003), continuando as pesquisas em proteólise de carne suína, estudaram o comportamento das proteínas (*Longissimus dorsi*) no processo *post mortem* de 25 animais. Análises de maciez foram realizadas e relacionadas com o processo proteolítico da carne. Os autores verificaram a presença de 345 *spots* em comum, sendo 103 ($P < 0,01$) significantes para a maciez.

É sabido que as mudanças bioquímicas no *post mortem* interferem diretamente na maciez da carne. Uma das análises mais estudadas é a queda no pH, que está vinculada com as reservas glicolíticas *ante mortem*. Jia et al. (2006) estudaram a proteólise no músculo de nove bovinos da raça Norueguês Vermelho, antes e depois do animal ser abatido, verificando o metabolismo energético dos animais. Amostras de *Longissimus thoracis* foram analisadas por meio de eletroforese bidimensional. Os autores encontraram 24 *spots* significativos, dentre 833 avaliados. Com o resultado encontrado, os autores inferiram que o metabolismo

energético *post mortem* do músculo sofre um aumento nas enzimas envolvidas na via glicolítica, podendo levar a uma variação na qualidade final da carne.

Estudando a proteólise inicial (zero e 24 horas) em dois músculos diferentes (*Longissimus dorsi* – LD– e *Semitendinosus* – ST), Jia et al. (2006) verificaram diferença significativa em 13 (LD) e 18 (ST) de 923 e 630 *spots* analisados, respectivamente. Os autores afirmaram que a diferença dos padrões das proteínas encontradas se deve, principalmente, as diferenças estruturais e bioquímicas dos dois músculos.

Em outro estudo, a eletroforese bidimensional foi utilizada para verificar o perfil protéico de *Longissimus lomborum* em dois grupos contrastes para maciez. Após realização da força de cisalhamento em 1.000 amostras de suínos, foram selecionados 12 animais com característica de carne mais dura e outros 12 com carne mais macia. Por meio da análise comparativa entre os géis dos grupos contrastantes, dos 310 *matches* encontrados, 14 *spots* tiveram diferença significativa ($P < 0,05$). Os autores concluíram que essa diferença de maciez dever-se-ia ao fato de possível presença de tecido adiposo nas amostras. Este tecido seria responsável por esta diferença, haja vista que se solubilizariam durante o processo de cozimento, aumentando a capacidade de retenção de água e gerando uma carne mais macia (LAVILLE et al., 2007).

Oito animais da raça *Norwegian Red*, tiveram amostras de *Longissimus thoracis* estudadas para efeito de proteólise muscular (1, 2, 3, 6, 10 e 14 horas *post mortem*). Através da análise de 96 géis, foram detectados 105 *spots* em comum, sendo que 47 apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$). Essas alterações indicam que mecanismos bioquímicos importantes estariam diretamente relacionados com o desenvolvimento da maciez da carne (JIA et al., 2007).

2.4 Conclusão

Durante o processo *post mortem* há uma continuidade das atividades bioquímicas, fazendo com que haja um aumento ou diminuição da intensidade de expressão das proteínas. Sugere-se, portanto, que existe uma possível relação entre intensidade de expressão de proteínas e processo de maturação. A identificação dessas proteínas com padrão de expressão diferenciada pode auxiliar no entendimento do processo de maciez da carne bovina.

Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportação de carne bovina do Brasil subiu 23% e gerou receita de US\$400,8 milhões. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id={2252ED65-215E-4012-B854-18BB2976F9B7}#>. Acesso em: 24 fev. 2012.

ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, BRA, v.6, n.3, p.135-149, jul./set. 2005.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - AMSA Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, Chicago, 1995.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Ed. FNP Consultoria & Comércio, São Paulo, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 25 ago. 2011.

DRANSFIELD, E. Modelling *post-mortem* tenderization-IV: role of calpains and calpastatin in conditining. **Meat Science**, Barking, USA, v.34, n.2, p.217-239, 1993.

JIA, X. et al. 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**, Washington, USA, v.5, n.7, p.1763-1769, jun. 2006.

JIA, X. et al. Proteome analysis of early *post-mortem* changes in two bovine muscle types: *M. Longissimus dorsi* and *M. Semitendinosus*. **Proteomics**, Weinheim, DEU, v.6, n.3, p.936-944, fev. 2006.

JIA, X. et al. Proteome changes in bovine *Longissimus thoracis* muscle during the early *postmortem* storage period. **Journal of Proteome Research**, Washington, USA, v.6, n.7, p.2720-2731, jun. 2007.

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

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing *post mortem* changes in porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.49, n.10, p.4531-4537, set. 2001.

LAMETSCH, R.; et al. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.84, n.4, p.918-924, abr. 2006.

LAMETSCH, R. et al. *Post mortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.51, n.24, p.6992-6997, out. 2003.

LAVILLE, E. et al. Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles for shear force of cooked meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.55, n.14, p.5834-5841, jun. 2007.

MORGAN, J.B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.71, n.6, p.1471-1476, jun. 1993.

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Campaign, USA, v.71, n.2, p.408-414, fev. 1993.

OLIVEIRA, A.L. Maciez da carne bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, BRA, n.33, p.7-18, 2000.

PFLANZER, S.B.; FELÍCIO, P.E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, Barking, GBR, v.83, n.4, p.697-701, dez. 2009.

RUBENSAM, J.M; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, BRA, v.18, n.4, p.405-409, 1998.

SEIDEMAN, S.C; CROSS, H.R; OLTJEN, R.R. Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.55, n.4, p.826-840, out. 1982.

SHACKELFORD, S.D. et al. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.69, n.1, p.171-177, jan. 1991a.

SHACKELFORD, S.D. et al. Predictors of beef tenderness: development and verification. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v.56, n.5, p.1130-1135, set. 1991b.

WHEELER, T.L.; SAVEKK, J.W.; CROSS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4206-4220, dez. 1990.

WILKINS, M.R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino-acids analysis. **Biotechnology**, Frankfurt, DEU, v.14, p.61-65, 1996.

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

WHIPPLE, G. et al. Predicting beef-*longissimus* tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4193-4199, dez. 1990a.

3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MARCADORES PARA CALPAÍNA E CALPASTATINA NA PROTEÓLISE DA CARNE

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar por meio de ferramenta proteômica o efeito de marcadores associados ao complexo calpaína/calpastatina, na proteólise *post mortem* da carne de bovinos inteiros da raça Nelore, terminados em confinamento. Foram coletadas amostras de sangue para análises genômicas e amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD), maturadas por um, 7 e 14 dias. Após cada período de maturação foram coletadas amostras para análises proteômicas e determinadas às perdas por cocção e a força de cisalhamento das carnes. A caracterização e determinação dos genótipos polimórficos (SNP) para os marcadores do gene da μ -calpaína (CAPN4751) e do marcador UOGCAST1, associado à calpastatina foram realizadas por meio de PCR em Tempo Real. Para as análises proteômicas foram selecionadas amostras inteiramente ao acaso, dentro de cada genótipo e para cada marcador avaliado, visando estudos alelos-específicos. As análises de variância da intensidade para os volumes de expressão normalizados (IVEN) indicaram 21 *spots* significativos ($P < 0,05$) para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1. Foram realizadas análises de correlação entre as IVEN destes *spots* e maciez da carne. Foi observada a existência de estimativas de correlações medianas e significativamente diferente de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) em relação à maciez 14 dias em amostras de um e 7 dias de maturação. Análises de regressão múltipla para os *spots* significativos indicaram que alguns *spots*, além dos marcadores estudados, podem prever a maciez da carne aos 14 dias de maturação. Portanto, as avaliações de *spots* permitirão identificar as proteínas diferencialmente expressas, auxiliando no melhor entendimento do complexo mecanismo que determina a maciez da carne.

Palavras-chave: Nelore, proteômica, maciez, qualidade de carne, marcadores SNP

Abstract

This study aimed to evaluate through the effect of proteomic and markers associated with complex calpain/calpastatin, the proteolysis *post mortem* in Nellore bulls in confinement. It was collected blood samples for genomic analysis, and samples of *Longissimus dorsi* (LD), aged for one, seven and 14 days. After each period of aging were collected samples for proteomic analysis and determined the cooking loss and Shear Force of meat. The characterization and determination of genotypes polymorphic (SNP) markers gene μ -calpain (CAPN4751) and marker UOGCAST1, associated with calpastatin were performed using Real Time PCR. For analysis proteomics, samples taken were analyzed completely randomized within each genotype for each marker and evaluated in order to study allele-specific. Analyses of variance of the intensity of expression for the normalized volumes (IENV) 21 spots indicated significant ($P < 0,05$) for the markers CAPN4751 and UOGCAST1. Correlation analysis between the spots IENV significant and meat tenderness were performed. It was observed the existence of correlation estimates medians and significantly different from zero ($P < 0,05$ or $P < 0,01$) compared to the softness in samples of 14 days in samples from 24 hours and seven days old. Multiple regression analyses showed significant spots for some spots. In addition to the markers studied, may predict meat tenderness at 14 days aging. Therefore, the assessments will identify the spots differentially expressed proteins, aiding in better understanding the complex mechanism determines the softness of the meat.

