

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EFEITO DE GANHO COMPENSATÓRIO NA EXPRESSÃO
DE GENES RELACIONADOS COM METABOLISMO DO
TECIDO CONJUNTIVO E MACIEZ DA CARNE NO
MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE VACAS DE
DESCARTE DA RAÇA NELORE

Acadêmico: Waleska Ascurra Nunes Nascimento

Aquidauana-MS
Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EFEITO DE GANHO COMPENSATÓRIO NA EXPRESSÃO
DE GENES RELACIONADOS COM METABOLISMO DO
TECIDO CONJUNTIVO E MACIEZ DA CARNE NO
MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE VACAS DE
DESCARTE DA RAÇA NELORE

Acadêmico: Waleska Ascurra Nunes Nascimento
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz
Co-orientador: Dr. Gelson Luis Dias Feijó

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.”

Aquidauana-MS
Fevereiro de 2013

N199e Nascimento, Waleska Ascurra Nunes

Efeito de ganho compensatório na expressão de genes relacionados com metabolismo do tecido conjuntivo e maciez da carne no músculo *Longissimus dorsi* de vacas de descarte da raça Nelore / Waleska Ascurra Nunes Nascimento. Aquidauana, MS: UEMS, 2013.

80p. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2013.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz.

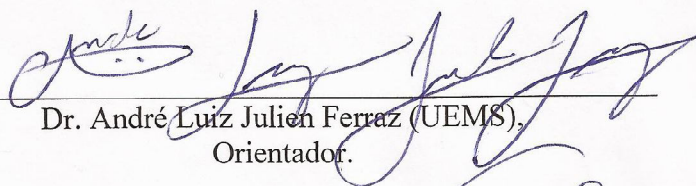
1.Colágeno 2.PCR 3.Qualidade de carne I.Título.

CDD 20.ed. 636.207

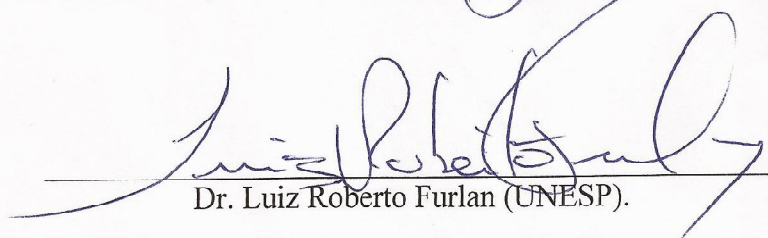
WALESKA ASCURRA NUNES NASCIMENTO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Zootecnia.

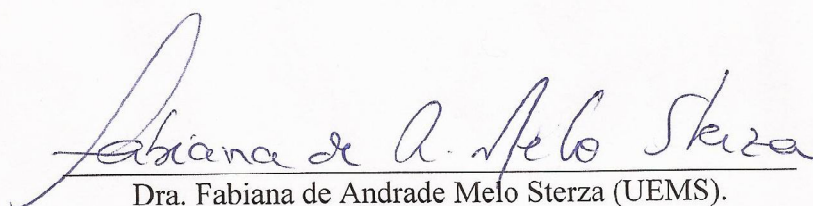
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/02/2013.



Dr. André Luiz Julien Ferraz (UEMS),
Orientador.



Dr. Luiz Roberto Furlan (UNESP).



Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza (UEMS).

"Chamamos de Ética o conjunto de coisas que as pessoas fazem quando todos estão olhando. O conjunto de coisas que as pessoas fazem quando ninguém está olhando chamamos de Caráter."

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter estado ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Ele e Nossa Senhora são minhas fontes de inspiração e de força.

Agradecimentos especiais ao meu orientador, o Doutor André Luiz Julien Ferraz. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos, por toda a ajuda que me foi dada e pela compreensão. Meu orientador foi muito mais do que um professor, foi um amigo com quem pude contar em qualquer situação, meus sinceros agradecimentos.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundect pela concessão do financiamento para execução do experimento.

À mestrande Bruna Biava de Menezes por toda a ajuda no laboratório, que muito pacientemente se dispôs a auxiliar nos trabalhos, que não foram poucos. Obrigada pelo apoio e amizade sincera.

Aos mestrandos Giancarlo de Moura Souza e Isabella Maiumi Blecha pelo trabalho em equipe e pela amizade.

Aos funcionários e pesquisadores da Embrapa Gado de Corte que colaboraram com a realização deste projeto.

À Jessica Farias Neres que é muito mais do que uma amiga, é uma companheira para a vida toda. Ela que me acompanhou durante todo esse tempo, e me deu muita força sempre que eu precisava. Ela sabe o que representa para mim.

Agradeço eternamente a meus pais Walter Nunes Nascimento e Elva de Jesus Ascurra Nunes Nascimento por absolutamente tudo o que eles fizeram por mim. Pelo amor e carinho que sempre me foram dados. Eles sempre terão meu amor e eterna gratidão.

Aos meus queridos irmãos Wanessa Ascurra Nunes Nascimento e Wagner Ascurra Nunes Nascimento que são meus melhores amigos. É maravilhoso saber que terei sempre eles ao meu lado, principalmente a Wanessa que é como uma segunda mãe para mim.

À todos que de forma direta ou indireta colaboraram para tornar esse sonho realidade.

Meu muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
<i>ABSTRACT</i>	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 QUALIDADE E MACIEZ DA CARNE	3
2.1.1 Ganho compensatório.....	5
2.1.2 Músculo esquelético	7
2.1.3 Colágeno	9
2.1.3.1 Processo de síntese do colágeno.....	11
2.2 EXPRESSÃO GÊNICA.....	14
2.2.1 PCR em Tempo Real.....	17
2.3 GENES EM ESTUDO.....	20
2.3.1 COL1A1, COL1A2 e COL3A1	22
2.3.2 MMP2	23
2.3.3 TIMP1 e TIMP2	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2 – EFEITO DE GANHO COMPENSATÓRIO NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM METABOLISMO DO TECIDO CONJUNTIVO	

E MACIEZ DA CARNE NO MÚSCULO <i>LONGISSIMUS DORSI</i> DE VACAS DE	
DESCARTE DA RAÇA NELORE	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÕES	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
APÊNDICE	61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Diagrama esquemático para mostrar o arranjo do Tecido Conjuntivo Intramuscular (IMCT) dentro do músculo	8
Figura 2. Síntese de colágeno tipo I e degradação	14
Figura 3. Estrutura de um gene eucarioto	17
Figura 4. Curva de amplificação do PCR em Tempo Real	18
Figura 5. Molécula de Syber Green entre a fita dupla de DNA	19
Figura 6. Diagrama esquemático para resumir as principais vias das respostas celulares dentro do tecido muscular <i>in vivo</i> que podem afetar a renovação do tecido conjuntivo intramuscular (IMCT)	21

CAPÍTULO 2

Figura 1. Resultado do programa geNorm® referente a análise de estabilidade dos genes constitutivos B2M, HMBS e ACTB para expressão relativa em qPCR	41
Figura 2. Resultado do programa normFinder® referente a análise de estabilidade dos genes constitutivos HMBS, B2M e ACTB para expressão relativa em qPCR	42
Figura 3. Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os tratamentos compensatório e manutenção	43
Figura 4. Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os grupos com diferentes forças de cisalhamento	51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Genes, número de acesso no GenBank e sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em Tempo Real	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB – *B – ACTINA*

B2M – *B- 2- MICROGLOBULINA*

cDNA – DNA complementar

COL1A1 – *COLÁGENO I ALFA 1*

COL1A2 – *COLÁGENO I ALFA 2*

COL3A1 – *COLÁGENO III ALFA 1*

Ct – Ciclo de “threshold”

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECM / MEC – Matriz extracelular

HMBS – *HIDROXIMETILBILANE SINTASE*

hnRNAs – Ácidos Ribonucleicos nucleares heterogêneos

IMCT – Tecido conjuntivo intramuscular

Kgf – quilograma-força

MMP2 – *MATRIZ METALOPROTEINASE 2*

MMPs – Matriz metaloproteinases

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

TIMP1 – *INIBIDORES TECIDUAIS DA MATRIZ METALOPROTEINASE 1*

TIMP2 – *INIBIDORES TECIDUAIS DA MATRIZ METALOPROTEINASE 2*

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

RESUMO

A maciez representa uma das características mais importantes de uma carne de qualidade. O colágeno, presente no tecido conjuntivo intramuscular, interfere quanto à maciez, sendo que, com o avançar da idade do animal, as ligações cruzadas do colágeno tornam-se mais estáveis o que favorece o endurecimento da carne. O ganho compensatório tem demonstrado afetar na taxa de renovação protéica do músculo, podendo, dessa forma, melhorar a maciez da carne. Objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a expressão dos genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 e TIMP2 em músculo *Longissimus dorsi*, de vacas de descarte da raça Nelore submetidas a tratamentos alimentares distintos. Os animais foram distribuídos em dois grupos: no primeiro grupo os animais receberam suplementação para promover a manutenção do peso durante o período experimental e no segundo grupo, após passar por restrição alimentar, os animais obtiveram uma suplementação alimentar para promover o ganho compensatório. As amostras foram classificadas de acordo com o tratamento (manutenção e compensatório) e com a força de cisalhamento (maior ou menor do que 9,77Kgf). Durante o abate foram coletadas amostras do músculo desses animais e armazenadas em freezer a -80°C. Foi extraído o RNA total de todas as amostras e posteriormente realizou-se a síntese de cDNA, utilizando, para tanto, 3 µg de RNA total de cada amostra. A comparação da expressão dos genes estudados foi realizada pelo método de quantificação relativa em PCR em Tempo Real, sendo a expressão gênica diferencial entre os grupos definida pelo método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Para a variável tratamento houve uma maior expressão, com diferença estatística ($p < 0,05$), de todos os genes em estudo no grupo de animais com ganho compensatório. Para a variável força de cisalhamento não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na expressão de nenhum dos genes analisados. Os resultados sugerem que, apesar de não haver diferença na força de cisalhamento, a manipulação do crescimento utilizando o ganho compensatório pode ser uma via eficiente para o processo de renovação protéica do tecido conjuntivo intramuscular.

