

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da
raça Nelore**

Minos Esperândio Carvalho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal
e Pastagens

**Piracicaba
2012**

Minos Esperândio Carvalho
Zootecnista

**Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça
Nelore**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal
e Pastagens

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Carvalho, Minos Esperândio

Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore /
Minos Esperândio Carvalho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr
6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

65 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bovinos de corte 2. Carnes - Maciez 3. Expressão gênica 4. Proteômica
I. Título

CDD 636.2082
C331e

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais e irmãos, que sempre me incentivaram e apoiaram nos
caminhos que decidi seguir.....*

E OFEREÇO.....

*a minha especial companheira Rachel e a nossa pessoinha Luísa,
por me acompanharem sempre.....*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha companheira *Rachel*, por me acompanhar, ajudar, e suportar meus ânimos e desânimos durante esse período.

Aos meus pais e irmãos por sempre me incentivarem nos caminhos que resolvi seguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela oportunidade e pela orientação permanente durante o desenvolvimento do projeto, buscando recursos e entendimentos para solucionar as questões encontradas nos nossos trabalhos.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal, pela ajuda e convivência durante o período: Aurea, Nirlei, Millor, Jorge, Priscila, Dênia, Fábio, Renato, Mila, Marcela....

A Andrezza minha colega antiga de FZEA e inglês..... Ao parceiro de projeto e coletas! Gustavo! sempre disposto a ajudar em tudo que possível!!

Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão pelo apoio, parceria e auxílio nas análises!

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro e seu grupo: Alessandra, Mirele, Cris, Vanessa, Bárbara e Fábio, pelo suporte em nossas análises 2-DE....trabalho demorado, mas com muitos resultados....

Ao Prof. Dr. Carlos Labate, por nos ajudar em toda parte de seqüenciamento de peptídeos e discussão de resultados...

Ao Prof. Dr. Saulo Luz e Silva, que possibilitou trabalharmos com as amostras e fenótipos de seus experimentos em Nelore.

A Embrapa e em particular a Pesquisadora Dr^a. Luciana Correia de Almeida Regitano, pela parceria no projeto com colaboração científica e fornecimento de amostras e informações do rebanho Nelore utilizado.

Ao programa Ciência Animal e Pastagem, pela oportunidade de desenvolver o projeto de doutorado e adquirir conhecimentos que nunca deixarão de me acompanhar....

Ao Prof. Dr. Sila Carneiro, coordenador do programa, que sempre me atendeu “de porta aberta” durante todo o curso para solucionar burocracias!

A CAPES, pela concessão da bolsa durante parte do curso.

Ao CNPq pelo auxílio à pesquisa para o desenvolvimento do projeto e também pela concessão da bolsa na parte final do curso.

BIOGRAFIA

Minos Esperândio Carvalho ingressou no curso de Zootecnia, da *Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA)*, da Universidade de São Paulo (USP) em 2001. Estagiou no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento sob orientação do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles entre o 2º Semestre de 2002 até o final de 2004. No 1º semestre de 2005 desenvolveu o estágio curricular, sendo supervisionado pela pesquisadora Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, no Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste da Embrapa, São Carlos – SP, formando em Zootecnia em julho de 2005. No 2º semestre de 2005 foi bolsista FAPESP de treinamento técnico na empresa DNAconsult, São Carlos – SP. Em 2006 iniciou o mestrado, como bolsista FAPESP, no programa Qualidade e Produtividade Animal, da FZEA – USP e desenvolveu o projeto de mestrado “*Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados a maciez da carne em bovinos da raça Nelore*”, sob orientação do Prof. Dr. Joanir Pereira Eler. Em julho de 2008 ingressou no curso de doutorado, do programa de Ciência Animal e Pastagem, da Escola Superior de Agricultura “*Luiz de Queiroz*” - USP, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho para desenvolver o projeto de “*Estudo de Genes Associados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore*”.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivos Geral.....	18
1.2 Objetivos específicos.....	18
Referências.....	18
2 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES À MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE	
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.1 Animais avaliados e amostras coletadas.....	24
2.2.2 Análises de maciez da carne (Força de cisalhamento).....	24
2.2.3 Descrição dos genes investigados.....	25
2.2.4 Amplificação e identificação dos polimorfismos.....	25
2.2.5 Caracterização das informações fenotípicas avaliadas e da estrutura genética da população.....	25
2.2.6 Extração do RNA e reação de transcrição reversa.....	26
2.2.7 Caracterização do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real.....	26
2.2.8 Eficiência de Amplificação e Normalização dos Dados.....	27
2.2.9 Efeito genotípico dos marcadores SNP sobre a expressão gênica.....	28
2.2.10 Análise estatística de associação.....	29
2.3 Resultados e Discussão.....	30
2.3.1 Análises de força de cisalhamento.....	30
2.3.2 Genótipos dos polimorfismos para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1...	31
2.3.3 Quantificação da expressão gênica.....	31
2.3.4 Análise com modelo reduzido.....	32
2.3.5 Análise com modelo completo.....	35
2.4 Conclusões.....	36
Referências.....	36

3 PROTEÍNAS DE “HEAT SHOCK” E ESTRUTURAIAS ASSOCIADAS COM MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Material e Métodos.....	44
3.2.1 Animais avaliados e coleta de amostras.....	44
3.2.2 Análises de maciez da carne (força de cisalhamento)	44
3.2.3 Estratégia para análise proteômica.....	45
3.2.4 Preparação da amostra para Eletroforese Bi-Dimensional.....	46
3.2.5 Realização da Eletroforese Bi-Dimensional.....	46
3.2.6 Análise do mapa “in silico”.....	47
3.2.7 Análise do perfil diferencial de proteínas.....	47
3.2.8 Purificação e digestão <i>in-gel</i> das proteínas.....	47
3.2.9 Sequenciamento de peptídeos por LC-MS/MS.....	48
3.3 Resultados e Discussão.....	48
3.3.1 Análises de força de cisalhamento.....	48
3.3.2 Informações descritivas dos extremos selecionados para análise de proteínas.....	49
3.3.3 Spots detectados com diferentes quantidades nas análises de eletroforese bi-dimensional.....	50
3.3.4 Variação na quantidade das proteínas entre os extremos fenotípicos de força de cisalhamento e sequenciamento de peptídeos por LC-MS/MS.....	52
3.3.5 Proteínas relacionadas a organização celular e ao estresse.....	54
3.3.6 Proteínas estruturais.....	55
3.3.7 Demais proteínas identificadas.....	56
3.4 Conclusões.....	57
Referências.....	57
ANEXO.....	61

RESUMO

Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore

O Brasil é o maior exportador de carne bovina mundial com aproximadamente 1,7 mil toneladas, e o segundo em produção, estando atrás apenas dos Estados Unidos. A produção brasileira está embasada em técnicas extensivas de produção. No entanto, esse sistema de produção exige rebanhos resistentes as grandes adversidades encontradas no ambiente. Os bovinos da raça Nelore, de origem *Bos taurus indicus*, são predominantes no rebanho brasileiro, devido sua elevada resistência ao ambiente tropical e seu potencial de produção. Estudos sobre a ciência da carne estão sendo realizados para avançar na seleção de animais que atendam com qualidade os consumidores, pois bovinos de origem *Bos taurus indicus* são conhecidos por produzirem carne de menor maciez quando comparado as raças de origem taurina. Com o objetivo de descobrir possíveis genes que estejam associados a força de cisalhamento da carne de animais da raça Nelore, foi avaliada no presente estudo, em uma primeira população (n=76), a expressão de genes que codificam proteínas da família de "heat shock": *CRYAB*, *HSPB1* e *DNAJA1*, e genes envolvidos na proteólise do tecido muscular: μ -calpaína (*CAPN1*), *calpastatina* (*CAST*) e duas isoformas do gene da *calpastatina*. A maior expressão do gene *CRYAB* foi associada a maior maciez da carne (menor força de cisalhamento) aos sete e 14 dias de maturação, enquanto a maior expressão do gene *CAPN1* foi associada negativamente com a menor força de cisalhamento, na análise de 24 horas após abate, e positivamente com 14 dias de maturação da carne. No estudo também foi avaliado uma distinta população (n=138), quanto a diferença do perfil proteômico de amostras do músculo *Longissimus dorsi*, com auxílio da eletroforese bi-dimensional (2-DE), seguido do sequenciamento peptídico por espectrometria de massas (EM), para identificação das proteínas com diferentes quantidades nos extremos fenotípicos de força de cisalhamento da carne. Foram observados 17 spots com diferentes volumes entre os extremos fenotípicos ($P \leq 0,05$), sendo 13 deles identificados. Entre as identificações estão proteínas estruturais, relacionadas a proteção celular, metabolismo energético e lipídico, e proteínas não caracterizadas. Baseado nos resultados existe a possibilidade de traçar um perfil protéico, ou com fragmentos protéicos, para identificar amostras que proporcionem carne de maior maciez.

Palavras-chave: Expressão gênica; Maciez; Nelore; Proteômica

ABSTRACT

Study of genes associated with tenderness in Nelore cattle

Brazil is the largest beef exporter of the world with approximately 1.7 tons per year and the second in production, behind only the United States. The Brazilian system production is based on extensive techniques. However, this system requires herds resistant to environmental adversities. The Nelore cattle, (*Bos taurus indicus*) is predominant in the Brazilian herd due to its high resistance to the tropical environment and its potential to meat production. Studies on meat science are being made to evolve the selection of animals that meet quality consumers. *Bos taurus indicus* cattle are known to produce less tender meat compared to *Bos taurus* breeds. In order to find possible genes that are associated with the shear force of meat, this study evaluated in a first study population (n = 76) the expression of genes that encode proteins of the "heat shock" family: *CRYAB*, *HSPB1*, *DNAJA1*, and genes involved in proteolysis of the muscular tissue: μ -calpain (*CAPN1*), calpastatin (*CAST*) and two isoforms of the calpastatin gene. The higher expression of *CRYAB* was associated with increased meat tenderness (smaller shear force) at seven and 14 days of maturation, while the *CAPN1* gene expression was negatively associated with lower shear force in the analysis 24 hours after slaughter and positively with 14 days of maturation. The study also evaluated a different population (n = 138) and the difference in the proteomic profile of *Longissimus dorsi* muscle samples using two-dimensional electrophoresis (2-DE), followed by peptide sequencing by mass spectrometry (MS) to identify proteins expressed in the two meat shear force extremes. It was verified 17 differentially expressed spots between the phenotypic extremes ($P \leq 0.05$), but only 13 were could be identified. Among the identifications, there are structural proteins related to cell protection, lipid and energy metabolism and uncharacterized proteins. Based on these results, it is possible to trace a protein expression profile, or protein fragments in order to identify samples to provide meat more tender.

Keywords: Gene expression; Tenderness; Nelore; Proteomics

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção brasileira de bovinos de corte foi de 7,5 mil de toneladas de equivalente carcaça em 2011, o que confere ao Brasil a segunda posição mundial em termos de produção. Os Estados Unidos permanece como o maior produtor, sendo cerca de 11,5 mil toneladas de equivalente carcaça produzidas no ano de 2011. A respeito das exportações, o Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo, seguido de países como: Austrália, Estados Unidos, Índia e Canadá (FNP, 2011). A projeção do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil ainda em 2007, é que até o ano de 2017 o Brasil se mantenha como o maior exportador de carne mundial.

A produção de carne bovina no Brasil está embasada, na sua grande maioria, em técnicas extensivas de produção, fato este justificado pelas grandes extensões de pastagens existentes no país. No entanto, uma especificidade é exigida para que esse sistema de produção seja funcional: os rebanhos devem ser resistentes as grandes adversidades encontradas no ambiente.

Os animais *Bos taurus indicus* têm sido preferidos nas regiões tropicais, devido sua resistência às doenças e grande tolerância ao calor. Entretanto, em relação à característica maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal (CROUSE et al., 1989).

A questão da pior textura da carne dos animais de origem *Bos taurus indicus*, quando comparados com animais *Bos taurus taurus*, não é nova e já foram bem reportadas nos trabalhos de Ramsey et al. (1963), Shackelford et al. (1991). O menor nível enzimático das calpaínas e o maior nível da calpastatina em animais *Bos taurus indicus*, seria umas das razões para menor maciez da carne nesses animais (WHIPPLE et al., 1990).

O`Connors et al. (1997) compararam animais *indicus* compostos *versus taurus* quanto à maciez e concluíram que a maior maciez da carne é observada em animais *taurus*. Os autores ainda sugerem o uso inferior (até 25%) de genética *Bos taurus indicus* para obter carne com maior maciez. Todavia, os resultados obtidos por Hadlich et al. (2006) demonstraram que é possível se obter carne com maciez desejável, em animais jovens da raça Nelore com apenas sete dias de maturação. Este fato mostra a existência da variabilidade dentro da raça e justifica a possibilidade da seleção e melhoramento dessa característica.

Trabalhos conduzidos com *Bos taurus taurus* têm evidenciado que as proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *pos mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez da carne.

Koohmaraie (1996) reporta que a protease μ -calpaína (CAPN1) degrada as proteínas miofibrilares do músculo no *pos mortem* e que, este fato por si só, já justificaria ser um dos mais importantes alvos para entendimento do complexo mecanismo que estaria associado à característica maciez.

A calpastatina (CAST), proteína inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *pos mortem* (KOOHMARAIE, 1988). No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (MORGAN et al., 1993). Observações da atividade da calpastatina realizadas por Pringle et al. (1997), detectaram aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos taurus indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos.

Ainda, em *Bos taurus taurus*, estudos recentes mostraram que a expressão de genes anti-apoptóticos, proteínas de “Heat Shock”, estão correlacionados com a maciez da carne de bovinos (BERNARD et al., 2007).

Estudos do nosso grupo (dados ainda não publicados) demonstraram que, marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) para o gene CAPN1 e da calpastatina que foram identificados em *Bos taurus taurus*, também apresentaram resultados favoráveis e foram significativamente associados com maciez em animais da raça Nelore, de origem *Bos taurus indicus*.

