

TAIANE DA SILVA MARTINS

**FIBROGÊNESE E ADIPOGÊNESE INTRAMUSCULAR E PROTEÓLISE
POST MORTEM EM BOVINOS NELORE E ANGUS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M386f
2015
Martins, Taiane da Silva, 1988-
Fibrogênese e adipogênese intramuscular e proteólise post mortem em bovinos Nelore e Angus. / Taiane da Silva Martins. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 51f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luciana Navajas Rennó.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino de corte. 2. Tecido adiposo. 3. Carne bovina - Composição. 4. Carne bovina - Teor de gordura. 5. Colágeno. 6. Proteólise. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
II. Título.

CDD 22. ed. 636.213

TAIANE DA SILVA MARTINS


**FIBROGÊNESE E ADIPOGÊNESE INTRAMUSCULAR E PROTEÓLISE
POST MORTEM EM BOVINOS NELORE E ANGUS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

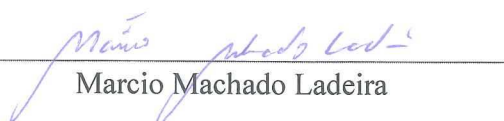
APROVADA: 30 de março de 2015



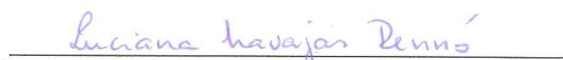
Mário Luiz Chizzotti
(Coorientador)



Simone Eliza Facioni Guimarães
(coorientadora)



Marcio Machado Ladeira



Luciana Navajas Rennó
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Reiner e Fátima, pelo incentivo, paciência e apoio de sempre. Aos meus queridos irmãos, Tamara, Tatiane e Reiner Júnior pela amizade, companheirismo e compreensão nos momentos difíceis. A minha sobrinha Marcella, por toda alegria, amor e luz.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus pai, sabedoria suprema de todas as coisas.

À Universidade Federal de Viçosa, principalmente ao Departamento de Zootecnia pelos ensinamentos e contribuição em minha formação acadêmica.

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante todo o curso de mestrado.

A professora Luciana Rennó, pela orientação, apoio e amizade.

Ao professor Mario Chizzotti pela dedicação, empenho e ensinamentos.

A professora Simone, pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao professor Pedro Veiga, ex-orientador e eterno mestre.

Agradeço em especial, ao professor Marcio Duarte. Pela confiança, incentivo e apoio na orientação durante todo período do curso. Muito obrigada por sua contribuição na realização deste trabalho.

Ao laboratório de biotecnologia animal (LABTEC) e todos os seus membros. Walmir, Letícia, Margareth, Carol, Darlene, Vanessa e demais. Obrigada pelos ensinamentos e pela excelente convivência.

Ao laboratório de qualidade da carne e a todos os seus membros. Principalmente aos amigos, Lyvian, Juliana, Jaqueline e Luiz Janaúba.

Aos companheiros e amigos de jornada Jarbas, Bruninho, Diego Zanetti, Gercino, Mariele, Bruna, Lorena, Luana, Adriana, Cássia, Marcília e tantos outros que passaram por minha vida.

Ao Wander Furtado Garbero, obrigada pelas conversas, desabafos e conselhos.

Agradeço a minha família, meu alicerce, minha base. Apoio insubstituível que se fez sempre presente quando necessário.

A todos vocês que contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Taiane da Silva Martins, Filha de Reiner Martins e Maria de Fátima da Silva Martins, nascida em Viçosa-MG, em outubro de 1988.

Ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa em 2008. Graduando em maio de 2013.

Iniciou-se o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa em abril de 2013. Submetendo-se a defesa da dissertação de mestrado no dia 30 de março de 2015.

EPÍGRAFE

Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem

Tem gente que está do mesmo lado que você
Mas deveria estar do lado de lá
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Tem gente enganando a gente

Veja a nossa vida como está
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança

Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior, de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança...
Quem acredita sempre alcança...
Quem acredita sempre alcança...
Quem acredita sempre alcança...
Renato Russo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	7

CAPÍTULO 1: Adipogênese intramuscular de bovinos Nelore e Angus associada a células adipo-fibroblásticas do tecido muscular esquelético.

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31

CAPÍTULO 2: Proteólise post-mortem em bovinos Nelore e Angus. Atividade da calpastatina, expressão gênica e proteica de marcadores da maciez da carne.

RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	50

RESUMO

MARTINS, Taiane da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015.

Fibrogênese e adipogênese intramuscular e proteólise post mortem em bovinos nelore e angus. Orientadora: Luciana Navajas Rennó. Co-Orientadores: Mario Luiz Chizzotti e Simone Eliza Facioni Guimarães.

O presente trabalho foi desenvolvido a partir de dois experimentos descritos em dois capítulos. O primeiro com objetivo de verificar se a adipogênese contribuiria para discrepância no teor de gordura intramuscular presente na carne de animais Nelore comparado a animais Angus em fase de terminação. Objetivou-se ainda investigar se possíveis diferenças na quantidade de células adipo-fibrogênicas presentes no tecido muscular esquelético de animais Angus e Nelore estaria associada à diferença no teor de gordura intramuscular da carne oriunda desses animais. Foram utilizados 6 animais da raça Nelore (peso inicial = $372,5 \pm 37,3$ kg) e 6 da raça Angus (peso inicial = $382,8 \pm 23,9$ kg), mantidos sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram abatidos no final do período de terminação, e amostras do Longissimus dorsi foram coletadas logo após a sangria, para posterior análises de expressão gênica (RT-PCR) e expressão proteica (Western blot). Outras amostras na mesma região muscular foram coletadas 24 horas após o abate, para posterior análise de extrato etéreo e colágeno. Os genes adipogênicos avaliados foram: *C/EBP α* , *PPAR γ* e *Zfp423*; Sendo que o *PPAR γ* e *Zfp423* também tiveram sua expressão proteica avaliada. Os genes fibrogênicos avaliados foram: *COL1A1*, *COL3A3*, *FN1*, *LOX*, *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *TGF- β* , para o *TGF- β* também foi realizada expressão de proteína. Além dessas, foram realizadas expressão proteica da *SMAD* (proteína envolvida na iniciação da fibrogênese) e da *PDGFR α* (proteína indicadora de células indiferenciadas), comum às vias de sinalização adipogênica e fibrogênica. Não foi observada diferença significativa para expressão gênica dos mRNA adipogênicos e fibrogênicos ($P > 0,05$). No entanto, houve diferença significativa entre Angus e Nelore para expressão proteica do *SMAD* ($P < 0,05$), *PPAR γ*

($P < 0,05$) e $PDGFR\alpha$ ($P < 0,05$), em que tais proteínas foram mais expressas nos animais da raça Angus. Embora não tenha sido encontrada diferença para quantificação química de colágeno e sua solubilidade ($P > 0,05$), houve diferença entre as raças para quantificação química do extrato etéreo, indicando maior deposição de gordura intramuscular em Angus do que em Nelore ($P < 0,001$). Conclui-se que existe diferença na adipogênese intramuscular entre animais Angus e Nelore, o que contribui para diferenças na quantidade de tecido adiposo intramuscular depositado na carne destes animais. Além disso, a maior expressão de $PDGFR\alpha$ em Angus em relação a Nelore evidencia maior número de células mesenquimais indiferenciadas em músculo esquelético de animais Angus em relação a animais Neloires. Dada à capacidade adipogênica das células $PDGFR\alpha$ associado à ausência de diferenças entre as raças quanto à fibrogênese, a maior abundância de células mesenquimais indiferenciadas observada no tecido muscular esquelético dos animais Angus explica a diferença quanto à adipogênese intramuscular entre as raças estudadas. No segundo experimento, objetivou-se avaliar a atividade da calpastatina e expressão de mRNA de possíveis marcadores da maciez da carne no músculo Longíssimus dorsi de Angus e Nelore. Foram utilizados os mesmos animais do experimento anterior. Os animais foram abatidos no final do período de terminação, e amostras do Longissimus dorsi foram coletadas logo após a sangria, para posterior análises de expressão gênica (RT-PCR) para calpaína 3 (CAPN3), calpastatina (CAST), caspase 3 (CASP3) e HSP70 (DNAJA1) e também expressão proteica (Western blot) para calpaína e calpastatina. Outras amostras na mesma região muscular foram coletadas 24 horas após o abate, para posterior análise de atividade da calpastatina, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar (IMF). Não houve diferença significativa para expressão gênica da CAPN3, CAST, CASP3 e DNAJA1 ($P > 0,05$). Apesar da atividade da

calpastatina ter sido maior em Nelore do que em Angus ($P = 0,0292$), não houve diferença para a expressão proteica da calpastatina e nem da calpaína ($P > 0,05$). No entanto, observou-se diferença significativa para o índice de fragmentação miofibrilar ($P = 0,0051$), em que a carne de Angus apresentou maior IMF que a do Nelore. Conclui-se que embora haja diferença na atividade da calpastatina entre os dois grupos genéticos estudados, não se verificou diferença quanto a abundância dessas proteínas na carne de Nelore e Angus. No entanto, o maior índice de fragmentação miofibrilar dos Angus indica maior degradação miofibrilar post – mortem e conseqüentemente carne mais macia do que Nelore. A ausência de diferença na expressão da caspase e da HSP70 aqui encontrada, deve ser melhor investigada a fim de esclarecer melhor a importância destas proteínas no amaciamento da carne de bovinos Nelore e Angus.

ABSTRACT

MARTINS, Taiane da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2015. **Intramuscular adipo/fibrogenesis and postmortem proteolysis in Nellore and Angus Cattle.** Advisor: Luciana Navajas Rennó. Co-advisor: Mario Luiz Chizzotti e Simone Eliza Facioni Guimarães.

This work presents two experiments that were described separately in chapters. The first trial was conducted to evaluate if the difference between Angus and Nellore on intramuscular fat content after finishing period can be explained by adipogenesis. In addition, was evaluated if discrepancy of intramuscular fat content in beef from Nellore and Angus is associated with differences on amount of intramuscular adipo/fibrogenic cells. Six Nellore (initial body weight = 372.5 ± 37.3 kg) and six Angus (initial body weight = 382.8 ± 23.9 kg) were confined at the same experimental conditions. At the end of finishing period, the animals were slaughtered and longissimus muscle samples for quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were collected just after exsanguination. Longissimus muscle samples for ether extract and collagen assays were obtained at the same carcass region after 24 hours chilling. The qPCR were performed to evaluate mRNA expression of adipogenic genes (C/EBP α , PPAR γ and Zfp423) and fibrogenic genes (COL1A1, COL3A3, FN1, LOX, MMP2, TIMP1, TIMP2, TIMP3 and TGF- β). Western blot assays were performed to evaluate protein expression of adipogenic markers (PPAR γ and Zfp423), the fibrogenic marker TGF- β and genes related with both pathways (SMAD and PDGFR α). No differences ($P > 0.05$) were observed for mRNA expression of neither adipogenic nor fibrogenic markers. However, the breed affected ($P < 0.05$) protein expression of SMAD, PPAR γ and PDGFR α , which were greater in Angus than Nellore. Although meat collagen content and solubility did not differ ($P > 0.05$) among breeds, Angus meat presented greater ($P < 0.001$) ether extract content than Nellore, proving greater intramuscular fat in Angus beef. In conclusion, the Angus enhanced adipogenesis contribute to greater intramuscular fat

content of this breed in contrast to Nellore cattle. In addition, Angus higher PDGFR α expression likely indicate greater muscle content of undifferentiated mesenchymal cells than Nellore. Our data suggest that although PDGFR α cells have adipo/fibrogenic capacity, fibrogenesis is not different among breeds thus greater density of undifferentiated mesenchymal cells in Angus explain the greater adipogenesis compared to Nellore. The second trial aimed to evaluate calpastatin activity and gene expression of meat tenderness markers of longissimus muscle from Angus and Nellore. The same animals from the first trial were used. At the end of finishing period, the animals were slaughtered and longissimus muscle samples for quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were collected just after exsanguination. The qPCR were performed to evaluate mRNA expression of calpain 3 (CAPN3), calpastatin (CAST), caspase 3 (CASP3) and HSP70 (DNAJA1). Protein expression (Western blot) of calpain and calpastatin were also evaluated. Longissimus muscle samples for calpastatin activity, Warner-Bratzler shear force and myofibrillar fragmentation index (MFI) assays were obtained at the same carcass region after 24 hours chilling period. The mRNA expression of CAPN3, CAST, CASP3 and DNAJA1 genes did not differ ($P > 0.05$) among breeds. Although Nellore calpastatin activity was greater ($P = 0.0292$) than Angus, no difference was observed ($P > 0.05$) among breeds for calpastatin and calpain protein expression. The MFI differ ($P = 0.0051$) among breeds, which was greater in Angus than Nellore beef. In conclusion, although calpastatin activity is different among breeds the calpastatin and calpain protein abundance are not. Beef from Angus presents greater postmortem myofibril proteolysis and consequently greater tenderness than Nellore beef. Furthermore, the absence of HSP70 and caspase expression differences needs further investigation to better clarify the role of these proteins on meat tenderness.