Palavras-chave: colágeno, PCR, qualidade de carne

ABSTRACT

Tenderness is one of the most important features of a quality meat. Collagen, present in the intramuscular connective tissue, is a factor contributing to the tenderness that its turn, with advancing age of the animal, collagen crosslink becomes more stable, contributing to the toughening of meat. Compensatory growth has been shown to affect rate of muscle protein turnover, improving tenderness of beef. The aim was evaluate expression of genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 and TIMP2 in *Longissimus dorsi* muscle of cull cows Nellore submitted to distinct feeding treatments. The animals were divided into two groups: the first group received supplementation to promote weight maintenance during the experimental period, and, in the second group, after feeding restriction, animals obtained a feeding supplementation to promote compensatory growth. The samples were classified according treatment (maintenance and compensatory) and shear force (greater or less than 9.77Kgf). During the slaughter were collected muscle samples and stored in a freezer at -80°C. Total RNA was extracted from samples and after was realized cDNA synthesis, being used 3 µg of total RNA from each sample. Comparison of gene expression was performed by the relative quantification method in real-time PCR, and differential gene expression between the groups defined by delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method. For the variable treatment was higher expression, with statistical difference ($p < 0,05$), all of the genes in the group of animals with compensatory growth. For variable shear force there was no statistical difference ($p > 0,05$) in expression of any genes analyzed. The results suggest that, although no difference for shear force, the growth manipulation using compensatory growth may be an efficient way for the process of intramuscular connective tissue protein turnover.

Keywords: collagen, PCR, meat quality

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 209 milhões de bovinos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo, produzindo aproximadamente 9,8 milhões de toneladas de carne (ABIEC, 2012). Esses dados demonstram a real importância da criação de bovinos de corte na economia do país.

Contudo, o cenário atual da carne apresenta um produto voltado, na maioria dos casos, para a quantidade comercializada, ou seja, almeja-se abater o maior número possível de animais visando à rentabilidade, e algumas vezes não há a devida preocupação com a qualidade da carne que será ofertada aos consumidores. Isso implica em uma ausência de padrão de qualidade contínuo.

Segundo Koohmaraie (1994), em virtude de muitos consumidores considerarem a maciez a característica organoléptica mais importante da carne, é essencial que se entenda os mecanismos envolvidos com o processo de amaciamento da carne, a fim de se desenvolver novas metodologias que possam manipular o processo vantajosamente, consequentemente, satisfazendo as exigências do consumidor.

A qualidade da carne pode ser influenciada por fatores *ante e post mortem*. Dentre os fatores *ante mortem* que podem interferir na qualidade da carne em termos de maciez, pode-se citar o estresse que está intimamente relacionado com o declínio do pH da carne durante o processo de transformação do músculo em carne, a genética (raça), a alimentação, o sexo e a idade do animal ao abate. E dentre os fatores *post mortem* destacam-se a velocidade de resfriamento, a estimulação elétrica das carcaças durante o abate, o tempo de maturação e os métodos de cocção da carne (FELÍCIO, 1997).

Apesar de se conhecer alguns dos mecanismos envolvidos no processo de amaciamento da carne, ainda não se tem um conhecimento global de todos os fatores que participam da manifestação dessa característica. Dessa maneira, conhecer mais sobre diferenças genéticas, moleculares e

bioquímicas entre raças e animais que apresentam estas diferenças é de extrema importância.

Segundo Felício (1997) e Field et al. (1997), a idade é um dos fatores que determinam a maciez da carne bovina, de tal forma que há diminuição na maciez à medida que a idade avança. Os mesmos autores afirmam que uma explicação para a dureza observada em carnes de animais velhos deve ser determinada e o melhor candidato para tal efeito é o tecido conjuntivo presente no músculo. Assim, estudos envolvendo a participação do colágeno na maciez da carne estão sendo cada vez mais realizados, na busca por uma explicação consistente do principal responsável pela dureza da carne em animais mais velhos.

O colágeno, importante componente do tecido conjuntivo intramuscular (IMCT - *Intramuscular Connective Tissue*), possui uma grande influência na maciez ou dureza da carne (BURSON & HUNT, 1986; BLANCO & ALONSO, 2007), sendo que, dependendo da idade do animal, serão influenciados diretamente quanto a quantidade e qualidade do colágeno presente na matriz extracelular (SORIA & CORVA, 2004; LEPETIT, 2007; NISHIMURA, 2010). Lepetit (2008) estabeleceu que a força de cisalhamento da carne crua está altamente correlacionada com o conteúdo de colágeno e isso mantém a convicção de que a quantidade de colágeno é importante na determinação da maciez da carne. Segundo Bailey (1985) e Nishimura (2010), a maciez da carne geralmente diminui conforme aumenta a idade do animal, e isso ocorre, principalmente, devido a formação de ligações cruzadas intermoleculares que estabilizam o colágeno tornando-o mais resistente

Para Purslow et al. (2012), manipular o estado de maturidade do colágeno é biologicamente viável, por meio do aumento da renovação do tecido conjuntivo, produzindo estruturas menos maduras, melhorando, dessa forma, a maciez da carne. Segundo Nishimura (2010), a renovação do IMCT pode ser o futuro alvo para manipulação da maciez da carne.

A manipulação da dieta para controlar a taxa de crescimento do animal induzindo ao ganho compensatório seria um manejo indicado para renovar o tecido conjuntivo intramuscular (HANSEN et al., 2006; PURSLOW et al., 2012). Segundo Therkildsen (2005) e Hansen et al. (2006), quando animais são alimentados *ad libitum* após um período de restrição alimentar, eles respondem

com o ganho compensatório. Segundo os autores, o ganho compensatório é responsável por aumentar as taxas de síntese e degradação protéica, sendo, portanto uma estratégia para renovação da proteína muscular.

Está se tornando consensual entre os pesquisadores da área, que a busca de um entendimento mais claro da relação gene-fenótipo e uma análise detalhada das interações genótipo-ambiente, responsáveis pela manifestação das características fenotípicas, seriam cruciais para a manutenção da competitividade do país no mercado da carne, pois estes conhecimentos poderão fornecer os subsídios necessários para o desenvolvimento de novas tecnologias e/ou produtos que ajudarão a sobrepujar os atuais entraves enfrentados pela pecuária de corte nacional.

Nesse sentido, pesquisas voltadas para a identificação de indicadores de qualidade e em uma maior compreensão da biologia do músculo para controlar as características de qualidade estão sendo realizadas (HOCQUETTE et al., 2007). Segundo os mesmos autores, o estudo da biologia molecular é capaz de identificar associações entre moléculas (DNA, RNA, proteínas) e fenótipos complexos de interesse econômico, bem como possibilita o desenvolvimento de novas teorias biológicas que poderão ser confirmadas com metodologias específicas. Para eles, a maciez da carne é um exemplo de fenótipo complexo que poderá ser beneficiado pelo uso da engenharia genética.

Dessa forma, objetivou-se analisar a expressão gênica diferenciada de genes relacionados com o metabolismo e maciez da carne em músculo *Longissimus dorsi* de vacas de descarte da raça Nelore, submetidas e não ao processo de ganho compensatório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE E MACIEZ DA CARNE

Ao longo dos anos, alguns fatores têm sido apontados como influenciadores do processo de formação do fenótipo maciez da carne, tais como: idade do animal ao abate, sexo, taxa de glicólise, quantidade e solubilidade do colágeno, comprimento do sarcômero, força iônica e degradação das proteínas miofibrilares (KOOHMARAIE, 1994), genética do

animal (raça), a alimentação, o uso de agentes hormonais (agentes β -adrenérgicos) e os tratamentos *post-mortem* (resfriamento, estimulação elétrica das carcaças e maturação) (ALVES & MANCIO, 2007).

Segundo Riley et al. (2005), tratamentos apropriados para carcaças durante o período *post-mortem* podem controlar efetivamente eventuais variações organolépticas, especialmente, a maciez. Ignorando-se que fatores *post-mortem*, como estimulação elétrica e maturação, possam impactar positivamente na maciez da carne bovina, fatores pré-abate, ou seja, inerentes ao próprio animal, são os de maior importância na determinação dessa característica. Em outras palavras, segundo o mesmo autor, aspectos genéticos e fatores ambientais presentes durante o processo de criação dos bovinos predis põem à produção de carne mais ou menos macia.

Na verdade, genética e ambiente atuam de forma conjunta na determinação da qualidade da carne, pois o potencial genético de um animal para produzir carne macia, por exemplo, só será expresso em sua totalidade se o ambiente permitir que esse animal o expresse.

Avaliações da maciez da carne de diferentes raças identificaram o efeito da genética na determinação da maciez. Dentre os vários mecanismos propostos para explicar as diferenças raciais está o efeito do estado de ativação do sistema enzimático calpaína-calpastatina, que é responsável pelo amaciamento *post-mortem* que ocorre durante o processo de maturação da carne (KOOHMARAIE, 1994). Whipple et al. (1990) identificaram que raças zebuínas apresentam esse sistema enzimático menos ativo por apresentarem maiores teores do inibidor calpastatina.

Evidências mostram que as proteases neutras ativadas pelo íon cálcio, as calpaínas, são em parte responsáveis pela proteólise *post mortem*, que conduz a um aumento progressivo da maciez da carne (KOOHMARAIE; 1992, 1994). Segundo Wheeler et al. (1990), Whipple et al. (1990) e Koohmaraie (1992, 1994), apesar do importante papel das calpaínas na maturação, é o efeito inibidor de proteólise da calpastatina, da mesma forma ativada pelo íon cálcio livre no sarcoplasma, que apresenta maior correlação com a maciez da carne conservada sob refrigeração.

Outro fator que também tem sido relacionado à maciez da carne e que tem sido alvo de muitos estudos é o colágeno, que está presente no tecido

conjuntivo intramuscular. Purslow (2005) relatou que a maciez da carne geralmente diminui conforme avança a idade do animal e que músculos ricos em colágeno evidenciam muito mais esse efeito do que aqueles com baixo conteúdo de IMCT. Para Lepetit (2008), Nishimura (2010) e Purslow et al. (2012), a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno com o avanço da idade interfere na maciez da carne, visto que, o colágeno se torna mais termo-estável. Segundo Bailey (1985), o aumento do número de ligações cruzadas no colágeno com o aumento da idade do animal explica o aumento da dureza da carne de animais mais velhos.

A maciez da carne pode ser avaliada subjetivamente (MÜLLER, 1980), por meio de painéis de degustação, no qual pessoas treinadas degustam um pedaço da amostra e posteriormente atribuem uma nota, obedecendo a escala de 1 a 9, sendo: 1 = extremamente dura; 2 = muito dura; 3 = dura; 4 = maciez levemente abaixo da média; 5 = maciez média; 6 = maciez levemente acima da média; 7 = macia; 8 = muito macia e 9 = extremamente macia.