Para estudos de expressão gênica, a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), vem sendo amplamente empregada. É um método bastante sensível e preciso para tal objetivo (GIULLETE et al., 2001). A quantificação relativa é baseada na expressão relativa do gene de interesse versus um gene de referência e deve ser utilizada quando o objetivo é comparar diferenças de expressão gênica entre tratamentos (LIVAK; SCHIMTTGEN, 2001).

Killefer e Koohmaraie 1994 estudaram a expressão gênica da calpastatina, e identificaram uma maior expressão de mRNA da calpastatina em bovinos, quando tratados com agonistas beta-adrenérgicos, seguido de maior atividade da calpastatina, no músculo *Longissimus dorsi*.

Takano et al. (2000) pesquisando a estrutura do gene da calpastatina em ratos, reportou a partir de transcritos do mRNA, que a calpastatina é codificada em quatro isoformas. Os mRNA dos tipos I e III são expressos em níveis elevados no fígado, o tipo II mRNA foi abundantemente expresso no coração e músculo esquelético, seguido de níveis mais baixos no cérebro, fígado e testículos. O tipo IV teve expressão marcante no testículo. Segundo Raynaud et al., em 2005, as mesmas sequencias de transcritos são encontradas nos bovinos.

Com o mesmo objetivo dos estudos de marcadores genômicos e de expressão dos genes de interesse, a proteômica, denominada de estudo funcional dos genes, tem grande potencial para busca de biomarcadores (HOCQUETE et al., 2009). Segundo Wilkins et al. (1996), proteoma seria o equivalente protéico do genoma, ou seja, o total expresso de proteínas na célula quando esta recebe um estímulo. O primeiro perfil protéico foi reportado por Ghaemmaghami et al. (2003). Bouley et al. (2005) reportaram o primeiro estudo de proteômica relacionado com hipertrofia muscular nos bovinos. Caracterizações de mapas protéicos já foram relatadas em espécies de produção por Lamestch et al. (2002), em suínos; Bouley et al. (2004), em bovinos e Doherty et al. (2004), em aves.

Novas orientações surgiram na ciência da carne com o desenvolvimento de métodos de análises da regulação dos genes e proteínas do tecido muscular. Bendixen (2005) reporta que a implementação da proteômica é um passo importante na produção animal sustentável. Técnicas de análise de proteomas podem, além de obter a expressão protéica, revelar as funções de genes e ainda explicar interações genéticas e ambientais que podem controlar as funções celulares e as características fisiológicas dos organismos vivos.

Para Hocquete et al. (2007), o conhecimento de genes que controlam as características musculares e suas expressões pode trazer um melhor entendimento da fisiologia muscular e das características de qualidade da carne.

1.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral identificar genes associados com força de cisalhamento em bovinos da raça Nelore, visando contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares importantes para a maciez da carne de bovinos.

1.2 Objetivos específicos

- i. Quantificar e diferenciar as expressões dos genes da μ -calpaína (CAPN1), DNAJA1, HSPB1, CRYAB e da calpastatina (CAST), com suas duas isoformas, por meio PCR em Tempo Real (RT-PCR), em bovinos da raça Nelore;
- ii. Relacionar as informações obtidas pela técnica de RT-PCR, visando obter um melhor entendimento do complexo calpaína/calpastatina, e de outros genes que hipoteticamente estariam relacionados com maciez da carne em bovinos;
- iii. Quantificar relativamente os spots peptídicos com diferentes volumes por eletroforese bi-dimensional, diferenciando os perfis de proteínas em animais da raça Nelore que apresentarem carne de maior e menor maciez;
- iv. Identificar as proteínas que estão com diferentes quantidades, por espectrometria de massas, da carne de maior e menor maciez em animais da raça Nelore.

Referências

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, Barking, v. 71, p. 138–149, 2005.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression

of specific genes. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 55, n. 13, p. 5229-5237, 2007.

BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 1811-1824, 2004.

BOULEY, J.; MEUNIER, B.; CHAMBON, C.; DE SMET, S.; HOCQUETTE, J.F.; PICARD, B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 490–500, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 24 maio 2008.

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

DOHERTY, M.K.; MCLEAN, L.; HAYTER, J.R.; PRATT, J. M.; ROBERTSON, D.H.; EL-SHAFEI, A.; GASKELL, S.J.; BEYNON, R.J. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 7, p. 2082–2093, 2004.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **ANUALPEC 2011**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Ed. Argos Comunicações, 2011. 378 p.

GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W.K.; BOWER, K.; HOWSON, R.W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; O'SHEA, E.K.; WEISSMAN, J.S. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, London, v. 425, n. 6959, p. 737–741, 2003.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, New York, v. 25, p. 386-401, 2001.

HADLICH, J.C.; MORALES, D.C.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.N.; CHARDULO, L.A.L. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 57-62, 2006.

HOCQUETTE, J.F.; CASSAR-MALEK, I.; BERNARD-CAPEL, C.; PICARD, B. Functional genomics and new markers for beef production: mini review. **Animal Science Papers and Reports**, Jastrzębiec, v. 27, n. 4, p. 273-280, 2009.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, New York, v. 1, p. 159–173, 2007.

- KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, p. 606-614, 1994.
- LAMETSCH, R.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 20, p. 5508–5512, 2002.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2. CT method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.
- O'CONNERS, S.F.; TATUN, J.D.; WULF, D.M.; GREEN, R.D.; SMITH, G.C. Genetics effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos Taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 1822-1830, 1997.
- RAMSEY, C.B.; COLE, J.W.; MEYER, B.H.; TEMPLE, R.S. Effects of type and breed of British, zebu and dairy cattle on production, palatability and composition. II. Palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels. **Journal Animal Science**, Albany, v. 22, n. 4, p. 1001-1008, 1963.
- RAYNAUD, P.; JAYAT-VIGNOLES, C.; LAFORET, M. P.; LEVEZIEL, H.; AMARGER, V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 437, p. 69–77, 2005.
- SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. An evaluation of tenderness of the *Longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal Animal Science**, Albany, v. 69, p. 171-177, 1991.
- TAKANO, J.; WATANABE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 128, p. 83–92, 2000.
- WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 74, p. 2394, 1990.
- WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, New York, v. 14, n. 1, p. 61–65, 1996.

2 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES À MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Resumo

A maciez da carne é uma característica de extrema importância para satisfação do consumidor. Bovinos da raça Nelore, de origem *Bos taurus indicus*, são conhecidos por produzirem carne de menor maciez quando comparados às raças de origem taurina. Com o objetivo de descobrir possíveis genes que estejam associados a força de cisalhamento da carne de animais da raça Nelore, no presente estudo avaliou-se a expressão dos genes que codificam proteínas da família de “heat shock”: CRYAB, HSPB1 e DNAJA1, e genes envolvidos na proteólise do tecido muscular: da μ -calpaína (CAPN1) e de diferentes isoformas da calpastatina (CAST). A maior expressão do gene CRYAB foi associado a maior maciez da carne (menor força de cisalhamento) aos sete e 14 dias de maturação ($P < 0,02$). Enquanto a maior expressão do gene da CAPN1 foi associada negativamente com a maior maciez (menor força de cisalhamento) na análise de 24 horas após abate e positivamente com 14 dias de maturação da carne ($P < 0,05$). Baseado nos resultados é possível sugerir que a expressão diferenciada dos genes CAPN1 e CRYAB podem ser potenciais marcadores de maciez em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*).

Palavras-chave: Expressão gênica; μ -Calpaína; Calpastatina; Maciez; Nelore

Abstract

Meat tenderness is a trait of extreme importance to customer satisfaction. The Nelore cattle, a *Bos taurus indicus* origin breed, are known to produce less tender meat when compared to *Bos taurus taurus* breeds. In order to find possible genes that are associated with meat shear force from these animals, in the present study we evaluated the expression of genes that encode proteins of the heat shock family (CRYAB, HSPB1 and DNAJA1), and genes involved in the of muscular tissue proteolysis, with are the μ -calpain (CAPN1) and different isoforms of calpastatin (CAST). The higher expression of the CRYAB gene was associated ($P < 0.02$) with increased tenderness (lower shear force) at 7 and 14 days of aging, while the μ -calpain expression levels had different effects on shear force depending of the aging period: higher expression level is associated with higher shear force at 24 hours after slaughter, but it is related with lower shear force at 14 days meat aging ($P < 0.05$). Based on these results, we suggest that the differential expression of the CRYAB and CAPN1 genes may act as potential markers for meat tenderness in Nelore.

Keywords: Gene Expression; μ -Calpain; Calpastatin; Nelore; Tenderness

2.1 Introdução

A maciez da carne (força de cisalhamento) é uma característica crítica, uma vez que está diretamente relacionada à satisfação do consumidor. Dentre as características ligadas à qualidade da carne *in natura*, a maciez se destaca por ser a mais desejada pelo consumidor (KOOHMARAIE et al., 2002). Particularmente neste aspecto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à maior maciez da carne (PAGE et al., 2004).

A maciez da carne pode ser avaliada pela análise sensorial, medida subjetiva e realizada por degustadores, pela força mecânica de cisalhamento, medida objetiva e realizada pelo aparelho *Warner Bratzler*, como descrito por Wheeler et al. (1995), sendo ambos os métodos altamente correlacionados, ou ainda, por meio do índice de fragmentação miofibrilar (MFI). Pelo MFI, maiores valores indicam maior fragmentação miofibrilar, indicando maior maciez da carne (CULLER et al., 1978).

Trabalhos têm evidenciado que as proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *pos mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez, sendo considerada uma extensão do processo de amaciamento (GESSINK; KOOHMARAIE, 1999).

O entendimento destas proteases tem despertado grande interesse, uma vez que a característica da maciez da carne é uma das mais importantes dentre os atributos da qualidade sensorial da carne bovina (MORGAN, 1992; KOOHMARAIE, 1994).

Koohmaraie (1996) reporta que a protease μ -calpaína degrada as proteínas miofibrilares do músculo no *pos mortem* e que, este fato por si só, já justificaria ser um dos mais importantes alvos na investigação para entendimento do complexo mecanismo que estaria associado à característica maciez. Anteriormente, Locker (1976) demonstrou que as calpaínas degradam também os "filamentos do espaço vazio" (conectinas, titinas; Maruyama et al., 1979). Assim, quando os músculos estriados são maturados, o cozimento subsequente provoca o desaparecimento dos "filamentos do espaço vazio" (enquanto as linhas Z aparecem intactas; DAVEY; GRAAFHUIS, 1976).

Dransfield (1994) reporta que a ação proteolítica das calpaínas enfraquece a interação dos filamentos finos no disco Z, do sarcolema das fibras musculares. A

ação ocorre nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T, onde encontram seu sítio de ligação específico.

A calpastatina, proteína inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *pos mortem* (Koochmaraie, 1988). As sequências helicoidais da calpastatina impedem as calpaínas de se ligarem às membranas (Mellgren et al., 1989), e os quatro domínios da calpastatina são capazes de inibir quatro moléculas de calpaínas. No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (Morgan et al., 1993). Observações da atividade da calpastatina realizadas por Pringle et al. (1997), detectaram aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos taurus indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos.

Smith et al. (2000) relataram a identificação do gene da protease neutra ativada por cálcio, μ -calpaína (CAPN1), o qual codificaria a enzima proteolítica μ -calpaína no cromossomo 29. Bishop et al. (1993) relataram identificação do gene da calpastatina (CAST) no cromossomo 7. Pelo exposto, a função fisiológica das enzimas por si só, torna esses genes candidatos para pesquisas ligadas à qualidade de carne.

Outros genes associados à maciez da carne têm sido relatados na literatura. Bernard et al. (2007) associaram a expressão do gene DNAJA1 (que codifica a proteína Hsp70, membro da família “heat shock”) com a maciez da carne de bovinos. Essa proteína é conhecida por ter a função anti-apoptótica, e a hipótese seria que a atividade anti-apoptótica poderia contribuir para retardar a morte celular durante a conversão do músculo em carne, e isso poderia influenciar na qualidade da carne no *post-mortem* (BERNARD et al., 2007).

O gene HSPB1, é outro alvo importante, por ser responsável pela resistência ao estresse e organização da actina. Bernard et al. (2007) sugerem que a sua baixa expressão pode estar associada à desorganização da actina. O gene CRYAB, outro candidato a associação com a maciez da carne, possui a função de proteger os filamentos intermediários e estabilizar as proteínas dos miofilamentos como a desmina (WANG et al., 2003). A hipótese seria também que sua menor expressão pode estar associada a degradação dos filamentos intermediários e, por conseguinte, promover uma melhor maciez a carne (BERNARD et al., 2007).

Para Hocquete et al. (2007), o conhecimento de genes que controlam as características musculares e suas expressões, podem trazer um melhor

entendimento da fisiologia muscular e das características de qualidade da carne. Assim, objetivou-se com este estudo relacionar o nível da expressão de genes envolvidos com a degradação e a proteção celular com os valores de força de cisalhamento, visando obter um melhor entendimento dos processos relacionados com maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais avaliados e coleta de amostras

A população utilizada da raça Nelore foi proveniente do Campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo, em Pirassununga.

Foi extraído o DNA dos 75 animais, empregando-se o método de extração e precipitação em NaCl, a partir de amostras de sangue, seguindo o protocolo descrito por Olerup e Zetterquist (1992).

A coleta das amostras de carnes em bifes foi realizada no abatedouro experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, da Universidade de São Paulo, localizado em Pirassununga, SP, onde os animais foram criados.

Imediatamente ao abate, as amostras para análise de expressão gênica foram coletadas do músculo *Longissimus dorsi* de 75 animais, entre a 12^a e 13^a costela na direção caudal, e armazenadas em nitrogênio líquido. Após as carcaças permanecerem 24 horas na câmara de resfriamento foram coletadas de cada animal, três amostras de aproximadamente 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, de cortes obtidos entre a 12^a e 13^a costela na direção caudal. As amostras foram identificadas individualmente, embaladas a vácuo (embaladora Selovac M160) em filme flexível de alta barreira, Polyfilm (marca registrada).