INTRODUÇÃO GERAL

A carne brasileira é oriunda principalmente de animais zebuínos da raça Nelore, que por sua vez é apontada por muitos como uma raça que apresenta predisposição genética para baixa deposição de gordura intramuscular quando comparada a animais de origem europeia. Baseado em tal afirmação, estudos apontam além desse motivo, o alto teor de colágeno como fatores contribuintes para redução da maciez da carne de animais zebuínos (Oliveira et al., 2011). Entretanto, as conclusões obtidas nestes estudos são fundamentadas principalmente na precocidade da raça, uma vez que animais taurinos apresentam maiores taxas de crescimento em relação a animais zebuínos, ao passo que avaliações de possíveis diferenças em vias de sinalização celular são raramente estudadas.

A intensidade dos programas de seleção animal visando o aumento da deposição de tecido magro tem como um dos principais impactos a redução da deposição do tecido adiposo intramuscular, intermuscular e subcutâneo. A redução do tecido adiposo intramuscular visualmente localizado entre células musculares apresenta-se intrinsecamente relacionado a aspectos sensoriais da carne tais como suculência, maciez e sabor (Hausman et al., 2009, Du et al., 2010b;). O baixo teor de gordura intramuscular na carne bovina produzida no Brasil contribui de forma significativa para que a carne in natura brasileira tenha baixo valor agregado frente ao mercado internacional.

Em animais de produção, o processo de adipogênese é marcado por modificações celulares assíncronas onde são formados primariamente o tecido adiposo visceral seguido pelo intermuscular, subcutâneo e mais tardiamente o intramuscular (Hausman et al., 2009). Dessa forma, o insucesso de estudos que visam aumentar o teor de gordura intramuscular via suplementação alimentar de bovinos de corte na fase de

terminação, ocorre possivelmente, pelo fato de que grande parte da energia suplementar é utilizada para a hiperplasia e hipertrofia de adipócitos do tecido adiposo visceral e apenas uma pequena parte da energia consumida é utilizada para deposição de tecido adiposo intramuscular (Hausman et al., 2009; Smith et al., 2009; Du e Dodson, 2012). Assim, uma vez que o desenvolvimento da gordura intramuscular não ocorre de forma independente dos demais tipos de tecidos adiposos (Albrecht et al., 2011), a busca pelo aumento do marmoreio na carne bovina sem causar aumento excessivo da deposição de gordura no animal tem se tornado alvo de pesquisas recentes.

A adipogênese é regulada em grande parte pelos fatores de transcrição pertencentes à família C/EBP (Enhancer binding protein) e o PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) (Dodson et al., 2010a; Du et al., 2010b; Yamada et al., 2009). Durante a adipogênese, C/EBP α é ativado e se liga diretamente aos promotores de PPAR γ , que por sua vez são induzidos a expressão. A expressão de PPAR γ desencadeia a expressão de C/EBP α , promovendo uma ação auto-reguladora entre estes fatores, fazendo-se necessária a ação conjunta destes para estimular a diferenciação das células mesenquimais em adipócitos (Rosen et al., 2002).

Em estudos recentes sobre fatores de transcrição do processo de adipogênese foi detectado o fator Zfp423 como marcador para estágios iniciais do processo de adipogênese (Gupta et al., 2010; Gupta et al., 2012). Denominado Zinc-finger protein 423, o Zfp423 é um fator que promove a adipogênese através do aumento da expressão do PPAR γ . Resultados apresentados por Gupta et al. (2010) demonstram que o fator de transcrição Zfp423 é abundantemente expresso na fração estromal-vascular de tecidos contendo pré-adipócitos bem como em adipócitos maduros. Além disso, o Zfp423 foi identificado como gene responsável pela expressão de grande parte dos marcadores para

pré-adipócitos (Gupta et al., 2012) e pode regular a expressão do $PPAR\gamma$ em fibroblastos induzindo a diferenciação de tais células em adipócitos (Gupta et al., 2010).

Além do Zfp423, o Fator-2 de Crescimento de Fibroblasto (FGF-2) tem sido reportado como outro fator de transcrição que pode causar aumento da adipogênese (Kakudo et al., 2007). Inoue et al. (2005) observaram que células-tronco oriundas de tecido adiposo ao receberem FGF-2 foram induzidas à adipogênese com aumento de atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, a qual facilita a conversão de glicose em triglicerídeos. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) atuam como sinalizadores moleculares que se ligam e ativam os receptores FGF (FGFr) os quais por sua vez mediam a sinalização através do recrutamento de moléculas específicas para se ligarem à tirosina fosforilada na região citosólica do receptor (Yun et al., 2010). Em trabalho com células-tronco adiposas, Kakudo et al., (2007) sugeriram que o processo de adipogênese ocorreu em função do aumento da expressão do FGF-2, que por sua vez desencadeou o aumento da expressão de $PPAR\gamma$ e conseqüentemente ao aumento da adipogênese.

Assim como a adipogênese, a fibrogênese é fundamental para aspectos qualitativos da carne uma vez que essa via é responsável pela formação do tecido conectivo o qual se apresenta negativamente correlacionado com a maciez da carne (Duarte et al., 2011). Colágeno tipo I e tipo III são os tipos mais abundantes no músculo esquelético (Huang et al., 2012). Colágeno tipo I é caracterizado por filamentos espessos e apresenta-se em maior quantidade em relação ao Colágeno tipo III em músculos com predominância de fibras oxidativas. Por outro lado, o colágeno tipo III é constituído de finos filamentos e mais abundante em músculos com predominância de fibras glicolíticas. A fibrogênese é mediada principalmente pelo Fator Transformador de Crescimento beta ($TGF-\beta$) que promove a fosforilação das proteínas SMAD2 e

SMAD3 que reagem com SMAD4 e translocam-se para o núcleo e iniciam a transcrição dos genes-alvo do *TGFβ* (Gosselin et al., 2004; Decolonne et al., 2007), tais como a Fibronectina e Colágeno Tipo I (Kennedy et al., 2008).

Células musculares, adipócitos e fibroblastos são derivados do mesmo pool de células mesenquimais indiferenciadas abundantemente encontradas no tecido muscular esquelético durante estágios iniciais do desenvolvimento (Du et al., 2010a; Duarte et al., 2012; Paulino et al., 2012). Contudo, a maior parte destas células é direcionada à linhagem miogênica restando uma porção reduzida de células passíveis de se diferenciarem em adipócitos e/ou fibroblastos. Segundo Uezumi et al. (2011), fibroblastos e adipócitos competem por células mesenquimais indiferenciadas por meio de uma via de sinalização comum. Recentemente foi demonstrado que células mesenquimais progenitoras contribuem para formação de tecido adiposo em tecido muscular esquelético (Uezumi et al., 2010) além de apresentarem capacidade de diferenciarem-se em fibroblastos (Joe et al., 2010). Estas células possuem habilidade de induzir a fibrogênese em músculo esquelético através da ativação da expressão dos receptores α de fatores de crescimento derivados de plaquetas (*PDGFR α*), sugerindo que o tecido adiposo e tecido conectivo são oriundos da mesma população de células (Olson e Soriano, 2009). Estudos in vitro e in vivo demonstram que além da capacidade adipogênica, as células positivas para *PDGFR α* também expressam colágenos Tipo I e III, comprovando assim a capacidade fibrogênica das mesmas (Uezumi et al., 2011).

Os resultados dos estudos citados anteriormente nos levam a crer que seja possível que animais da raça Nelore apresentem menor expressão gênica de fatores transcricionais responsáveis pela deposição de tecido adiposo em relação a animais taurinos, o que caracterizaria assim, um fator intrinsecamente relacionado à raça. Além disso, uma vez que resultados recentes de pesquisa demonstrem um potencial

antagonismo entre a adipogênese e fibrogênese em tecido muscular esquelético, a menor deposição de gordura intramuscular pode ser um dos principais fatores responsáveis pela maior deposição de tecido conectivo em animais Nelore.

Dessa forma, devido à ausência de informações sobre aspectos moleculares ligados à deposição de gordura intramuscular e colágeno em animais Nelore, com os resultados até então reportados na literatura, torna-se impossível discernir se o baixo teor de gordura de marmoreio na carne destes animais é uma característica diretamente ligada à raça, sendo este o motivo pelo qual propõe-se a realização deste trabalho.

Além da gordura intramuscular e do colágeno, a qualidade da carne é também influenciada pela degradação miofibrilar. O sistema calpaína-calpastatina é o principal sistema proteolítico que afeta a degradação das fibras musculares durante o período post - morte e, conseqüentemente, afeta a maciez da carne (Taylor et al.,1995). Neste contexto, a menor de maciez da carne bovina brasileira baseia-se no fato de que ela é originada principalmente de bovinos *Bos indicus*, que poderia apresentar uma menor atividade de calpaína em relação aos animais *Bos taurus* (Koohmaraie, 1994). No entanto, a maioria dos estudos que compararam a atividade calpaína-calpastatina e sua relação com a maciez da carne entre bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*, não utilizaram a raça Nelore. O Nelore é a principal raça de gado de corte produzido no Brasil, e a maior atividade da calpastatina tem sido apontada como um dos principais fatores que influencia na discrepância da maciez da carne entre Nelore e Angus. No entanto, a diferença na proteólise post - morte entre essas raças pode não só estar ligada ao sistema calpaína/calpastatina, como também em outros sistemas proteolíticos que podem influenciar a maciez da carne.

Além do complexo calpaína-calpastatina existem vários outros complexos enzimáticos que foram sugeridos em estar envolvidos com o amaciamento da carne. Um

deles é o complexo caspase, que provoca a degradação de proteínas celulares iniciando a apoptose celular e só depois teria ação por outras enzimas proteolíticas, incluindo a calpaína (Ouali et al., 2006). Por outro lado, ao mesmo tempo em que essas enzimas atuam sobre a degradação miofibrilar, há um aumento dos níveis de proteínas de choque térmico (HSP), que atuam para preservar as funções celulares (Arrigo et al. 2005; Beere et al. 2005; Flower et al. 2005) e, portanto, estaria inibindo o processo de amaciamento da carne.

Diante disso, surgiu a hipótese que, além da diferença da atividade enzimática da calpastatina, a expressão gênica de outras enzimas proteolíticas e HSP diferem no músculo esquelético de Nelore e Angus contribuindo para a discrepância na maciez da carne entre estas raças.

Sendo assim, objetivou-se no presente trabalho:

1º) Investigar se possíveis diferenças na expressão de genes de células adipogênicas presentes no tecido muscular esquelético de animais Angus e Nelore, estaria associada à diferença na adipogênese intramuscular.

2º) Investigar se possível diferença na adipogênese intramuscular estaria contribuindo para a discrepância de marmoreio entre os dois grupos genéticos estudados.

3º) Avaliar a atividade da calpastatina e expressão de genes relacionados a maciez da carne no músculo Longísimus dorsi de Angus e Nelore.

4º) Esclarecer melhor se a diferença na maciez dessas raças estariam relacionadas as diferenças na expressão gênica e proteica de alguns marcadores da maciez da carne.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Albrecht, E., T. Gotoh, F. Ebara, J. X. Xu, T. Viergutz, G. Nürnberg, S. Maak, and J. Wegner. 2011. Cellular conditions for intramuscular fat deposition in japanese black and holstein steers. *Meat Science* 89: 13-20.

Arrigo, A. P. (2005). Heat shock proteins as molecular chaperones. *Medicine Sciences*, 21(6-7), 619-625.

Beere, H. M. (2005). Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2633-2639.

Decologne, N., M. Kolb, P. J. Margetts, F. Menetrier, Y. Artur, C. Garrido, J. Gauldie, P. Camus, and P. Bonniaud. 2007. Tgf-beta1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 179: 6043-6051.

Dodson, M. V., G. J. Hausman, L. Guan, M. Du, T. P. Rasmussen, S. P. Poulos, P. Mir, W. G. Bergen, M. E. Fernyhough, D. C. McFarland, R. P. Rhoads, B. Soret, J. M. Reecy, S. G. Velleman, and Z. Jiang. 2010a. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int J Biol Sci* 6: 691-699.