Keywords: Nellore, proteomics, tenderness, meat quality, SNP markers

3.1 Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro, contando com o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (BRASIL, 2011). Desse efetivo, aproximadamente 176 milhões são bovinos de corte, representados na sua maioria por animais *Bos indicus* (ANUALPEC, 2010). Segundo Carvalho (2008), os zebuínos têm sido preferidos nas regiões tropicais devido à resistência as doenças e tolerância ao calor. A raça Nelore, originária da Índia, foi introduzida no Brasil no século XIX, e é a raça mais utilizada na pecuária de corte do país. Essa escolha se deve a sua rusticidade, prolificidade e precocidade, além da alta produção em condições mínimas de manejo.

Na década de 90, estudos pioneiros correlacionaram a maciez com a presença de alelo zebu ou taurino nos animais (OLIVEIRA, 2000). Whipple et al. (1990a, b) e Shackelford et al. (1991a, b) indicaram em suas pesquisas que carnes provindas de cruzamentos com mais de 50% de sangue zebuínio tendiam a ser menos macias que as oriundas de animais com menos de 50%. Este fato pode ser explicado pela maior atividade enzimática das calpastatinas em animais zebras do que em taurinos (RUBENSAM; FELÍCIO; TERMIGNONI, 1998).

A maciez é um dos principais atributos relacionado à qualidade de carne, pois esta diretamente relacionada à satisfação do consumidor. A carne é resultado de diversas transformações bioquímicas sofridas pelo músculo após o abate e, particularmente em relação à maciez de carne, podem-se observar diferenças importantes entre animais inteiros e castrados. A condição sexual pode influenciar o ganho de peso e a composição da carcaça. Animais de sexos diferentes podem apresentar o mesmo grau de acabamento de carcaça em pesos ou idades diferentes (ALVES; GOES; MANCIO, 2005). Fêmeas atingem o ponto de abate mais cedo e mais leve que os machos castrados. Estes, por sua vez, atingem grau de acabamento mais cedo e mais leve que machos inteiros (ALVES, 2005).

De acordo com estudos de maciez, em diferentes sexos, realizados por Morgan et al. (1993), maiores valores de força de cisalhamento foram observados em animais inteiros, quando comparados com animais castrados. Wheeler; Savekk e Cross (1990), e Morgan; Wheeler e Koohmaraie (1993) afirmaram que a diferença

na maciez da carne entre inteiros e castrados, se deve a uma maior atividade das calpastatinas nos músculos de animais inteiros, inibindo a atividade das enzimas proteolíticas das calpaínas.

Estudos mostram que o principal sistema relacionado à maciez é o complexo das calpaínas, que são proteases ativadas por íons cálcio (Ca^{2+}), sendo um sistema totalmente dependente de cálcio para ser ativado (OLIVEIRA, 2000). O complexo é composto por três componentes principais: μ -calpaína (calpaína I), m-calpaína (calpaína II) e calpastatina. Cada um destes componentes age em momentos diferentes no processo de amaciamento da carne, sendo a calpastatina a responsável em inibir a atividade das calpaínas I e II. Segundo Dransfield (1993), as calpaínas inativas estão livres no sarcoplasma e imediatamente após o abate, os níveis de cálcio começam a aumentar, sendo estes provenientes do retículo endoplasmático. Dessa forma, os Ca^{2+} promovem a ativação das calpaínas, fazendo com que o sistema enzimático apresente diferentes comportamentos.

Por muitos anos, pesquisadores buscaram melhorar a qualidade da carne. Por meio da genética e, atualmente com o uso de novas técnicas de genética molecular, Dekkers; Rothschild e Malek (2002) identificaram genes ou regiões genômicas de qualidade de carne por meio do mapeamento dos *Quantitative Trait Loci* (QTL), indicando que o uso desta ferramenta no fornecimento de informações para seleção e cruzamento de raças poderia potencializar a produção e obter uma melhor qualidade de carcaça. A principal classe de marcadores empregados para verificar genes de qualidade da carne são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs).

Diversos pesquisadores têm avaliado possíveis marcadores relacionados à qualidade de carne em bovinos e, dentre eles, o gene CAST, que codifica a enzima calpastatina e o CAPN1, que codifica as enzimas calpaínas. Os marcadores CAPN316 e o CAPN530 já foram analisados e associados com maciez em populações de origem *Bos taurus* (PAGE et al., 2002).

Schenkel et al. (2006), associaram genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOGCAST1) com uma maior maciez de carne. Como a calpastatina é o inibidor específico das calpaínas, o aumento de sua atividade é correlacionado com a redução da maciez da carne. Carvalho (2008), estudando os marcadores CAPN316, CAPN350, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1 em bovinos Nelore,

encontrou efeitos significativos para o marcador CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1.

De forma complementar as metodologias descritas anteriormente, a proteômica surge como uma importante ferramenta para avaliação de expressão gênica, pois permite verificar se as diferenças encontradas nos genótipos dos animais avaliados, em nível molecular, são realmente transcritas e traduzidas, gerando animais portadores de proteínas ou enzimas mais ativas ou eficientes.

A função da proteômica é obter informações sobre a expressão das proteínas celulares, revelando dessa forma como e onde podem estar agindo alguns genes. Além disso, a proteômica vem sendo utilizada nos últimos anos para explicar como características hereditárias interagem com o meio no controle das funções fisiológicas e celulares dos organismos (BENDIXEN, 2005).

Com poucas décadas de estudo, a eletroforese bidimensional (2DE) tornou-se importante para a caracterização das vias de expressão das proteínas celulares. Segundo Lametsch e Bendixen (2001), o principal objetivo da 2DE é mostrar o comportamento das proteínas celulares, por meio de sua separação em frações individuais. Segundo estudos, utilizando-se a eletroforese bidimensional, é possível relacionar mudanças *post mortem* com a maciez da carne, (LAMETSCH et al. 2003; 2006).

Neste contexto, objetivou-se estudar, por meio de análise proteômica, o efeito do complexo calpaína/calpastatina na proteólise *post mortem* da carne de bovinos Nelore inteiros, com genótipos contrastantes para maciez.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local

A presente pesquisa foi conduzida na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), na cidade de Pirassununga, São Paulo, sendo utilizado o Matadouro Escola da Coordenadoria do Campus de Pirassununga (CCPS) para abate e processamento dos cortes; o Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade de Carne (LAAQC) do Departamento de Zootecnia (ZAZ) para análise de maciez de carne; o Laboratório de Estudos Avançados em Ciência da Carne (LEACC), provisoriamente funcionando no

Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) para as corridas eletroforéticas e o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Celular (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) para análise de dados.

3.2.2 Animais

Durante os anos de 2009 e 2010, foram criados a pasto e terminados em confinamento um total de 155 bovinos Nelore (Figura 3.1), sendo 75 animais inteiros. Aos 19 meses de idade os animais foram confinados por 56, 84, 112 e 140 dias. Ao final de cada período de confinamento, uma média de 20 animais foram abatidos no Matadouro Escola da PUSP-P, por meio de insensibilização com o uso de pistola pneumática de penetração e posterior sangria, seguindo as técnicas de abate humanitário.

Figura 3.1 – Animais utilizados no experimento

3.2.3 Coleta de Amostras

Bifes de músculo *Longissimus dorsi* (LD), com 2,5cm de espessura, foram retirados entre a 10^a e 12^a costelas, para determinação da maciez. Foram realizadas medidas de cor objetiva (CM-2500d, Konica Minolta) dos bifes 15min após o corte. Em seguida, foram acondicionados em embalagens a vácuo e maturados em câmara fria com temperatura controlada (0°C a 2°C) pelo período de um, sete e 14 dias.

Ao final de cada período de maturação, os bifes foram conduzidos ao LAAQC para a realização da maciez. As embalagens foram abertas, o exsudato retirado e pesado. Amostras de aproximadamente um grama foram coletadas de cada bife, para realização de análise eletroforética. Estas amostras foram colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C . Os bifes foram então pesados e assados para determinação de perdas por cozimento (PPC) e força de cisalhamento (FC – kgf).