2.2.2 Análises de maciez da carne (força de cisalhamento)

Para os estudos de maciez da carne, foram realizadas as análises de força de cisalhamento em diferentes períodos de maturação a partir das três amostras do músculo *Longissimus dorsi*, maturadas a 2°C ± 1°C por 0, 7 e 14 dias, respectivamente, seguindo os protocolos recomendados pela AMSA (1995). De cada

amostra foram retiradas oito sub-amostras cilíndricas de 1,27 cm ($\frac{1}{2}$ ") de diâmetro, com auxílio de uma furadeira elétrica adaptada com vazadores de aço inoxidável, segundo recomendações de Kastner e Henrickson (1969). O cisalhamento foi realizado com a lâmina *Warner Bratzler*, equipada com balança de 25 kg de capacidade e velocidade do seccionador de 20 cm/minuto. O valor da força de cisalhamento de cada amostra foi constituído da média aritmética dos valores de força de cisalhamento obtidos das oito sub-amostras. As análises foram realizadas no Laboratório de Carnes da FZEA/USP.

2.2.3 Descrição dos genes investigados

Os genes selecionados para esse estudo de expressão gênica e associação aos fenótipos da força de cisalhamento são: DNAJA1, HSPB1, CRYAB, que estão relacionados à proteção celular e atividade anti-apoptótica; os genes CAPN1 e CAST, além de mais duas isoformas do gene CAST, que estão relacionados a proteólise do muscular após o abate.

2.2.4 Amplificação e identificação dos Polimorfismos da população

Foram genotipados os 75 animais para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1. Os genótipos foram obtidos por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* da *Applied Biosystems*. Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan[™] em que *primers* e sondas pareiam na região do DNA que contém o polimorfismo, e permitem a identificação dos diferentes alelos.

2.2.5 Caracterização das informações fenotípicas avaliadas e da estrutura genética da população

As informações fenotípicas relacionadas a maciez da carne maturada avaliada aos 0, 7 e 14 dias foram submetidas a verificações das pressuposições de análises de dados (normalidade, homogeneidade das variâncias, dentre outras). Estas análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1 (SAS, 2003), utilizando o procedimento MIXED. As frequências genotípicas dos resultados obtidos por PCR em Tempo Real foram estimadas para cada loco, por contagem simples dos diferentes genótipos, conforme descrito por Falconer e Mackay (2001).

2.2.6 Extração do RNA e reação de transcrição reversa

Amostras de carne coletadas no momento do abate foram armazenadas individualmente em nitrogênio líquido até o momento da extração do RNA. O RNA total foi recuperado a partir de 50-100 mg de tecido muscular imerso em 1 ml de solução Trizol (Invitrogen®), segundo instruções do fabricante. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®), e a qualidade foi avaliada pela relação 260/280, seguido da avaliação de sua integridade por eletroforese em gel de agarose.

Para transcrição reversa, 1 µg do RNA total foi transcrito reversamente em reações de 20 µl específicas, realizadas a 42 °C por 15 minutos, 50 °C por 50 minutos e 70 °C por 15 minutos para inativação da enzima.

2.2.7 Caracterização do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real

O desenho e a construção dos *primers* contidos na Tabela 1 foram realizados com o auxílio do programa *Primer Express*TM (Applied Biosystems). Genes controles foram testados para serem utilizados como referência para a quantificação.

Tabela 1. Primers desenhados para quantificação das expressões gênicas

Gene (GenBank ID)	Sequências (5'-3')
<i>CAPN1</i> (281661)	F: CGCCTCCCTTACCCTCAA R: CATCCACCCACTCACCAAAC
<i>DNAJA1</i> (528862)	F: GACAAAGGCATGAAAGATGG R: TATCTCCTGGCTCCAGTCCT
<i>HSPB1</i> (516099)	F: GAGATCACTGGCAAGCACGA R: GGGGACAGAGAGGAGGAGAC
<i>CRYAB</i> (281719)	F: TTCTCCCCAGAGGAACTCAA R: CGGGAGATAAAACCATGTTCA
<i>CAST_isol</i> (001030318.2)	F: CACCCAGGAGCATGTCAGTA R: ACTGCTCCCAAGGCTTGTT
<i>CAST_isoll</i> (174003.2)	F: TGCAAGCTGGTGGTACAAGA R: GAGAGCTGACTGCTCCCAAG
<i>CAST</i> (281039)	F: ATGAGGAAACAGTCCCATCG R: GGGCTTGGGTTTTTCTTCAG
<i>EEF1A</i> (AJ238405.1)	F: GCAGCCATTGTGGAGATG R: ACTTGCCCGCCTTCTGTG
<i>GAPDH</i> (281181)	F: GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT
<i>RPL-19</i> (510615)	F: GAAATCGCCAATGCCAAC R: GAGCCTTGTCTGCCTTCA

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção *Lightcycler*[®] 480 (Roche). As reações foram preparadas com volume total de 10 µl, contendo 1 µl de cDNA na diluição 1:10, 5 µl de SYBR Green I Master (Roche) 2x, 0,8 µl de cada primer na concentração de 2 µM/µl.

2.2.8 Eficiência de Amplificação e Normalização dos Dados

A eficiência individual de cada amostra foi calculada utilizando-se o programa *LinRegPCR*, utilizando no mínimo quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial (RAMARKES et al., 2003). Os dados de fluorescência obtidos no equipamento *LightCycler*[®] 480 (Roche) foram exportados para o programa *LinRegPCR*. Este programa utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de RNAm (R_0) e a eficiência de amplificação (E) usando as equações 2, 3 e 4. Através do programa *LinRegPCR* os valores de Ct foram determinados para cada amostra.

$$\log R = \log (E+1) \times n + \log R_0; \text{intercept} = \log R_0, \text{slope} = \log [E + 1] \quad (2)$$

$$R_0 = 10^{\text{Intercept}} \quad (3)$$

$$E = 10^{\text{Slope} - 1} \quad (4)$$

A partir da eficiência individual das amostras obtidas pelo programa *LinRegPCR* foi adotado um procedimento de correção para uma eficiência ideal, definida em 2.0 (Equação 5).

$$Ct_{ij} = \log_2 (E_gene_{ij}^{/ct/-gene(ij)}) \quad (5)$$

Em que:

Ct_{ij} é Ct da amostra ij corrigido para eficiência 2.0

$E_gene_{ij}^{Ct_gene(ij)}$ é a eficiência real calculada pelo *LinRegPCR* elevado o Ct da amostra para o gene ij.

Para a normalização dos dados, os valores de Ct dos genes referência foram analisados considerando-se um modelo estatístico que incluiu o efeito fixo do gene referência e um efeito aleatório associado ao animal, como forma de considerar a

variabilidade natural do indivíduo amostrado, com abordagem de modelos mistos, usando a equação 6.

$$Y_{ij} = \mu + g_i + a_j + e_{ij} \quad (6)$$

Em que:

Y_{ij} é o Ct na base 2 observado para o gene referência i no animal j ;

μ é a média geral;

g_i é o efeito fixo do i^{th} gene referência ($i = 1, \dots, 7$);

a_j é o efeito aleatório associado ao animal considerando $a_j \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$;

e_{ij} é o efeito aleatório residual, com $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$.

A partir deste modelo foram obtidos os valores BLUP (Best linear unbiased predictor) para o efeito animal, sendo estes considerados como fatores de ajustes dos valores Ct dos genes alvos.

2.2.9 Efeito genotípico dos marcadores SNP sobre a expressão gênica

Os efeitos dos genótipos encontrados para os diferentes marcadores, considerando as quantificações obtidas relacionadas às expressões foram avaliados a partir do modelo especificado a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + e_{ij} \quad (9)$$

em que,

Y_{ij} é o valor fenotípico das quantificações obtidas relacionadas às expressões gênicas (em Ct);

μ é uma constante inerente a todas as observações;

M_i é o efeito fixo do genótipo para os marcadores CAPN4751 (CC, CT e TT) e UOGCAST1 (CC, CG e GG);

e_{ij} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ij} , $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$;

Para testar os efeitos das combinações genotípicas, considerando dois *locus* simultaneamente, também foi adotado o mesmo modelo estatístico anteriormente citado, apenas trocando o efeito M_i por G_i , onde G_i representará a $k^{\text{ésima}}$ combinação genotípica para os dois *loci* em questão.

2.2.10 Análise Estatística de Associação

Para avaliar as implicações dos resultados associados a RT-PCR em relação aos fenótipos para a característica de maciez da carne 24 horas após abate e maturada aos 7 e 14 dias, tais medidas foram utilizadas como variáveis dependentes, sob dois modelos descritos a seguir.

Para a associação da quantificação das expressões dos genes CAPN1, DNAJA1, HSPB1, CRYAB e da CAST e suas isoformas I e II, com a maciez da carne maturada 0, 7 e 14 dias, foram aplicados duas abordagens.

O modelo 1 considera a expressão de apenas um gene no modelo a cada análise, aqui denominado de “modelo reduzido”.

Modelo 1:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + U_j + C_k + A_l + \beta_1(O_{ijklm} - \bar{O}) + \beta_2(P_{ijklm} - \bar{P}) + \beta_3(E_{ijklm} - \bar{E}) + e_{ijklm} \quad (7)$$

μ = é uma constante inerente a todas observações;

Y_{ijklm} = é o valor fenotípico observado da característica maciez;

T_i = é o efeito fixo do touro, com $i=1, \dots, 8$;

U_j = é o efeito fixo do genótipo para o marcador (UOGCAST) com $j=CC, CG$ e GG ;

C_k = é o efeito fixo do genótipo para o marcador (CAPN4751) com $k=CC, CT$ e TT ;

A_l = é o efeito fixo do abate, com $l=1, 2, 3$ e 4 ;

O_{ijklm} = é o efeito fixo da covariável ordem de abate do animal;

\bar{O} = é a média da ordem ao abate dos animais avaliados;

P_{ijklm} = é o efeito fixo da covariável valor de pH;

\bar{P} = é média do valor de pH;

E_{ijklm} = é a efeito fixo da covariável expressão gênica;

\bar{E} = é a média da expressão gênica;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = são os coeficientes de regressão linear associados aos efeitos de ordem de abate, pH e expressão gênica, respectivamente;

e_{ijklm} = é o efeito aleatório residual.

Adicionalmente foi constituído um segundo modelo, modelo 2, que considera as expressões dos genes CAPN1 e CAST concomitantemente, denominado de “modelo completo”.

O modelo completo segue a mesma estrutura do modelo reduzido, apenas considerando um quarto coeficiente de regressão linear (β_4) para o efeito de expressão do segundo gene contemplado no modelo.

Modelo 2:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + U_j + C_k + A_l + \beta_1(O_{ijklm} - \bar{O}) + \beta_2(P_{ijklm} - \bar{P}) + \beta_3(E_{ijklm} - \bar{E}) + \beta_4(Q_{ijklm} - \bar{Q}) + e_{ijklm} \quad (8)$$

Em que:

E_{ijklm} = é a efeito fixo da covariável expressão gênica do gene da μ -calpaína;

\bar{E} = é a média da expressão gênica gene da μ -calpaína;

Q_{ijklm} = é o efeito fixo da covariável expressão do gene da calpastatina;

\bar{Q} = é a média da expressão do gene da calpastatina;

Demais efeitos foram descritos no modelo 1.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análises da força de cisalhamento

Na Tabela 2, estão apresentados os dados descritivos da força de cisalhamento com 0, 7 e 14 dias de maturação. As médias dos valores da força de cisalhamento apresentaram queda dos valores de força de cisalhamento, condizentes com o processo esperado de maturação, em que a proteólise da carne no processo de maturação, permite uma queda desse valor quando o processo for satisfatório.

Tabela 2. Informações descritivas dos dados fenotípicos analisados

Características	N	MED*	DP*	CV%	MIN*	MAX*
FC0 ¹	66	10,16	2,23	21,95	3,35	15,65
FC7 ²	66	8,69	2,16	24,86	4,06	13,88
FC14 ³	66	6,98	2,03	29,08	3,82	13,23

*valores em kgf, ¹FC0 = média do valor de força de cisalhamento no dia 0 pos abate, FC7 = média do valor de força de cisalhamento com 7 dias de maturação e FC14 = média do valor de força de cisalhamento com 14 dias de maturação.

2.3.2 Genótipos dos polimorfismos para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1

Os genótipos dos polimorfismos obtidos para cada marcador (Tabela 3) foram incluídos no modelo reduzido e completo, como citado no item 2.2.10. O alelo C para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 são reportados na literatura como favoráveis a maciez da carne em bovinos, segundo os autores White et al., 2004 e Schenckel et al., 2005, respectivamente.

Tabela 3. Frequências genotípicas dos marcadores CAPN4751 e UOGCAST1

Marcadores	Genótipos	N	Frequência %
CAPN4751	CC	4	5,33
	CT	23	30,66
	TT	48	64,00
UOGCAST1	CC	18	24,00
	CG	40	53,33
	GG	17	22,66

2.3.3 Quantificação da expressão gênica

A eficiência de amplificação para todos os genes calculada a partir dos dados de fluorescência utilizando o programa *LinRegPCR* apresentou-se entre 1,6 e 1,8, sendo corrigidas para eficiência 2 como citado anteriormente.

Os genes selecionados como referência passaram por um teste de estabilidade. Segundo Pérez et al. (2008), isso é importante para a certeza que os genes referência selecionados apresentem baixa variação de expressão no tecido que a amostra foi coletada. Segundo os mesmo autores além dos genes tradicionalmente utilizados como *RPL19* e *GAPDH*, um gene mais estável para

estudos de amostras de músculo esquelético é o *EEF1A*, fator de alongação eucariótico, que foi incluído neste estudo, e confirmada sua estabilidade.