A maciez da carne também pode ser avaliada pelo método objetivo, por meio de equipamento, como o texturômetro, que mede a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal de carne e, quanto maior a força dispensada, menor a maciez apresentada pelo corte de carne. Segundo Santos (2008) a medição é realizada utilizando-se um aparelho denominado *Warner-Bratzler Shear Force (WBS)*. Os valores são dados em quilograma-força (kgf), onde quanto menor for o valor expresso menor a força necessária para cortar a carne e maior a maciez.

2.1.1 Ganho compensatório

Um dos aspectos que contribui negativamente para o desenvolvimento do setor da bovinocultura de corte brasileira é o baixo nível tecnológico das propriedades, com falhas, principalmente, na nutrição animal, na superlotação das pastagens e no baixo potencial genético dos animais, apesar de existir grande número de informações técnicas voltadas para os aspectos de alimentação, manejo de pastagens e critérios de seleção e melhoramento genético animal (BUTOLO, 2002).

Quanto às gramíneas, é notório que nos trópicos existe uma sazonalidade de produção das forrageiras, tanto em termos de quantidade como de qualidade nutritiva, isso quer dizer que nos meses de primavera-verão (outubro a março), onde existe elevada pluviosidade, maior número de horas de luz solar e, conseqüentemente, maior temperatura ambiente, as plantas se desenvolvem rapidamente, ocorrendo o inverso nos períodos de outono-inverno (abril a setembro). Segundo Prates et al. (1999), na quase totalidade das gramíneas tropicais, este crescimento nas épocas de primavera-verão atinge mais de 80% da sua produção de matéria seca anual. Desta maneira, a criação de animais mantidos exclusivamente em sistemas de pastejo ocasiona o efeito denominado “sanfona”, ou seja, com ganho de peso satisfatório no período de maior disponibilidade de forragem (primavera-verão ou época das águas) e perda de peso no período de escassez de pasto (outono-inverno ou época da seca).

Animais que apresentam perda de peso na época seca e no subsequente período de primavera-verão têm à sua disposição uma boa oferta de alimento, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos, geralmente, apresentam maior velocidade de ganho de peso. Este efeito é conhecido como ganho compensatório. De acordo com Ryan (1990), vários fatores podem influenciar o ganho compensatório, entre eles, a idade, a severidade e a duração da restrição alimentar.

Segundo Euclides et al. (1998), o ganho compensatório tem sido explorado, de forma consciente ou inconsciente, em animais em crescimento e, sob o ponto de vista econômico, a perda de peso que os animais experimentam durante a época de restrição na oferta de forragem pode ser compensada pela abundância de pasto na época favorável. No entanto, esse ganho compensatório quase sempre implica no abate de animais com mais de dois anos de idade.

Entre outros fatores determinantes da qualidade da carne, a mesma também está associada à velocidade de ganho de peso, de tal forma que novilhos alimentados *ad libitum* produzem carne de melhor qualidade que outros sob restrição alimentar (THERKILDSEN et al., 2002). Em um estudo da renovação tecidual que ocorreu durante a fase de re-alimentação (ganho compensatório) em bezerros, Therkildsen (2005) observou que o pico de

renovação protéica em biópsias do músculo *Longissimus dorsi* coincidiu com o pico de RNA e DNA nessas amostras e também com o pico da velocidade de ganho de peso. Dessa forma, o autor concluiu que a renovação protéica muscular é afetada por estratégias de restrição/re-alimentação e apresenta-se aumentada em animais submetidos a ganho compensatório em comparação aos animais que apresentaram ganho de peso normal.

O crescimento muscular reflete a diferença entre a taxa de síntese protéica e a taxa de degradação protéica, e tem sido sugerido que tanto as taxas de síntese e degradação protéica são elevadas durante o período de ganho compensatório (MILLWARD et al., 1975; JONES et al., 1990).

A conjunção do efeito genético negativo para maciez, pois a base do rebanho é zebuína, com a avançada idade ao abate tem determinado que a carne consumida por grande parte da população brasileira seja proveniente de animais com pouca capacidade de produzir carne macia. Mesmo que todas as propriedades rurais adotassem alta tecnologia para a produção de carne bovina e reduzissem a idade média ao abate dos machos para menos de três anos, ainda assim haveria as fêmeas oriundas dos rebanhos de cria que geralmente são abatidas com idades maiores, em média entre sete e dez anos. Para essa categoria, o melhoramento genético é a única solução para o problema de falta de maciez.

2.1.2 Músculo Esquelético

O músculo esquelético é o principal componente da carne, sendo este, um músculo estriado de contração voluntária, ou seja, sua ação é controlada pela própria vontade do animal (ALVES & MANCIO, 2007).

A maciez da carne depende também da estrutura e composição do músculo esquelético, que é composto principalmente por fibras musculares e circundado por tecido conjuntivo intramuscular (IMCT - *Intramuscular Connective Tissue*) (NISHIMURA, 2010).

As fibras musculares são constituídas de uma membrana externa (sarcolema) e de um citoplasma diferenciado (sarcoplasma), que está praticamente tomado pelas miofibrilas, que são feitas de filamentos finos (actina) e espessos (miosina). O sarcômero constitui a menor unidade contrátil

estrutural repetitiva da miofibrila, apresentando um papel importante no ciclo de contração e relaxamento muscular (ALVES & MANCIO, 2007).

A integridade estrutural das fibras musculares é mantida por três camadas de tecido conjuntivo intramuscular: 1) o endomísio que circunda as fibras musculares esqueléticas individualmente; 2) o perimísio que recobre o grupo de feixe de fibras musculares e 3) o epimísio que recobre todo o músculo. A Figura 1 mostra o esquema de organização do Tecido Conjuntivo Intramuscular. O tecido conjuntivo é formado por células e matriz extracelular (MEC), que é composto de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (NISHIMURA, 2010).

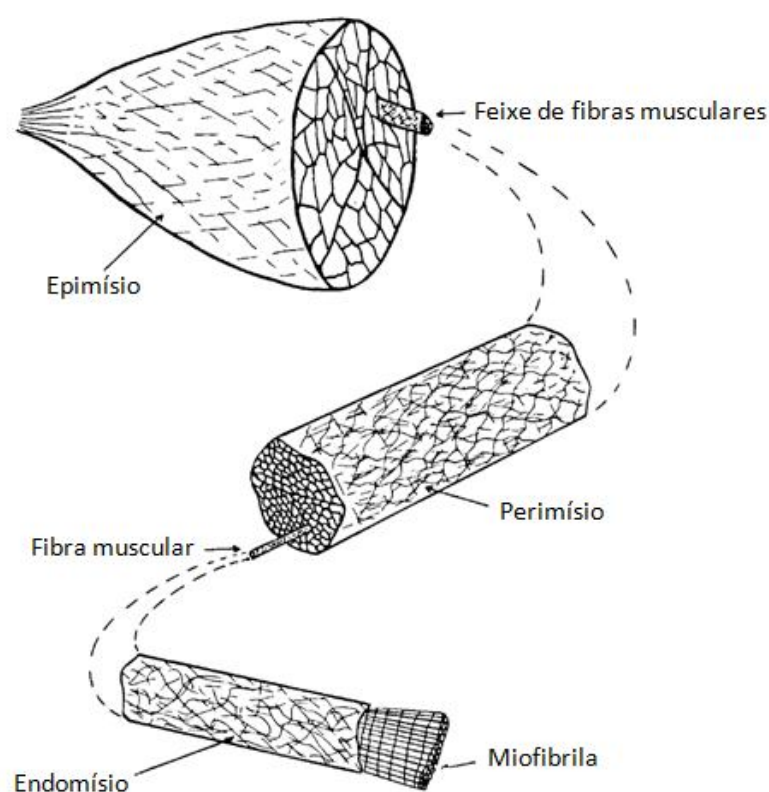


Figura 1. Diagrama esquemático para mostrar o arranjo do Tecido Conjuntivo Intramuscular (IMCT) dentro do músculo. Três estruturas distintas são mostradas. O músculo todo é cercado pelo epimísio, feixes de fibras são separados pelo perimísio e fibras musculares individuais são separadas pelo endomísio. Fonte: Adaptado de Purslow (2002).

Nishimura et al. (1994), estudaram a composição das fibras e concluíram que o endomísio é composto por bainhas que consistem em redes

de fibrilas de colágeno, o perimísio é composto por fibras de colágeno (feixe de fibrilas de colágeno) que apresentam um padrão ondulado regular, e o epimísio é composto de várias camadas de fibras de colágeno. Sendo que mais de 90% do colágeno intramuscular está localizado no perimísio.

Dessa forma, a maciez da carne varia principalmente devido a duas causas: fibras musculares e o tecido conjuntivo que recobre os mesmos (BLANCO & ALONSO, 2007).

2.1.3 Colágeno

É uma proteína de relevante importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, tendo papel fundamental na arquitetura tecidual e na resistência dos tecidos (RODRIGUES, 2009). A proteína colágeno é formada pelos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina, sendo estes últimos responsáveis pela estabilização da molécula, pois na falta desta hidroxilação a molécula perde sua conformação original, devido à falta de ligações cruzadas adequadas (SANTOS et al., 2008). Segundo metodologia proposta por Woessner Júnior (1961), o colágeno e suas frações são quantificados pela determinação do aminoácido hidroxiprolina.

O colágeno representa um terço, ou mais, das proteínas dos mamíferos, sendo que, no músculo apresenta-se, conforme visto no subtópico anterior, de três formas morfológicamente distintas: epimísio, perimísio e endomísio. O colágeno compõe aproximadamente 95% dos elementos fibrosos do tecido conjuntivo, sendo, portanto o principal componente do tecido conjuntivo intramuscular, enquanto que os 5% restantes são compreendidos por elastina, proteoglicanos e glicoproteínas (OLIVEIRA et al., 1998). O conteúdo total de colágeno no músculo bovino varia de 1% a 15% do peso seco (NISHIMURA, 2010).

Para Bailey (1985), várias propriedades do colágeno como: tamanho da fibra, tipo genético, conteúdo total e solubilidade do colágeno, que está intimamente relacionada com a natureza e integridade de suas ligações cruzadas, são importantes para determinar a contribuição desta proteína para a maciez da carne.

Segundo Rodrigues (2009), com o envelhecimento do animal, a síntese de colágeno é diminuída e os níveis das Metaloproteinases (MMPs) são aumentados. Esta diminuição de colágeno, devido ao envelhecimento natural, surge a partir da redução da síntese e aumento da degradação do colágeno com a concomitante elevação da expressão das MMPs. Ainda segundo o autor, a diminuição da quantidade de colágeno é resultante de uma diminuição da atividade metabólica dos fibroblastos, que são as células responsáveis por sua síntese. Com o envelhecimento o colágeno muda tanto qualitativamente quanto quantitativamente. As mudanças qualitativas refletem-se na diminuição da solubilidade e na alteração de propriedades físicas da molécula. O colágeno fica mais estável com a idade.