3.2.4 Análises Físico-Químicas

3.2.4.1 Temperatura e pH

Na altura da 12ª costela, foram medidos os valores de pH e temperatura, com auxílio de um medidor digital portátil de pH (*pH 11 Series, Oakton*), composto por uma sonda de perfuração de vidro (pH) e sonda metálica (temperatura).

3.2.4.2 Cor

Com auxílio de um colorímetro portátil (*CM-2500d, Konica Minolta*), os valores de cor foram determinados, com uso da escala L^* , a^* , b^* , do sistema *CIE Lab*, com fonte de luz de D_{65} , ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30mm. O aparelho foi sempre calibrado com um padrão branco ($L^* = 93,80$, $a^* = -0,89$, $b^* = 0,95$) e outro preto ($L^* = 1,19$, $a^* = 1,27$, $b^* = 1,92$). As medidas foram feitas em três lugares distintos, na superfície da amostra, tomando-se a média como o valor determinado.

3.2.4.3 Maciez

Após o período pré-determinado de maturação foi realizada a maciez dos bifes por meio da força de cisalhamento, conforme protocolo da AMSA (1995).

Os bifes foram retirados das embalagens e o exsudato pesado em balança semi-analítica (*A2000, Marte*) e descartado. Em seguida foram pesados e levados ao forno elétrico (*Luxo Classic 2.4, Lary*) com temperatura controlada (170°C). As temperaturas internas das amostras foram monitoradas através de termopares *Data*

Logger digital (700-10s, *Gulterm*), sendo o bife virado ao atingir 42°C e retirado do forno aos 71°C. Após o cozimento, ao atingir 28°C, os bifes foram pesados, embalados em filme plástico e armazenados em geladeira comum por 24 horas.

Foram retirados quatro a seis cilindros de carne de cada amostra, com diâmetro de 13 milímetros cada, e cisalhados no aparelho *Warner Bratzler Shear Force* (WBSF), com sonda *Warner Bratzler* deslocando-se com velocidade de 500mm/min. A força de cisalhamento foi calculada através da média dos cilindros.

3.2.5 Avaliação Genética

3.2.5.1 Extração de DNA

Durante a pesagem dos animais no confinamento, foram colhidas amostras de sangue da jugular dos bovinos, em tubos *vacutainer* com anticoagulante (EDTA). As amostras foram conduzidas ao LEACC para realização de extração de DNA.

Foi utilizada a metodologia de extração de DNA de sangue em NaCl, onde 1mL de sangue de cada amostra foi transferido para um microtubo devidamente identificado. Adicionou-se 500µL de solução de lise de hemácias em cada microtubo, e por inversão foram homogeneizados. Em seguida ocorreu a centrifugação as amostras a 13.000rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de solução de lise de hemácias. Com auxílio de uma pipeta, o volume do microtubo foi homogeneizado e em seguida centrifugado a 13.000rpm por um minuto. Este passo foi repetido até que o *pellet* formado no fundo do microtubo ficasse totalmente branco.

O *pellet* foi então lavado com 1mL de água ultrapura. Em seguida, após secagem, foi adicionado um volume de 80µL de tampão de proteinase K, 280µL de água ultrapura, 10µL de SDS 20%, 8µL de proteinase K (25mg/mL) em cada microtubo. As amostras foram incubadas por 3 horas a 55°C, em leve agitação, até que a solução ficasse totalmente transparente. Em seguida foram mantidas a 4°C por 15min, evitando choque térmico ao adicionar 120µL de solução NaCl (5M) gelada.

As amostras foram agitadas por oito segundos e centrifugadas a temperatura ambiente por 10min, a 13.000rpm para peletização da proteína desnaturada.

Em seguida, 400µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, evitando-se que a proteína fosse pipetada. Foi adicionado 1mL de etanol 95% e por inversão homogeneizou-se a solução. Em seguida as amostras foram mantidas em *freezer* -80°C por 15min e centrifugadas a 14.000rpm, por 10min a 4°C. Após esta etapa, os microtubos foram mantidos por 20min a -80°C. Novamente as amostras foram centrifugadas por 10min, a 4°C em 14.000rpm.

Na seqüência, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de álcool 70% gelado. As amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 10min. Descartou-se o sobrenadante e os microtubos foram secos em dessecador por 30min, seguindo-se de adição de 50µL de água ultrapura em cada amostra. Uma leve homogeneização foi feita e as amostras foram aquecidas em agitação (100rpm) durante uma hora a 37°C, para que o DNA fosse diluído. Em seguida as amostras foram quantificadas em *Nano Drop 2000* (*Thermo Scientific*).

3.2.5.2 Genotipagem

O processo de genotipagem foi realizado com auxílio do método de discriminação alélica, usando a *TaqMan® Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*). As sondas e *primers* utilizados para a determinação dos genótipos foram sintetizados usando *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay, non Human* (*Applied Biosystems*) compostos por *primers* para PCR e sondas *TaqMan® MGB* (Tabela 3.1). Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 20ng de DNA, para uma reação de 10µL, contendo 0,25µL de *Assay Mix®* (*Applied Biosystems*), 5,0µL de *TaqMan® Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*) em 10min a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 92°C e um minuto a 60°C. A reação efetivou-se por meio de PCR em tempo real, utilizando-se o equipamento *ABI Prism® 7500 Fast Sequence Detection System* da *Applied Biosystems*.

Tabela 3.1. Seqüência dos *primers* e das sondas utilizadas para cada marcador estudado

Marcador	Seqüência	Sonda
CAPN4751	F: TGGCATCCTCCCCTTGACT	CTGCGCCTCGGTT
	R:CCCCCGTCACTTGACACA	CTGCGCCTCAGTTT
UOGCAST1	F: GGAAGGAAGGAATTGCATTGTTTCA	CTTTGGGTAGAAAATT
	R:CACTTGTGTTTTATGTAGTCAATTGTGAGAA	TTGGGTACAAAATT

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 seqüência 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.

Os marcadores utilizados (Tabela 3.2) foram previamente escolhidos em virtude dos relatos de Casas et al. (2005), White et al (2005), Schenkel et al. (2006) e Carvalho et al. (2007a, b e 2008). A descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos e introns, inversões de nucleotídeos, bem como suas posições estão na Tabela 3.3.

Os genótipos gerados foram analisados com o software *TaqMan®Genotyper versão 1.2* (Applied Biosystems) e confirmado visualmente.

Tabela 3.2. Marcadores investigados, número de acesso no *GenBank*, bem como as respectivas referências

Marcadores	ID GenBank	Referências
CAPN4751	AF248054	White et al. (2005); Carvalho et al. (2007 e 2008)
UOGCAST1	AY008267	Schenkel et al. (2006); Carvalho et al. (2007 e 2008)

Tabela 3.3. Descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos, introns, substituição de nucleotídeos, bem como suas posições

Marcadores	Cromossomo	Intron	Mutação	Posição do Nucleotídeo
CAPN4751	29	Intron 18	C/T	6545
UOGCAST1	07	Intron 5	C/G	282

3.2.6 Análise Proteômica

3.2.6.1 Preparo das amostras

Foram selecionados animais de interesse de acordo com os genótipos para os marcadores em questão, totalizando 17 bovinos inteiros. Estes animais foram divididos em seis *pools* de acordo com as combinações genotípicas particulares. Cada *pool* foi composto por 2 ou 3 animais para evitar o efeito do animal nas amostras.

Para realização da extração das proteínas da carne, foram pesadas de 200 a 300mg de cada amostra. Para *pools* com 2 animais, foram utilizados 300mg de cada amostra e para *pools* com 3 animais, 200mg de cada amostra. Foram acrescentados 5mL de tampão de extração (LAMETSCH et al., 2003) e 50µL de inibidor de protease em cada tubo, seguindo de homogeneização por um minuto a 14.000rpm, com auxílio do homogeneizador *Turratrec (TE-102, Tecnal)*. Os extratos obtidos foram transferidos para *erlenmeyers* e colocados no *shaker* para sob agitação vigorosa por 2 horas a temperatura ambiente (25°C). Após este período, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 4°C, 9.500rpm por 30min, em centrífuga refrigerada (*Allegra 64R, Beckman Coulter*). Finalizada a extração das proteínas, os sobrenadantes foram acondicionados em tubos criogênicos e armazenados a -80°C.