Para o teste de estabilidade, os três genes referência foram comparados quanto a variação de Ct (*Cycle threshold*) com o auxílio do programa *Genorme*. Os desvios padrão dos dados de expressão gênica expressos em “Ct” foram: 0,88 para o gene *EEF1*, 0,90 para o *RPL19* e 1,54 para o *GAPDH*.

Os resultados da amplificação dos genes de interesse e referência estão contidos na Tabela 4.

Tabela 4. Informações descritivas dos resultados de expressão gênica

Genes	N¹	Ct² Médio	DP³	Mínimo	Máximo
<i>CAPN1</i>	66	30,17	1,27	27,96	33,30
<i>CAST</i>	66	26,52	1,03	24,80	28,77
<i>CAST ISO1</i>	66	32,85	1,08	30,73	35,42
<i>CAST ISO2</i>	64	37,05	1,86	33,74	43,40
<i>CRYAB</i>	66	23,79	0,77	21,52	25,79
<i>DNAJA1</i>	66	25,86	0,86	24,53	28,78
<i>HSPB1</i>	64	25,62	0,93	23,30	27,98
<i>EEF1</i>	66	24,03	0,88	22,27	26,15
<i>RPL19</i>	65	31,88	0,90	30,40	33,66
<i>GAPDH</i>	65	18,60	1,55	15,55	22,72

¹número de amostras, ²*Cycle threshold*, ³Desvio padrão

2.3.4 Análise com o modelo reduzido

Para estimar os efeitos da expressão dos genes na maciez da carne foram realizadas anteriormente duas verificações. A primeira, se haviam efeitos dos genótipos dos marcadores *CAPN4751* e *UOGCAST* na maciez da carne 24 horas após abate, 7 e 14 dias de maturação, e na segunda, se havia efeitos dos genótipos dos mesmos marcadores na expressão dos genes *CAPN1*, *CAST*, *CRYAB*, *DNAJA1* e *HSPB1*. Em ambos os casos não foram observados efeitos dos genótipos. No entanto, quando os genótipos são incluídos nos modelos, reduzido e completo, para associação da expressão gênica com a maciez, houve a melhor adequação dos modelos para estimar os efeitos da expressão gênica.

Nas análises apresentadas na Tabela 5, apenas um gene foi considerado no modelo por vez, para estimar o efeito na maciez dentro de cada tempo de maturação. Assim, a expressão dos genes *DNAJA1*, *HSPB1*, *CAST* e as isoformas

CAST_ISO I e CAST_ISO II, não apresentou efeitos associados aos valores da força de cisalhamento. Dentre esses, o HSPB1 apresentou o menor nível de significância ($P=0,08$) aos 7 dias de maturação da carne, o que pode sugerir estar próximo de um efeito da expressão do gene.

Com relação ao gene CAST se esperava algum efeito, pois ela poderia estar associada ao valor da força de cisalhamento junto de suas isoformas, uma vez que são enzimas inibidoras diretas da ação da μ -calpaína (KILLEFER e KOOHMARAIE, 1994). Assim como no presente estudo, Ilian et al. (2001) também não observaram efeito da expressão sobre a força de cisalhamento, tanto em bovinos, quanto em ovinos.

O gene CRYAB apresentou resultados não esperados, efeitos associados a maciez aos 7 e 14 dias de maturação da carne, com estimativas positivas para aumento da força de cisalhamento (Tabela 5). Ou seja, como o resultado de Ct é inversamente proporcional, a cada unidade de aumento de Ct, diminui a expressão, logo, nos filamentos intermediários deveria existir um efeito menor de proteção para diminuir a força de cisalhamento, e isto não ocorreu, como reportado por Bernard et al. (2007) avaliando a expressão do mesmo gene. No entanto, esse resultado está de acordo com a hipótese de Morzel et al. (2007), como o gene CRYAB tem a função semelhante ao gene HSPB1, de proteger e manter a estabilidade dos filamentos intermediários, em especial do gene CRYAB de proteger a desmina (FISCHER et al., 2002). A ação desse gene, poderia no primeiro momento após abate retardar o início da proteólise, mas ao continuar o processo de proteólise durante a maturação da carne, a maior ação desse gene poderia ser benéfica por limitar a agregação dos filamentos intermediários no *pos mortem* e com isso favorecer a ação proteolítica em agregados menores.

Com relação a expressão do gene do CAPN1, efeitos opostos foram observados para 0 e 14 dias de maturação. Isto é aceitável e condizente com os processos proteolíticos, já que no tempo zero, um efeito inverso da expressão na maciez não é problemático, pois não se espera um efeito de proteólise da μ -calpaína imediatamente ao abate, mas, para o tempo de 14 dias de maturação da carne sim. Nesse caso, a estimativa é que a cada ciclo que Ct aumente, a expressão do CAPN1 diminui, e assim o valor da força de cisalhamento aumente em aproximadamente 0,510 kilogramas força (ilustração dos valores de Ct levando a menor força de cisalhamento na figura 1).

Tabela 5. Estimativas para força de cisalhamento baseada no Ct de cada gene, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez 0, 7 e 14 dias de maturação, de acordo com o modelo 1

Gene	FC0 ¹			FC7 ²			FC14 ³		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
DNAJA1	0,21	0,164	0,215	-0,08	0,17	0,623	0,11	0,15	0,46
HSPB1	-0,50	0,338	0,144	0,61	0,341	0,081	0,48	0,307	0,128
CRYAB	0,05	0,249	0,842	0,56	0,24	0,023*	0,48	0,214	0,029*
CAST_ISO I	0,18	0,169	0,298	0,03	0,175	0,861	0,03	0,155	0,837
CAST_ISO II	-0,13	0,135	0,356	0,18	0,139	0,192	0,11	0,124	0,401
CAST_T	-0,30	0,351	0,401	-0,41	0,356	0,257	-0,44	0,314	0,167
CAPN1	-0,56	0,289	0,058*	0,38	0,302	0,218	0,51	0,262	0,056*

¹FC0 = força de cisalhamento no dia 0 pos abate, FC7 = força de cisalhamento com 7 dias de maturação e FC14 = força de cisalhamento com 14 dias de maturação.

Esses resultados diferem dos reportados anteriormente por Ilian et al. (2001), em que não observaram efeitos da expressão do gene CAPN1 em relação a maciez da carne de bovinos e ovinos, entretanto, entre músculos diferentes, os mesmos autores reportam a diferença no nível da expressão do gene CAPN1.

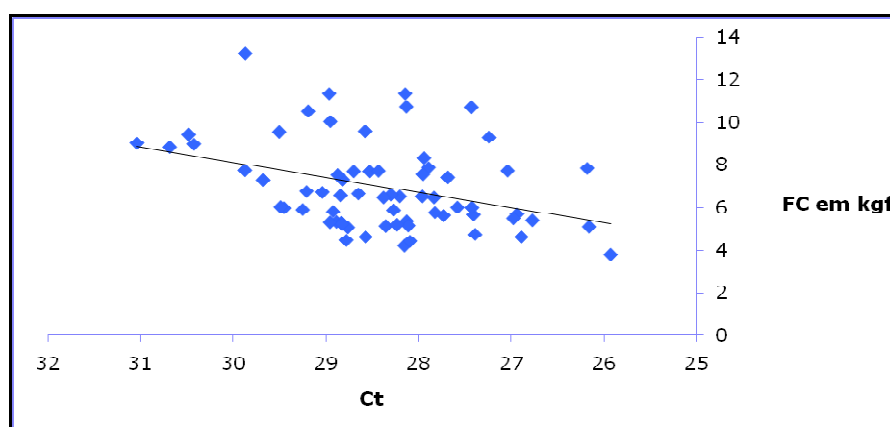


Figura 1. Força de Cisalhamento aos 14 dias de maturação da carne em kilogramas força (FC em kgf) em função dos valores de Ct (*Cycle threshold*) do gene CAPN1.

2.3.5 Análise com modelo completo

Na análise com modelo completo (Tabela 6), o modelo contempla a expressão de dois genes ao mesmo tempo, para avaliação dos valores fenotípicos da força de cisalhamento aos 0, 7 e 14 dias de maturação da carne. Com o fato da enzima μ -calpaína participar como promotor da proteólise, e a enzima calpastatina ser o inibidor direto da μ -calpaína, torna-se importante considerar as respectivas expressões de seus genes, na mesma análise para estimar os possíveis efeitos na maciez.

Na análise com modelo completo foram observadas estimativas dos efeitos para o gene CAPN1 bastante próximas em magnitude e sentido, das obtidas quando o mesmo foi analisado como único gene no modelo reduzido.

Com relação ao gene CAST, para as estimativas obtidas conjuntamente com o CAPN1, nas três datas da força de cisalhamento não foram observados efeitos significativos e as estimativas permaneceram semelhantes de quando o gene foi analisado unicamente no modelo reduzido.

Tabela 6. Estimativas, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos da força de cisalhamento aos 0, 7 e 14 dias de maturação, considerando as expressões de dois genes simultaneamente, de acordo com o modelo 2

Gene	FC0 ¹			FC7 ²			FC14 ³		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
CAPN1	-0,59	0,29	0,05	0,35	0,303	0,248	0,49	0,261	0,067
CAST_T	-0,35	0,34	0,313	-0,38	0,355	0,292	-0,4	0,306	0,199

¹FC0 = força de cisalhamento no dia 0 pos abate, FC7 = força de cisalhamento com 7 dias de maturação e FC14 = força de cisalhamento com 14 dias de maturação.

Esses resultados indicam consistência e adequação da análise dos dados, pois, o modelo foi capaz de estimar os efeitos semelhantes dos genes CAPN1 e CAST, mesmo adicionando a expressão do segundo gene no modelo completo, o que poderia influenciar na estimação dos efeitos.

2.4 Conclusões

Entre os genes referência, o *EEF1*, teve a menor variação para estudo do tecido muscular esquelético, e pode ser mais indicado do que os genes *GAPDH* e *RPL19*, tradicionalmente verificados em estudo dessa natureza.

Os resultados de associação da expressão dos genes *CAPN1* e *CRYAB* com a força de cisalhamento são os primeiros reportados em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Foi possível quantificar e observar a diferença de expressão dos genes citados para os valores de força de cisalhamento. No presente estudo a maior expressão do gene *CAPN1* nos indivíduos no momento do abate está associada aos menores valores da força de cisalhamento aos 14 dias de maturação da carne. O aumento da expressão do gene *CRYAB* está associado a menores estimativas da força de cisalhamento da carne maturada aos 7 e 14 dias de maturação da carne, e portanto, maior maciez da carne.

Referências

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness, measurements of fresh meat.** Chicago, IL: American Meat Science Association, 1995.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 55, n. 13, p. 5229-5237, 2007.

BISHOP, M.D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatina gene. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 71, p. 2277, 1993.

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

DAVEY, C.L.; GRAAFHUIS, A.E. Structural changes in beef muscle during ageing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 27, p. 301-306, 1976.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. V. Inactivation of calpains. **Meat Science**, Barking, v. 37, p. 391-409, 1994.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduccion a la genética cuantitativa**. 4. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 2001. 469 p.

FISCHER, D.; MATTEN, J.; REIMANN, J., BÖNNEMANN, C.; SCHRÖDER, R. Expression, localization and functional divergence of alpha-B-crystallin and heat-shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 101, p. 297–304, 2002.

GEESINK, G.H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *postmortem* conditions. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 77, p. 2685-2692, 1999.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, New York, v. 1, p. 159–173, 2007.

ILIAN, M.A.; MORTON, J. D., KENT, M. P., LE COUTEUR, C. E., HICKFORD, J., COWLEY, R., BICKERSTAFFE, R. Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 79, p. 122-132, 2001.

KASTNER, C.L.; HENRICKSON, R.L. Providing uniform meat cores for mechanical Shear Force measurement. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 34, p. 603-605, 1969.

KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, p. 606-614, 1994.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 41., 1988, Wyoming. **Proceedings...** Champaign: AMSA, 1988. p. 89-100.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulations the toughening and tenderization process of meat. **Journal of Animal Science**, Albany. v. 43, p. S193-S201, 1996.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHAKELFORD, S.D. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 354-352, 2002.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D. **Beef tenderness: regulation and prediction**. Nebraska: USDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, 1994. 11 p.

LOCKER, R.H.; DAINES, G.J. Transverse anisotropy in beef muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 27, n. 2, p. 186–192, 1976.

MARUYAMA, K.; KIMURA, S.; TOYOTA, N.; OHASHI, K. In: PARRY, D.A.D.; CREAMER, L.K. (Ed.). **Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects**. New York: Academic Press, 1979. v. 2, p. 257.

MELLGREN, R.L.; LANE, R.D.; MERICLE, M.T. The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 999, p. 71-77, 1989.

MORGAN, J.B. Tenderness problems and potential solicitations. In: NATIONAL BEEF QUALITY AUDIT. **The final report of the National Beef Quality Audit – 1991**. Albany, 1992. p. 180-187.

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

MORZEL, M.; TERLOUW, C.; CHAMBON, C.; MICOL, D.; PICARD, B. Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 297-304, 2007.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 39, p. 225-235, 1992.

PAGE, B.T.; CASAS, E.; QUAAS, R.L.; THALLMAN, R.M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; WHITE, S.N.; BENNETT, G.L.; KEELE, J.W.; DIKEMAN, M.E.; SMITH, T.P.L. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 82, n. 12, p. 3474-3481, 2004.

PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, London, v. 9, p. 79-84, 2008.

PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S.; JOHNSON, D.D.; WEST, R.L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 2955-2961, 1997.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 339, p. 62-66, 2003.

RASMUSSEN R. Quantification on the light cycler. In: MEUER S.; WITTEWER C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle real time PCR, methods and applications**. Heidelberg: Springer Press; 2001. p. 21–34.

RAYNAUD, P.; JAYAT-VIGNOLES, C.; LAFORET, M.P.; LEVEZIEL, H.; AMARGER, V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 437, p. 69–77, 2005.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: user's guide; version 9.1. ed. Cary, 2003. 5136 p.