Segundo Santos et al. (2008), as ligações cruzadas do colágeno passam a ser substituídas por ligações termicamente mais estáveis a partir dos dois anos de idade, reduzindo, assim, a maciez da carne. Lepetit (2007) também relacionou os teores e a presença de pontes cruzadas no colágeno com a maciez da carne concluindo que variações na maciez eram proporcionais à elasticidade da molécula de colágeno, ou seja, a dureza seria proporcional ao teor de ligações cruzadas por volume de músculo.

Dessa forma, conclui-se, de acordo com Santos et al. (2008) e Rodrigues (2009), que em um animal mais novo, o colágeno apresenta-se em uma proporção maior, porém, esse colágeno gelatiniza-se quando em contato com o calor, ou seja, é mais solúvel. Em contrapartida, conforme avança a idade do animal a quantidade de colágeno diminui, contudo, ocorre a formação de ligações cruzadas entre as cadeias das moléculas de colágeno, que com o avançar da idade se tornam mais complexos, o que ocasiona um aumento na rigidez e na perda de elasticidade do tecido conjuntivo, conferindo uma termo-estabilidade.

Hadlich et al. (2008), concordaram que a carne menos macia de animais mais velhos é resultado de uma mudança na estrutura química que ocorre no colágeno intramuscular com o avançar da idade, particularmente nas ligações cruzadas covalentes das fibras de colágeno que estabilizam, havendo, desta forma, uma mudança na estrutura, mas segundo os autores não ocorre mudança na quantidade de tecido conjuntivo.

Da mesma forma, Alvarez & Santos (2001), alegam que com o aumento da idade do animal ocorre um aumento na concentração de ligações cruzadas. Estas modificações nas características do colágeno são responsáveis pelo endurecimento da carne de animais mais velhos. Os autores citados afirmam que, existe pouca variação na concentração do colágeno do músculo esquelético com o crescimento e com o aumento da idade do animal. Em geral, as alterações na concentração de colágeno muscular são mínimas, indicando que a síntese, aumento ou as mudanças nas proteínas celulares e extracelulares do músculo permanecem em equilíbrio durante quase toda vida do animal.

Segundo trabalho de Therkildsen (2005), Hansen et al. (2006) e Purslow et al. (2012) animais que obtiveram o ganho compensatório, após passarem por um período de restrição alimentar, sofreram um processo de renovação tecidual protéica, incluindo o colágeno, o que interferiu na qualidade da carne, tornando-a mais macia.

Portanto, sabendo da influência do colágeno na maciez da carne, que estudos voltados para a melhor compreensão do que de fato ocorre quando o animal envelhece estão sendo cada vez mais realizados. Dessa maneira, a identificação de genes ligados à renovação tecidual, em especial à deposição de colágeno, poderá permitir a identificação de marcadores moleculares associados à deposição tardia de colágeno termo-estável (maduro). Esses marcadores poderão ser usados como ferramenta na seleção de touros que, por sua vez, produzirão filhos e filhas com carne mais macia, melhorando o produto comercializado no Brasil.

2.1.3.1 Processo de síntese do colágeno

O músculo esquelético contém colágeno tipo I, III, IV, V, VI, XII e XIV sendo que os colágenos tipo I e III são os principais (NISHIMURA, 2010).

Os fibroblastos são as células mais numerosas do tecido conjuntivo frouxo e possuem intensa capacidade de síntese. São eles os responsáveis pela formação das fibras colágenas, reticulares e elásticas, além de proteoglicanas. Portanto, os fibroblastos participam da formação de toda a matriz extracelular (RODRIGUES, 2009). A biossíntese do colágeno é um

processo extremamente complexo e ocorre, inicialmente, no retículo endoplasmático, depois no aparelho de Golgi e, finalmente, no espaço extracelular (VELLEMAN, 1999).

A síntese de colágeno tipo I será utilizada para ilustrar a formação do colágeno fibrilar devido a sua posição dominante no tecido conjuntivo de tendão e músculo, mas a síntese de outros tipos de colágeno compartilha muitas similaridades com a formação do colágeno tipo I (KJAER, 2004).

Segundo Rodrigues (2009), a obtenção de colágeno pelos fibroblastos consiste na síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e III conhecidas como moléculas precursoras chamadas pró-colágeno. A síntese de colágeno tipo I, como a de qualquer proteína, se inicia no núcleo onde os genes codificadores das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são ativados e produzem os respectivos RNA mensageiros. Estes se deslocam do núcleo para o citoplasma, onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas que são imediatamente internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático. No interior do retículo estes polipeptídios sofrem processamento, sendo que o evento mais importante inclui a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina. Posteriormente, lisina hidroxilada (hidroxilisina) ainda sofre um processo de glicosilação. Segundo Velleman (1999), a vitamina C é um cofator das hidroxilases da prolina e da lisina, e sua deficiência leva à inadequada síntese de colágeno. Para Hadlich et al. (2008) e Kjaer (2004) a hidroxiprolina se destaca por ser um aminoácido exclusivo do colágeno, por isso é utilizada como parâmetro para se estabelecer a quantidade de colágeno presente na carne.

As cadeias α se organizam no interior do retículo endoplasmático em grupos de três, formando as moléculas de pró-colágeno, precursora da molécula de colágeno madura. Os resíduos de hidroxiprolina garantem a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias α , mantendo a coesão entre as mesmas (RODRIGUES, 2009).

As moléculas de pró-colágeno são então transferidas do retículo endoplasmático para o espaço extracelular através do aparelho de Golgi. Pelo fato do pró-colágeno ser maior, o transporte convencional por vesículas não é possível, necessitando dessa forma do transporte dentro do aparelho de Golgi (KJAER, 2004).

Na matriz extracelular (MEC) as moléculas de pró-colágeno são digeridas por uma enzima também produzida e secretada pelos fibroblastos, o pró-colágeno peptidase. Ocorrerá a formação do tropocolágeno, que é uma molécula que contém um domínio único em forma de tripla-hélice, constituído por três cadeias polipeptídicas, que se enrolam formando uma alfa-hélice (VELLEMAN, 1999).

Finalmente, o tropocolágeno se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno (isso também ocorre nas moléculas de colágeno II e III) e podem agregar-se em unidades microfibrilares. Certas proteoglicanas e glicoproteínas estruturais desempenham papel importante na agregação do tropocolágeno para formar as fibrilas e mesmo as fibras de colágeno (RODRIGUES, 2009).

Depois que as moléculas de colágeno são sintetizadas, são secretadas por fibroblastos para o espaço extracelular e armazenados na matriz. Ligações cruzadas entre as microfibrilas são iniciadas e fibrilas de diâmetro maior se formam. Conforme um animal envelhece, as ligações cruzadas do colágeno são progressivas e as fibras aumentam de tamanho (VELLEMAN, 1999).

Resumidamente, segundo Kjaer (2004), a síntese de fibrilas de colágeno ocorre primeiro com uma etapa intracelular com montagem e secreção do pró-colágeno, seguido por uma etapa extracelular convertendo o pró-colágeno em colágeno e subsequente incorporação de ligações cruzadas estáveis nas fibrilas de colágeno.

O processo de biossíntese de colágeno pode ser visualizado na Figura 2.

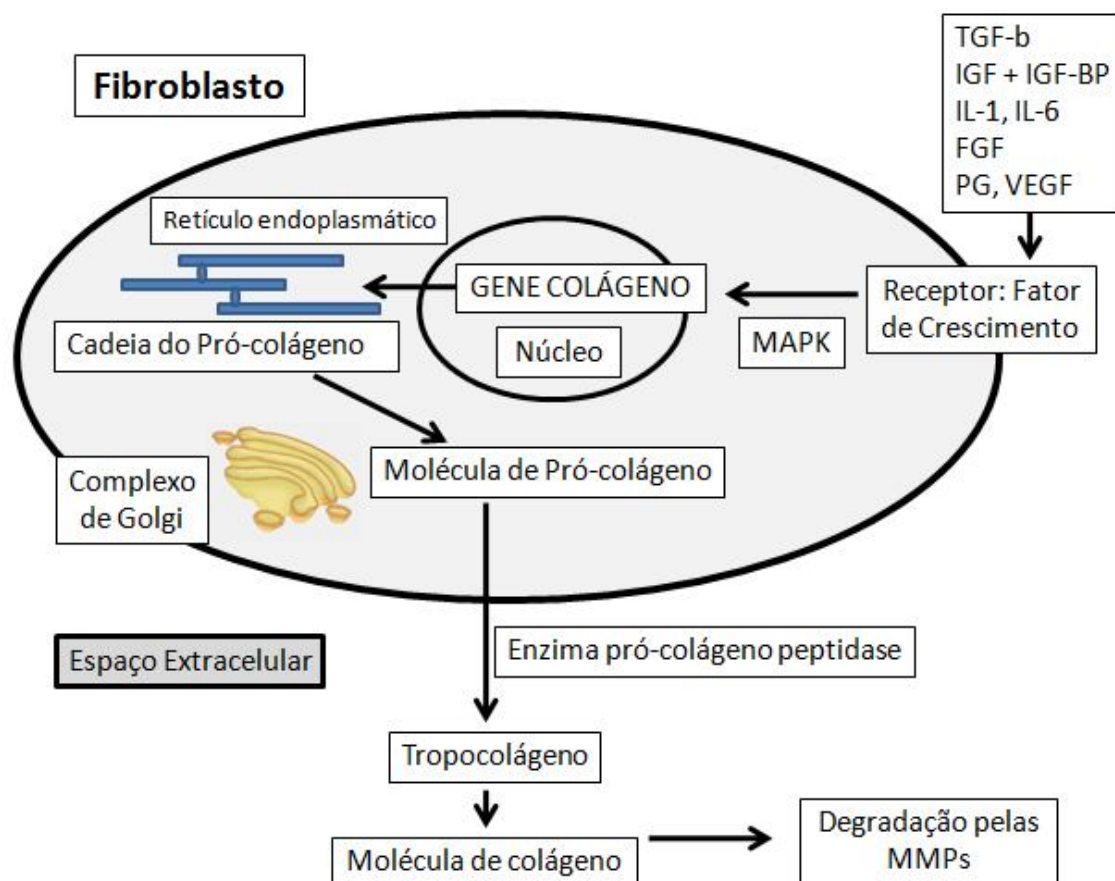


Figura 2. Síntese de colágeno tipo I e degradação. Representação esquemática das vias envolvidas na síntese de colágeno. Fatores de crescimento como potenciais candidatos que funcionam como importantes reguladores da ativação de genes são indicados. TGF- β , transformando fator de crescimento β ; IGF/IGF-BP, insulina como fator de crescimento e ligando proteínas; IL, interleucina; FGF, fibroblastos como fator de crescimento; PG, prostaglandina; VEGF, fator de crescimento vasoativo endotelial. Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) desempenha um importante papel na regulação para iniciação da sinalização do gene, e matriz metaloproteinases (MMPs) são os maiores reguladores da degradação do colágeno.