Em seguida foram feitas as quantificações de proteínas totais dos sobrenadantes de cada *pool*, através do *2-D Quant Kit (GE Healthcare)*, onde foi utilizado como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA) para a elaboração da curva padrão. Para a formulação da curva, foram utilizadas concentrações diversas de BSA, obtendo-se suas respectivas absorbâncias a 480nm. Foram feitas as leituras das amostras, e estas interpoladas na curva padrão, obtendo-se a concentração de proteína no extrato protéico.

3.2.6.2 Focalização Isoelétrica - 1ª dimensão

Para a realização da 1ª dimensão, fez-se necessário a preparação das amostras no dia anterior, por meio da reidratação das tiras de *IPG (GE Healthcare)*, onde foram aplicadas as amostras. As tiras foram previamente selecionadas para o tipo de análise feita, sendo escolhidas tiras de 13cm de comprimento e faixa de pH

de 4 a 7. Para a reidratação das tiras, foi utilizada solução de reidratação e uma alíquota do extrato cárneo de cada amostra, contendo este 500µg de proteína. Foram colocados 250µL de solução de reidratação em cada canaleta do *IPG Box* (GE Healthcare) e em seguida a tira foi sobreposta ao líquido, com o gel voltado para baixo para que este reidratasse com a solução. Todos os *pools*, em todos os tempos de maturação, foram feitos em triplicata, para uma resposta mais segura. A etapa de reidratação durou 14 horas, e em seguida foi realizada a 1ª dimensão.

As tiras reidratadas foram inseridas no aparelho *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare) para a focalização isoeletrica das proteínas. Em cada uma das 12 canaletas foram acondicionados 9mL de *Dry Strip Cover Fluid* (GE Healthcare). Cada tira foi acondicionada em uma canaleta, com o gel voltado para cima, fixadas nos extremos com *Paper Wicks* (GE Healthcare) umedecidos em água Milli-Q (*Direct Q-5, Millipore*), para que a corrente elétrica pudesse passar pela tira e efetivar a separação isoeletrica proteica. A 1ª dimensão foi realizada a temperatura de 20°C, com variação de voltagem de 500 a 8.000V e limite de corrente de 50µA por tira. Cada corrida foi realizada, em média, em seis horas, até atingir 19.600Vh. Ao final as tiras foram retiradas e inseridas em tubo de ensaio com o gel voltado para cima, e guardadas em *freezer* -80°C até o momento do uso.

3.2.6.3 SDS PAGE - 2ª dimensão

Para a realização da 2ª dimensão, foram preparados previamente dois géis de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), com concentração de 12,5%. Os géis foram vedados com butanol 80% e isolados com filme plástico.

As tiras a serem utilizadas foram retiradas do *freezer* e equilibradas, em leve agitação, em tampão de equilíbrio SDS I e tampão de equilíbrio SDS II, por 15min cada. O butanol 80% foi retirado e a extremidade do gel lavada com água Milli-Q. Com auxílio de pinças, cada tira equilibrada foi colocada sobre o gel previamente preparado, e acomodada com ajuda de uma régua plástica. No pólo positivo foi colocado papel filtro para *Blotting* com 10µL de marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas*), com 10 bandas distintas de peso molecular de 10 a 170kDa. Em seguida, as tiras foram seladas ao gel com solução selante de agarose, e as placas introduzidas na cuba eletroforética (*SE 600 Ruby*,

Amersham Biosciences). Foi utilizado tampão de corrida *SDS Laemmli* concentrado 1x no ânodo e 3x no cátodo.

A programação utilizada no *EPS 1001 (GE Healthcare)* para a corrida de 2ª dimensão foi dividida em duas etapas:

- 15mA/gel, a 100V por 30min: migração das proteínas da tira para o gel;
- 50mA/gel, a 600V por aproximadamente 3h30min: migração das proteínas no gel até o corante da tira atingir a base do gel.

Ao término da corrida, os géis foram cuidadosamente retirados das placas de vidro e colocados em potes plásticos com solução corante, em agitação por 50min. Após este período, o gel foi colocado em solução descorante, também em agitação, por 30min, sendo esta trocada por uma nova logo em seguida, deixando o gel descorar *overnight*. No dia seguinte, a solução foi descartada e o gel foi mantido em água Milli-Q.

Foram realizadas 27 corridas eletroforéticas, gerando um total de 54 géis. Estes foram então escaneados (*Image Scanner III; GE Healthcare*) e as imagens digitalizadas para análise.

3.2.6.4 Análise dos Géis

Os géis foram analisados no *Image Master 2D Platinum (GE Healthcare)* com o intuito de identificar *spots* de forma automática. Em seguida foi realizada uma vistoria minuciosa gel por gel, verificando se algum *spot* não havia sido capturado, sendo este inserido nas análises. As imagens foram então sobrepostas, para que proteínas expressas dentro do mesmo período de maturação fossem identificadas através do seu ponto isoelétrico e peso molecular.

3.2.7 Análise Estatística

Para avaliar as implicações dos resultados associados à técnica de eletroforese bidimensional, em relação aos genótipos contrastantes para a característica à maciez da carne maturada, as intensidades dos 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, 7 e 14 dias):

Modelo A:
$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + A_j + M_k + C_l + MC_{kl} + e_{ijklm}$$

em que,

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

μ = é uma constante inerente a todas as observações;

S_i = efeito aleatório do reprodutor i associado à característica com média 0 e variância $\sigma^2_{S_i}$;

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

M_k = é o efeito fixo do genótipo k para marcador CAPN4751;

C_l = é o efeito fixo do genótipo l para marcador UOGCAST1;

MC_{kl} = é o efeito da interação do genótipo k para marcador CAPN4751 com o genótipo l para marcador UOGCAST1;

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

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, 7 e 14 dias) foram utilizadas como variável dependente.

As análises descritas acima foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED e do PROC REG do programa do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.3. Para avaliação das possíveis relações entre a maciez da carne maturada com um, 7 e 14 dias e as intensidades dos volumes de expressão normalizados significativos, foram utilizadas também análises de correlação momento-produto de *Pearson* por meio do procedimento PROC CORR do programa anteriormente citado.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análises Físico-Químicas

Na Tabela 3.4 está apresentada a estatística descritiva, com os números de observações (N), estimativas de médias (MED), erro padrão (EP), coeficientes de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características físico-químicas relacionadas à qualidade de carne.

Os valores de pH uma e 24 horas *post mortem* bem como a cor objetiva foram determinados para monitorar a possível ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft and Exsudative*) e/ou DFD (*Dark, Firm and Dry*), que podem interferir nos resultados das análises de maciez e proteômicas. Apesar da queda de pH ter ocorrido no período de uma hora para 24 horas *post mortem*, houve indicação de possível presença de carne DFD, com a presença de pH 24 horas superior a 5,8 (FERREIRA, 2005).

Os valores de maciez diminuíram durante o período de maturação de um, 7 e 14 dias, mas ainda foram superiores ao descrito na literatura para uma carne macia, que é considerado de 4,5kgf. Estudos evidenciam a maciez desfavorável para animais *Bos indicus* quando comparado com *Bos taurus* (WHIPPLE et al., 1990a, b; SHACKELFORD et al. 1991a, b; OLIVEIRA, 2000).

Pflanzer e Felício (2009), utilizando o protocolo da AMSA (1995) para determinação da maciez, relataram valores médios de força de cisalhamento próximos a 7,0kgf, em bifes de *Longissimus dorsi* maturados por 14 dias e posteriormente congelados.

Tabela 3.4. Número de observações (N), média (MED), erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) para as características de qualidade de carne em bovinos Nelore inteiros

VARIÁVEL	N	MED	EP	CV	MIN.	MAX.
pH1h	17	6,68	7,84	90,33	6,44	7,41
pH24h	17	5,71	0,31	5,41	5,38	6,43
L* 1d	17	35,30	5,63	15,94	24,12	44,52
a* 1d	17	15,59	3,05	19,57	11,66	20,81
b* 1d	17	14,55	4,66	32,02	8,49	22,41
L* 7d	17	36,38	5,08	13,97	30,10	45,53
a* 7d	17	15,82	3,49	22,05	11,91	22,40
b* 7d	17	15,23	5,68	37,30	8,06	22,87
L* 14d	16	36,60	5,11	13,96	30,89	45,87
a* 14d	16	16,16	2,87	17,73	12,66	20,72
b* 14d	16	14,54	4,55	31,30	8,88	22,81
PPC 1d	16	23,93	3,81	15,90	18,59	31,47
PPC 7d	17	24,52	8,64	35,25	2,28	40,56
PPC 14d	17	24,18	4,58	18,92	14,00	32,28
FC 1d	17	9,77	1,65	16,87	7,32	12,49
FC 7d	17	8,77	1,75	19,97	6,40	12,30
FC 14d	17	7,10	1,57	22,09	4,33	10,74

pH1h e pH24h = pH intramuscular obtido a uma hora e 24 horas *post mortem*; L*,a* e b* foram mensurações de cor realizadas após 15min de exposição da carne ao ar realizadas no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; PPC = perda por cocção mensurados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*; FC = valores de força de cisalhamento em quilogramas/força determinados no 1º, 7º e 14º dia *post mortem*

3.3.2 Análise Genômica

As frequências alélicas e genóticas associadas aos polimorfismos UOCAST1 e CAPN4751 obtidas dos diferentes grupos genéticos estão apresentadas na Tabela 3.5. O polimorfismo para UOCAST1 apresentou melhor distribuição genotípica quando comparado ao marcador CAPN4751. Para UOCAST1 as frequências alélicas foram C=0,61 e G=0,39. Já para o polimorfismo CAPN4751 a frequência do Alelo C (0,17) foi inferior à do alelo G (0,83).