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

SMITH, T.P.L.; CASAS, E.; REXROAD III, C.E.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W. Bovine CAPN maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.

WANG, X.; KLEVITSKY, R.; WEI HUANG, W.; GLASFORD, J.; LI, F.; ROBBINS, J. α B-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. **Circulation Research**, New York, v. 93, p. 998-1005, 2003.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized warner bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Clay Center: Romam L. Hruska U. S. MARC, USDA, 1995. 7 p.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, C. C. Jr.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in CAPN extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.83, n.9, p.2001-2008, 2005.

3 PROTEÍNAS DE “HEAT SHOCK” E ESTRUTURAIS ASSOCIADAS COM MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Resumo

O rebanho brasileiro, de quase 170 milhões de animais, é predominantemente formado por bovinos de origem *Bos taurus indicus*. Na bovinocultura nacional de corte a raça predominante é a Nelore, que apresenta excelente produção em clima tropical, mas produz carne com maior valor de força de cisalhamento do que animais de raças taurinas. Com o intuito identificar proteínas relacionadas com a maciez da carne, este estudo avaliou os extremos fenotípicos para força de cisalhamento de 138 animais representativos de diferentes linhagens da raça Nelore. Foi avaliada a diferença do perfil proteômico de amostras do músculo *Longissimus dorsi*, com o auxílio da eletroforese bi-dimensional (2-DE), seguido do sequenciamento peptídico por espectrometria de massas (EM). Foram observados 17 spots com diferentes volumes entre os extremos fenotípicos ($p < 0,05$), sendo 13 deles identificados. Entre as identificações estão proteínas estruturais, proteínas relacionadas a proteção celular, metabolismo e proteínas não caracterizadas. Os resultados confirmam o potencial da metodologia adotada para identificação de proteínas relacionadas com a maciez da carne e indicam que algumas das proteínas envolvidas com a maciez da carne em *Bos taurus taurus*, também são importantes no processo de maturação da carne em *Bos taurus indicus*, e revelam a presença de novas proteínas não previamente identificadas que podem contribuir para o processo de maturação da carne de bovinos

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*; Maciez; Proteômica; Força de cisalhamento

Abstract

The Brazilian herd of approximately 170 million animals is predominantly composed of bovine *Bos taurus indicus* origin. The Nelore beef cattle (*Bos taurus indicus*) are known to produce less tender meat when compared to *Bos taurus taurus* cattle. The Brazilian bovine herd consists of about 80% of animals of Zebu breeds due to their high resistance to the tropical environment and potential production. Studies with zebuine cattle are necessary to improve the selection of animals that meet with quality the industry and the consumers. In order to work with a representative sample, the study assessed the extreme meat tenderness phenotypes from 138 animals, based on the difference in the proteomic profile of samples from the *Longissimus dorsi* muscle, using two-dimensional electrophoresis (2-DE) gel followed by peptide sequencing through mass spectrometry (MS) to identify the expressed proteins in these extremes. We observed 17 differentially expressed spots ($p < 0.05$) between the two groups. Among the 13 proteins that could be identified, there are structural proteins related to cell protection, metabolism and some uncharacterized proteins. The results confirm the existence of differential expression in the shear force phenotypic extremes, which makes the differentially expressed proteins as potential indicators of meat tenderness.

Keywords: *Bos taurus indicus*; Tenderness; Proteomics; Shear force

3.1 Introdução

Com a demanda de alimentos em escala mundial para suprir o crescimento populacional, o aumento em quantidade e qualidade, da produção de proteína de origem animal é um importante alvo de pesquisas. Em específico, novas orientações surgiram na ciência da carne com o desenvolvimento de métodos de análises da regulação dos genes e proteínas do tecido muscular. Nas ciências agropecuárias, assim como em outras áreas, as ferramentas proteômicas e pós-genômica se tornaram um importante passo no avanço do entendimento dos processos biológicos complexos (BENDIXEN et al., 2011).

As estratégias proteômicas possuem um grande potencial para aumentar os conhecimentos de mecanismos que controlam o metabolismo no *post-mortem*, podendo caracterizar panoramas protéicos, identificar modificações de estados protéicos e buscar isoformas de proteínas (BENDIXEN, 2005).

Técnicas de análise de proteomas podem, além de obter o perfil protéico, revelar as funções de genes e ainda explicar interações genéticas e ambientais que podem controlar as funções celulares e as características fisiológicas dos organismos vivos.

Algumas caracterizações de mapas protéicos já foram relatadas em espécies de produção por Lametsch et al. (2002), em suínos; Bouley et al. (2004), em bovinos e Doherty et al. (2004), em aves.

Pan et al. (2005) reportaram a importância dos biomarcadores e sua larga aplicação para melhorar os métodos de produção e processamento de carne. Nesse sentido, estudando bovinos da raça *Nowergian Red*, Jia et al. (2009), observaram que a proteína peroxiredoxina-6, quando expressa em abundância, é indicadora de indivíduos que podem produzir carne com maior maciez.

Outras características além da maciez podem ser avaliadas com os métodos de proteômica.

O acompanhamento das alterações de proteínas durante a maturação da carne é uma delas. Segundo Jia et al. (2007), os níveis de proteínas mais afetados durante as primeiras 24 horas após abate são das HSPs (proteínas *heat shock*) e as enzimas do metabolismo energético e protéico. Para, Ouali et al. (2006), a expressão elevada das HSP, que desempenham papel anti-apoptótico nos músculos, pode potencialmente retardar os processos de morte celular e,

consequentemente, a maturação da carne, tendo assim um impacto negativo sobre o amaciamento da carne.

Com os estudos proteômicos pode-se ainda estabelecer novas relações que tragam maiores entendimentos no âmbito da qualidade da carne. Desta forma Guillemin et al. (2009), observaram em uma análise funcional que as proteínas dos processos metabólicos da e contráteis e glicose tiveram baixa representatividade no estudo de um interactoma da maciez, representando somente três e quatro por cento do total de proteínas identificadas, respectivamente. Isto poderia explicar por que é difícil estabelecer claramente as relações entre o metabolismo e o tipo de fibra com a maciez. Neste sentido, Bouley et al. (2004), desenvolveram um experimento com a detecção de cerca de 450 spots reprodutíveis de proteínas do músculo esquelético de bovinos, utilizando um gradiente de pH 4-7 na primeira dimensão, e puderam obter inúmeras relações com os tratamentos ou fenótipos de interesse dos indivíduos.

Também é importante salientar que, como para maciez, inúmeros marcadores podem ser identificados, mas são muitas vezes específicos para um tipo de animal (adulto ou jovem), de uma raça ou de condições ambientais (HOCQUETTE et al., 2007), e até mesmo para um determinado músculo (GUILLEMIN et al., 2011a).

Bouley et al. (2004), em estudo sobre a carne produzida de animais das diferentes raças: Charolês, Limousin e Salers verificaram que os potenciais marcadores de maciez parecem diferir entre raças. Diferenças na quantidade de várias proteínas (parvalbumina, MLC2, ACBP) relacionadas ao metabolismo de cálcio foram encontradas entre grupos de carne macia, nas duas raças de corte, mas não em bovinos Salers.

Vários outros estudos têm mostrado que a abundância de algumas transcrições de genes, ou proteínas podem ser afetada pelo sistema de produção ou tipo de músculo (HOCQUETTE et al., 2007). Cassar-Malek et al. (2009), observaram que, os músculos de bovinos criados a pasto têm mais características oxidativas, do que os de novilhos alimentados com silagem de milho em ambientes confinados.

Portanto, a quantidade de algumas proteínas pode ser influenciada, e o conhecimento destas influências pode ser explorado para gerenciar a enorme quantidade de diferentes biomarcadores sensíveis na produção de carne, a fim de introduzir métodos de gestão que poderiam melhorar a qualidade da carne

(GUILLEMIN et al., 2011b). Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar proteínas que estão envolvidas com a maior maciez da carne, em animais da raça Nelore, com a função de potenciais biomarcadores, bem como, conseguir maior esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela maior maciez da carne.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais avaliados e coleta de amostras

A população utilizada para este estudo é da raça Nelore e foi proveniente do Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste, da Embrapa, localizada na cidade de São Carlos, Estado de São Paulo. Os animais foram criados a pasto até aproximadamente 23 meses de idade, e confinados por aproximadamente de 90 a 110 dias para terminação com dieta a base de silagem de milho, grão de milho e casca de soja sendo então encaminhados ao abate.

A estrutura da população para o estudo foi formada por 138 animais avaliados, sendo filhos de 18 touros. O número de progênie por touro variou entre 2 e 14, com a média de 7,6 progênie por touro. A escolha dos touros para produção dos animais avaliados foi baseada na representatividade das diferentes linhagens de Nelore, dentro do rebanho brasileiro, que são principalmente comercializadas na forma de sêmen.

As coletas das amostras foram realizadas no abatedouro comercial Friburdog, localizado em Bariri, SP. Imediatamente ao abate, de 138 animais, amostras para as análises proteômicas foram coletadas do músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12^a e 13^a costela, e armazenadas em nitrogênio líquido. Para análise de maciez, após as carcaças permanecerem 24 horas na câmara de resfriamento, foram coletados dos 138 animais, três amostras de aproximadamente 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, de cortes obtidos entre a 12^a e 13^a costela em direção caudal. As amostras foram identificadas individualmente e embaladas a vácuo (embaladora Selovac M160) em filme flexível de alta barreira, Polyfilm®.

3.2.2 Análises de maciez da carne (força de cisalhamento)

Para as análises de maciez da carne, um dos três bifes retirados foi submetido à análise no mesmo dia da coleta, aproximadamente 24 horas após o abate. Os outros dois bifes foram maturados por 7 e 14 dias na câmara fria entre 0 e

2 °C, e posteriormente foram analisados. Na análise os bifes foram cozidos em forno industrial elétrico (Tadesco, modelo TCO6/ELT) a temperatura de 170 °C, até a temperatura interna das amostras atingirem 70 °C, sendo monitorado com auxílio de termopares. Após os bifes serem cozidos foram embalados e resfriados a 5 °C por 24 horas. Posteriormente, foram retirados de cada bife oito cilindros na direção das fibras musculares, com auxílio de um furador metálico de 1,27 cm de diâmetro. Para obter as medidas de cisalhamento, foi utilizado um texturômetro digital (Exponent modelo TAXT plus) equipado com lâmina Warner Bratzler em que o valor médio dos oito cilindros de cada amostra foi o valor adotado para o fenótipo maciez, como descrito por Wheeler et al. (2005).

3.2.3 Estratégia para análise proteômica

As amostras dos indivíduos foram selecionadas em dois grupos, as seis que obtiveram os menores valores da força de cisalhamento (maior maciez da carne) em 7 e 14 dias de maturação da carne, formando um extremo, e as seis com os maiores valores da força de cisalhamento (menor maciez da carne) nos mesmos períodos de maturação, formando o outro extremo.

Os valores genéticos para seleção dos extremos foram obtidos pelo método máxima verossimilhança restrita, utilizando um modelo animal completo. Com base nas informações de qualidade de carne dos indivíduos, principalmente de meio-irmãos foi possível determinar os valores genéticos destes animais. A matriz do numerador do coeficiente de parentesco continha 284 animais. O modelo matemático utilizado: $Y = Xb + Zu + e$, em que “Y” é o vector variável dependente; “X” é a matriz de incidência dos efeitos fixos; “b” é o vector de efeitos fixos; “Z” é a matriz de incidência para efeitos aleatórios; “u” é o vetor de valores genéticos aleatórios, NID $(0, \sigma_a^2)$ para M7 e M14, e, “e” é o vetor de efeitos residuais, NID $(0, \sigma_e^2)$ para M7 e M14). Os efeitos fixos (vetor b) considerados para M7 e M14 foram grupo de contemporâneos (grupo de abate e estação de nascimento) e idade de medição como covariável linear. O efeito aleatório (vetor u) considerado foi o efeito genético aditivo direto, utilizando componentes de variância estimados em outra população (n=2500), pelo programa de melhoramento animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP (dados ainda não publicados).

As análises de eletroforese bi-dimensional foram realizadas em triplicatas para cada animal estudado, num total de 36 geis.

3.2.4 Preparação da amostra para Eletroforese Bi-Dimensional

Um grama de músculo (*Longissimus dorsi*) foi homogeneizado no gelo por 30 s em seis mL de tampão (Tris-HCl 0,1M pH 8.0 contendo inibidor de protease – Amersham Biosciences), a 9500 rpm com o auxílio de um homogeneizador Turratec TE-102 (Tecnal). O sobrenadante foi obtido após a centrifugação por 20 minutos a 4°C e armazenado em nitrogênio líquido para posterior análise por eletroforese.

As proteínas totais foram determinadas pelo kit de análise de proteína BCA (Pierce), utilizando como padrão, uma solução de albumina bovina.

3.2.5 Realização da Eletroforese Bi-Dimensional

Um volume de 250 µl da solução de reidratação “DeStreak” (Amersham Biosciences) contendo 500 µg de proteína, 0,5 % de tampão de IPG pH 3-10, 20 mM DTT e 1 % Inibidores de Protease (Amersham Bioscience) foi utilizado para reidratar, por uma noite, as tiras de IPG de 13 cm de pH 4-7 à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a focalização isoeletrica (IEF) usando o aparelho Ettan IPGphor (GE Healthcare) à temperatura de 20°C, com uma voltagem inicial de 500 V, aplicando-se em seguida, um gradiente de 1000 a 8000 V e por fim 8000 V, com um limite de corrente de 75 µA/tira. O produto total no tempo de corrida foi a voltagem de 17403 V/h. Para a segunda dimensão, as tiras foram equilibradas por 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo dietiltreitol para reação de redução com agitação, e 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida para reação de alquilação sob leve agitação e, em seguida, sobrepostas ao gel de acrilamida, fixando-as com uma solução selante de agarose. O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli 1x concentrado para o anodo e 3x concentrado para o cátodo. Para a corrida eletroforética, foi mantida a corrente de 25 mA/gel e a voltagem inicial de 90 V por 30 minutos possibilitando que as proteínas migrassem da tira para o gel, e aumentada para 250 V por 4 horas. Ao final da corrida, os géis imersos em solução fixadora (40% de etanol e 10% ácido acético) por 30 minutos, e foram corados por 24 horas com azul de Coomassie a 0,1 %, e descorados em agitação por 48 horas em água. Em seguida, a água foi renovada e gel foi então mantido em repouso na geladeira até a obtenção das imagens.