Dodson, M. V., Z. Jiang, J. Chen, G. J. Hausman, L. L. Guan, J. Novakofski, D. P. Thompson, C. L. Lorenzen, M. E. Fernyhough, P. S. Mir, and J. M. Reecy. 2010b. Allied industry approaches to alter intramuscular fat content and composition in beef animals. *Journal of Food Science* 75: R1-R8.

Du, M., and M. V. Dodson. 2012. Advanced techniques to enhance marbling in meat. In: S.-T. Joo (ed.) *Control of meat quality*. Research signpost, Kerala.

Du, M., J. Tong, J. Zhao, K. R. Underwood, M. Zhu, S. P. Ford, and P. W. Nathanielsz. 2010a. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim Sci*. 88: E51-60.

Du, M., J. Yin, and M. J. Zhu. 2010b. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Science* 86: 103-109.

Duarte, M. S., P. V. Paulino, M. A. Fonseca, L. L. Diniz, J. Cavali, N. V. Serao, L. A. Gomide, S. F. Reis, and R. B. Cox. 2011. Influence of dental carcass maturity on carcass traits and meat quality of nellore bulls. *Meat Sci* 88: 441-446.

Duarte, M. S., P. V. R. Paulino, and M. Du. 2012. Fetal programming in beef cattle: How to optimize performance and carcass value in early life stages. In: VIII Symposium of beef cattle production, Viçosa, MG - Brazil

Flower, T. R., Chesnokova, L. S., Froelich, C. A., Dixon, C., & Witt, S. N. (2005). Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *Journal of Molecular Biology*, 351(5), 1081–1100.

Gosselin, L. E., J. E. Williams, M. Deering, D. Brazeau, S. Koury, and D. A. Martinez. 2004. Localization and early time course of tgf-beta 1 mrna expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30: 645-653. Gupta, R. K., Z. Arany, P. Seale, R. J. Mepani, L. Ye, H. M. Conroe, Y. A. Roby, H. Kulaga, R. R. Reed, and B. M. Spiegelman. 2010. Transcriptional control of preadipocyte determination by zfp423. *Nature* 464: 619-623.

Gupta, R. K., R. J. Mepani, S. Kleiner, J. C. Lo, M. J. Khandekar, P. Cohen, A. Frontini, D. C. Bhowmick, L. Ye, S. Cinti, and B. M. Spiegelman. 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* 15: 230-239.

Hausman, G. J., M. V. Dodson, K. Ajuwon, M. Azain, K. M. Barnes, L. L. Guan, Z. Jiang, S. P. Poulos, R. D. Sainz, S. Smith, M. Spurlock, J. Novakofski, M. E. Fernyhough, and W. G. Bergen. 2009. Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci* 87: 1218-1246.

Huang, Y., X. Yan, M. J. Zhu, R. J. McCormick, S. P. Ford, P. W. Nathanielsz, and M. Du. 2010. Enhanced transforming growth factor- β signaling and fibrogenesis in ovine fetal skeletal muscle of obese dams at late gestation. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 298: E1254-E1260.

Huang, Y., J. X. Zhao, X. Yan, M. J. Zhu, N. M. Long, R. J. McCormick, S. P. Ford, P. W. Nathanielsz, and M. Du. 2012. Maternal obesity enhances collagen accumulation and cross-linking in skeletal muscle of ovine offspring. *PLoS ONE* 7: e31691.

Inoue, S., Y. Hori, Y. Hirano, T. Inamoto, and Y. Tabata. 2005. Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipo-stromal cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 16: 57-77.

Joe, A. W. B., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M. A. Rudnicki, and F. M. V. Rossi. 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature Cell Biology* 12: 153-U144.

Kakudo, N., A. Shimotsuma, and K. Kusumoto. 2007. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 239-244.

Kennedy, L., X. Shi-Wen, D. E. Carter, D. J. Abraham, and A. Leask. 2008. Fibroblast adhesion results in the induction of a matrix remodeling gene expression program. *Matrix Biol* 27: 274-281.

Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science* 36 : 93-104.

Oliveira, I. M. d., P. V. R. Paulino, M. I. Marcondes, S. d. C. Valadares Filho, J. Cavali, L. F. Prados, M. d. S. Duarte, and E. Detmann. 2011. Beef quality traits of nellore, f1 simmental × nellore and f1 angus × nellore steers fed at the maintenance level or ad libitum with two concentrate levels in the diet. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 2894-2902.

Olson, L. E., and P. Soriano. 2009. Increased pdgfralpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell* 16: 303-313.

Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1), 44–58.

Paulino, P. V. R., D. M. S., and M. P. Gionbelli. 2012. Desempenho e eficiência de ganho no confinamento: Tudo começa antes do que você imagina. In: S. Consultoria (ed.) Encontro de confinamento da Scot Consultoria No. 1. p 37-56. Gráfica e Editora Multipress, Ribeirão Preto.

Rosen, E. D., C.-H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez, and B. M. Spiegelman. 2002. C/ebpα induces adipogenesis through pparγ: A unified pathway. *Genes & Development* 16: 22-26.

Smith, S. B., H. Kawachi, C. B. Choi, C. W. Choi, G. Wu, and J. E. Sawyer. 2009. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J Anim Sci* 87: E72-82.

Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, & V. F. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science* 73 : 1351-1367.

Uezumi, A., S. Fukada, H. Yamada, S. Takeda, and K. Tsuchida. 2010. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Differentiation* 80: S41-S41.

Uezumi, A., T. Ito, D. Morikawa, N. Shimizu, T. Yoneda, M. Segawa, M. Yamaguchi, R. Ogawa, M. M. Matev, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, K. Tsuchida, H. Yamamoto, and S. Fukada. 2011. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 124: 3654-3664.

Yamada, T., S. I. Kawakami, and N. Nakanishi. 2009. Expression of adipogenic transcription factors in adipose tissue of fattening wagyu and holstein steers. *Meat Sci* 81: 86-92.

Yun, Y. R., J. E. Won, E. Jeon, S. Lee, W. Kang, H. Jo, J. H. Jang, U. S. Shin, and H. W. Kim. 2010. Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010: 218142.

CAPÍTULO 1

ADIPOGÊNESE INTRAMUSCULAR DE BOVINOS NELORE E ANGUS ASSOCIADA A CÉLULAS ADIPO-FIBROGÊNICAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.

RESUMO: O presente trabalho foi realizado com objetivo de verificar se a adipogênese contribuiria para discrepância no teor de gordura intramuscular presente na carne de animais Nelore comparado a animais Angus em fase de terminação. Objetivou-se ainda investigar se possíveis diferenças na expressão gênica de células adipo-fibrogênicas presentes no tecido muscular esquelético de bovinos machos não castrados, Angus e Nelore, estaria associada à diferença no teor de gordura intramuscular da carne oriunda de animais Nelore e Angus. Foram utilizados 6 animais da raça Nelore (peso inicial = $372,5 \pm 37,3$ kg) e 6 da raça Angus (peso inicial = $382,8 \pm 23,9$ kg), mantidos sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram abatidos no final do período de terminação. Amostras do Longissimus dorsi foram coletadas logo após a sangria, para análises de expressão gênica (RT-PCR) e expressão proteica (Western blot). Outras amostras na mesma região muscular foram coletadas 24 horas após o abate, para análise química de extrato etéreo e colágeno. Os genes adipogênicos avaliados foram: *C/EBP α* , *PPAR γ* e *Zfp423*; Sendo que o *PPAR γ* e *Zfp423* também tiveram sua expressão proteica avaliada. Os genes fibrogênicos avaliados foram: *COL1A1*, *COL3A3*, *FN1*, *LOX*, *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *TGF- β* . Para o *TGF- β* também foi realizada expressão de proteína. Além dessas, foram realizadas expressão proteica da *SMAD* (proteína envolvida na iniciação da fibrogênese) e da *PDGFR α* , proteína indicadora de células indiferenciadas, comum a via de sinalização adipogênica e fibrogênica. Não foi observada diferença significativa para expressão gênica dos mRNA's adipogênicos e fibrogênicos ($P > 0,05$). No entanto, houve diferença para expressão proteica do *SMAD* ($P < 0,05$), *PPAR γ* ($P \leq 0,05$) e *PDGFR α* ($P \leq 0,05$), em que essas três proteínas foram

mais expressas em Angus comparada a Nelore. Embora não tenha sido encontrada diferença para quantificação química de colágeno e sua solubilidade ($P > 0,05$), houve diferença entre as raças para quantificação química do extrato etéreo, indicando maior deposição de gordura intramuscular em Angus do que em Nelore ($P < 0,001$). Conclui-se que existe diferença na adipogênese intramuscular entre animais Angus e Nelore, o que contribui para diferenças na quantidade de tecido adiposo intramuscular depositado na carne destes animais. Além disso, a maior expressão de *PDGFR α* em Angus em relação a Nelore evidencia maior número de células mesenquimais indiferenciadas em músculo esquelético de animais Angus em relação a animais Neloires. Dada à capacidade adipo-fibrogênica das células *PDGFR α* e associado à ausência de diferenças entre as raças quanto à fibrogênese, a maior abundância de células mesenquimais indiferenciadas observada no tecido muscular esquelético dos Animais Angus explica a diferença quanto à adipogênese intramuscular entre as raças estudadas.

Palavras chave: Marmoreio, bovinos, *PDGFR α* , *PPAR γ* , *SMAD*, extrato etéreo, colágeno.

CHAPTER 1

NELLORE AND ANGUS INTRAMUSCULAR ADIPOGENESIS ASSOCIATED WITH ADIPO/FIBROGENIC CELLS IN SKELETAL MUSCLE TISSUE.

ABSTRACT: This trial was conducted to evaluate if the difference between Angus and Nellore on intramuscular fat content after finishing period can be explained by adipogenesis. In addition, was evaluated if discrepancy of intramuscular fat content among beef from Nellore and Angus young bulls is associated with differences on genes expression of intramuscular adipo/fibrogenic cells. Six Nellore (initial body weight = 372.5 ± 37.3 kg) and six Angus (initial body weight = 382.8 ± 23.9 kg) were confined at the same experimental conditions. At the end of finishing, the animals were slaughtered and longissimus muscle samples for quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were collected just after exsanguination. Longissimus muscle samples for ether extract and collagen assays were obtained at the same carcass region after 24 hours chilling period. The qPCR were performed to evaluate mRNA expression of adipogenic genes (C/EBP α , PPAR γ and Zfp423), fibrogenic genes (COL1A1, COL3A3, FN1, LOX, MMP2, TIMP1, TIMP2, TIMP3 and TGF- β). Western blot assays were performed to evaluate protein expression of adipogenics markers (PPAR γ and Zfp423), the fibrogenic marker TGF- β and genes related with both pathways (SMAD and PDGFR α). No differences ($P > 0.05$) were observed for mRNA expression of neither adipogenic nor fibrogenic markers. However, the breed affected ($P < 0.05$) protein expression of SMAD, PPAR γ and PDGFR α , which were greater in Angus than Nellore skeletal muscle. Although meat collagen content and solubility did not differ ($P > 0.05$) among breeds, Angus meat presented greater ($P < 0.001$) ether extract content than Nellore, proving greater intramuscular fat in Angus beef. In conclusion, the Angus enhanced adipogenesis contribute to greater intramuscular fat content of this breed in contrast to Nellore cattle. In addition, the Angus greater PDGFR α expression likely

indicate greater muscle content of undifferentiated mesenchymal cells than Nellore. Our data suggest that although PDGFR α cells have adipo/fibrogenic capacity, fibrogenesis is not different among breeds thus greater density of undifferentiated mesenchymal cells in Angus explain the greater adipogenesis compared to Nellore skeletal muscle.

Keywords: Marbling, cattle, PDGFR α , PPAR γ , SMAD, ether extract, collagen.

INTRODUÇÃO

A carne bovina brasileira é oriunda principalmente da raça Nelore. Essa por sua vez é caracterizada por apresentar baixa quantidade de gordura intramuscular, diferentemente da carne oriunda de animais *Bos taurus* a qual apresenta tal característica acentuada e conseqüentemente é mais aceita por nichos de mercados relacionados a carne de qualidade superior. Entretanto, pouco se sabe a respeito de mecanismos moleculares responsáveis pela deposição deste tecido em animais Zebuínos comparativamente a animais taurinos o que limita sua exploração para tal característica.

O tecido adiposo apresenta elevada plasticidade fenotípica e sua deposição pode se dar em virtude da hipertrofia de adipócitos (lipogênese) e/ou hiperplasia de células adipogênicas (adipogênese) (Hausman et al., 2009). Assim, uma vez que a gordura intramuscular é aquela que apresenta deposição tardia em relação aos demais tipos de tecido adiposo da carcaça, acredita-se que o aumento da deposição deste tecido se dê prioritariamente em virtude da lipogênese e não adipogênese. Contudo, em estudo recente demonstrou-se que a adipogênese intramuscular foi associada ao elevado teor de marmoreio na carne de bovinos em fase de terminação (Duarte et al., 2013).