Com relação às frequências genóticas, ainda na Tabela 3.5, observam-se frequências baixas para o genótipo CC do CAPN4751. Esses resultados também

foram relatados por outros autores (CASAS et al., 2000; 2005 e 2006; SCHENKEL et al., 2006; CARVALHO et al. 2007a, b), os quais verificaram baixa frequência desse genótipo nas populações avaliadas.

Tabela 3.5. Frequência gênica e genotípica dos marcadores utilizados

Marcador	UOGCAST1	CAPN4751
Frequência Alélica	C - 0,61	C - 0,17
	G - 0,39	T - 0,83
Frequência Genotípica	f(GG) = 13,6	f(TT) = 69,0
	f(CG) = 51,6	f(CT) = 28,4
	f(CC) = 34,8	f(CC) = 2,6

Na Tabela 3.6 estão apresentados os valores médios da maciez para cada genótipo e em cada tempo de maturação. Embora os valores de força de cisalhamento sejam altos, observa-se aumento geral da maciez durante o período de maturação, independente do genótipo. Foi identificada associação significativa ($P < 0,05$) entre o marcador UOGCAST1 e os valores de maciez. O genótipo favorável (CC) teve os menores valores de força de cisalhamento (6,38kgf) aos 14 dias de maturação, confirmando a eficiência desse marcador. Os resultados do marcador CAPN4751 corroboram a baixa frequência do alelo favorável e possivelmente, por esse motivo que não se observa diferença entre os valores de maciez determinados.

De acordo com Wheeler e Koohmaraie (1999), as calpaínas são responsáveis pela degradação das proteínas miofibrilares que estão relacionadas com a maciez da carne. Schenkel et al. (2006) associaram o marcador UGOCAST com valores de força de cisalhamento durante a maturação da carne e verificaram também que o genótipo CC teve carne mais macia que o genótipo GG e o genótipo CG foi considerado como intermediário, corroborando os resultados observados nesse trabalho.

Tabela 3.6. Valores médios da força de cisalhamento (maciez) e erro padrão de acordo com o marcador molecular e o tempo de maturação

Marcador ¹	Genótipo	Maciez (kgf)		
		1 dia	7 dias	14 dias
<i>UOCAST1</i>	CC	9,72±0,27 ^A	8,06±0,25 ^A	6,38±0,22 ^B
	CG	9,35±0,21 ^A	8,03±0,20 ^A	6,78±0,18 ^B
	GG	9,12±0,43 ^A	8,49±0,41 ^A	7,75±0,36 ^A
<i>CAPN 4751</i>	CC	7,54±0,97 ^B	6,25±0,91 ^B	6,35±0,83 ^A
	CT	9,55±0,29 ^A	7,96±0,27 ^{AB}	6,53±0,25 ^A
	TT	9,48±0,18 ^{A,B}	8,23±0,17 ^A	6,89±0,16 ^A

¹ Médias em uma mesma linha, seguidas por diferentes letras, diferem significativamente (P<0,05)

3.3.3 Análise Proteômica

As análises de variância dos volumes de expressão normalizado dos *spots*, dentro de cada tempo de maturação e considerando a correção de Bonferroni para múltiplos testes, indicaram que: (i) para as amostras de um dia foram observados média de 220 *spots* em comum. Foram retirados das análises 66 *spots* por não estarem presentes em todas as combinações genotípicas. Assim, 154 foram submetidos à análise de variância e 5 *spots* mostraram efeito significativo, sendo um com efeito principal para CAPN (APÊNDICE A), um para UOCAST (APÊNDICE A) e 3 para interação CAPN x UOCAST (APÊNDICE B); (ii) em amostra de 7 dias de maturação, 251 *spots* em comum foram encontrados, sendo retirados 79 por não estarem presentes em todas as combinações genotípicas. Dessa forma, 179 foram considerados na análise de variância e 9 *spots* foram significativos, sendo 3 *spots* com efeito principal para UOCAST (APÊNDICE C), um em comum com CAPN (APÊNDICE C) e 6 para interação CAPN x UOCAST (APÊNDICE D); e, (iii) para os dados de 14 dias de maturação foram observados 237 *spots* em comum. Foram retirados das análises 78 *spots* por não estarem presentes em todas as combinações genotípicas. Assim, 159 foram submetidos à análise de variância e 7 *spots* tiveram efeitos significativos, sendo 2 *spots* com efeito principal para CAPN

(APÊNDICE E), 3 para UOGCAST (APÊNDICE E) e 2 com efeito de interação CAPN x UOGCAST (APÊNDICE F).

Dessa forma, foram encontrados 21 *spots* significativos nos três tempos de maturação. Podemos observar na Figura 3.2 que 4 *spots* foram significativos em mais de um tempo de maturação. Esses resultados demonstram que não há uma relação definida entre o genótipo identificado com as diferenças de expressão da proteína, portanto o efeito do genótipo pode estar relacionado às características intrínsecas da função biológica. A identificação dos *spots* poderá ajudar auxiliar no melhor entendimento do fenômeno em estudo.

Figura 3.2 – Gel bidimensional com os 21 *spots* significativos ($P < 0,05$), sendo 5 *spots* (em preto) para um dia, 9 *spots* (em roxo) para 7 dias e 7 *spots* (em vermelho) para 14 dias

Foram realizadas análises de correlação entre as intensidades para os volumes de expressão normalizados (IVEN) dos *spots* que manifestaram expressões

significativamente distintas, bem como, entre o número de alelos favoráveis para cada marcador avaliado, e as variáveis indicadoras da qualidade da carne.

Para as análises da carne um dia (APÊNDICE G) em relação à variável maciez aos 14 dias de maturação (FC14d), foi observada a existência de 3 estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$). Em relação à maciez no dia 7 (FC7d) e no dia um (FC1d), foi verificada apenas uma estimativa mediana e significativamente diferente de zero ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) em ambos os tempos.

Para as análises da carne com 7 dias de maturação (APÊNDICE H), foi possível verificar a existência de 2 estimativas de correlações altas e 5 estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) em relação à variável maciez 14 dias (FC14d). Para característica maciez da carne com 7 dias de maturação (FC7d), foram observadas 5 estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$). Já para a característica maciez da carne com um dia de maturação (FC1d) foram observados 2 *spots* medianamente correlacionados.

Para as análises das amostras com 14 dias de maturação (APÊNDICE I), verificou-se a existência de 5 estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) associada à variável maciez 14 dias (FC14d), 3 em relação à variável maciez 7 dias (FC7d) e 2 em relação à variável maciez um dia (FC1d).

Todas as estimativas de correlações relatadas podem ser consideradas medianas, e algumas podem ser consideradas de magnitude alta. Estes resultados são relevantes, pois demonstram que a expressão dos genes avaliados foi diferenciada e que alguns *spots* foram associados à maciez futura com base em amostras com apenas um ou 7 dias *post mortem*.

Conforme proposto por Zapata et al. (2009), foram realizadas análises de regressão múltipla das intensidades do volume de expressão normalizado dos *spots* significativos dentro de cada tempo, bem como, os número de alelos favoráveis para os genótipos CAPN e UOGCAST como variáveis independentes e valores de maciez um, 7 e 14 dias como variáveis dependentes.

Nas Tabelas 3.7, 3.8 e 3.9 são apresentados a constante de regressão, os coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para cada tempo de maturação, respectivamente.