3.2.6 Análise do mapa “in silico”

Os géis 2-DE foram escaneados com *ImageScanner PowerLook 1120* (Amersham Biosciences) e analisados com o software *ImageMaster Platinum* (Amersham Biosciences). O software foi utilizado para a detecção dos spots e também na determinação do volume dos spots.

3.2.7 Análise do perfil diferencial de proteínas

Para avaliar as intensidades dos volumes de expressão normalizados (IVEN) de cada spot obtido pela técnica de eletroforese bi-dimensional, foi adotado o modelo linear misto, que contemplou o efeito fixo de grupos comparativos (carne com maior força de cisalhamento versus menor força de cisalhamento), além dos efeitos aleatórios de animal e residual. Para avaliação das triplicatas dos géis de cada animal, adotou-se a estratégia de medidas repetidas. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1 (SAS, 2003), utilizando o procedimento MIXED.

3.2.8 Purificação e digestão *in-gel* das proteínas

Os spots detectados diferencialmente em volumes entre os extremos fenotípicos para maciez da carne foram retirados do gel, cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm², e colocados em tubos eppendorf de 1,5 ml. Em seguida os fragmentos de spots foram descorados com 3 lavagens da solução contendo 50 % de acetonitrila (ACN) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 (AMBIC), sendo agitados por 10 minutos no vortex a intervalos de 15 minutos entre cada lavagem. Posteriormente a solução descorante foi retirada das amostras e os fragmentos foram desidratados em 200 µl de ACN 100% por 10 minutos, deixando o resíduo remanescente no gel evaporar a temperatura ambiente. No passo seguinte para reação de redução os fragmentos foram reidratados com 200 µl de DTT a 20 mM e AMBIC a 50 mM por 40 minutos a 56 °C. Após esse período a solução de DTT foi removida.

Para reação de alquilação foi adicionado a cada amostra 200 µl da solução de iodoacetamida (IAA) a 55 mM e AMBIC a 50 mM, repousando em ambiente escuro por 30 minutos as amostras. No próximo passo, o sobrenadante foi descartado e os fragmentos lavados com 200 µl de AMBIC a 25 mM com auxílio do vortex e

posteriormente desidratados duas vezes com ACN 100%, e o resíduo evaporado a temperatura ambiente até os fragmentos.

Para digestão das amostras foram adicionados nos fragmentos 15 µl de tripsina a concentração de 20 ng/µl e acondicionadas a 4 °C por 15 minutos para penetração da tripsina nos fragmentos de gel. Após esse período foram retirados os excessos de tripsina que restaram em algumas amostras, e adicionados mais 50 µl de AMBIC a 50 mM para cobrir os fragmentos e em seguida as amostras foram incubadas a 37 °C por 14 horas. Posteriormente, a ação da *tripsina* foi interrompida com a adição de 15 µl da solução com ACN 50% e ácido fórmico a 5 %. No passo seguinte para primeira eluição, por duas vezes, foram adicionados 50 µl da solução de metanol a 60 % e ácido fórmico a 1 %, para sonicação das amostras por 15 minutos a 40°C, e coleta do sobrenadante em novo tubo. Já para segunda eluição e também por duas vezes, foram adicionados 50 µl da solução de ACN a 50% e ácido fórmico a 1%, para novamente a sonicação da amostras por 15 minutos a 40 °C e coleta do sobrenadante para o mesmo tubo usado na coleta da lavagem anterior. Para terceira e última eluição foram adicionados 50 µl de ACN 100% nas amostras e também coletados os sobrenadante no tubo das coletas anteriores. Finalmente as amostras foram submetidas ao concentrador a vácuo até 1 µl e ressuspendida em 13 µl de ácido fórmico a 0,1 % para o sequenciamento por espectrometria de massas.

3.2.9 Sequenciamento de peptídeos por LC-MS/MS

Os sequenciamentos dos produtos de digestão dos spots foram realizados no sequenciador Synapt G2 HDMS, da WatersTM, e com auxílio do programa *Protein Lynx versão 2.5*. As proteínas foram identificadas quando submetidas ao proteoma completo de *Bos taurus*, no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análises da força de cisalhamento

Os 138 animais estudados apresentaram valores de força de cisalhamento (Tabela 1) com maior variação do que o já reportado anteriormente na raça Nelore (PINTO et al., 2010), possivelmente, pelo presente estudo contemplar na estrutura da população, touros com maior representatividade no rebanho brasileiro. E ainda,

como relatado na literatura, valores da força de cisalhamento foram superiores aos observados para animais de origem *Bos taurus taurus* (CASAS et al., 2006).

Os valores da força de cisalhamento foram condizentes com o processo esperado de maturação, em que a proteólise da carne diminui a força de cisalhamento no processo de maturação (OUALI et al., 2006).

Tabela 1. Estatísticas descritivas dos dados de força de cisalhamento, espessura de gordura subcutânea e pH

Características	N	Média	DP¹	CV%	MIN	MAX
SF0 ¹	138	8,09 ⁴	1,48	18,3	4,26	12,03
SF7 ²	138	5,31 ⁴	1,43	26,9	1,98	9,56
SF14 ³	136	3,65 ⁴	1,18	32,3	1,53	7,49
Espessura de gordura	138	6.5 ⁵	3.53	54.3	4.0	20.0
pH(24h)	138	5.7	0.17	3.1	5.6	6.0

¹FC0 = força de cisalhamento 24 horas após abate, ²FC7 = força de cisalhamento com 7 dias de maturação, ³FC14 = força de cisalhamento com 14 dias de maturação e ⁴valores em kgf/cm², ⁵valores em milímetros.

A média da espessura de gordura subcutânea e do pH 24 horas após abate nas carcaças dos 138 animais avaliados foi de 8 mm e 5,66, respectivamente. E para as 12 carcaças selecionadas nos extremos para avaliações proteômicas, foi de 8,3 mm de espessura de gordura, e pH=5,64.

Dentre os 18 touros que formaram a população, 8 deles foram representados nos extremos selecionados para as avaliações proteômicas, sendo que 3 deles estavam presentes nos diferentes extremos fenotípicos da força de cisalhamento.

3.3.2 Informações descritivas dos extremos selecionados para análise de proteínas

É possível observar as diferenças nos valores médios para força de cisalhamento entre os extremos fenotípicos que foram selecionados para as análises de proteína (Tabela 2). Para a análise de força de cisalhamento em 0, 7 e 14 dias de maturação da carne, foram observadas diferenças de 2,84, 4,5 e 3,57 kg, respectivamente, entre os extremos para força de cisalhamento. Assim, também é

possível observar a variação na característica e a possibilidade de seleção na raça Nelore.

Tabela 2. Estatísticas descritivas dos extremos selecionados fenotípicos para os dados de força de cisalhamento, espessura de gordura subcutânea e pH

Extremos	Características	N	Média	DP⁶	CV%⁷	MIN	MAX
Menor FC	FC0 ¹	6	6,50 ⁴	1,07	16,6	4,52	7,75
	FC7 ²	6	3,08 ⁴	0,76	24,9	1,97	4,34
	FC14 ³	6	2,01 ⁴	0,51	25,8	1,65	3,02
	Espessura de gordura	6	8.17 ⁵	1.33	16.2	7.00	10.00
	pH(24h)	6	5.57	0.16	2.8	5.38	5.85
Maior FC	FC0 ¹	6	9,34 ⁴	1,43	15,4	7,22	11,60
	FC7 ²	6	7,58 ⁴	0,77	10,2	6,30	8,43
	FC14 ³	6	5,58 ⁴	1,55	27,7	3,54	7,49
	Espessura de gordura	6	6.17 ⁵	2.40	38.8	4.00	10.00
	pH(24h)	6	5.67	0.24	4.2	5.36	5.97

¹FC0 = força de cisalhamento 24 horas após abate, ²FC7 = força de cisalhamento 7 dias de maturação, ³FC14 = força de cisalhamento 14 dias de maturação, ⁴ valores em Kilogramas força, ⁵ valores em milímetros, ⁶desvio padrão e ⁷coeficiente de variação.

3.3.3 Spots detectados com diferentes quantidades nas análises de eletroforese bi-dimensional

Um fator importante nos estudos de proteômica é a resolução que o gel 2-DE apresenta. A resolução pode ser avaliada pelo número de spots observados, após o tratamento das imagens para detecção de apenas spots peptídicos. No presente estudo, para os 36 géis analisados com faixa de pH 4-7 foi observado a média de 386 spots por gel. Resultado comparável ao observado por Bouley et al. (2004), que também avaliando o mesmo tecido muscular em bovinos reportaram a média de 3 géis analisados, com 450 spots por gel na mesma faixa de pH. No entanto, os autores utilizaram nas análises 800 µg de proteínas, enquanto que no presente estudo foi utilizado 500 µg.

Para representar a análise do perfil protéico diferencial, a imagem (Figura 1) de um dos géis de eletroforese bi-dimensional analisados indica os spots que foram

diferenciados em volumes, entre os extremos fenotípicos para os valores da força de cisalhamento. O gel contém os spots com proteínas e fragmentos identificados, seguidos do número do spot e nome da proteína. Os spots indicados apenas com número estavam detectados diferentemente em volume, porém os peptídeos não foram identificados. Em particular, o spot 138 foi sequenciado, porém trata-se de uma proteína ainda não caracterizada no proteoma de *Bos taurus taurus*, devendo ser objeto de novos estudos para caracterização da mesma. Ainda, deve-se atentar para o fato das amostras serem de bovinos de origem *Bos taurus indicus*, e, portanto, podendo haver variações na comparação com as sequencias peptídicas, mesmo tendo o conhecimento que 99,98% do genoma codificante de *Bos taurus taurus* está presente em regiões codificantes do genoma *Bos taurus indicus* (CANAVEZ et al., 2012).

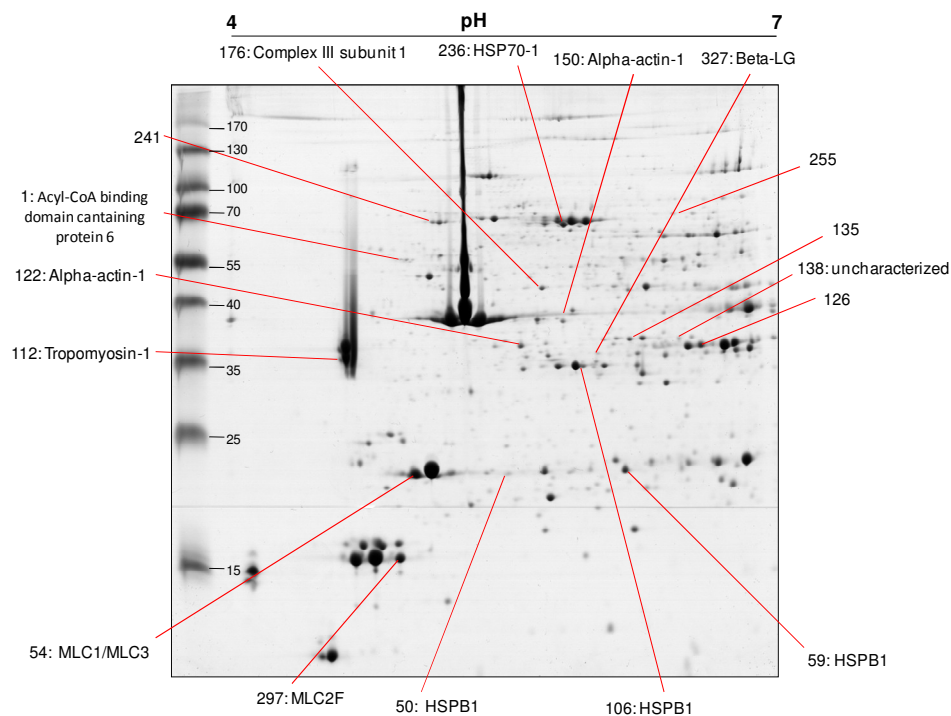


Figura 1. Gel de eletroforese bi-dimensional de proteína total extraída do músculo *Longissimus dorsi* de bovino da raça Nelore. Os spots indicados são os detectados em diferentes volumes nos extremos fenotípicos para maciez da carne.

3.3.4 Variação na quantidade das proteínas entre os extremos fenotípicos de força de cisalhamento e sequenciamento de peptídeos por LC-MS/MS

Dentre os spots com diferentes volumes detectados entre os extremos fenotípicos da força de cisalhamento (Tabela 3), cinco deles foram observados em maior expressão no grupo de indivíduos de menor força de cisalhamento, (spots 50, 106, 122, 138 e 327). Os spots de menor intensidade de volume, no grupo de menor força de cisalhamento, foram: 1, 54, 59, 112, 150, 176, 236 e 297.