Células adiposas são originadas de um mesmo pool de células mesenquimais que originam as fibras musculares e os fibroblastos (Du et al., 2010a). Adicionalmente, foi demonstrado que a adipogênese e a fibrogênese apresentam uma via de sinalização comum (Uezumi et al., 2010) sendo eventos competidores por células mesenquimais indiferenciadas. Conseqüentemente, células mesenquimais recrutadas para a via de sinalização comum à adipogênese e fibrogênese foram denominadas adipo-fibroblastos por apresentarem capacidade de se diferenciar em fibroblastos e/ou pré-adipócitos (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2011). Essas células permanecem quiescentes e mediante a estímulo podem contribuir para formação de tecido conectivo e/ou tecido adiposo,

sendo um possível fator modulador da diferença na deposição de tecido adiposo intramuscular durante a fase de acabamento de bovinos de corte.

Baseado em tal conhecimento, no presente trabalho surgiu à hipótese de que a adipogênese contribuiria para discrepância no teor de gordura intramuscular presente na carne de animais Nelore comparado a animais Angus em fase de terminação. Objetivou-se ainda investigar se possíveis diferenças na expressão gênica de células adipogênicas presentes no tecido muscular esquelético de animais Angus e Nelore estariam associada à diferença no teor de gordura intramuscular da carne oriunda desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação pelo comitê de ética

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (19/2013-CEUAP/UFV).

Animais e dieta e delineamento experimental

Foram utilizados 6 animais da raça Nelore (peso inicial = $372,5 \pm 37,3$ kg) e 6 da raça Angus (peso inicial = $382,8 \pm 23,9$ kg), com idade de 20 meses, mantidos sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram confinados em baias individuais por 84 dias onde foram alimentados ad libitum com dietas contendo 70% de concentrado e 30% de silagem de milho. A composição química e proporção dos ingredientes da dieta experimental estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da dieta experimental

Item	% MS
Ingredientes	
Silagem de Milho	30,0
Milho moído	58,0
Farelo de Soja	10,0
Núcleo Mineral*	2,0
Composição nutricional	
MS ¹	72,0
Proteína Bruta ²	12,4
FDN ²	26,2
NDT ²	78,1
Amido ²	49,7

¹ - base da matéria natural, ² - base da matéria seca

*Níveis de garantia por quilograma do produto: Ca: 170 g; P 31 g; Na: 155 g; Zn: 2 mg; Cu: 396 mg; Mn: 515 mg; Co: 15 mg; I: 29 mg; Se: 5,4 mg; Vit. A: 111.000 UI; Vit. D3: 22.000 UI; Vit. E: 265 UI.

Abates e coleta de tecido muscular

Ao final do período de terminação os animais foram abatidos na área de abate experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos de abate foram realizados de acordo com o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997).

O abate foi feito por insensibilização via concussão cerebral, com posterior secção da jugular para sangramento total. Imediatamente após a sangria, foram retiradas amostras do músculo Longissimus dorsi na altura da 12^a costela. Uma amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a temperatura de -80°C para posterior extração de proteínas. Outra amostra foi seccionada em amostras com dimensões de a 0,5cm x 2,0cm, as quais foram imediatamente imersas no reagente

RNALater (Ambion), numa relação peso:volume de 1:5, conforme recomendado pelo fabricante, identificadas e mantidas por cerca de 16 horas a 4°C. Decorridas 16 horas, o material coletado foi armazenado a -80°C até a extração de RNA.

Adicionalmente, 24 horas após o abate, amostras de *Longissimus dorsi* (aproximadamente 100 g) foram coletadas para realização da quantificação química de gordura intramuscular e colágeno.

Extração do RNA total e preparo do cDNA

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) do departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As amostras foram descongeladas à 4°C uma hora antes da realização da extração do RNA total. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído do tecido muscular por meio do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Conforme recomendado para tecidos fibrosos, foi adicionada ao protocolo a proteinase K (Fungal – Invitrogen) para melhorar o rompimento celular. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences Inc.) e a integridade do RNA nessas amostras foi observada através de gel de agarose à 1%. Em seguida as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen de Carlsbad, CA) anteriormente à reação de transcrição reversa. Para síntese de cDNA foi utilizando o kit GoScript™ (Promega, Madison, WI), seguindo as recomendações do fabricante.

Desenho dos primers para análise quantitativa em tempo real (qPCR)

O desenho e a construção dos primers para os genes estudados foram feitos por meio da análise da sequência disponível em bancos de dados como o NCBI e

UNIGENE. Os genes analisados para o melhor entendimento da adipogênese em Nelore e Angus foram os seguintes: *C/EBP α* , *PPAR γ* e *Zfp423*. Para esclarecimento do processo de fibrogênese foram analisados os seguintes genes: *COL1A1*, *COL3A3*, *FN1*, *LOX*, *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *TGF β* . O gene de controle endógeno utilizado para normalização da expressão gênica foi o *GAPDH*. As sequencia dos primers utilizados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência dos primers referentes aos genes estudados:

Gene	Abreviação		Sequência
CCAAT enhancer binding protein, alpha	<i>C/EBPα</i>	Forward	TGCGCAAGAGCCGGGACAAG
		Reverse	ACCAGGGAGCTCTCGGGCAG
Peroxisome proliferator activated-receptor gamma	<i>PPARγ</i>	Forward	TGGAGACCGCCCAGGTTTGC
		Reverse	AGCTGGAGGACTCGGGGTG
Zinc finger protein	<i>Zfp423</i>	Forward	GGATTCCTCCGTGACAGCA
		Reverse	TCGTCCTCATTCTCTCCTCT
Collagen type I, alpha 1	<i>COL1A1</i>	Forward	CCACCCCCAGCCGCAAAGAGT
		Reverse	ACGCAGGTGACTGGTGGGATGTC
Collagen type III, alpha 1	<i>COL3A3</i>	Forward	GGCCCCTGGAAAGGACGGA
		Reverse	CCCCGCCAGCACCACAACAT
Fibronectin 1	<i>FN1</i>	Forward	GCGTGTCACCTGGGCTCCAC
		Reverse	CGGTGCCGGGCAGGAGATTT
Lysyl oxidase	<i>LOX</i>	Forward	TGCCCCACAGATGCGCACAC
		Reverse	CCCCGGACGTCGAGTAGCCA
matrix metallopeptidase 2	<i>MMP2</i>	Forward	CGTCGCCCATCATCAA
		Reverse	CAGCCGTAGAAGGTGTTTAG
TIMP metallopeptidase inhibitor 1	<i>TIMP1</i>	Forward	CCCAGCGCCAGAGAGGCTA
		Reverse	TCTGTGGGTGGGGTGGGACG
TIMP metallopeptidase inhibitor 2	<i>TIMP2</i>	Forward	CCCGGACGAGTGCCTCTGGA
		Reverse	CGCAGGAGCCGTGCTTC
TIMP metallopeptidase inhibitor 3	<i>TIMP3</i>	Forward	CCTCTCCCAGCGCAAGGG
		Reverse	GCCACCCTTCTGCCGGAT
Transforming growth factor, beta 1	<i>TGFβ</i>	Forward	AGCCAGGGGGGATGTGCCA
		Reverse	TAGCACGCGGGTGACCTCCT
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	Forward	AGATAGCCGTAACCTTCTGTGC
		Reverse	ACGATGTCCACTTTGCCAG

Análises de expressão gênica quantitativa

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green RT-PCR Master Mix GoTaq® da Promega e os seguintes parâmetros de ciclos: 95 °C durante 10 min e 40 ciclos a 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min. Após a amplificação, uma curva de fusão (0,01 C/s) foi utilizada para confirmar a pureza do produto.

Em cada reação foi utilizado 12,5µL de Power SYBR®GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,5µL de cada primer (forward and reverse), 5µL de cDNA e água MilliQ (ultrapura) para completar o volume de 20µL. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos. Após 40 ciclos, foi empregado um ciclo final onde as amostras foram submetidas a aquecimento crescente de 1°C a cada 30 segundos, de 60°C a 94°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados (Δ Ct) com base nos valores de Ct obtidos para o gene constitutivo GAPDH.

Antes da análise de expressão, cada gene teve sua eficiência calculada através da utilização de diferentes concentrações dos primers (100, 200 e 400 nM) e cDNA (5, 30, 45 ng/ µL). Os níveis relativos de expressão gênica foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Quantificação de gordura intramuscular

A quantidade de gordura intramuscular foi determinada por meio da quantificação do extrato etéreo da amostra de Longissimus dorsi liofilizada. A

quantificação do extrato etéreo foi realizada pelo método AM 5-04, conforme descrito por AOCS (2009).

Quantificação de colágeno total e solúvel

A quantificação do colágeno foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cross et al. (1973). Aproximadamente 4g de amostra liofilizada em duplicata, foram colocadas em tubos falcon de 50 ml contendo 12 ml de $\frac{1}{4}$ da solução de Ringer (7g de NaCl, 0,026g CaCl₂, 0,35g KCl dissolvidas em 1 litro de ddH₂O) agitados e levados a banho maria a 78 ° C por 60 min e posteriormente resfriados a 4°C durante 15 min em banho de gelo. Centrifugados por duas vezes durante 20 min a 27.216 g_{max} a 2°C, e o sobrenadante separado do resíduo. Para a hidrólise ácida, foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico (7N) nas amostras do sobrenadante e 20 mL de ácido sulfúrico a 7N. Os frascos foram lacrados e colocados na estufa a 105°C durante 16h. As amostras foram filtradas com papel de filtro quantitativo para filtração rápida (Vetec Quimica Fina Cód. 050154) em balões volumétricos de 200 ml para sobrenadante e de 500 ml para o resíduo. O pH do extrato foi corrigido para 6 sob agitação magnética antes de se completar o volume dos balões com água destilada. Foram transferidos para dois tubos de ensaio 2,0 mL de amostra diluída. Em cada tubo foram adicionados 1 mL de tampão Cloramina-T (1,41g de Cloramita-T em 100ml da solução tampão (formada por 30g de ácido Cítrico monohidratado, 15g de NaOH, 90g de acetato de sódio tri-hidratado, 500ml H₂O e 290ml isopropanol a pH= 6)) e após repouso por 20 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de reagente de cor (10 g de 4-dimetilaminobenzaldeído; 35ml de ácido perclórico 60%, 65 ml isopropanol) em cada tubo. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 60°C em banho-maria. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 560nm.

Para construção da curva padrão foi preparada solução stock de hidroxiprolina purificada (60 mg de 4-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)/100 mL de isopropanol 10%). A reação de cor e a leitura foram realizadas da mesma forma àquela realizada com as amostras. Foram utilizadas quatro concentrações conhecidas de hidroxiprolina para estabelecimento da curva padrão: 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 ug de hidroxiprolina/mL. Para determinar a quantidade efetiva de colágeno, a quantidade de hidroxiprolina foi multiplicada por 7,52 para o sobrenadante e por 7,25 para o resíduo (Cross et al., 1973). O sobrenadante determinou a fração do colágeno solúvel e o resíduo a fração de colágeno insolúvel, em mg/g . O colágeno total (mg de colágeno/g de carne), foi definido pela soma dos dois. A porcentagem de solubilidade foi calculada a partir da razão do colágeno presente na fração sobrenadante e o colágeno total.

SDS-PAGE e Western Blot

A proteína total do músculo Longissimus dorsi foi extraído em tampão de lise (Tris 10 mM pH 7,2; 0,5% de Triton X-100; 10% de glicerol; 0,5% de ditioneitol-DTT; 0,5mM de fluoreto de fenilmetano-PMSF 0,5mM e benzamidina). O teor de proteína foi mensurado através do método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), e uma mesma quantidade de proteína foi separada por meio de SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com solução de bloqueio (BSA a 3% p/v em TBST) durante 1 h, com agitação suave à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com os seguintes anticorpos primários anti PPAR γ (#2435S), anti α PDGF Receptor (#3174S.), anti TGF-p (#3711S.), anti B-tubulina (#2128S.) adquiridos da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA); anti SMAD (#SC7153), anti Zfp-423 (#SC48785) adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio a 1: 250 (exceto para o

SMAD que se utilizou a diluição de 1:500) e incubados por 16 h a 4 ° C com agitação suave. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBST três vezes (por 5 minutos) à temperatura ambiente e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário goat antirabbit IgG-HRP (anticorpo de cabra anti-coelho #SC 2004) da Santa Cruz a diluição de 1: 5000, durante 1 h à temperatura ambiente com agitação suave. Após incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas 3 vezes (5 min cada) com TBST, reveladas com substrato ECL Clarity™ (Bio-Rad, Hercules, CA), revelado com o scanner Blot c-Digit®, e analisados com Software Image Studio Digits Ver 4.0 (Licor Biosciences).