Fonte: adaptado de Kjaer (2004)

2.2 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão da informação genética contida em um segmento de DNA sempre envolve a geração de uma molécula de mRNA. A diferença essencial entre genes que são expressos e genes que não o são é que os primeiros são transcritos em mRNA. A sequência de aminoácidos de cada proteína e a sequência de nucleotídeos de cada molécula de mRNA numa célula são especificadas pela sequência do DNA da célula. Um segmento de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biológico

funcional (proteína ou RNA) é referido como um gene (LEHNINGER et al., 2000).

A função primária de todo gene é produzir uma cadeia polipeptídica, isto é, uma proteína. No entanto, sabe-se que nos organismos eucariotos o DNA se encontra no núcleo das células enquanto a síntese protéica se dá no citoplasma. Assim, o DNA transfere suas informações para moléculas de RNA, as quais atravessam a membrana nuclear para comandar a síntese protéica no citoplasma. Este processo de transferência de informações do DNA para o RNA se chama transcrição. A transcrição não é feita ao longo de todo o comprimento da molécula de DNA, mas sim de genes individuais ou grupos de genes seletivamente escolhidos. Para isto, a enzima RNA polimerase se acopla a determinada região – *sítio promotor* – da molécula de DNA a ser transcrita. Esta enzima desfaz as pontes de hidrogênio entre as bases complementares permitindo a separação das duas fitas e exposição dos nucleotídeos a serem transcritos (RAMALHO et al., 1997).

A formação da molécula de RNA mensageiro (mRNA) se dá na direção 5' → 3' pela incorporação de nucleotídeos, os quais são complementares aos nucleotídeos de uma das fitas do DNA. A transcrição prossegue até que um ponto de terminação seja encontrado. A enzima e a molécula de mRNA são então liberadas e a molécula de DNA se refaz por meio da reconstituição das pontes de hidrogênio que haviam sido rompidas pela RNA polimerase no início do processo (RAMALHO et al., 1997).

Em procariontes, a molécula de RNA transcrita se constitui no mRNA propriamente dito, sendo, em seguida, utilizada na síntese de proteínas e, posteriormente, degradada. Porém, em eucariontes a situação é mais complexa, ocorrendo uma série de modificações do RNA antes que ele possa servir como mediador na síntese de proteínas (VOET et al., 2002).

Os genes eucarióticos apresentam uma característica estrutural distinta: suas sequências de nucleotídeos contêm um ou mais segmentos de DNA que não codificam a sequência de aminoácidos do produto polipeptídico. Estes insertos não traduzíveis interrompem a relação até então precisamente colinear entre a sequência de nucleotídeos do gene e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo que ele codifica. Tais segmentos de DNA não-

traduzíveis são chamados de sequências intercaladas, ou íntrons, e os segmentos codificados de éxons (LEHNINGER et al., 2000).

A produção de um mRNA eucariótico adequado para a tradução começa com a transcrição do gene inteiro, incluindo seus íntrons. Os transcritos primários, também chamados de pré-mRNAs ou RNAs nucleares heterogêneos (hnRNAs), são variáveis em comprimento e são bem maiores do que o esperado para proteínas eucarióticas (VOET et al., 2002). Assim, os pré-mRNAs são processados, gerando um mRNA maduro. Por meio de um processo chamado de emenda ("splicing"), os íntrons são removidos dos transcritos primários, pela ação de enzimas específicas chamadas *endonucleases*, e os éxons unidos formando a molécula de mRNA completa (LEHNINGER et al., 2000).

Os mRNAs eucarióticos são também modificados em cada extremidade. Uma estrutura chamada de capacete é adicionada na extremidade 5' e um polímero contendo 20 a 250 resíduos adenilatos, chamada de cauda poli (A), é adicionado na extremidade 3'. As funções do capacete 5' e da cauda poli (A) são apenas parcialmente conhecidas. O capacete 5' liga-se a uma proteína e pode participar na ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução. A cauda poli (A) também se liga a uma proteína específica. Parece que o capacete 5', a cauda poli (A) e suas proteínas associadas ajudam a proteger o mRNA da destruição enzimática (RAMALHO et al., 1997; LEHNINGER et al., 2000). A cauda poli (A) é designada como uma parte de extrema importância ao processamento, pois facilita o transporte do RNA mensageiro para o citoplasma e ao ser lentamente degradado, estabiliza a molécula no citoplasma (MATIOLI, 2001).

Todas as reações de processamento do hnRNA se dão no núcleo da célula. A molécula de RNA é então liberada para o citoplasma na forma de um mRNA maduro capaz de ser traduzido na forma de uma cadeia polipeptídica (RAMALHO et al., 1997). Na figura 3 pode-se visualizar a estrutura e processamento do RNA.

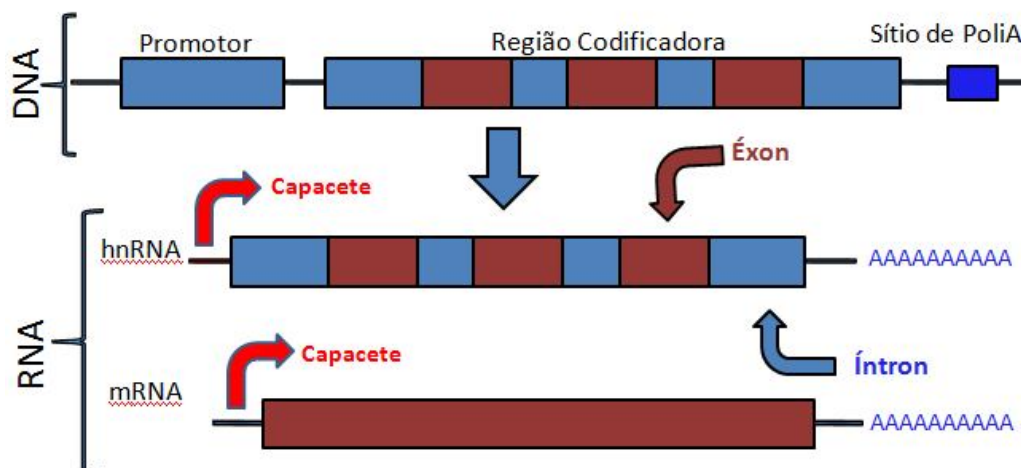


Figura 3. Estrutura de um gene eucarioto.

Um aspecto comum a todos pré-mRNAs é a presença da sequência de AAUAAA, 11-30 nucleotídeos antes do sítio de poliadenilação (local onde deve ser inserida a cauda poli (A)). Esta sequência, chamada de sequência sinal para poliadenilação, é reconhecida por um fator específico, que sinaliza o local e permite que ocorra a clivagem por meio de uma endonuclease. A adição da cauda poli (A) é feita na extremidade 3' OH gerada pela clivagem. Depois que o RNA mensageiro poliadenilado chega ao citoplasma, a cauda poli (A) vai diminuindo, com o decorrer do tempo, provavelmente, devido à ação de nucleases. Esta cauda não está codificada no DNA e não existe nos RNAs ribossômicos e RNAs transportadores (ALBERTS et al., 2004).

2.2.1 PCR em Tempo Real

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis, é uma técnica altamente sensível, pela qual, são obtidas milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA *polimerase* e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde (GANDRA et al., 2008).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real ou PCR quantitativa (qPCR), que consiste em fazer cópias de DNA “*in vitro*” usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA ou cDNA monitorando a duplicação das cópias ao final de cada ciclo, tornou-se uma

importante ferramenta utilizada no estudo da expressão gênica, pois a quantificação da expressão facilita a seleção de indivíduos que possuam pré-disposição genética, a fenótipos de interesse econômico, visto que, o RNA mensageiro a ser quantificado, é quem dará origem a proteína, responsável pelo fenótipo desejado (GIUSTI, 2011).

O primeiro passo da técnica consiste na síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA), utilizando como molde uma fita do RNA mensageiro de interesse, pela enzima catalisadora transcriptase reversa. Na reação de PCR quantitativa, a curva de amplificação do cDNA de interesse é dividida em três fases, como pode ser observado na Figura 4. A linha basal (*baseline*) na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência; a fase log (exponencial) em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (GIUSTI, 2011).

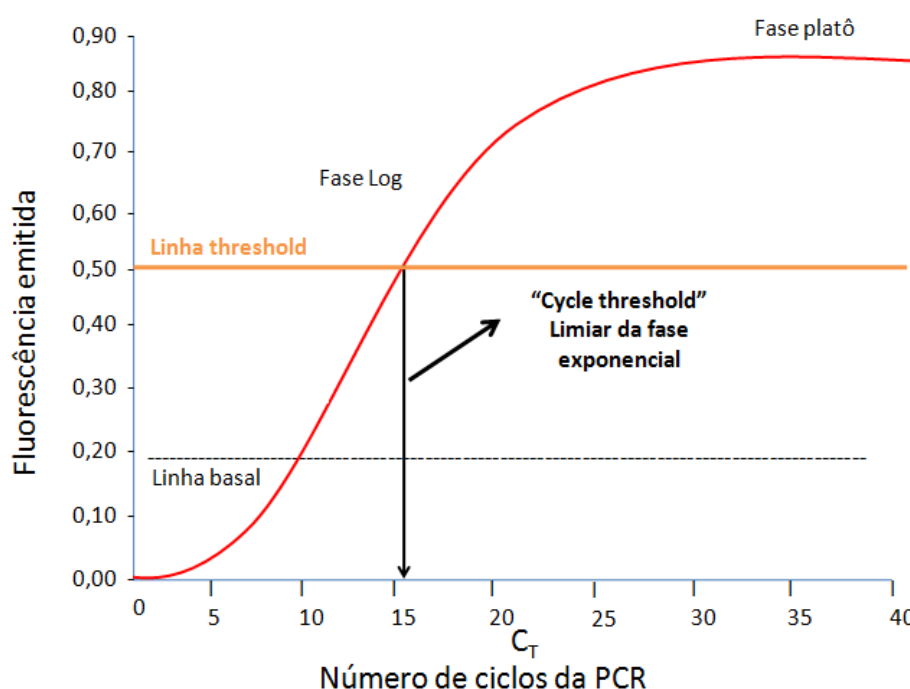


Figura 4. Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T – Cycle Threshold. A amplificação mostra três fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos.