Tabela 3.7. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e CAPN4751 e *spots* significativos obtidos nas análises das amostras com um dia *post mortem*

Maciez 1 dia				
Coeficientes	Estimativa	EP	Valor de F	Pr>F
Intercepto	10,86345	0,45942	559,13	<.0001
CAPN_S	-2,06924	0,63142	10,74	0,0051
Maciez 7 dias				
Intercepto	-5,07263	4,11299	1,52	0,2411
UOG_S	3,91617	1,2933	9,17	0,0105
SPOT_1	-17,00042	4,07526	17,4	0,0013
SPOT_17	24,07884	10,01427	5,78	0,0332
SPOT_41	30,88366	7,07927	19,03	0,0009
Maciez 14 dias				
Intercepto	5,04731	0,60312	70,03	<.0001
CAPN_S	-1,74589	0,39582	19,46	0,0006
SPOT_17	12,15062	2,23381	29,59	<.0001

Na análise de regressão para os *spots* significativos dentro do tempo de maturação um dia foram observados que o número de alelos favoráveis para o marcador CAPN4751 explica melhor o efeito de maciez um dia. O número de alelos favoráveis para o marcador UOGCAST1 e os *spots* um, 17 e 41 foram os melhores preditores para os valores de maciez 7 dias. Já para a avaliação da maciez aos 14 dias de maturação, o número de alelos favoráveis para o marcador CAPN4751 e *spot* 17 foram considerados os melhores preditores.

Os modelos acima descritos apresentaram coeficientes de determinação e estatística C(p) de 0,4172 e -0,2385, 0,6573 e 4,5808, 0,7651 e 0,7553, respectivamente.

Tabela 3.8. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e CAPN4751 e *spots* significativos obtidos nas análises das amostras com 7 dias *post mortem*

Maciez 1 dia				
Coeficientes	Estimativa	EP	Valor de F	Pr>F
Intercepto	10,87379	1,4161	58,96	<.0001
SPOT_15	-15,72124	4,7648	10,89	0,0058
SPOT_51	79,65823	23,721	11,28	0,0051
SPOT_158	-2,06268	1,0334	3,98	0,0673
Maciez 7 dias				
Intercepto	11,81259	0,772	234,1	<.0001
CAPN_S	-1,81908	0,5788	9,88	0,0072
SPOT_02	-1,51302	0,4813	9,88	0,0072
Maciez 14 dias				
Intercepto	26,04327	4,2296	37,91	<.0001
CAPN_S	-2,09093	0,4305	23,59	0,0003
SPOT_02	-6,45473	1,3754	22,03	0,0004
SPOT_04	-3,60242	0,9174	15,42	0,0017

Segundo a análise de regressão múltipla realizada com os números de alelos favoráveis e os *spots* significativos obtidos nas análises das amostras com maturação 7 dias, os *spots* 15, 51 e 158 predisseram melhor o efeito de maciez um dia. O número de alelos favoráveis para o marcador CAPN4751 e o *spot* dois explicaram melhor os valores de maciez 7 dias. Já para a maciez da carne aos 14 dias de maturação, o número de alelos favoráveis e as intensidades dos volumes de expressão dos *spots* 2 e 4 foram selecionados como os melhores preditores.

Os modelos acima descritos apresentaram coeficientes de determinação e estatística C(p) de 0,4965 e 2,0254, 0,5963 e 2,6430, 0,7711 e 2,4574, respectivamente.

Tabela 3.9. Estimativas da constante de regressão, coeficientes de regressão, valores de estatística F e a respectiva probabilidade de cada coeficiente de regressão para as análises de número de alelos favoráveis para UOGCAST1 e CAPN4751 e *spots* significativos obtidos nas análises das amostras com 14 dias *post mortem*

Maciez 1 dia				
Coeficientes	Estimativa	EP	Valor de F	Pr>F
Intercepto	6,35106	1,1951	28,24	<.0001
<i>SPOT_44</i>	9,33773	3,1408	8,84	0,0095
Maciez 7 dias				
Intercepto	3,38932	2,8532	1,41	0,2561
<i>SPOT_44</i>	15,90229	4,1505	14,68	0,0021
<i>SPOT_87</i>	-20,3507	5,7375	12,58	0,0036
<i>SPOT_113</i>	4,94938	2,2599	4,8	0,0474
Maciez 14 dias				
Intercepto	16,00426	1,3948	131,66	<.0001
<i>SPOT_10</i>	-6,08802	1,1233	29,38	<.0001
<i>SPOT_48</i>	-19,39887	3,8272	25,69	0,0002

Na análise de regressão múltipla para os números de alelos favoráveis para os marcadores UOGCAST1 e CAPN4751, bem como para os *spots* significativos de amostras da carne com 14 dias de maturação que as IVEN do *spot* 44 explica melhor o efeito de maciez um dia. As IVEN dos *spots* 44, 87 e 113 foram relacionados aos valores de maciez aos 7 dias de maturação. Já as IVEN dos *spots* 10 e 48 explicaram melhor maciez da carne com 14 dias de maturação.

Os modelos acima descritos apresentaram coeficientes de determinação e estatística C(p) de 0,3708 e 0,7791, 0,6610 e 2,4554, 0,7501 e 1,5064, respectivamente.

Conforme relataram Zapata et al. (2009), a análise de regressão múltipla ($P < 0,05$) foi capaz de prever a maciez de 7 dias através de análise de amostras de 36 horas *post mortem*. O mesmo foi feito com amostras de 72 horas *post mortem*, predizendo a maciez da carne aos 14 dias de maturação, corroborando com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Focalizando os resultados obtidos nos marcadores CAPN4751 e UOGCAST1, é possível verificar que estes possuem uma aplicabilidade em *Bos indicus*, podendo ser uma alternativa interessante para identificar animais com carne mais macia.

Carvalho et al. (2007) estudando a associação de polimorfismo no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em 229 animais Nelore, encontraram efeitos significativos para CAPN4751 em relação a maciez da carne aos 7, 14 e 21 dias de maturação.

Estudando a especificidade do marcador CAPN530 em Nelores puros e cruzados, Curi et al. (2009) verificaram que este não apresentou uma boa associação entre o genótipo e a maciez da carne. Os autores indicam que os resultados encontrados se devem as diferenças genéticas entre as subespécies (*Bos indicus* X *Bos taurus*), uma vez que outros pesquisadores encontraram associação para tal marcador. White et al. (2005) mostram em seus estudos que um marcador funcional para Nelore seria o CAPN4751, corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

Pinto et al. (2010) estudaram a associação de SNPs CAPN4751 e UOGCAST1 com a maciez da carne em 638 Nelores. Ambos marcadores estudados tiveram associação com a maciez da carne com 7, 14 e 21 dias de maturação. Estes resultados mostram a importância destes marcadores, uma vez que explicam a variação funcional de maciez em Nelore.

Em estudo realizado por Cafe et al. (2010) com bovinos Brahman, houve resultados semelhantes aos estudos com Nelore. O marcador CAPN4751 mostrou uma relação direta com maciez, com resultados significativos ($P < 0,05$) sobre força de cisalhamento. A carne de animais com genótipo favorável para o marcador apresentou valores reduzidos de força de cisalhamento quando comparado com animais de genótipo desfavorável.

3.4 Conclusão

A calpaína e a calpastatina se expressam de maneira independente na presença de algumas proteínas e de maneira simultânea sobre outras.

As alterações significativas nas intensidades dos volumes de expressão normalizados em função dos genótipos para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 sugerem que as taxas de expressão gênica foram diferenciadas entre os animais com diferentes genótipos para os marcadores em questão.

Portanto, as avaliações de *spots* com intensidade de volumes de expressão normalizados diferenciadas permitirão identificar as proteínas diferencialmente expressas, auxiliando no melhor entendimento do complexo mecanismo que determina a maciez da carne.

Referências

ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, BRA, v.6, n.3, p.135-149, jul./set. 2005.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - AMSA Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, Chicago, 1995.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Ed. FNP Consultoria & Comércio, São Paulo, 2010.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, Barking, GBR, v.71, n.1, p.138-149, set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 25 ago. 2011.

CAFE, L.M. et al. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.88, n.9, p.3059-3069, set. 2010.

CARVALHO, M.E. et al. Associação de polimorfismos no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em animais da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** Brasília: SBZ, 2007b. 1 CD-ROM.

CARVALHO, M.E. et al. Avaliação de diferentes combinações genótípicas para polimorfismos no gene da μ -calpaína e calpastatina associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 2007a.

CARVALHO, M.E. **Caracterização da frequência de polimorfismo em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.83.n 1, p.13-19, jan. 2005.

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

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

CURI, R.A. et al. Genetic polymorphisms related to meat traits in purebred and crossbred Nelore cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, BRA, v.44, n.12, p.1660-1666, dez. 2009.

DEKKERS, J.C.M.; ROTHSCILD, M.F.; MALEK, M.M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002, p.240-263.