Tabela 3. Anticorpos utilizados.

Anticorpo	Nº catálogo	Fabricante	Diluição
PPAR γ (policlonal)	2435S	Cell Signaling	1/250
OAZ (Zfp423) -(policlonal)	sc-48785	Santa Cruz	1/250
PDGFR α (monoclonal)	3175S	Cell Signaling	1/250
TGF- β	3711S	Cell Signaling	1/250
SMAD (policlonal)	sc-7153	Santa Cruz	1/500
β -Tubulin (monoclonal)	2128S	Cell Signaling	1/100
Goat antirabbit IgG-HRP Anticorpo secundário	sc- 2004	Santa Cruz	1/5.000

Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + R_i + PI_{(i)j} + e_{ij}$$

onde Y_{ij} é o valor fenotípico observado no indivíduo; μ é a média geral; R_i é o efeito fixo do i° nível de Raça; $PI_{(i)j}$ é o efeito fixo da covariável Peso Inicial aninhado com Raça; e e_{ij} é o erro aleatório associado com Y_{ij} , distribuído como $e_{ij} \sim N(0, I\sigma_e^2)$.

Posterior às análises finais, normalidade dos resíduos da análise de cada característica foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Conforme esperado, os dados de expressão gênica não foram normalmente distribuídos, e logo, foram transformados usando $\ln(2^{-\Delta\Delta Ct} + 1)$ conforme sugerido por Vogel et al. (2004). Uma vez que a normalidade dos resíduos foi obtida ($P > 0.05$), o efeito da covariável Peso Inicial aninhado com Raça foi testado, e removido das análises finais quando $P > 0.10$. Médias de quadrados mínimos foram estimadas para o efeito de Raça. Todas análises estatísticas foram feitas usando SAS 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, EUA).

RESULTADOS

Expressão dos mRNA's e proteínas envolvidas com a adipogênese, e conteúdo da gordura intramuscular no músculo Longissimus dorsi de bovinos Nelore e Angus.

Não houve diferença da expressão do fator de transcrição $C/EBP\alpha$ ($P = 0.14$), que é um dos reguladores da adipogênese (Figura 1A). Também não foi observada diferença significativa para a expressão gênica do $PPAR\gamma$ (Figura 1A). No entanto na análise da expressão proteica pode-se observar diferença entre as raças estudadas para $PPAR\gamma$ ($P \leq 0,05$; Figura 2B). A expressão de mRNA do fator de transcrição $Zfp423$ também não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,49$; Figura 1A), o que não foi diferente para a sua expressão proteica ($P = 0,62$; Figura 2C). Apesar de não ter observado

diferença significativa para a maioria das características moleculares, a carne de animais Angus apresentou maior teor de gordura intramuscular em relação à carne de animais Nelore ($P < 0,01$; Figura 1B). Os dois grupos genéticos avaliados se diferiram para expressão proteica de PDGFR α e PPAR γ (Figura 2A e Figura 2B).

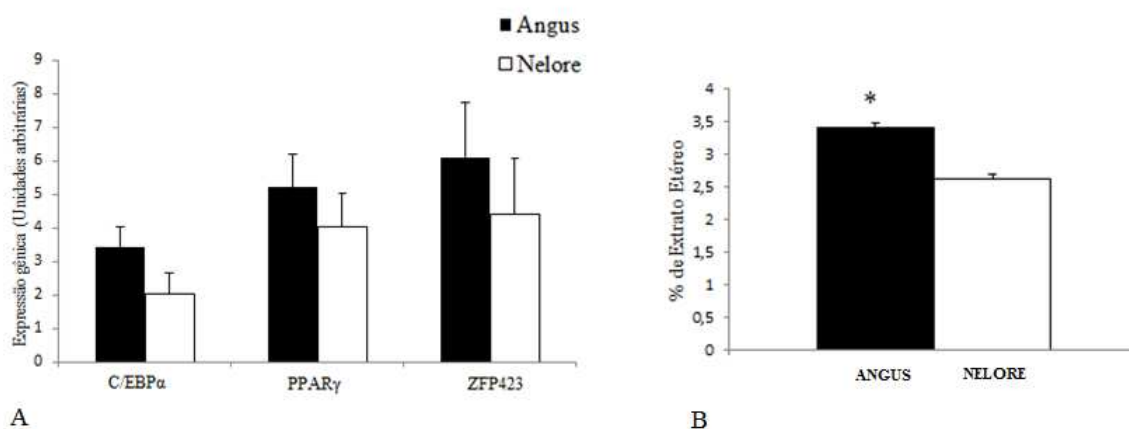


FIGURA 1. Expressão de mRNA de *C/EBP α* , *PPAR γ* , *ZFP423* (A) e teor de gordura intramuscular avaliada pela quantificação do extrato etéreo (B). As diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$ (*).

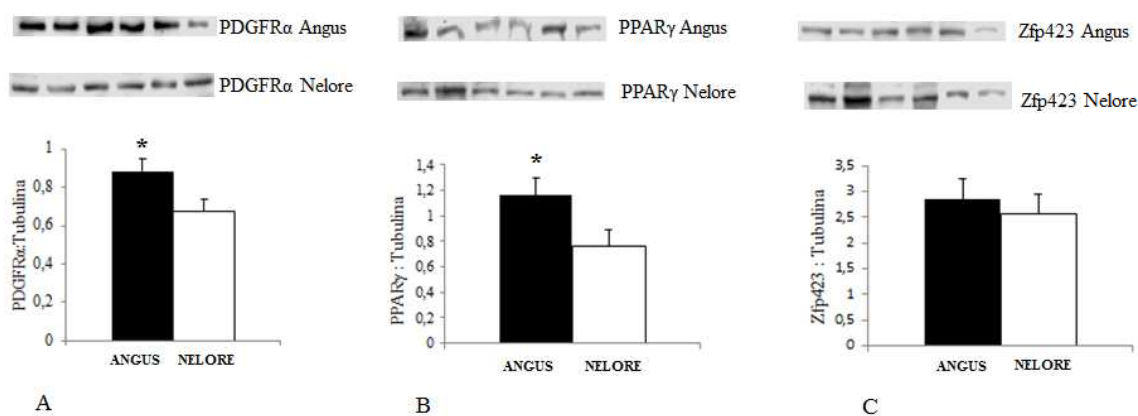


FIGURA 2. Expressão proteica do PDGFR α (A), PPAR γ (B) e Zfp423 (C) no músculo Longissimus dorsi. As diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$ (*).

Expressão dos mRNA's e proteínas envolvidas com a fibrogênese, conteúdo e solubilidade do colágeno intramuscular no músculo Longissimus dorsi de bovinos Nelore e Angus.

Não foram observadas diferenças na expressão gênica do COL1A1 ($P = 0,30$), por outro lado, houve tendência a diferença da expressão gênica do COL3A3 ($P = 0,07$) (Figura 3A). Não houve diferença para os marcadores FN1 ($P = 0,32$) e LOX ($P = 0,19$) (Figura 3A). Dentre as inibidoras metalopeptidases avaliadas não houve diferença na expressão de mRNA para TIMP 2 ($P = 0,67$) e TIMP 3 ($P = 0,31$), sendo observada tendência para TIMP 1 ($P = 0,08$) entre as raças (Figura 3A). Houve tendência a diferença de expressão da metalopeptidase MMP2 ($P = 0,10$; Figura 3A). Não houve diferença na expressão de mRNA de TGF- β ($P = 0,24$) e nem em sua expressão proteica ($P = 0,47$) (Figura 4A). Entretanto, pode-se observar diferença significativa para expressão proteica entre Nelore e Angus da SMAD ($P = 0,04$) (Figura 4B). Não houve diferença entre os tratamentos para colágeno total ($P = 0,16$) e sua solubilidade ($P = 0,81$) (Figura 3B).

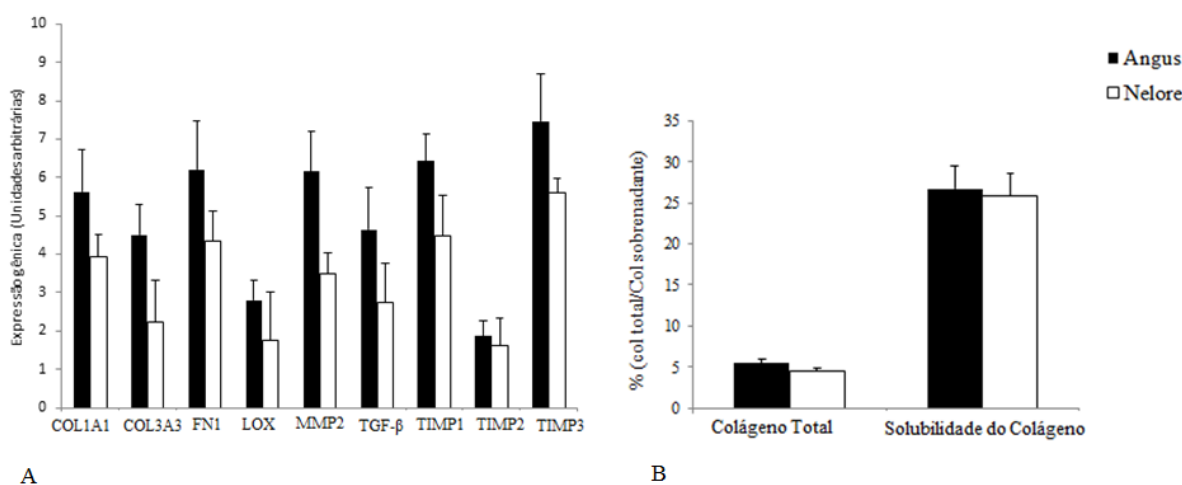


FIGURA 3. Expressão de mRNA genes fibrogênicos (A). Quantificação química de colágeno e solubilidade do colágeno (B) no músculo Longissimus dorsi.

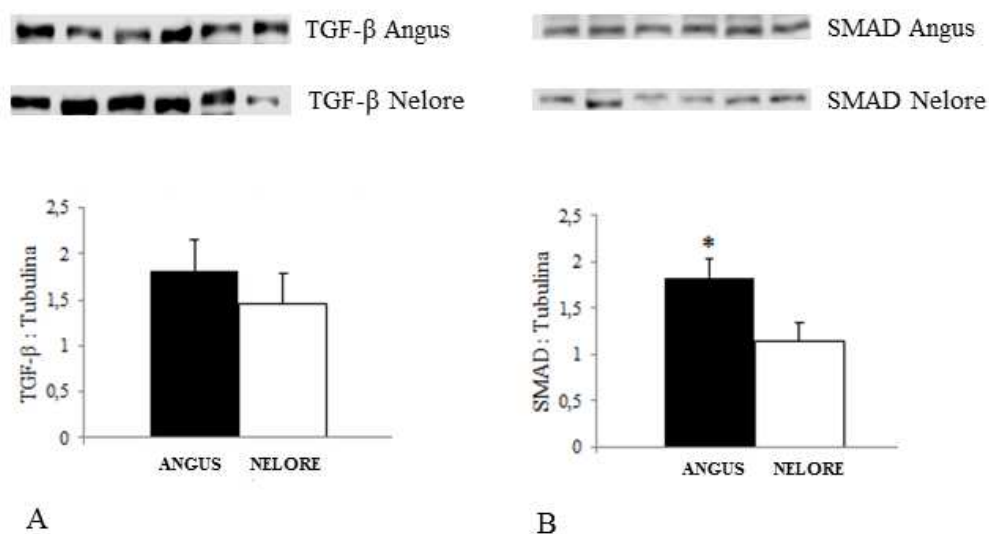


FIGURA 4. Expressão proteica do TGF- β (A) e SMAD (B), no músculo Longissimus dorsi. As diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$ (*).

DISCUSSÃO

Fatores de transcrição pertencentes à família C/EBP (Enhancer binding protein) e o PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) são chaves na regulação da adipogênese (Dodson et al., 2010a; Du et al., 2010b; Yamada et al., 2009). A ausência de diferença significativa na expressão do fator de transcrição C/EBP α , nos mostra que nesse estágio da transcrição o controle da expressão de certos genes relacionados à adipogênese não difere entre as duas raças estudadas. No entanto, a expressão proteica de PPAR γ que desencadeia a expressão de C/EBP α promovendo uma ação autorreguladora do mesmo obteve diferença significativa ($P = 0,05$), evidenciando maior expressão do PPAR γ em Angus do que em Nelore. Isso sugere a possível resposta para maior deposição de gordura intramuscular em Angus em relação ao Nelore ($P < 0,001$), uma vez que a ação conjunta destes (C/EBP α e PPAR γ) estimulam a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros em adipócitos (Rosen et al., 2002).