O processo de quantificação utilizando a PCR em Tempo Real permite avaliar os dados com precisão determinando os reais valores durante a fase exponencial. Neste sistema, o ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). O

C_T permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, no qual a emissão de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Esses valores da fluorescência são gravados em um dispositivo de armazenamento durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (NOVAIS & ALVES, 2004).

Um dos sistemas que emite fluorescência mais utilizado é o Syber Green. O Syber Green se liga entre a fita dupla de DNA, funcionando como um intercalante de DNA dupla fita e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador emite uma fluorescência verde (VALONES et al., 2009), conforme ilustra a Figura 5.

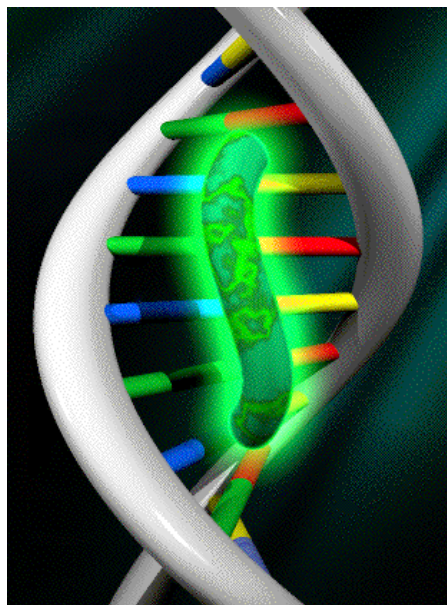


Figura 5. Molécula de Syber Green entre a fita dupla de DNA.
Fonte: NOVAIS & ALVES, 2004

A PCR quantitativa requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, com sistema ótico para excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um software para a aquisição dos dados e análise final da reação (NOVAIS & ALVES, 2004; GANDRA et al., 2008).

Os resultados da PCR em tempo real podem ser calculados de acordo com dois métodos distintos, a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Na quantificação absoluta determina-se o número exato de moléculas, no qual

se obtém valores numéricos, utilizando-se uma curva padrão. A quantificação relativa descreve a diferença de expressão entre dois grupos, no qual, geralmente se utiliza um grupo controle ou referência e um grupo tratamento. Os genes endógenos são utilizados como controles internos da expressão gênica, uma vez que apresentam expressão teoricamente constante, ou seja, sofrem pequena oscilação na expressão mediada por fatores reguladores externos, tais como hormônios, fatores de crescimento, entre outros (NASCIMENTO et al., 2010).

Segundo Alberts et al. (2004) os genes responsáveis por funções vitais são expressos constitutivamente (velocidade e quantidades constantes), assim, são expressos sob todas as circunstâncias por uma célula ou organismo, independente de influências do ambiente. Outros genes somente são expressos quando seus produtos são necessários, assim, sua expressão é induzida e varia de acordo com as condições da célula.

As vantagens da PCR em Tempo Real incluem a facilidade de quantificação, a maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão, análise rápida, melhor controle de qualidade no processo e um menor risco de contaminação (VALONES et al. 2009), curto tempo necessário para a realização da técnica e execução simples (NASCIMENTO et al., 2010).

2.3 GENES EM ESTUDO

No presente estudo, foram avaliados os genes da família do colágeno (COL1A1, COL1A2 e COL3A1); das metaloproteinases (MMP2) e dos inibidores teciduais da matriz metaloproteinase (TIMP1 e TIMP2), por haver relatos na literatura de uma estreita relação nas atividades desses genes, o que pode interferir diretamente na maciez da carne.

As metaloproteinases (MMPs) possuem o complexo papel fisiológico centrado no controle da homeostase da matriz extracelular (MEC), sendo a atividade mais conhecida a quebra e remodelação da MEC em todo o corpo, incluindo o tecido conjuntivo intramuscular, degradando, dessa forma, também, o colágeno. A atividade das MMPs é modulada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP). Pelo menos onze MMPs e três TIMPs possuem

relatos de serem expressos no músculo esquelético bovino (PURSLOW et al., 2012).

A Figura 6 resume os potenciais papéis da MMP, TIMP e expressão do colágeno por células no interior do músculo esquelético e suas modificações extracelulares no ciclo de renovação do tecido conjuntivo intramuscular. Conforme pode ser visto na figura, as vias de sinalização celular podem reagir a uma grande variedade de estímulos para aumentar a expressão da matriz metaloproteinase (MMP), dos inibidores teciduais da matriz metaloproteinase (TIMP), e síntese de novos componentes da matriz, tal como a proteína colágeno. As MMPs são expressas intracelularmente na forma latente (pró-enzimas) e ativadas extracelularmente. O colágeno é expresso intracelularmente como pró-colágeno e modificado extracelularmente. A atividade da MMP na matriz extracelular é um balanço entre a quantidade de MMP ativada e o nível de inibição do TIMP. A atividade das enzimas MMPs e a síntese de novos componentes da matriz afetam o ciclo de renovação e remodelação do tecido conjuntivo intramuscular (PURSLOW et al., 2012).

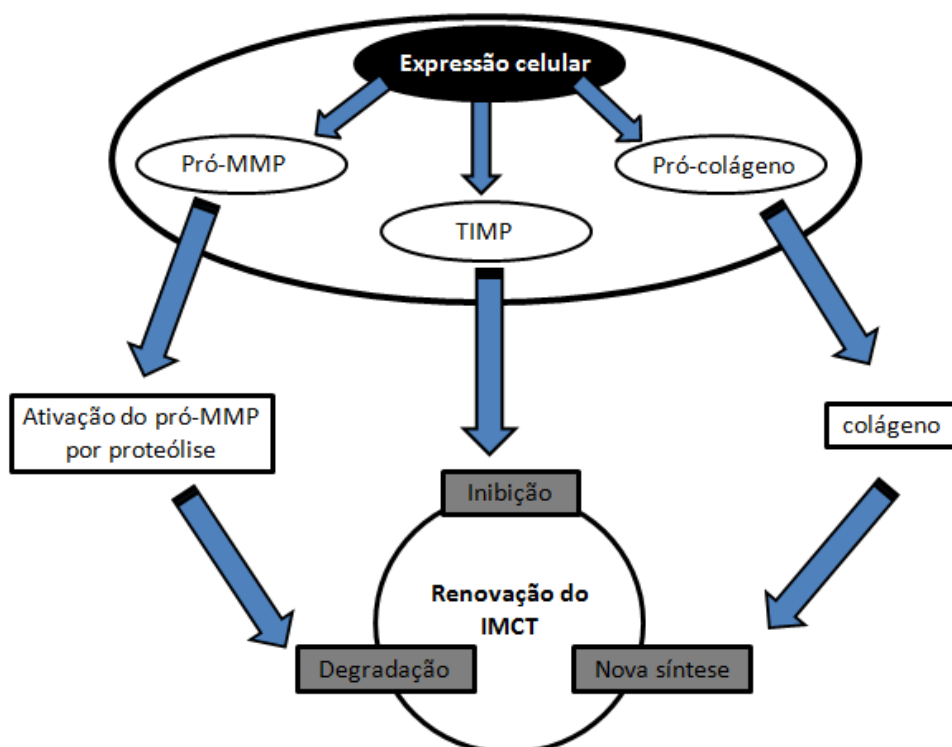


Figura 6. Diagrama esquemático para resumir as principais vias das respostas celulares dentro do tecido muscular *in vivo* que podem afetar a renovação do tecido conjuntivo intramuscular (IMCT).

Fonte: adaptado de Purslow et al., 2012.

2.3.1 COL1A1, COL1A2 e COL3A1

São encontrados 19 tipos diferentes de fibras de colágeno com distribuição tecidual específica, sendo que os colágenos tipos I, III, IV, V, VI, XII e XIV foram previamente encontrados no tecido conjuntivo intramuscular (NISHIMURA, 2010). As fibras de colágeno tipo I e III são os principais componentes do tecido conjuntivo e sua ocorrência e características são fatores que contribuem para a maciez da carne (BLANCO & ALONSO, 2007).

O colágeno do tipo I é a forma mais abundante de colágeno no músculo esquelético. É composto de duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, produzindo fibras de alta resistência em função das ligações cruzadas intermoleculares estabelecidas dentro da matriz. O colágeno do tipo III é a segunda forma fibrosa mais abundante da proteína encontrada no músculo esquelético. É composto de três cadeias α idênticas, $\alpha 1$, possuindo fibras menores do que a do colágeno tipo I (RODRIGUES, 2009).

Para Burson & Hunt (1986), os colágenos do tipo I e III são dois tipos de colágeno predominantes no músculo esquelético e podem ser afetados diferentemente pelo calor. O epimísio, que contém, principalmente, colágeno do tipo I, apresenta maior maciez conforme aumenta a temperatura de cozimento. O endomísio, que contém uma maior proporção de colágeno do tipo III do que de colágeno do tipo I, parece ser menos afetado pelo aquecimento. Portanto, pode-se concluir que, o colágeno do tipo III pode ser menos solúvel ao aquecimento do que o colágeno do tipo I.

Por outro lado, as fibrilas de colágeno do tipo III é menor em diâmetro do que as fibrilas de colágeno do tipo I, o que poderia sugerir uma menor resistência à força de cisalhamento (BLANCO & ALONSO, 2010), portanto, apresentar uma maior maciez.

A degradação do colágeno representa uma etapa obrigatória da renovação e remodelamento do tecido conjuntivo e durante o carregamento mecânico dos fibroblastos e das estruturas da matriz extracelular. Tanto as vias de degradação intracelular como extracelular estão presentes, usando a fagocitose lisossomal e proteinases da matriz extracelular, respectivamente. A degradação do colágeno é iniciada extracelularmente pelas MMPs (KJAER, 2004).

O gene COL1A1 está localizado no cromossomo 19 do genoma bovino e seu mRNA contém 4.751 pares de bases, enquanto que o gene COL1A2 encontra-se no cromossomo 4 e seu mRNA possui 4.628 pares de bases. Já o gene COL3A1 está localizado no cromossomo 2 e seu mRNA contém 5.448 pares de bases (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*).

2.3.2 MMP2

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases Zn^{2+} - (zinco) dependente, que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC), sendo também chamadas de matrixinas. Conjuntamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas da MEC (ARAÚJO et al., 2011).