DRANSFIELD, E. Modelling *post-mortem* tenderization-IV: role of calpains and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, Champaign, GBR, v.34, n.2, p.217-239, 1993.

FERREIRA, G.B. **Avaliação do tempo de transporte e descanso de bovinos e seus efeitos na qualidade da carne em carcaças estimuladas eletricamente.** 2005. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing *post mortem* changes in porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.49, n.10, p.4531-4537, set. 2001.

LAMETSCH, R. et al. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.84, n.4, p.918-924, abr. 2006.

LAMETSCH, R. et al. *Post-mortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.51, n.24, p.6992-6997, out. 2003.

MORGAN, J.B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in *longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.71, n.6, p.1471-1476, jun. 1993.

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.71, n.2, p.408-414, fev. 1993.

OLIVEIRA, A.L. Maciez da carne bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, BRA, n.33, p.7-18, 2000.

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

PFLANZER, S.B.; FELÍCIO, P.E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, Champaign, GBR, v.83, n.4, p.697-701, dez. 2009.

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

RUBENSAM, J.M; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, BRA, v.18, n.4, p.405-409, 1998.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.84, n.2, p.291-299, fev. 2006.

SHACKELFORD, S.D. et al. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.69, n.1, p.171-177, jan. 1991a.

SHACKELFORD, S.D. et al. Predictors of beef tenderness: development and verification. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v.56, n.5, p.1130-1135, set. 1991b.

WHEELER, T.L.; SAVEKK, J.W.; CROSS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4206-4220, dez. 1990.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. The extent of proteolysis is independent of sarcomere length in lamb *Longissimus* and *psoas major*. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.77, n.9, p.2444-2451, set. 1999.

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

WHIPPLE, G. et al. Predicting beef-*longissimus* tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v.68, n.12, p.4193-4199, dez. 1990a.

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

ZAPATA, I.; ZERBY, H.N.; WICK, M. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and tenderness differential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v.57, n.11, p.4956-4963, mai. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – *Spots* significativos com efeito principal para UOGCAST e/ou CAPN no tempo um dia de maturação

SPOT	UOGCAST	MED	EP	SPOT	CAPN	MED	EP
17	CC	0,1263	0,02591 B	75	CT	0,8616	0,04137 A
17	CG	0,2937	0,02591 A	75	TT	0,5227	0,04137 B
17	GG	0,3225	0,02591 A				

APÊNDICE B – *Spots* significativos com efeito de interação CAPN x UOGCAST no tempo um dia de maturação

SPOT	UOGCAST	CAPN					
		CT			TT		
		MED	EP		MED	EP	
1	CC	0,5841	0,0616	A	0,5406	0,0616	A
1	CG	0,8595	0,0616	A	0,3397	0,0616	B
1	GG	0,3771	0,0616	B	0,6091	0,0616	A
41	CC	0,5412	0,0349	A	0,3400	0,0349	B
41	CG	0,3634	0,0349	B	0,6032	0,0349	A
41	GG						
145	CC	3,1644	0,1733	A	1,4913	0,1733	B
145	CG	1,0128	0,1415	B	3,1740	0,1415	A
145	GG	3,8379	0,1415	A	2,6933	0,1733	B

APÊNDICE C – *Spots* significativos com efeito principal para UOGCAST e/ou CAPN no tempo 7 dias de maturação

SPOT	UOGCAST	MED	EP		SPOT	CAPN	MED	EP	
56	CC	0,2880	0,0122	B	56	CT	0,2900	0,0100	B
56	CG	0,3230	0,0122	B	56	TT	0,3958	0,0100	A
56	GG	0,4176	0,0122	A					
57	CC	0,4656	0,0252	C					
57	CG	0,5859	0,0252	B					
57	GG	0,7321	0,0252	A					
158	CC	1,0889	0,0752	A					
158	CG	0,7768	0,0841	B					
158	GG	0,3781	0,0752	C					

APÊNDICE D – *Spots* significativos com efeito de interação CAPN x UOGCAST no tempo 7 dias de maturação

SPOT	UOGCAST	CAPN					
		CT			TT		
		MED	EP		MED	EP	
2	CC	1,3297	0,0828	B	2,3979	0,0828	A
2	CG	1,6837	0,0828	A	1,0572	0,0828	B
2	GG	1,1817	0,0828	A	0,4842	0,0828	B
4	CC	2,8757	0,1843	A	1,1626	0,1843	B
4	CG	1,6977	0,1843	B	2,8556	0,1843	A
4	GG	2,5664	0,1843	B	3,9134	0,1843	A
15	CC	0,6257	0,0488	B	0,8911	0,0488	A
15	CG	0,3122	0,0488	B	0,7063	0,0488	A
15	GG	0,8414	0,0488	A	0,5554	0,0488	B
49	CC	0,2439	0,0218	B	0,3481	0,0218	A
49	CG	0,1026	0,0218	B	0,3510	0,0218	A
49	GG	0,3361	0,0218	A	0,2648	0,0218	B
51	CC	0,1287	0,0095	B	0,1916	0,0095	A
51	CG	0,0645	0,0095	B	0,1581	0,0095	A
51	GG	0,1446	0,0095	A	0,1266	0,0095	A
173	CC	0,4395	0,0280	A	0,1188	0,0228	B
173	CG	0,1433	0,0280	A	0,0808	0,0228	A
173	GG	0,1106	0,0228	A	0,1441	0,0228	A

APÊNDICE E – *Spots* significativos com efeito principal para UOGCAST e/ou CAPN no tempo 14 dias de maturação

SPOT	UOGCAST	MED	EP		SPOT	CAPN	MED	EP	
73	CC	0,1988	0,0136	A	44	CT	0,2757	0,0274	B
73	CG	0,1020	0,0136	B	44	TT	0,4671	0,0274	A
73	GG	0,0825	0,0136	B					
87	CC	0,2222	0,0107	A	48	CT	0,2169	0,0107	A
87	CG	0,1489	0,0107	B	48	TT	0,1343	0,0107	B
87	GG	0,1209	0,0107	B					
114	CC	0,0847	0,0062	A					
114	CG	0,0349	0,0055	C					
114	GG	0,0625	0,0055	B					

APÊNDICE F – *Spots* significativos com efeito de interação CAPN x UOGCAST no tempo 14 dias de maturação

SPOT	UOGCAST	CAPN					
		CT			TT		
		MED	EP		MED	EP	
10	CC	0,8990	0,0413	B	1,1929	0,0413	A
10	CG	0,8261	0,0413	A	0,8452	0,0413	A
10	GG	1,0087	0,0413	A	0,5831	0,0413	B
113	CC	0,9092	0,0427	A	0,2939	0,0523	B
113	CG	0,6616	0,0427	A	0,4568	0,0427	B
113	GG	0,6100	0,0427	A	0,6070	0,0427	A

APÊNDICE G - Resumo das análises de correlação entre as principais variáveis qualitativas variáveis indicadoras (número de alelos favoráveis e intensidades do volume de expressão normalizados dos *spots*) para amostras de carne com um dia *post mortem*

Variáveis indicadoras	Variáveis qualitativas													
	pH1h	pH24h	L*1d	a*1d	b*1d	L*14d	a*14d	b*14d	PPC1d	PPC7d	PPC14d	FC1d	FC7d	FC14d
UOG_S	-0,299	0,068	0,317	-0,005	0,061	0,568	-0,009	0,323	-0,083	0,201	-0,212	-0,116	-0,288	-0,625
H ₀ : $\rho=0$	0,243	0,796	0,216	0,984	0,816	0,022	0,973	0,222	0,759	0,439	0,414	0,658	0,263	0,007
CAPN_S	0,241	0,123	-0,342	0,332	0,328	-0,351	0,330	0,238	0,215	0,069	0,132	-0,646	-0,558	-0,518
H ₀ : $\rho=0$	0,351	0,639	0,180	0,194	0,199	0,183	0,212	0,375	0,424	0,791	0,615	0,005	0,020	0,033
SPOT_01	-0,286	-0,390	-0,394	0,650	0,494	-0,090	0,473	0,540	0,367	0,362	0,440	-0,008	-0,103	-0,091
H ₀ : $\rho=0$	0,267	0,122	0,117	0,005	0,044	0,739	0,064	0,031	0,162	0,153	0,077	0,975	0,695	0,729
SPOT_17	0,225	-0,127	-0,463	0,132	0,009	-0,635	0,191	-0,180	0,090	-0,242	0,404	0,114	0,320	0,662
H ₀ : $\rho=0$	0,384	0,628	0,061	0,615	0,973	0,008	0,479	0,504	0,741	0,350	0,108	0,662	0,211	0,004
SPOT_41	-0,199	-0,406	-0,407	0,464	0,289	-0,315	0,281	0,207	0,318	0,181	0,430	0,282	0,353	0,410
H ₀ : $\rho=0$	0,445	0,106	0,105	0,061	0,260	0,234	0,291	0,441	0,230	0,487	0,085	0,274	0,164	0,102
SPOT_145	0,335	0,379	0,144	-0,441	-0,332	-0,193	-0,362	-0,498	-0,242	-0,348	-0,310	-0,165	0,117	0,010
H ₀ : $\rho=0$	0,189	0,133	0,582	0,077	0,193	0,475	0,168	0,050	0,366	0,172	0,226	0,526	0,655	0,969