O *Zfp423* foi identificado como fator transcricional que induz a expressão de *PPAR γ* e *C/EBP α* sendo um regulador crítico da adipogênese (Gutpa et al. 2012). Apesar de ter sido encontrada diferença para expressão do *PPAR γ* , não houve diferença entre as raças estudadas sobre a expressão do *Zfp423*. A ausência de diferença para esse fator de transcrição pode ser explicada pelo fato deste ser pouco expresso em animais adultos, uma vez que grande parte das células adipogênicas em animais adultos são comprometidas com a adipogênese em estágios iniciais do desenvolvimento. Ademais, estes resultados sugerem ainda que a formação dos pré - adipócitos intramusculares nas duas raças não difere, mas sim a diferenciação desses em adipócitos pela maior expressão do *PPAR γ* em Angus comparado a Nelore.

O tecido adiposo origina-se das mesmas células mesenquimais progenitoras que formam o tecido muscular esquelético (Uezumi et al., 2010). Essas células indiferenciadas, apresentam capacidade de diferenciarem-se também em fibroblastos (Joe et al., 2010). Os receptores α de fatores de crescimento derivados de plaquetas (*PDGFR α*), são marcadores usados para indicar se há ou não mais células mesenquimais indiferenciadas no tecido, que dependendo de sua sinalização podem se diferenciar em adipócitos ou fibroblastos (Uezumi et al., 2011, Joe et al.,2010). No presente trabalho, a maior expressão proteica do *PDGFR α* em Angus em relação a Nelore evidencia maior abundância de células indiferenciadas no tecido muscular esquelético de animais Angus comparado à animais Nelore. Coletivamente, a maior abundância de células mesenquimais progenitoras associada a maior expressão das *PPAR γ* demonstram haver maior adipogênese intramuscular em animais Angus comparado à animais Nelore. Tal fato corrobora o maior teor de gordura intramuscular observada na carne de animais Angus em relação à carne de animais Nelore observada no presente estudo.

Além do tecido adiposo, o colágeno intramuscular é responsável pela redução da maciez da carne de animais abatidos com idade avançada (Duarte et al., 2011), influenciando a qualidade da carne. Nas condições em que o experimento foi realizado, não foi encontrada diferença na expressão de mRNA de COL1A1 ($P = 0,3$) e do COL3A3 ($P = 0,07$) como também não foi observada diferença na quantidade de colágeno ($P = 0,16$) e na solubilidade do mesmo ($P = 0,81$). A ausência de diferença pode ser explicada pela semelhança de idade entre os animais. A solubilidade do colágeno é influenciada pela formação de ligações intermoleculares entre as fibras de colágeno. Essas aumentam com a idade do animal, e são reguladas principalmente pela enzima lisil-oxidase.

O gene LOX codifica um membro da família de genes da lisil-oxidase, não apresentou diferença significativa entre as duas raças estudadas. Este gene é essencial para a síntese de tecido conjuntivo, e codifica uma amina oxidase-dependente de cobre, que catalisa o primeiro passo na formação de ligações cruzadas em colágenos e elastina. Como reportado anteriormente, a pequena diferença na idade dos animais, pode ter contribuído para expressão similar desse gene entre as raças.

Conforme observado, a expressão de MMP2 ($P = 0,10$) e TIMP1 ($P = 0,08$) tendeu a ser maior no tecido muscular de animais Angus em relação aos animais Nelore. O gene MMP2 (matriz metaloproteíase 2) tem como uma de suas funções clivar as proteínas de colágeno do tipo IV, um componente estrutural principal das membranas basais que separam as células da matriz extracelular. Concomitantemente, não foi observada diferença para TIMP2 e TIMP3, os quais pertencem a uma família de genes que são inibidores das metaloproteínas. Dessa maneira, possivelmente a tendência observada para MMP2 e TIMP1 sugere maior turnover do tecido conectivo presente no músculo esquelético de animais Angus em relação à animais Nelore.

O processo de sinalização fibrogênica inicia-se quando o TGF- β se liga a um receptor na superfície da célula (TGF β receptor II) que recruta e ativa os TGF- β receptores I. Em seguida, proteínas SMAD2 e SMAD3 são fosforiladas e se ligam a SMAD4. O complexo SMAD formado é então translocado para o núcleo celular. No núcleo, os complexos SMAD se ligam a zonas específicas de DNA, onde controlam a transcrição de genes fibrogênicos. No presente trabalho não foi observado diferença para expressão mRNA e proteica do TGF- β entre os tratamentos. Contudo, foi observado maior abundância do complexo SMAD no tecido muscular esquelético de animais Angus em relação à animais Nelore. Entretanto, a maior abundância do complexo SMAD não resultou em aumento da expressão de mRNA dos marcadores fibrogênicos. A ausência de diferença na expressão dos marcadores fibrogênicos bem como a similaridade no teor de colágeno na carne dos animais avaliados sugere não haver diferenças quanto a fibrogênese no tecido muscular esquelético de animais Nelore e Angus.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram existir diferença na adipogênese intramuscular entre animais Angus e Nelore, o que contribui para diferenças na quantidade de tecido adiposo intramuscular depositado na carne destes animais. Além disso, a maior expressão de PDGFR α em Angus em relação a Nelore evidencia maior número de células mesenquimais indiferenciadas em músculo esquelético de animais Angus em relação à animais Nelore. Dada à capacidade adipo-fibrogênica das células PDGFR α (positiva), associado à ausência de diferenças entre as raças quanto à fibrogênese, a maior abundância de células mesenquimais indiferenciadas observada no tecido muscular esquelético dos Animais Angus relaciona-se a diferença quanto à adipogênese intramuscular entre as raças estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Denver: AOCS; 2009

Brasil. (1997). Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal [Food of animal origin sanitary and industry inspection]. In. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Cross, H.R.; Carpenter, Z.L.; Smith, G.C. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *Journal of Food Science*, v.38, n.6, p.998-1003, 1973.

Dodson, M. V., G. J. Hausman, L. Guan, M. Du, T. P. Rasmussen, S. P. Poulos, P. Mir, W. G. Bergen, M. E. Fernyhough, D. C. McFarland, R. P. Rhoads, B. Soret, J. M. Reecy, S. G. Velleman, and Z. Jiang. 2010. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int J Biol Sci* 6: 691-699.

Du, M., J. Tong, J. Zhao, K. R. Underwood, M. Zhu, S. P. Ford, and P. W. Nathanielsz. 2010a. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim Sci*. 88: E51-60.

Du, M., J. Yin, and M. J. Zhu. 2010b. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. *Meat Science* 86: 103-109.

Duarte, M. S., P. V. Paulino, M. A. Fonseca, L. L. Diniz, J. Cavali, N. V. Serao, L. A. Gomide, S. F. Reis, and R. B. Cox. 2011. Influence of dental carcass maturity on carcass traits and meat quality of nellore bulls. *Meat Sci* 88: 441-446.

Duarte, M. S. ; Paulino, P. V. R. ; Das, A. K. ; Wei, S. ; Serao, N. V. L. ; Fu, X. ; Harris, S. M. ; Dodson, M. V. ; Du, M. 2013 Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J. Anim Sci*. v. 91, p. 2938-2946.

Gupta, R. K., R. J. Mepani, S. Kleiner, J. C. Lo, M. J. Khandekar, P. Cohen, A. Frontini, D. C. Bhowmick, L. Ye, S. Cinti, and B. M. Spiegelman. 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* 15: 230-239.

Hausman, G. J., M. V. Dodson, K. Ajuwon, M. Azain, K. M. Barnes, L. L. Guan, Z. Jiang, S. P. Poulos, R. D. Sainz, S. Smith, M. Spurlock, J. Novakofski, M. E. Fernyhough, and W. G. Bergen. 2009. Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci* 87: 1218-1246.

Joe, A. W. B., L. Yi, A. Natarajan, F. Le Grand, L. So, J. Wang, M. A. Rudnicki, and F. M. V. Rossi. 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature Cell Biology* 12: 153-U144.

Rosen, E. D., C.-H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez, and B. M. Spiegelman. 2002. *C/ebp α* induces adipogenesis through *ppary*: A unified pathway. *Genes & Development* 16: 22-26.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2ddct method. *Methods* 25: 402-408

Uezumi, A., S. Fukada, H. Yamada, S. Takeda, and K. Tsuchida. 2010. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Differentiation* 80: S41-S41.

Uezumi, A., T. Ito, D. Morikawa, N. Shimizu, T. Yoneda, M. Segawa, M. Yamaguchi, R. Ogawa, M. M. Matev, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, K. Tsujikawa, K. Tsuchida, H. Yamamoto, and S. Fukada. 2011. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 124: 3654-3664.

Yamada, T., S. I. Kawakami, and N. Nakanishi. 2009. Expression of adipogenic transcription factors in adipose tissue of fattening wagyu and holstein steers. *Meat Sci* 81: 86-92.

CAPÍTULO 2

PROTEÓLISE POST-MORTEM EM BOVINOS NELORE E ANGUS.

RESUMO: Objetivou-se nesse capítulo avaliar a atividade da calpastatina e expressão de mRNA de possíveis marcadores da maciez da carne no músculo Longíssimus dorsi de Angus e Nelore. Foram utilizados os mesmos animais do capítulo anterior. Os animais foram abatidos no final do período de terminação, e amostras do Longissimus dorsi foram coletadas logo após a sangria, para posterior análises de expressão gênica (RT-PCR) para calpaína (CAPN3), calpastatina (CAST), caspase (CASP3) e HSP70 (DNAJA1) e expressão proteica (Western blot) para calpaína e calpastatina. Outras amostras na mesma região muscular foram coletadas 24 horas após o abate, para posterior análise de atividade da calpastatina, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar (IFM). Não houve diferença significativa para expressão gênica da CAPN3, CAST, CASP3 e DNAJA1 ($P > 0,05$). Apesar da atividade da calpastatina ter sido maior em Nelore do que em Angus ($P = 0,0292$), não houve diferença para a expressão proteica da calpastatina e nem da calpaína ($P > 0,05$). No entanto, observou-se diferença significativa para o índice de fragmentação miofibrilar (IFM) ($P = 0,0051$), em que os animais Angus apresentaram maior porcentagem de IFM em relação aos Nelores. Conclui-se que embora não haja diferença quanto a abundância das proteínas calpaína e calpastatina, existe diferença na atividade da calpastatina entre os dois grupos genéticos estudados, indicando alterações pós transcricionais. Além disso, o maior índice de fragmentação miofibrilar nos animais da raça Angus indica maior degradação miofibrilar post-mortem e conseqüentemente carne mais macia do que a do Nelore. A ausência de diferença na expressão da caspase 3 e da HSP70 aqui encontrada, deve ser melhor investigada a fim de esclarecer melhor a importância destas proteínas no amaciamento da carne de bovinos Nelore e Angus.

Palavras chave: Maciez da carne, sistema calpaína, índice de fragmentação miofibrilar, CASP3, DNAJA1.

CHAPTER 2

POSTMORTEM PROTEOLYSIS IN ANGUS AND NELLORE CATTLE

ABSTRACT: This trial aimed to evaluate calpastatin activity and gene expression of meat tenderness markers of longissimus muscle from Angus and Nellore. The same animals from the first chapter were used. At the end of finishing period, the animals were slaughtered and longissimus muscle samples for quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were collected just after exsanguination. The qPCR were performed to evaluate mRNA expression of calpain 3 (CAPN3), calpastatin (CAST), caspase 3 (CASP3) and HSP70 (DNAJA1). Protein expression (Western blot) of calpain and calpastatin were also evaluated. Longissimus muscle samples for calpastatin activity, Warner-Bratzler shear force and myofibrillar fragmentation index (MFI) assays were obtained at the same carcass region after 24 hours chilling period. The mRNA expression of CAPN3, CAST, CASP3 and DNAJA1 genes did not differ ($P > 0.05$) among breeds. Although Nellore calpastatin activity was greater ($P = 0.0292$) than Angus, no difference was observed ($P > 0.05$) among breeds for calpastatin and calpain protein expression. The MFI differ ($P = 0.0051$) among breeds, which was greater in Angus than Nellore beef. In conclusion, although calpastatin and calpain protein abundance are not different among breeds the calpastatin activity is different, indicating that calpastatin activity is altered by post-translational modifications. Beef from Angus presents greater postmortem myofibril proteolysis and consequently greater tenderness than Nellore beef. Furthermore, the absence of HSP70 and caspase 3 expression differences needs further investigation to better clarify the role of these proteins on meat tenderness.