Todos os membros dessa família são secretados na forma latente (pró-enzimas/zimogênios), por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos (WOESSNER, 1991) e são ativadas extracelularmente pela remoção proteolítica de um pequeno domínio que protege o sítio ativo (PURSLOW et al., 2012).

Em condições fisiológicas normais, as atividades das MMPs são reguladas ao nível de transcrição, ativação do precursor zimogênio, interação com componentes específicos da matriz extracelular e inibição por inibidores endógenos. A atividade das MMPs é inibida pelos Inibidores Teciduais das Metaloproteinases (TIMP) (NAGASE & WOESSNER, 1999).

A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas, que são divididas em: Colagenases (MMP1, MMP8, MMP13, MMP18) que clivam os colágenos do tipo I, II e III; gelatinases (MMP2 e MMP9) que possuem como substrato colágeno desnaturado (gelatinas), sendo que a MMP2 digere os colágenos do tipo I, II, III; estromelisinases (MMP3, MMP10); matrilisinases (MMP7, MMP26) e MMPs tipo membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17 e MMP24) e outras MMPs, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo a sua estrutura (VISSE & NAGASE, 2003).

Segundo Aimes & Quigley (1995), as colagenases (MMP1 e MMP8) clivam a tripla-hélice do colágeno e os fragmentos de colágeno produzidos são susceptíveis a ação das gelatinases (MMP2 e MMP9), sendo assim, elas

rapidamente degradam o colágeno desnaturado e os seus fragmentos. O processo de degradação do colágeno há muito tempo tem-se acreditado ser dependente da presença de duas enzimas: collagenases e gelatinases. Porém, os dados do estudo de Aimes & Quigley (1995), comprovam que a MMP2 é capaz de degradar o colágeno do tipo I na ausência das collagenases. A MMP2 foi capaz de clivar a tripla-hélice do colágeno do tipo I, apesar de serem necessárias duas a quatro vezes mais MMP2 do que de MMP1 para gerar as mesmas quantidades de fragmentos clivados. Essa atividade não é comum para as gelatinases, visto que, a MMP9 não foi capaz de clivar o colágeno no mesmo estudo. Com isso, os autores concluíram que a MMP2 também atua como uma collagenase.

Para Sylvestre et al. (2002), no músculo esquelético, a atividade e expressão do gene MMP2 são claramente as mais abundantes. Para Kjaer (2004), embora existam algumas preferências das MMPs em relação aos tipos de colágenos, a especificidade de certos MMPs pelos tipos de colágeno pode ser menor do que se pensava até agora, enfatizando que a MMP2 pode degradar o colágeno do tipo I.

Segundo a literatura, para garantir a integridade da matriz extracelular, é necessário um balanço dinâmico entre as MMPs e a atividade dos inibidores dessas enzimas, ou seja, os TIMPs, pois um descontrole na atividade de MMPs provoca uma excessiva degradação ou acumulação de elementos constitutivos da MEC (ARAÚJO et al., 2011). Para Cha & Purslow (2012), o aumento da atividade de MMP2 extracelular é contrabalanceado pela presença aumentada de TIMP1. Segundo Kandasamy et al. (2010), existe uma especificidade do TIMP2 com o MMP2.

O gene MMP2 está localizado no cromossomo 18 e seu mRNA apresenta 2.350 pares de bases (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*).

2.3.3 TIMP1 e TIMP2

Os inibidores teciduais da matriz metaloproteinase (TIMP) são identificados como TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4 e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento e remodelação tecidual (VISSE & NAGASE, 2003).

Os TIMPs são moléculas endógenas que controlam a atividade das metaloproteinases (ARAÚJO et al., 2011). Dos quatro TIMPs identificados até o momento, o TIMP1 e TIMP2 são capazes de inibir as atividades de todas as MMPs com uma preferência para inibição da MMP2 e MMP9, respectivamente (KJAER 2004). Para Visse & Nagase (2003), os TIMPs inibem todas as MMPs.

TIMPs têm um domínio N- e C-terminal de 125 e 65 aminoácidos, respectivamente, cada uma contendo três pontes dissulfeto conservadas. O domínio N-terminal se dobra como uma unidade separada e é capaz de inibir as MMPs (VISSE & NAGASE, 2003).

O gene TIMP1 está presente no cromossomo X do genoma bovino e seu mRNA apresenta 808 pares de bases, enquanto que o gene TIMP2 está localizado no cromossomo 19 e seu mRNA contém 1.152 pares de bases (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira. São Paulo, 2012.

AIMES, R.T., QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.11, p.5872-5876, 1995.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular Celular*. **Artmed**, Porto Alegre, 4 ed., 2004.

ALVAREZ, M. I.; SANTOS, W. L. M. **Evaluación del porcentaje de colágeno total del bife angosto (músculo *Longissimus dorsi*) de bovinos machos castrados mestizos Nelore**. [S.l.:s.n.]. 4p. 2001.

ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina – uma revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 193-216, 2007.

ARAÚJO, R.V.S., SILVA, F.O., MELO-JÚNIOR, M.R., PORTO, A.N.F. Metaloproteinas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.10, n.1, p.82-88, 2011.

BAILEY, A.J. The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. **Journal of Animal Science**, v.60, n.6, p.1580-1587, 1985.

BLANCO, M.R.; ALONSO, C.R. Collagen type I and III in bovine muscles. **Archivos de Zootecnia**, v.56, n.214, p.253-256, 2007.

BLANCO, M.R.; ALONSO, C.R. Collagen types I and III in bovine muscles: influence of age and breed. **Journal of Muscle Foods**, v.21, p.417–423, 2010.

BURSON, D.E.; HUNT, M.C. Heat-induced changes in the proportion of types I and III collagen in bovine *Longissimus dorsi*. **Meat Science**, v.17, p.153-160, 1986.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Publicado: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Campinas - SP, p.325–331, 2002.

CHA, MC e PURSLOW, PP. Expressions of matrix metalloproteinases and their inhibitor are modified by beta-adrenergic agonist Ractopamine in skeletal fibroblasts and myoblasts. **Canadian Journal of Animal Science**, v.92, n.2, p.159-166, 2012.

EUCLIDES, V. P. B.; EUCLIDES FILHO, K.; ARRUDA, Z. J.; FIGUEIREDO, G. R. Desempenho de novilhos em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.246-254, 1998.

FELICIO, P.E. de. Fatores que Influenciam na Qualidade da Carne Bovina. In: A. M. Peixoto; J. C. Moura; V. P. de Faria. (Org.). *Produção de Novilho de Corte*. 1.ed. Piracicaba: **FEALQ**, v. Único, p.79-97, 1997.

FIELD, R.; McCORMICK, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; SANSON, D.; WISE, J.; HIXON, D.; RILEY, M.; RUSSEL, W. Tenderness variation among loin steaks from A to C maturity carcasses of heifers similar in chronological age. **Journal of Animal Science**, v.75, p.693-699, 1997.

GANDRA E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W. S. DE, GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.30, n.1, p.109-118, 2008.

GIUSTI, Juliana. **Expressão de genes relacionados à qualidade da carne do músculo *Longissimus dorsi* em Nelore (*Bos Indicus*) e Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*)**. 2011. 74f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

HADLICH, J. C.; LONGHINI, Luis G. R.; MASON, M. C. A influência do colágeno na textura da carne. **Pubvet**, v.2, n.32, 43 ed., Art. 160, 2008.

HANSEN, S.; THERKILDSEN, M.; BYRNE, D.V. Effects of a compensatory growth strategy on sensory and physical properties of meat from young bulls. **Meat Science**, v.74, p.628-643, 2006.

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

JONES, S.J., STARKEY, D.L., CALKINS, C.R., CROUSE, J.D. Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2707-2715, 1990.

KANDASAMY, A.D., CHOW, A.K., ALI, M.A.M., SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovascular research**, v.85, p.413-423, 2010.

KJAER, Michael. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**. v.84, p.649-698, 2004.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p.93–104, 1994.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca²⁺ - dependent proteinases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v.74, p.239-245, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. SARVIER, São Paulo, 2 ed., 2000.

LEPETIT, J. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness. **Meat Science**, v.76, p.147-159, 2007.

LEPETIT, J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. **Meat Science**, v.80, p.960-967, 2008.

MATIOLI, S.R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto. **Holos**. 2001.

MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., STEWART, R.J.C., NNANYELUGO, D.O., WATERLOW, J.C. Skeletal-muscle growth and protein turnover. **Biochemical Journal**, v.150, p.235-243, 1975.

MÜLLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos**. 1 ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 31 p. 1980.

NAGASE H., WOESSNER J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n.31, p. 21491–21494, 1999.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67 (supl.10), 2010.

NISHIMURA, Takanori. *et al.* Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. **Acta Anatomica (Basel)**, v.151, n.4, p.250-257, 1994.

NISHIMURA, Takanori. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. **Animal Science Journal**, v.81, p.21-27, 2010.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 33 ed., p.10–13, julho/dezembro, 2004.

OLIVEIRA, Lidiane B; SOARES, Germano J. D; ANTUNES, Pedro L. Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, 166-171, 1998.

PRATES, E. R.; PATIÑO, H. O.; BARCELLOS, J. O. J. Otimizando a utilização dos nutrientes da pastagem pode a utilização da energia da pastagem ser melhorada? In: Reunião Anual Sociedade Brasileira Zootecnia. **Anais dos Simpósios e Workshops**, Porto Alegre - RS, v.2, 36 ed., p.13-26, 1999.

PURSLOW, P.P.; ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; CHA, M.C. Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. **Journal of Animal Science**, v.90, p.950-959, 2012.

PURSLOW, P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, v.70, p.435-447, 2005.

PURSLOW, P.P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.133, p.947-966, 2002.

RAMALHO, Magno; SANTOS, João Bosco; PINTO, César Brasil. **Genética na Agropecuária**. São Paulo: Globo, 6 ed. 1997.

RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE Jr., C. C.; WEST, R. L.; COLEMAN, S. W.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, v.70, p.347-356, 2005.

RODRIGUES, V. **Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RYAN, W. J. Compensatory growth in cattle and sheep. **Nutrition Abstracts Reviews**, v.60, n.4, p.653-664, 1990.

SANTOS, A. P.; BARCELLOS, J. O. J.; KUSS, F.; LOPEZ, J.; CHRISTOFARI, L. F.; REINHER, C.; BRANDAO, F. Qualidade da carne de vaca de descarte. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p.35-45, 2008.

SORIA, L.A., CORVA, P.M. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.12, n.2, p.73-88, 2004.

SYLVESTRE, M.N., BALCERZAK, D., FEIDT, C., BARACOS, V.E., BELLUT, J.B. Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1871-1878, 2002.