Tabela 3. Proteínas em diferentes quantidades entre os extremos de maior e menor valor da força de cisalhamento

SPOT	Identificação	Maior força de cisalhamento		Menor força de cisalhamento		Valor de P	Expressão de menor força de cisalhamento ³
		MED ¹ (%)	EP ²	MED ¹ (%)	EP ²		
50	Heat shock protein beta 1	0,067	0,004	0,088	0,005	0,014	+
106	Heat shock protein beta-1	0,242	0,005	0,264	0,005	0,031	+
122	Actin, alpha skeletal muscle	0,475	0,028	0,569	0,028	0,023	+
138	Uncharacterized protein	0,142	0,003	0,155	0,003	0,048	+
327	Beta-lactoglobulin	0,045	0,002	0,054	0,002	0,046	+
1	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6	0,040	0,002	0,027	0,002	0,004	-
54	Myosin light chain 1/3, muscle isoform	1,530	0,056	1,275	0,056	0,009	-
59	Heat shock protein beta-1	0,603	0,044	0,447	0,048	0,040	-
112	Tropomyosin alpha -1 chain	2,166	0,300	0,915	0,339	0,028	-
150	Actin, alpha skeletal muscle	0,196	0,004	0,180	0,004	0,029	-
176	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	0,469	0,018	0,379	0,018	0,006	-
236	Heat shock 70 kDa protein 1A	0,048	0,002	0,040	0,002	0,006	-
297	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	1,276	0,084	0,964	0,081	0,028	-

¹Média da intensidade dos volume de expressão normalizado, ²Erro padrão e ³ sinais positivos e negativos indicam os spots com maior e menor expressão, respectivamente, nas amostras com menor força de cisalhamento.

As características de ponto isoeletrico e massa molecular dos spots no experimento tiveram algumas variações com relação às características teóricas das proteínas identificadas (Tabela 4). Nos casos dos spots com pequenas variações, pode-se atribuir aos desvios de calibração dos parâmetros na 2-ED. Para as diferenças mais discrepantes de ponto isoeletrico e massa, como por exemplo, os desvios dos spots 1, 106 e 327, podem ser produtos de isoformas, resultados de *splicing* alternativo do RNA mensageiro, ou mesmo como reportado por Jia et al. (2006), como sendo resultados de mudanças pós traducionais (MPT). Porém, para essa confirmação seria necessário um estudo isolado desses spots e seus genes correspondentes, com técnicas capazes de detectar tais diferenças.

Tabela 4. Proteínas identificadas com diferentes quantidades nos extremos fenotípicos de maciez da carne, seguido da abreviação, score de identificação, massa (KDa) teórica e aparente, ponto isoeletrico teórico e aparente e número de acesso ao banco de Uniprot/Swissprot

Spot	Identificação	Abreviação	Score	Massa (KDa) teórica/aparente	Ponto isoeletrico teórico/aparente	Acesso Uniprot
50	Heat shock protein beta 1	HSPB1/HSP27	178	22,39/21	5,98/5,56	Q3T149
106	Heat shock protein beta-1	HSPB1/HSP27	267	22,39/34	5,98/5,94	Q3T149
122	Actin, alpha skeletal muscle	Alpha-actin-1	386	42,05/36	5,23/5,63	P68138
138	Uncharacterized protein	Gene(LOC508808)	102	35,35/37	8,52/6,51	F1MBK8
327	Beta-lactoglobulin	Beta-LG	190	19,88/36	4,93/6,06	P02754
1	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6	Gene(ACBD6)	194	31,27/54	4,93/4,95	A2VDR2
54	Myosin light chain 1/3, muscle isoform	MLC1/MLC3	208	20,93/21	4,96/5,04	A0JNJ5
59	Heat shock protein beta-1	HSPB1	323	22,39/22	5,98/6,21	Q3T149
112	Tropomyosin alpha -1 chain	Tropomyosin-1	143	32,69/35	4,69/4,65	Q5KR49
150	Actin, alpha skeletal muscle	Alpha-actin-1	335	42,05/38	5,23/5,86	P68138
176	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Complex III subunit 1	270	52,7/44	5,94/5,75	P31800
236	Heat shock 70 kDa protein 1A	HSP70-1	265	70,25/65	5,67/5,86	Q27975
297	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MLC2	246	19,01/15	4,88/4,95	Q0P571

As identificações realizadas com auxílio do programa Protein Lynx versão 2.5, da Waters™ foram confirmadas quando os fragmentos peptídicos foram submetidos ao banco de dados Uniprot/Swissprot com a ferramenta *blastp*. Os scores foram confiáveis (acima de 70), e com índice 0 de falso positivos.

As proteínas identificadas podem ser classificadas na maioria como estruturais, de organização celular e proteção ao estresse, e outras pontuais, com funções metabólicas específicas, como energética e metabolismo lipídico.

3.3.5 Proteínas relacionadas a organização celular e ao estresse

A família das Hsps é conhecida pelas funções de proteção celular, e em especial a HSP27, também conhecida como heat shock beta 1, pela organização celular (CREAGH et al., 2000). A HSP27 age na organização do sistema de miofilamentos de actina (FISCHER et al., 2002). No entanto, nos resultados obtidos, a HSP27 possui relações de maior complexidade com o fenótipo de menor força de cisalhamento. Pois, três spots diferentes dessa proteína foram identificados (50, 59 e 106), sendo o spot 106 diferente em massa, e os três em ponto isoelétrico.

É possível observar o maior volume nos spots 50 e 106 no grupo de menor força de cisalhamento. Na hipótese do spot 50, conter a proteína heat shock beta 1 na forma fosforilada, os resultados aqui obtidos estariam de acordo com os estudos de Morzel et al. (2007) em bovinos *Blond d'Aquitaine*, que sugerem a correlação da Hsp27 de menor ponto isoelétrico, como fosforilada, e em maior quantidade no grupo de animais que produziram carne com menores valores da força de cisalhamento. Segundo os mesmos autores, a proteína Hsp27 parece retardar o início a proteólise, mas no avanço do processo de maturação da carne em sete e 14 dias após abate, indica um maior amaciamento da carne, que seria devido ao papel da proteína além de participar da organização celular, de limitar o tamanho dos agregados de proteínas (WELCH, 1992), o que aumenta a superfície para ação enzimática e facilita posteriormente a proteólise. Estes resultados confirmam, que parece possível traçar um perfil de algumas proteínas, como as quantidades das proteínas de “heat shock”, para os indivíduos que irão proporcionar o fenótipo de menor força de cisalhamento da carne aos sete ou 14 dias de maturação da carne.

A HSP70 que desempenha a função anti-apoptótica (CREAGH et al., 2000), também está entre as identificações das proteínas em menor quantidade no grupo de maior maciez do presente estudo. A menor quantidade da HSP70 está de acordo

com reportado por Picard et al. (2010), em que essa proteína está em menor abundância nos indivíduos que apresentaram menor força de cisalhamento.

3.3.6 Proteínas estruturais

Dentre as proteínas estruturais e seus fragmentos identificados, o spot 122 do fragmento de Actina alfa foi o único entre as proteínas estruturais que estava em maior volume no grupo de indivíduos que apresentaram carne com menor força de cisalhamento. Os demais spots estavam todos em menor volume no grupo de menor força de cisalhamento.

A respeito do spot 122 e 150, os dois foram identificados como fragmentos da actina alfa. Por, possuírem massa molecular aparente menor que a teórica, os fragmentos podem existir no músculo anterior a maturação, devido ao “turn-over” basal protéico do músculo (BOULEY et al., 2004; MORZEL et al., 2007). Os mesmos autores reportam que esses fragmentos de actina alfa aumentam com a maturação da carne. Uma hipótese seria que: fragmentos específicos observados nas amostras coletadas imediatamente ao abate teriam potencial para indicar quais amostras resultariam em carne de menor força de cisalhamento.

Kim et al. (2008) reportaram a associação da maior quantidade da actina alpha com a maciez da carne, porém não especificaram a origem ou raça bovina, e Lametsch et al. (2003), também observaram a associação com a maior maciez da carne de suínos.

A miosina é a maior proteína do sistema contrátil, sendo formada por duas isoformas de cadeia pesada e quatro isoformas de cadeia leve (MUROYA et al., 2007). Segundo os mesmos autores a isoforma MLC2 tem a função regulatória contrátil através da fosforilação. No presente estudo os spots 54 e 297, corresponderam a isoformas da miosina de cadeia leve MLC1/3 e MLC2, respectivamente. Ambas isoformas estavam em menor quantidade no grupo de menor força de cisalhamento. São escassos os relatos sobre a variação da quantidade dessas isoformas com a maciez. No entanto, Lonergan et al. (2010) reportaram que modificações nas isoformas da miosina, tais como oxidação e degradação, podem aumentar a solubilidade da proteína e a resistência ao cisalhamento.

A respeito da tropomiosina alfa, também entre as proteínas diferentemente quantificadas, tem a função de ligar-se a actina para estabilização do citoesqueleto

celular, e de associação com o complexo troponina para participar da regulação na contração muscular. No presente estudo, ela foi representada pelo spot 112, que estava em menor volume no grupo de menor força de cisalhamento. Não há relatos anteriores sobre a relação direta da maior ou menor quantidade dessa proteína, com o fenótipo de força de cisalhamento da carne bovina.

3.3.7 Demais proteínas identificadas

Os spots 327, 1 e 176, foram identificados como Beta-LG, ACBD6 e Complex III subunidade 1, respectivamente. Entre elas a identificação da Beta-LG foi inesperada, pois não é produzida no tecido muscular esquelético, e sua identificação entre as proteínas do tecido muscular causou surpresa, no entanto, em estudos conduzidos em paralelo, de seqüenciamento do RNA total das mesmas amostras de tecido muscular em nosso laboratório, pode ser observados transcritos do gene codificante dessa proteína.

O resultado do presente estudo sobre a proteína ACBD6, com menor quantidade no grupo de indivíduos de menor força de cisalhamento, encontra-se em desacordo com o reportado por Bouley et al. (2004b). Esta proteína tem uma função importante no metabolismo da Acil-CoA, pois tem preferência ao se ligar a cadeias C18:1-CoA e pouca afinidade com cadeias C20:5-CoA e C16:0-CoA, e Garmyn et al. 2011, reportaram a correlação negativa da presença dos ácidos graxos de cadeia C18:1 com força de cisalhamento.

A ACBD6 também regula a liberação dos íons de cálcio do retículo sarcoplasmático, não permitindo a liberação discrepante de íons, ao aumentar a atividade dos canais de cálcio (FULCERI et al., 1997). Este processo ainda está ativo logo após o abate do animal (BOULEY et al., 2004b).

Já a proteína cytochrome b-c1 subunidade 1 mitocondrial, conhecida como complexo III subunidade 1, também estava em menor quantidade no grupo de menor força de cisalhamento. Não há relatos de associação dessa proteína com a maciez da carne bovina. Ela é uma importante proteína da cadeia transportadora de elétrons. Estudos anteriores sugerem que indivíduos que proporcionam carne de menor força de cisalhamento expressam mais proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo (BOULEY et al., 2004). No mesmo sentido, outros autores reportam que a maior proporção de fibras oxidativas de contração lenta, fibras do tipo 1, estão associadas a maior maciez da carne (PICARD et al., 2011).

3.4 Conclusões

Esse é o primeiro estudo de proteômica do tecido muscular, com bovinos de origem *Bos taurus indicus* (Nelore). Foi possível diferenciar as proteínas que estavam em diferentes quantidades nos extremos fenotípicos para força de cisalhamento da carne, e identificá-las em animais da raça Nelore. Porém, é complexo atribuir ao fenótipo de menor força de cisalhamento (maior maciez da carne) um específico biomarcador, pois, os resultados apresentados e já reportados na literatura, indicam diversas proteínas com diferentes quantidades para o fenótipo desejado. Isso faz com que as interações entre essas proteínas necessitem de mais estudos.

Os resultados confirmam a possibilidade de traçar um perfil de algumas proteínas, ou ainda com fragmentos das mesmas para identificar amostras que proporcionem carne de maior maciez em bovinos da raça Nelore.

Referências

- BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, Barking, v. 71, p. 138–149, 2005.
- BENDIXEN, E.; DANIELSEN, M.; HOLLUNG, K.; GIANAZZA, E.; MILLER, I. Farm animal proteomics: a review. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 282-293, 2011.
- BLUNT, B.C.; CREEK, A.T.; HENDERSON, D.C.; HOFMANN, P.A. H₂O₂ activation of HSP25/27 protects desman from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 293, p. 1518–1525, 2007.
- BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 1811-1824, 2004.
- BOULEY, J.; MEUNIER, B.; CULIOLI, J.; PICARD, B. Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. **Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants**, Vandoeuvre-lès-Nancy, v.11, p. 87–89, 2004b.
- CANAVEZ, F.C.; LUCHE, D.D.; STOTHARD, P.; LEITE, K.R.M.; SOUSA-CANAVEZ, J.M.; PLASTOW, G.; MEIDANIS, J.; SOUZA, M.A.; FEIJAO, P.; MOORE, S.S.; CAMARA-LOPES, L.H. Genome sequence and assembly of *Bos indicus*. **Journal of Heredity**, Washington, doi:10.1093/jhered/esr153, 2012.
- Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Johnson, D. D., Smith, T. P. L. Effects of calpastatin and μ -calpain

markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 84, p. 520-525, 2006.

CASSAR-MALEK, I.; JURIE, C.; BERNARD, C.; BARNOLA, I.; MICOL, D.; HOCQUETTE, J.F. Pasture-feeding of Charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 60, p. 83–90, 2009.

CREAGH, E.M.; SHEEHAN, D.; COTTER, T.G. Heat shock proteins modulators of apoptosis in tumors cells. **Leukemia**, London, v. 14, p. 1161–1173, 2000.

DOHERTY, M.K.; MCLEAN, L.; HAYTER, J.R.; PRATT, J.M.; ROBERTSON, D.H.; EL-SHAFEI, A.; GASKELL, S.J.; BEYNON, R.J. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 7, p. 2082–2093, 2004.

FISCHER, D.; MATTEN, J.; REIMANN, J., BÖNNEMANN, C.; SCHRÖDER, R. Expression, localization and functional divergence of alpha-B-crystallin and heat-shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 101, p. 297–304, 2002.

FULCERI, R.; KNUDSEN, J.; GIUNTI, R.; VOLPE, P.; NORI, A.; BENEDETTI, A. Fatty acyl-CoA–acyl-CoA-binding protein complexes activate the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Biochemical Journal**, London, v. 325, p. 423–428, 1997.