APÊNDICE H - Resumo das análises de correlação entre as principais variáveis qualitativas variáveis indicadoras (número de alelos favoráveis e intensidades do volume de expressão normalizados dos *spots*) para amostras de carne com 7 dias *post mortem*

Variáveis indicadoras	Variáveis qualitativas													
	pH1h	pH24h	L*1d	a*1d	b*1d	L*7d	a*7d	b*7d	PPC1d	PPC7d	PPC14d	FC1d	FC7d	FC14d
UOG_S	-0,299	0,068	0,317	-0,005	0,061	0,493	-0,176	-0,013	-0,083	0,201	-0,212	-0,116	-0,288	-0,625
H ₀ : $\rho=0$	0,243	0,796	0,216	0,984	0,816	0,044	0,498	0,961	0,759	0,439	0,414	0,658	0,263	0,007
CAPN_S	0,241	0,123	-0,342	0,332	0,328	-0,227	0,274	0,296	0,215	0,069	0,132	-0,646	-0,558	-0,518
H ₀ : $\rho=0$	0,351	0,639	0,180	0,194	0,199	0,382	0,288	0,248	0,424	0,791	0,615	0,005	0,020	0,033
SPOT_02	-0,087	0,010	0,232	0,053	0,127	0,444	-0,146	0,044	0,055	0,267	-0,157	-0,197	-0,558	-0,503
H ₀ : $\rho=0$	0,739	0,971	0,371	0,840	0,627	0,074	0,576	0,866	0,839	0,300	0,548	0,449	0,020	0,040
SPOT_04	0,028	0,027	-0,096	-0,130	-0,172	-0,333	0,049	-0,114	-0,103	-0,233	0,030	0,226	0,578	0,403
H ₀ : $\rho=0$	0,915	0,919	0,713	0,619	0,508	0,191	0,852	0,662	0,703	0,367	0,908	0,383	0,015	0,109
SPOT_15	0,240	0,359	0,576	-0,623	-0,412	0,310	-0,634	-0,522	-0,282	-0,121	-0,613	-0,047	-0,174	-0,172
H ₀ : $\rho=0$	0,353	0,157	0,016	0,008	0,100	0,227	0,006	0,032	0,291	0,645	0,009	0,857	0,504	0,509
SPOT_49	0,191	0,326	0,547	-0,681	-0,504	0,227	-0,623	-0,572	-0,350	-0,234	-0,542	0,132	0,097	0,072
H ₀ : $\rho=0$	0,463	0,201	0,023	0,003	0,039	0,380	0,008	0,017	0,184	0,366	0,025	0,613	0,710	0,782
SPOT_51	0,064	0,273	0,637	-0,629	-0,444	0,399	-0,640	-0,535	-0,320	-0,100	-0,585	0,159	0,019	-0,071
H ₀ : $\rho=0$	0,806	0,289	0,006	0,007	0,074	0,112	0,006	0,027	0,227	0,702	0,014	0,543	0,944	0,786
SPOT_56	0,000	-0,203	0,014	-0,134	-0,183	-0,148	-0,014	-0,125	0,001	-0,060	0,050	0,535	0,539	0,741
H ₀ : $\rho=0$	0,999	0,435	0,959	0,609	0,482	0,571	0,958	0,633	0,996	0,818	0,850	0,027	0,025	0,001
SPOT_57	0,168	-0,036	-0,026	-0,272	-0,297	-0,293	-0,080	-0,228	-0,116	-0,270	0,029	0,403	0,544	0,761
H ₀ : $\rho=0$	0,519	0,890	0,921	0,292	0,246	0,254	0,761	0,378	0,669	0,294	0,912	0,109	0,024	0,000
SPOT_158	-0,294	0,029	0,133	0,175	0,199	0,366	0,004	0,141	0,014	0,229	-0,073	-0,231	-0,334	-0,685
H ₀ : $\rho=0$	0,251	0,912	0,611	0,502	0,444	0,148	0,987	0,589	0,960	0,377	0,779	0,373	0,191	0,002
SPOT_173	-0,132	0,148	0,080	0,085	0,128	0,117	0,008	0,064	0,002	0,120	-0,173	-0,303	-0,164	-0,630
H ₀ : $\rho=0$	0,615	0,571	0,760	0,747	0,624	0,655	0,976	0,807	0,995	0,648	0,507	0,238	0,530	0,007

APÊNDICE I - Resumo das análises de correlação entre as principais variáveis qualitativas variáveis indicadoras (número de alelos favoráveis e intensidades do volume de expressão normalizados dos *spots*) para amostras de carne com 14 dias *post mortem*

Variáveis indicadoras	Variáveis indicadoras													
	pH1h	pH24h	L*1d	a*1d	b*1d	L*7d	a*7d	b*7d	PPC1d	PPC7d	PPC14d	FC1d	FC7d	FC14d
UOG_S	-0,299	0,068	0,317	-0,005	0,061	0,493	-0,176	-0,013	-0,083	0,201	-0,212	-0,116	-0,288	-0,625
H ₀ :p=0	0,243	0,796	0,216	0,984	0,816	0,044	0,498	0,961	0,759	0,439	0,414	0,658	0,263	0,007
CAPN_S	0,241	0,123	-0,342	0,332	0,328	-0,227	0,274	0,296	0,215	0,069	0,132	-0,646	-0,558	-0,518
H ₀ :p=0	0,351	0,639	0,180	0,194	0,199	0,382	0,288	0,248	0,424	0,791	0,615	0,005	0,020	0,033
SPOT_10	0,146	0,247	0,389	-0,247	-0,081	0,410	-0,395	-0,201	-0,098	0,100	-0,402	-0,317	-0,609	-0,540
H ₀ :p=0	0,577	0,340	0,123	0,339	0,757	0,102	0,117	0,440	0,719	0,701	0,109	0,215	0,010	0,025
SPOT_44	-0,344	-0,230	0,248	-0,137	-0,174	0,289	-0,140	-0,133	-0,120	0,042	0,011	0,609	0,428	0,425
H ₀ :p=0	0,176	0,376	0,336	0,600	0,505	0,261	0,591	0,612	0,659	0,873	0,967	0,010	0,086	0,089
SPOT_48	-0,054	0,044	-0,260	0,332	0,291	-0,152	0,295	0,281	0,139	0,091	0,126	-0,386	-0,175	-0,475
H ₀ :p=0	0,836	0,868	0,314	0,193	0,258	0,560	0,251	0,275	0,609	0,730	0,630	0,126	0,501	0,054
SPOT_73	-0,177	0,164	0,192	0,045	0,115	0,280	-0,083	0,031	-0,031	0,164	-0,236	-0,314	-0,286	-0,746
H ₀ :p=0	0,497	0,530	0,460	0,864	0,659	0,277	0,752	0,906	0,910	0,529	0,362	0,219	0,266	0,001
SPOT_87	-0,201	-0,001	0,293	0,085	0,163	0,506	-0,138	0,061	0,069	0,353	-0,229	-0,177	-0,495	-0,638
H ₀ :p=0	0,440	0,996	0,254	0,746	0,531	0,038	0,597	0,815	0,798	0,164	0,376	0,498	0,043	0,006
SPOT_113	0,025	0,070	-0,289	0,273	0,231	-0,257	0,285	0,233	0,117	0,012	0,124	-0,360	-0,084	-0,346
H ₀ :p=0	0,925	0,788	0,261	0,290	0,372	0,319	0,268	0,369	0,666	0,963	0,634	0,156	0,749	0,174
SPOT_114	-0,066	0,051	0,545	-0,294	-0,150	0,476	-0,418	-0,267	-0,051	0,246	-0,504	0,141	-0,152	-0,225
H ₀ :p=0	0,802	0,845	0,024	0,252	0,566	0,053	0,095	0,301	0,851	0,341	0,039	0,590	0,561	0,385