Keywords: Meat tenderness, calpain system, myofibrillar fragmentation index, CAPN3, CAST, CASP3, DNAJA1.

INTRODUÇÃO

O sistema calpaína-calpastatina é o principal sistema proteolítico que afeta a degradação das fibras musculares durante o período post - mortem e, conseqüentemente, afeta a maciez da carne (Taylor et al., 1995). Neste contexto, a falta de maciez da carne bovina brasileira baseia-se no fato de que ele é originado principalmente de bovinos *Bos indicus*, que é reconhecida por produzir carne menos macia devido a uma menor atividade de calpaína em relação a animais *Bos taurus* (Koochmaraie, 1994). No entanto, a maioria dos estudos que compararam a atividade calpaína-calpastatina e sua relação com a maciez da carne entre bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* utilizaram outras raças que não a Nelore como modelo experimental. O Nelore é a principal raça de corte produzida no Brasil, e a maior atividade da calpastatina tem sido apontada como um dos principais fatores que influenciam na discrepância de sua maciez da carne comparada a Angus. No entanto, a diferença na proteólise post - mortem entre essas raças pode não só estar ligada à atividade enzimática como também na expressão gênica e proteica de marcadores de maciez da carne.

Além de complexo calpaína-calpastatina, existe vários outros complexos enzimáticos que foram sugeridos estar envolvidos com o amaciamento da carne. Um deles é o complexo de enzimas caspase, que provoca a degradação de compostos de proteínas celulares iniciando a apoptose celular e só depois teria ação por outras enzimas proteolíticas, incluindo a calpaína (Ouali et al., 2006). Por outro lado, ao mesmo tempo em que essas enzimas atuam sobre a degradação miofibrilar, há aumento dos níveis de proteínas de choque térmico (HSP), que atuam na preservação das funções celulares (Arrigo et al. 2005; Beere et al. 2005; Flower et al. 2005) e, portanto, inibindo o processo de amaciamento da carne.

No presente trabalho foi hipotetizado que não somente a atividade da calpastatina, mas também a sua abundância e a presença de outros complexos enzimáticos proteolíticos estão associados à diferença existente na proteólise post-mortem em tecido muscular esquelético de animais Angus em relação a animais Nelores. Com isso, objetivou-se avaliar mecanismos enzimáticos e moleculares envolvidos na proteólise post-mortem.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação pelo comitê de ética

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (19/2013-CEUAP/UFV).

Animais e dieta e delineamento experimental

Foram utilizados 6 animais da raça Nelore (peso inicial = $372,5 \pm 37,3$ kg) e 6 da raça Angus (peso inicial = $382,8 \pm 23,9$ kg), com idade de 20 meses, mantidos sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram confinados em baia individuais por 84 dias onde foram alimentados ad libitum com dietas contendo 70% de concentrado e 30% de silagem de milho. A composição química e proporção dos ingredientes da dieta experimental estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da dieta experimental

Item	% MS
Ingredientes	
Silagem de Milho	30,0
Milho moído	58,0
Farelo de Soja	10,0
Núcleo Mineral*	2,0
Composição nutricional	
MS ¹	72,0
Proteína Bruta ²	12,4
FDN ²	26,2
NDT ²	78,1
Amido ²	49,7

¹ - base da matéria natural, ² - base da matéria seca

*Níveis de garantia por quilograma do produto: Ca: 170 g; P 31 g; Na: 155 g; Zn: 2 mg; Cu: 396 mg; Mn: 515 mg; Co: 15 mg; I: 29 mg; Se: 5,4 mg; Vit. A: 111.000 UI; Vit. D3: 22.000 UI; Vit. E: 265 UI.

Abates e coleta de tecido muscular

Ao final do período de terminação os animais foram abatidos na área de abate experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos de abate foram realizados de acordo com o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997).

O abate foi feito por insensibilização via concussão cerebral, com posterior secção da jugular para sangramento total. Imediatamente após a sangria, foram retiradas amostras do músculo Longissimus dorsi na altura da 12^a costela. Uma amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a temperatura de -80°C para posterior extração de proteínas. Outra amostra foi seccionada em amostras com dimensões iguais a 0,5cm x 2,0cm, as quais foram imediatamente imersas no reagente

RNALater (Ambion), numa relação peso:volume de 1:5, conforme recomendado pelo fabricante, identificadas e mantidas por cerca de 16 horas a 4°C. Decorridas 16 horas, o material coletado foi armazenado a -80°C até a extração de RNA.

Adicionalmente, 24 horas após o abate, amostras de *Longissimus dorsi* (aproximadamente 100 g) foram coletadas para análise da atividade enzimática da calpastatina e índice de fragmentação miofibrilar.

Extração do RNA total e preparo do cDNA

As amostras foram descongeladas à 4°C uma hora antes da realização da extração do RNA total. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído do tecido muscular por meio do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Conforme recomendado para tecidos fibrosos, foi adicionada ao protocolo a proteinase K (Fungal – Invitrogen) para melhorar o rompimento celular. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences Inc.) e a integridade do RNA nessas amostras foi observada através de gel de agarose à 1%. Em seguida as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen de Carlsbad, CA) anteriormente à reação de transcrição reversa. Para síntese de cDNA foi utilizando o kit GoScript™ (Promega, Madison, WI), seguindo as recomendações do fabricante.

Desenho dos primers para análise quantitativa em tempo real (qPCR)

O desenho e a construção dos primers para os genes estudados foram feitos por meio da análise da sequência disponível em bancos de dados como o NCBI e UNIGENE. Os genes analisados para o melhor entendimento da proteólise post - mortem em Nelore e Angus foram os seguintes: CAPN3 (Calpaína 3), CAST

(calpastatina), CASP3 (caspase 3) e DNAJA1 (HSP 70). O gene de controle endógeno utilizado para normalização da expressão gênica foi o GAPDH. As sequencia dos primers utilizados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados:

Abreviação		Sequência (5'-3')
CAPN3	Forward	CTACGAGGTTCCCAAAGAGATG
	Reverse	ACCTCCCGCATGTTAATGTAG
CAST	Forward	GTCGGATCCAATGAGTTCTACC
	Reverse	CCTGCGATCCCTTCTTCTTTAT
CASP3	Forward	CGTCCCTTTCTGCCATCC
	Reverse	CAGACCATTAGGCCCACTC
DNAJA1	Forward	AATGTGAAGGCCGAGGTG
	Reverse	CTGAACCATTCCAGGTCCTATC
GAPDH	Forward	AGATAGCCGTA ACTTCTGTGC
	Reverse	ACGATGTCCACTTTGCCAG

Análises de expressão gênica quantitativa

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green RT-PCR Master Mix GoTaq® da Promega e os seguintes parâmetros de ciclos: 95 ° C durante 10 min e 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min. Após a amplificação, uma curva de fusão (0,01 C / s) foi utilizada para confirmar a pureza do produto.

Em cada reação foi utilizado 12,5µL de Power SYBR®GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,5µL de cada primer (forward and reverse), 5µL de cDNA e água MilliQ (ultrapura) para completar o volume de 20µL. As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos. Após 40 ciclos, foi empregado um

ciclo final onde as amostras foram submetidas a aquecimento crescente de 1°C a cada 30 segundos, de 60°C a 94°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Os valores de “threshold cycle” (Ct) obtidos foram posteriormente normalizados (ΔC_t) com base nos valores de Ct obtidos para o gene constitutivo GAPDH.

Antes da análise de expressão, cada gene teve sua eficiência calculada através da utilização de diferentes concentrações dos primers (100, 200 e 400 nM) e cDNA (5, 30, 45 ng/ μ L). Os níveis relativos de expressão gênica foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Atividade da calpastatina

A atividade da calpastatina foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Koohmaraie (1990) e segundo a técnica descrita por Shackelford et al. (1994). Dez gramas de carne (músculo L. dorsi), livre de tecido conjuntivo (gordura e colágeno fisicamente separáveis), foram homogeneizados com 30 ml de solução Tris-base (Tri[hidroximetil]aminometano) 100 mM (Sigma), contendo EDTA (ácido etilenodinitrotetracético) 10 mM (Merck), 2-mercaptoetanol 10 mM, E-64 (trans-epoxisuccinil-L-leucilamido) 0,02 mM (Sigma), ovomucóide 10 mg/100 ml (Sigma) e PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), concentração final de 2 mM (Sigma), pH 8,3, em homogeneizador tipo turrax. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 30.000 x g por 2 duas horas. Em seguida, o sobrenadante foi dialisado por 18 horas contra solução Tris-base 40 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,35. Após a diálise, o material foi transferido para tubos de 50 mL, aquecidos em banho-maria a 95°C durante 15 minutos e resfriados em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 30.000 x g por 30 minutos. O volume do sobrenadante final foi filtrado em gaze, sendo anotado o

volume do filtrado, denominado extrato de carne para cálculo final da atividade. A determinação da atividade de calpastatina das amostras (d) foi realizada em triplicatas, verificando a inibição da hidrólise de caseína por uma preparação padrão de m-calpaína. Alíquotas (de 0,1 a 0,5ml) dos extratos de carne foram diluídas com solução Tris-base 40 mM, EDTA 0,5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 7,35, até completar 1 ml. A estas alíquotas foram adicionados a preparação de m-calpaína e o cloreto de cálcio 5 mM era adicionado por último porque a m-calpaína torna-se ativa em presença de íons cálcio. Foram feitos: um controle branco (b) no qual a m-calpaína era substituída por tampão; um controle (c) para determinar a atividade da preparação de m-calpaína e um controle (e) para descontar a atividade de outras peptidases presentes no extrato de carne. No controle (e), a adição de EDTA 10 mM assegurava a inibição da m-calpaína. Adicionou-se a todos os tubos 1 ml da solução substrato (caseína Hammersten 7mg/ml, Merck, Tris 100 mM, contendo azida sódica 1 mM, Merck, pH 7,5). Imediatamente após a adição de CaCl₂, agitavam-se os tubos para homogeneizar a mistura que era incubada em banho-maria a 25°C por 60 minutos. O ensaio era interrompido pela adição de 2ml de ácido tricloroacético 5%. Em seguida os tubos de ensaio foram centrifugados (500 x g, 30 min., temperatura ambiente) e a absorbância (278nm) do sobrenadante determinada. A atividade de calpastatina (Acal) das amostras foi, então, calculada da seguinte forma: $Acal/ml = (c - b) - [(d - b) - e] * volume \text{ das amostras}$ (Koohmaraie,1990).

Índice de fragmentação miofibrilar (IFM)

A determinação do índice de fragmentação miofibrilar (IFM) foi realizada conforme descrita por Culler et. al. (1978). Foram utilizados 4g do músculo *Longissimus dorsi*, livres de gordura e de tecido conectivo. As amostras foram homogeneizadas em Ultra-Turrax com haste de cialhamento (Marconi – MA 102/E) em

40 mL de Tampão de Índice de Fragmentação Miofibrilar (TIFM) à 2°C (100mM KCl, 20 mM de fosfato de potássio pH 7,0, 1 mM MgCl₂ e 1 mM NaN₃, pH 7,0), duas vezes, durante 30 segundos por vez. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos à 2°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 20 mL de TIFM à 2°C e homogeneizado com bastão de vidro, e novamente centrifugado a 1000 x g por 15 minutos a 2°C e o sobrenadante foi mais uma vez descartado. O *pellet* soluto foi então ressuspendido em 10 mL de TIFM à 2°C e submetido a agitação vigorosa em vortex até a amostra torna-se homogênea para ser filtrada em peneira de polietileno com malha de 1 mm. Foi feita a quantificação de proteínas miofibrilares totais pelo método do macro biureto (Gornall et al., 1949). Para determinação de IFM as amostras foram preparadas com o TIMF para um volume final de 8,0 mL e concentração de proteína de 0,5 mg/mL. As amostras foram então submetidas à leitura de absorbância (540nm). O valor de IFM foi obtido multiplicando a absorbância obtida por 200 (fator de escala para converter os valores de absorbância conforme sugerido por Culler et al. 1978).