GARMYN, A.J.; HILTON, G.G.; MATEESCU, R.G.; MORGAN, J.B.; REECY, J.M.; TAIT, R.G. JR.; BEITZ, D.C.; DUAN, Q.; SCHOONMAKER, J.P.; MAYES, M.S.; DREWOSKI, M.E.; LIU, Q.; VANOVERBEKE, D.L. Estimation of relationships between mineral concentration and fatty acid composition of *Longissimus* muscle and beef palatability traits. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 89, n. 9, p. 2849-2858, 2011.

GUILLEMIN, N.; MURIEL BONNET, M.; CATHERINE JURIE, C.; BRIGITTE PICARD, B. Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 352-365, 2011b.

GUILLEMIN, N.; JURIE, C.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J.-F.; RENAND, G.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, New York, v. 5, p. 885–894, 2011a.

GUILLEMIN, N.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J.F.; JURIE, C.; MICOL, D.; LISTRAT, A.; LEVÉZIEL, H.; RENAND, G.; PICARD, B. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine: identification de marqueurs biologiques. **INRA Productions Animales**, Paris, v. 22, p. 331–344, 2009.

HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, New York, v. 1, p. 159–173, 2007.

JIA, X.; VEISETH-KENT, E.; GROVE, H.; KUZIORA, P.; AASS, L.; HILDRUM, K.I.; HOLLUNG, K. P eroxiredoxin-6: a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. 2391–2399, 2009.

JIA, X.; HOLLUNG, K.; THERKILDSEN, M.; HILDRUM, K.I.; BENDIXEN, E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 936–944, 2006.

JIA, X.; EKMAN, M.; GROVE, H.; FAERGESTAD, E.M.; AASS, L.; HILDRUM, K.I.; HOLLUNG, K. Proteome changes in bovine *Longissimus thoracis* muscle during the early postmortem storage period. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, p. 2720–2731, 2007.

KIM, N.K.; CHO, S.; LEE, S.H.; PARK, H.R.; LEE, C.S.; CHO, Y.M.; CHOY, Y.H.; YOON, D.; IM, S.K.; PARK, E.W. Protein in *Longissimus* muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, Barking, v. 80, p.1068–1073, 2008.

LAMETSCH, R.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 50, n. 20, p. 5508–5512, 2002.

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

LONERGAN, E.H.; ZHANG, W.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, Barking, v. 86, p. 184-195, 2010.

MORZEL, M.; TERLOUW, C.; CHAMBON, C.; MICOL, D.; PICARD, B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 297-304, 2007.

MUROYA, S.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OE, M.; NAKAJIMA, I.; SHIBATA, M.; CHIKUNI, K. Double phosphorylation of the myosin regulatory light chain during rigor mortis of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 3998-4004, 2007.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 44–58, 2006.

PAN, S.; ZHANG, H.; RUSH, J.; ENG, J.; ZHANG, N.; PATTERSON, D.; COMB, M.J.; AEBERSOLD, R. High-throughput proteome-screening for biomarker detection. **Molecular and Cellular Proteomics**, Rockville, v. 4, n. 2, p. 182–190, 2005.

PICARD, B.; BERRI, C.; LEFAUCHEUR, L.; MOLETTE, C.; SAYD, T.; TERLOUW, C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, Oxford, v. 9, p. 259-278, 2010.

PICARD, M.; HEPPLER, R.T.; BURELLE, Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v. 302, n. 4, p. 629-641, 2011.

Pinto, L. F. B., Ferraz, J. B. S., Meirelles, F. V., Eler, J. P., Rezende, F. M., Carvalho, M. E., Almeida, H. B., Silva, R. C. G. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1431-1442, 2010.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: user's guide**; Version 9.1. ed. Cary, 2003. 5136 p.

WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/ function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 72, p. 1063–1081, 1992.

WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L.V.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): carcass, yield, and *Longissimus* palatability traits. **Journal of Animal Science**, Albany, v.83, p. 196–207, 2005.

ANEXO

Resumo enviado a 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Relação entre polimorfismos e expressão dos genes da *μ-calpaína* e *calpastatina* de bovinos da raça Nelore¹

Minos Esperândio Carvalho², Gustavo Gasparin³, Gerson Barreto Mourão⁴, Saulo da Luz e Silva⁵,
Luciana Correia de Almeida Regitano⁶, Luiz Lehmann Coutinho⁴

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pelo CNPq

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Departamento de Zootecnia/Esalq - USP/Piracicaba. Bolsista da Capes. e-mail: minovisk@hotmail.com.br

³Pos-Doutorando do departamento de Zootecnia/Esalq – USP/Piracicaba. Bolsista do CNPq. e-mail: gustavo_gasparin@yahoo.com.br

⁴Professor Pesquisador do departamento de Zootecnia/Esalq – USP/Piracicaba. e-mail: llcoutin@esalq.usp.br

⁵Professor Pesquisador do departamento de Zootecnia/FZEA – USP/Piracicaba. e-mail: sauloluz@usp.br

⁶Pesquisadora Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste/Embrapa – São Carlos. e-mail: luciana@cppse.embrapa.br

Resumo: Os genes da calpaína e calpastatina estão envolvidos na proteólise do músculo no *post mortem*, o que pode influenciar na maciez da carne. Estudos recentes associaram polimorfismos desses genes com a maciez da carne em bovinos. O objetivo foi verificar a associação dos genótipos dos polimorfismos (CAPN4751 e UOGCAST) no gene da calpaína e calpastatina e suas respectivas expressões. Neste trabalho foram utilizados 75 animais da raça Nelore. Os genótipos foram identificados com sondas TaqMan® e a determinação da expressão foi realizada por meio de PCR em Tempo Real. Não foi verificada associação dos genótipos dos dois polimorfismos com a expressão dos seus respectivos genes.

Palavras-chave: bovinos, calpaína, calpastatina, expressão gênica, *longissimus dorsi*

Abstract: The *calpain* and *calpastatin* genes are involved in the muscle proteolysis *postmortem* process, which may influence meat tenderness. Recent studies associated polymorphisms within these genes with bovine beef tenderness. The objective was to verify the relationship of the CAPN4751 and UOGCAST SNPs in the *calpain* and *calpastatin* genes and their respective expression levels. 75 animals were genotyped through TaqMan® probes and the gene expression performed in a RT-Real Time PCR system. No association was verified between the genotypes from both the polymorphisms with their relative genic expression.

Keywords: bovine, *calpain*, *calpastatin*, genic expression, *longissimus dorsi*

Introdução

Os produtos gênicos da calpaína e calpastatina são conhecidos por serem os principais responsáveis pela proteólise no tecido muscular *post mortem*, a qual possui grande interesse comercial por controlar a maciez na carne, dependendo da sua intensidade e extensão. O menor nível enzimático das calpaínas e o maior nível da calpastatina em animais *Bos taurus indicus* seria uma das razões para menor maciez da carne nesses animais (Whipple et al., 1990). Todavia, os resultados obtidos por Hadlich et al. (2006) demonstraram que é possível se obter carne com maciez desejável em animais jovens da raça Nelore com apenas sete dias de maturação. Este fato é indicador da existência de variabilidade genética na raça e justifica a possibilidade da seleção e com possível melhoramento dessa característica. Recentemente, alguns marcadores no gene da calpaína (CAPN) e na calpastatina (CAST) denominados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) foram associados favoravelmente com maciez da carne bovina (Casas et al, 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre a expressão gênica da *calpaína* e *calpastatina* em bovinos da raça Nelore. A expressão gênica relativa é baseada na relação da expressão do gene de interesse e um gene de referência, e normalmente utilizada quando o objetivo é comparar diferenças de expressão gênica entre tratamentos ou condições fisiológicas. Em 1994, Killefer e Koohmaraie verificaram maior expressão de RNA mensageiro da *calpastatina* em bovinos, quando tratados com agonistas beta-adrenérgicos, seguido de maior atividade da calpastatina, no músculo *Longissimus dorsi*. Visando melhor entendimento entre expressão gênica e os resultados sobre polimorfismos desses genes citados na literatura, o objetivo foi verificar a associação dos polimorfismos dos genes *calpaína* e *calpastatina* com a expressão dos mesmos em amostras de músculos de bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

Animais avaliados. Foram utilizados 75 animais da raça Nelore, com aproximadamente 24 meses de idade, criados a pasto e terminados em confinamento por 90 dias antes do abate. Cinco mL

de sangue de cada um dos animais foram coletados para extração de DNA e uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* foi coletada logo após o abate e armazenada em nitrogênio líquido até ser processada. O RNA total foi isolado a partir da homogeneização do tecido em reagente Trizol[®], segundo protocolo do fabricante. Depois de extraídas, as amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro e visualizadas em gel de agarose 1,5% para verificação da integridade do material. **Identificação dos polimorfismos.** A determinação dos genótipos dos dois marcadores foi realizada por meio de PCR em Tempo Real (ABI Prism[®] 7500 - *Applied Biosystems*) através do sistema de detecção *TaqMan[®]*, sendo sintetizadas sondas fluorescentes específicas que pareiam seletivamente no DNA molde onde se encontra o polimorfismo de interesse (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sondas

Marcador	Seqüência	Sondas
CAPN4751	F: TGGCATCCTCCCCTTGACT R:CCCCGTCACCTTGACACA	CTGCGCCTCG/AGTTT
UOCAST1	F: GGAAGGAAGGAATTGCATTGTTTCA R:CACTTGTGTTTTATGTAGTCAATTGTGAGAA	CTTTGGGTAG/CAAATT

Na reação de PCR foi utilizado aproximadamente 15 ng de DNA em volume final de 25 µl, contendo 0,2 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em 32 ciclos de 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 58°C e 1 minuto à 72°C. Os marcadores utilizados e as respectivas seqüências de seus *primers* e sondas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos marcadores investigados e as respectivas referências

Marcador	Cromossomo	Intron	Inversão de Nucleotídeo	Posição do Nucleotídeo	Nº de acesso (GenBank)	Referência
CAPN4751	29	18	C/T	6545	AF248054	White et al. (2005)
UOCAST1	7	5	C/G	282	AY008267	Schenkel et al. (2006)

Avaliação da expressão gênica. O cDNA foi sintetizado com o kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* da Roche[®] a partir de 1 µg de RNA total. A determinação da expressão dos genes-alvo (calpastatina e calpaína) e do gene referência *EEF-1* (*Eukaryotic Elongation Factor 1*) foi realizada por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento *LigthCycler* (Roche[®]) e reagente *SYBR[®]Green*. **Análise dos Resultados.** Os valores de expressão das amostras para os genes *calpaína*, *calpastatina* e *EEF-1* foram determinados em valores de Ct (*Threshold cycle* - ciclo de corte). As eficiências de amplificação das amostras para os genes foram determinadas através de transformação logarítmica da fluorescência das amostras na fase linear de amplificação pelo programa *LinRegPCR* e foram utilizadas para pré-ajustar os valores de Ct de cada uma das amostras. A normalização foi realizada utilizando-se o efeito aleatório de amostragem, obtido a partir dos genes alvo e referência. A análise de associação entre os genótipos e a expressão foi feita usando um modelo misto considerando o Ct como variável resposta, com os efeitos de abate e genótipos como fixos e o efeito de pai como aleatório. A inclusão dos genes UOCAST1 e CAPN4751 foram realizadas individualmente no processo de análise.

Resultados e Discussão

Segundo Casas et al. (2006) e Schenkel et al. (2006), os polimorfismos CAPN4751 e UOCAST estão associados com maciez da carne em bovinos. E para Killefer e Koohmaraie (1994), a maior expressão gênica da calpastatina está relacionada com sua maior atividade enzimática. Porém, no presente estudo, não houve associação dos genótipos, tanto de CAPN4751 quanto de UOCAST, com as respectivas expressões dos genes da calpaína e calpastatina (Tabela 3), o que é indicador de que esses polimorfismos não são os responsáveis diretos pela alteração no fenótipo. Estes podem estar em desequilíbrio de ligação com alguma outra mutação que esteja efetivamente atuando sobre a característica, a qual pode estar no mesmo gene ou em alguma região mais distante. Procurou-se, nas análises de expressão gênica, inovar ao se considerar um modelo misto a fim de realizar a correção dos valores de Ct utilizando os valores das próprias amostras como fator de correção.

Tabela 3. Associação genotípica dos polimorfismos nos genes da calpaína e calpastatina, com a expressão dos mesmos, em valores de Ct (*threshold cycle* - ciclo de corte).

Marcador / Gene	Genótipo	Fr (%) ¹	Ct±EP ²
CAPN4751/calpaína Valor P > 0,73	CC	5,33	28,0±0,48
	CT	30,66	28,2±0,20
	TT	64,00	28,4±0,13
UOCAST/calpastatina Valor P > 0,83	CC	24,00	24,7±0,20
	CG	53,33	24,8±0,14
	GG	22,66	24,9±0,21

¹ Fr = Frequência dos genótipos; ² Ct = Valor do ciclo de corte ± erro-padrão.

Conclusões

Não há associação entre genótipos dos marcadores CAPN4751 e UOCAST e expressão gênica de calpaína e calpastatina na população de bovinos Nelore avaliada no presente trabalho. Futuros estudos em outras populações, com maior tamanho amostral, poderão dar suporte aos resultados aqui obtidos.

Literatura citada

- CASAS, E. et al. **Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits.** *J. Anim. Sci.* v. 84, p. 520-525, 2006.
- HADLICH, J.C. et al. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. *Acta Sci. Animal Science*, v. 28, n. 1, p. 57-62, 2006.
- KILLEFER, J. and KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. *J. Anim. Sci.* v.72, p.606-614, 1994.
- SCHENKEL, F.S. et al. **Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle.** *J. Anim. Sci.* v. 84, p. 291-299, 2006.
- WHIPPLE, G. et al. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, Nebraska, v. 74, p. 2394, 1990.
- WHITE, S.N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J. Anim. Sci.*, v. 83, n. 9, p.2001-2008, 2005.