SDS-PAGE e Western Blot

A proteína total do músculo Longissimus dorsi foi extraído em tampão de lise (Tris 10 mM pH 7,2; 0,5% de Triton X-100; 10% de glicerol; 0,5% de ditioneitol-DTT; 0,5mM de fluoreto de fenilmetano-PMSF 0,5mM e benzamidina). O teor de proteína foi mensurado através de Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA), e 120 ng da proteína total foram separadas por meio de SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com solução de bloqueio (BSA a 3% w / v em TBST) durante 1 h, com agitação suave a temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com os seguintes anticorpos primários monoclonal anti Mu-Calpain (#MA3940), monoclonal Calpastatin (#MA3945) obtidos

da Thermo Scientific (Rockford, IL USA) diluição de 1:250; β -tubulina (#2128) adquirida da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA), diluição 1:100. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio e incubados por 16 h a 4 ° C com agitação suave. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBST três vezes (por 5 minutos) à temperatura ambiente e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário ANTI-IgG de camundongo (fc específico) conjugado com peroxidase, produzido em cabras (#A2554) adquirido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda; a uma diluição de 1: 5000, durante 1 h à temperatura ambiente com agitação suave. Após incubação com anticorpo secundário as membranas foram lavadas 3 vezes (5 min cada) com TBST, reveladas com substrato ECL Clarity™ (Bio-Rad, Hercules, CA), revelado com o scanner Blot c-Digit®, e analisados com Software Image Studio Digits Ver 4.0 (Licor Biosciences).

Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + R_i + PI_{(i)j} + e_{ij}$$

onde Y_{ij} é o valor fenotípico observado no indivíduo; μ é a média geral; R_i é o efeito fixo do i^o nível de Raça; $PI_{(i)j}$ é o efeito fixo da covariável Peso Inicial aninhado com Raça; e e_{ij} é o erro aleatório associado com Y_{ij} , distribuído como $e_{ij} \sim N(0, I\sigma_e^2)$.

Para os dados de expressão gênica, a normalidade dos resíduos da análise de cada característica foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Conforme esperado, os dados de expressão gênica não foram normalmente distribuídos, e logo, foram transformados usando $\ln(2^{-\Delta\Delta Ct} + 1)$ conforme sugerido por Vogel et al. (2004). Uma vez que a normalidade dos resíduos foi obtida ($P > 0,05$), o efeito da covariável peso inicial aninhado com raça foi testado, e removido das análises finais quando $P > 0,10$.

Médias de quadrados mínimos foram estimadas para o efeito de Raça. Todas análises estatísticas foram feitas usando SAS 9.3 (Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, EUA).

RESULTADOS

Não foram observadas diferenças para a expressão gênica de CAPN3 ($P = 0,7078$), CASP3 ($P = 0,9826$), CAST ($P = 0,4112$) e DNAJA1 ($P = 0,665$) (Figura 1) entre os tratamentos.

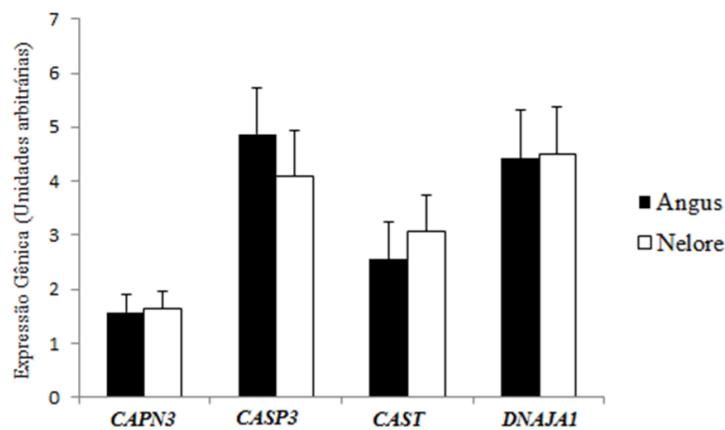


Figura 1. Expressão gênica dos marcadores de maciez da carne: calpaína (CAPN3), caspase (CASP3), calpastatina (CAST) e proteína de choque térmico 70kda (DNAJA1), no músculo Longissimus dorsi.

Similarmente, o conteúdo de calpaína ($P = 0,6346$) e calpastatina ($P = 0,1374$) presente no tecido muscular esquelético não diferiu entre os tratamentos (Figura 2).

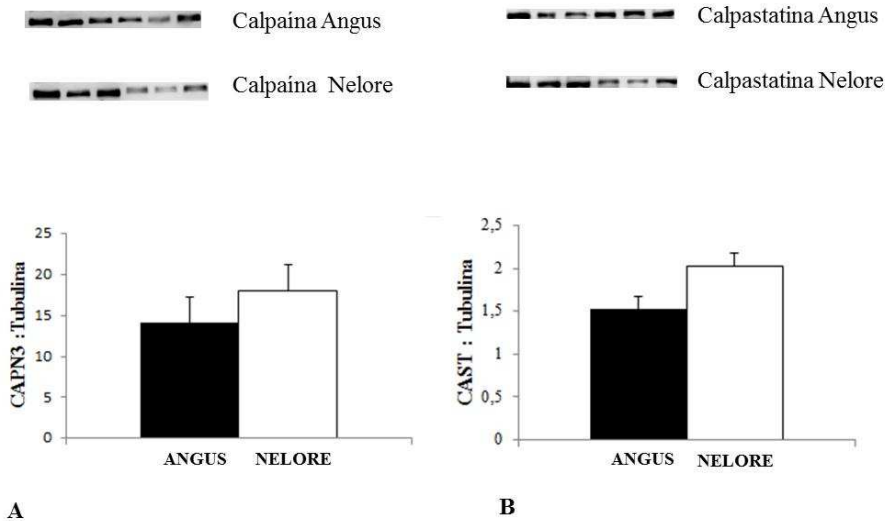


Figura 2: Expressão proteica da calpaína (A) e calpastatina (B) no músculo Longissimus dorsi.

No entanto, as raças estudadas diferiram quanto à atividade da calpastatina ($P = 0,0292$) e índice de fragmentação miofibrilar ($P = 0,0051$) (Figura 3).

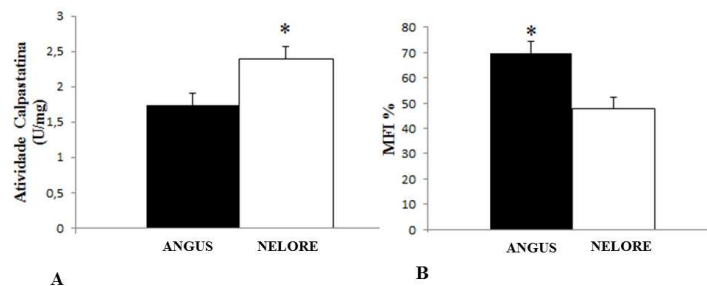


Figura 3: Atividade da calpastatina (A), Índice de fragmentação miofibrilar (B) no músculo Longissimus dorsi.

DISCUSSÃO

Um dos principais fatores que afetam a maciez da carne no post- mortem é a degradação das miofibrilas (Koochmariaie, 1994; Ouali et al., 2006). Fatores ambientais e genéticos podem contribuir de forma diferente entre diferentes grupos genéticos, resultando em maior degradação das miofibrilas e conseqüentemente, maior maciez da

carne. A proteólise post - mortem pode ser estudada através de diversas formas, entre elas, a mensuração da atividade enzimática da calpastatina e pelo índice de fragmentação miofibrilar.

O sistema calpaína-calpastatina é o principal sistema proteolítico que afeta a degradação das miofibrilas durante o período post - mortem e, conseqüentemente, afeta a maciez da carne (Taylor et al., 1995). A calpaína participa na degradação miofibrilar durante a vida e continua ativa no musculo no post - mortem influenciando o amaciamento da carne, porém tem a sua atividade inibida pela calpastatina (Goll et al., 2003). No presente estudo a atividade da calpastatina foi maior no músculo Longíssimus dorsi de bovinos Nelore do que em Angus ($P = 0,0292$). Assim, a maior atividade de calpastatina levou a uma diminuição na atividade de calpaína no músculo Longíssimus dorsi de Nelore em comparação com os de bovinos Angus.

O índice de fragmentação miofibrilar (IFM) mede a intensidade da proteólise das miofibrilas (Hopkins et al., 2000). Culler (1978) relatou que valores de IMF acima de 60% caracterizam carne macia, valores entre 50 e 60% maciez moderada e valores abaixo de 50% ausência de maciez. Ou seja, indica que quanto maior o índice, maior foi a fragmentação das miofibrilas musculares e, portanto, mais macia é a carne. O valor de IMF observado no presente trabalho indicou maior maciez da carne de Angus em relação a carne de Nelore ($P = 0,0051$). Podemos afirmar que, com os resultados obtidos, segundo a classificação de Culler (1978) que a carne de Angus é macia ($\%IMF > 60$) e que a carne de Nelore é ausente em maciez ($\%IMF < 50$). Estes dados mostram uma contribuição substancial da atividade de calpastatina na maciez da carne de bovinos Nelore em comparação com o gado Angus, resultando na maior proteólise post mortem confirmado pelo IFM.

Apesar da diferença existente na atividade de calpastatina entre Angus e Nelore, não foram encontradas diferenças para a expressão de mRNA da calpaína e da calpastatina, como também não foi observada diferença na expressão proteica. Nossos dados sugerem que a expressão de mRNA de calpaína e calpastatina não influencia a regulação da proteólise post - mortem em Nelore em comparação com carne Angus. Fatores de natureza microambiental, podem alterar a atividade enzimática do sistema calpaína e esses sim, resultariam na diferença de atividade enzimática, independente da abundância das proteínas nas raças estudadas. Fatores como, por exemplo, temperatura, queda do pH, força iônica, estado oxidativo e nitrosilação das proteínas intracelulares (Lonergan, et al. 2010) podem ser diferentes entre as raças, resultando na diferença da atividade da calpaína o que nos faz sugerir, que os mesmos poderiam influenciar na atividade da calpastatina também, em momento pós transcricional.

Além de sistema proteolítico calpaína-calpastatina, outros mecanismos de amaciamento da carne foram estudados. Os grupos das caspases aparece como o primeiro sistema proteolítico envolvido na conversão do músculo em carne sendo responsável pela apoptose celular (Ouali et al., 2006), que resulta no enfraquecimento da estrutura do músculo esquelético e, conseqüentemente, ao amaciamento da carne. No entanto, não houve diferença na expressão de mRNA de CASP3 ($P = 0,9826$) em Angus e Nelore, porém sua atividade enzimática não foi avaliada no presente trabalho, logo, maiores esclarecimentos devem ser feitos a fim investigar melhor a importância sobre a discrepância entre a maciez da carne de Nelore e Angus.

As proteínas de choque térmico (HSP) têm sido também sugeridas como um grupo de proteínas que controla o amaciamento da carne. Estas proteínas desempenham um papel crucial na manutenção da integridade da proteína celular evitando a desnaturação e provável perda de função (Kultz, 2003). Portanto, as HSPs podem

diminuir a atividade das caspases (Arrigo, et al. 2005; Beere, et al. 2005; Flower et al. 2005) e níveis crescentes de HSPs levariam a redução no amaciamento da carne. No entanto, não foram encontradas diferenças de expressão de mRNA de DNAJA1 (Hsp40) entre Nelore e Angus muscular ($P = 0,665$).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que embora haja diferença na atividade da calpastatina entre os dois grupos genéticos estudados, não se é verificada diferença quanto a abundância dessa proteína na carne de Nelore e Angus. Indicando que mecanismos pós transcricionais estão envolvidos na atividade da calpastatina. A ausência de diferença na expressão da caspase e da HSP70 aqui encontrada, deve ser melhor investigada a fim de esclarecer melhor a importância destas proteínas no amaciamento da carne de bovinos Nelore e Angus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrigo, A. P. (2005). Heat shock proteins as molecular chaperones. *Medecine Sciences*, 21(6–7), 619–625.
- Beere, H. M. (2005). Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2633–2639.
- Brasil. (1997). Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal [Food of animal origin sanitary and industry inspection]. In. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Culler, R. D., Parrish, F. C., Smith, G. C., & Cross, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. *Journal of Food Science*, 43 : 1177-1180.
- Flower, T. R., Chesnokova, L. S., Froelich, C. A., Dixon, C., & Witt, S. N. (2005). Heatshock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *Journal of Molecular Biology*, 351(5), 1081–1100.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2ddct method. *Methods* 25: 402-408
- Lonergan, E. H.; Zhang W, Lonergan, S. M. 2010. Biochemistry of postmortem muscle Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(2010), 184–195.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong. J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews* 83:731–801.
- Hopkins, D. L.; Littlefield, P. J.; Thompson, J. M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. *Meat Science*, v. 56, n.1, p. 19-22, 2000.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science* 36 : 93-104.
- Koohmaraie, M. (1990) Quantification of Ca₂(+)-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *Journal of Animal Science* 68 : 659-665.

Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1), 44–58.

Shackelford, S.D.; Koohmaraie, M.; Cundiff, L.V.; Gregory, K.E.; Rohrer, G.A.; Savell, J.W. (1994) Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. *J. Anim. Sci.*, 72:857-863.

Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, & V. F. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science* 73 : 1351-1367.

.