THERKILDSEN, M. Muscle protein degradation in bull calves with compensatory growth. **Livestock Production Science**, v.98, p.205-218, 2005.

THERKILDSEN, M.; LARSEN, L. M.; BANG, H. G.; VESTERGAARD, M. Effect of growth rate on tenderness development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, v.74, p.253–264, 2002.

VALONES, M.A.A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo v.40, n.1, p.1-11, Jan/Mar, 2009.

VELLEMAN, S.G. The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development. **Poultry Science**, v.78, p.778-784, 1999.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Journal of the American Heart Association**, Baltimore, v.92, n.8, p.827-839, 2003.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROSS, H.R.; LUNT, D.K.; SMITH, S.B. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.4206-4220, 1990.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2716-2728, 1990.

WOESSNER JÚNIOR, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, Bethesda, v.5, n.8, p.2145-2154, 1991.

WOESSNER JÚNIOR, J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.93, p.440-447, 1961.

**CAPÍTULO 2 – EFEITO DE GANHO COMPENSATÓRIO NA EXPRESSÃO
DE GENES RELACIONADOS COM METABOLISMO DO TECIDO
CONJUNTIVO E MACIEZ DA CARNE NO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI*
DE VACAS DE DESCARTE DA RAÇA NELORE**

(REVISTA BRASILEIRA DE ZOOTECNIA)

Efeito de ganho compensatório na expressão de genes relacionados com metabolismo do tecido conjuntivo e maciez da carne no músculo *Longissimus dorsi* de vacas de descarte da raça Nelore

RESUMO – Objetivou-se avaliar a expressão dos genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 e TIMP2 em músculo *Longissimus dorsi*, de vacas de descarte da raça Nelore submetidas a tratamentos alimentares distintos. Os animais foram distribuídos em dois grupos: no primeiro grupo os animais receberam suplementação para promover a manutenção do peso durante o período experimental e no segundo grupo, após passar por restrição alimentar, os animais obtiveram uma suplementação alimentar para promover o ganho compensatório. As amostras foram classificadas de acordo com o tratamento (manutenção e compensatório) e com a força de cisalhamento (maior ou menor que 9,77 Kgf). Durante o abate foram coletadas amostras do músculo desses animais e armazenadas em freezer a -80°C. Foi extraído o RNA total de todas as amostras e posteriormente realizou-se a síntese de cDNA, utilizando, para tanto, 3 µg de RNA total de cada amostra. A comparação da expressão dos genes estudados foi realizada pelo método de quantificação relativa em PCR em Tempo Real, sendo a expressão gênica diferencial entre os grupos definida pelo método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Para a variável tratamento houve uma maior expressão, com diferença estatística ($p < 0,05$), de todos os genes em estudo no grupo de animais com ganho compensatório. Para a variável força de cisalhamento não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na expressão de nenhum dos genes analisados. Os resultados sugerem que animais que passaram pelo processo de ganho compensatório obtiveram uma renovação protéica. Apesar de não haver diferença na força de cisalhamento, a manipulação do crescimento utilizando o ganho compensatório pode ser uma via eficiente para o processo de renovação do tecido conjuntivo intramuscular.

Palavras-chave: colágeno, PCR, qualidade de carne

Effect of compensatory growth on the expression of genes related with connective tissue metabolism and meat tenderness in *Longissimus dorsi* of cull cows Nellore

ABSTRACT – The aim was evaluate expression of genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 and TIMP2 in *Longissimus dorsi* muscle of cull cows Nellore submitted to distinct feeding treatments. The animals were divided into two groups: the first group received supplementation to promote weight maintenance during the experimental period, and, in the second group, after feeding restriction, animals obtained a feeding supplementation to promote compensatory growth. The samples were classified according treatment (maintenance and compensatory) and shear force (greater or less than 9.77 Kgf). During the slaughter were collected muscle samples and stored in a freezer at -80°C. Total RNA was extracted from samples and after was realized cDNA synthesis, being used 3 µg of total RNA from each sample. Comparison of gene expression was performed by the relative quantification method in real-time PCR, and differential gene expression between the groups defined by delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method. For the variable treatment was higher expression, with statistical difference ($p < 0,05$), all of the genes in the group of animals with compensatory growth. For variable shear force there was no statistical difference ($p > 0,05$) in expression of any genes analyzed. The results suggest that animals with compensatory growth obtained protein turnover. In spite of no difference for shear force, the growth manipulation using compensatory growth may be an efficient way for the process of intramuscular connective tissue protein turnover.

Keywords: collagen, PCR, meat quality

69 1 INTRODUÇÃO

70

71 A maciez é considerada uma das características mais importantes por aqueles que
72 consomem carne bovina (KOOHMARAIE, 1994; HANSEN et al., 2006) e muitas
73 pesquisas tem sido conduzidas, para entender as mudanças no tecido muscular durante o
74 processo de envelhecimento do animal e, para identificar os fatores chaves responsáveis
75 pelo desenvolvimento da maciez (THERKILDSEN et al., 2002a).

76 Segundo Hocquette et al. (2007), pesquisas voltadas para a identificação de
77 indicadores de qualidade e uma maior compreensão da biologia do músculo para
78 controlar as características de qualidade estão sendo realizadas, utilizando como
79 ferramenta o estudo da biologia molecular. A maciez da carne é um exemplo de
80 fenótipo complexo que poderá ser beneficiado pelo uso da genética molecular.

81 O papel do tecido conjuntivo na maciez da carne tem sido o foco de numerosos
82 estudos, sendo que a dureza da carne está altamente correlacionada com o conteúdo de
83 colágeno (LEPETIT, 2007). O colágeno, principal proteína do tecido conjuntivo, é um
84 constituinte integrante do músculo, e suas características são fatores que contribuem
85 para a maciez da carne (BLANCO & ALONSO, 2010). A maciez da carne geralmente
86 diminui conforme aumenta a idade do animal, e isso ocorre, principalmente, devido a
87 formação de ligações cruzadas intermoleculares que estabilizam o colágeno tornando-o
88 mais resistente (BAILEY, 1985; ARCHILE-CONTRERAS et al., 2010; NISHIMURA,
89 2010).

90 Para Purslow et al. (2005, 2012), manipular o estado de maturidade do colágeno é
91 biologicamente viável, por meio do aumento da renovação do tecido conjuntivo,
92 produzindo estruturas menos maduras, melhorando, dessa forma, a maciez da carne.
93 Segundo Nishimura (2010), a renovação do tecido conjuntivo intramuscular pode ser o

94 futuro alvo para manipulação da maciez da carne. Segundo Therkildsen (2005) e
95 Hansen et al. (2006), quando animais são alimentados *ad libitum* seguido de um período
96 de restrição alimentar, eles respondem com o ganho compensatório. O ganho
97 compensatório é responsável por aumentar as taxas de síntese e degradação protéica,
98 sendo, portanto uma estratégia para renovação da proteína muscular. Para Purslow et al.
99 (2012), a manipulação da dieta, para controlar a taxa de crescimento do animal,
100 induzindo ao ganho compensatório seria o tratamento para renovar o tecido conjuntivo
101 intramuscular.

102 Alguns genes estão associados à maciez da carne, como por exemplo, os
103 colágenos, as metaloproteinases e os inibidores teciduais das metaloproteinases. As
104 metaloproteinases (MMPs) têm o papel de remodelação da matriz extracelular, sendo
105 responsável também por degradar o colágeno, enquanto que os inibidores teciduais das
106 metaloproteinases (TIMPs) modulam a atividade das MMPs, inibindo-as (WOESSNER
107 JR., 1991; NAGASE & WOESSNER, 1999; VISSE & NAGASE, 2003; PURSLOW et
108 al., 2012). Dentre os diferentes tipos de colágeno, os tipos I e III representam a principal
109 proporção de colágeno nos músculos (BLANCO & ALONSO, 2007; LEPETIT; 2007,
110 2008). No músculo esquelético, a atividade e expressão do gene MMP2 são claramente
111 as mais abundantes (SYLVESTRE et al., 2002), sendo as MMPs as principais
112 responsáveis pelo processo de renovação do tecido conjuntivo (ARCHILE-
113 CONTRERAS et al., 2010). Dos quatro TIMPs identificados até o momento, o TIMP1 e
114 TIMP2 são capazes de inibir as atividades de todas as MMPs (KJAER, 2004).

115 Objetivou-se pesquisar, o efeito da renovação tecidual de vacas de descarte da
116 raça Nelore submetidas a tratamentos alimentares distintos, na expressão dos genes
117 COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 e TIMP2 em tecido muscular.

118

119 2 MATERIAL E MÉTODOS

120

121 Os animais foram provenientes do rebanho da Empresa Brasileira de Pesquisa
122 Agropecuária Gado de Corte, localizada em Campo Grande-MS. Foram utilizadas
123 amostras de 25 vacas de descarte da raça Nelore, com idade entre 4 e 11 anos. Os
124 animais foram divididos em dois grupos e cada grupo foi submetido a um dos manejos
125 alimentares: Grupo 1 – Os animais desse grupo permaneceram durante a época da seca
126 em um piquete de 16 hectares de *Brachiaria decumbens* com disponibilidade média de
127 2163,9 kg MS/animal e suplementação constituída de 20,6% de milho grão, 20% de
128 farelo de soja, 25% de casca de soja, 12% de uréia, 7% de sal de recria, 15% sal branco,
129 0,4% de monensina sódica. Esses animais mantiveram o peso durante todo o período
130 experimental (Grupo manutenção – GM); Grupo 2: Os animais desse grupo
131 permaneceram em uma área de 7 hectares com disponibilidade média de 824,5 Kg
132 MS/animal durante a época da seca. Esta condição de manejo resultou em uma restrição
133 alimentar. Um piquete de 9 hectares foi liberada para esses animais no início do período
134 das águas. As vacas desse grupo, com baixo escore corporal após a restrição alimentar,
135 foram suplementadas para promover o ganho de peso compensatório (Grupo ganho
136 compensatório – GC).

137 No período das águas foi disponibilizada a todos os animais uma suplementação
138 composta por 28% de milho grão, 15% de farelo de soja, 35% de casca de soja, 7% de
139 sal de recria, 14,6% de sal branco e 0,4% de monensina sódica. Todos os animais
140 tiveram acesso a sal mineral e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

141 No momento do abate, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*
142 (contrafilé) na altura da 13ª vértebra torácica com o objetivo de avaliar a maciez da
143 carne no tempo 0 (T0), por meio da análise de força de cisalhamento. Também foram

144 coletadas amostras do mesmo músculo com o objetivo de extrair o RNA total para
145 avaliar a expressão gênica. As amostras do músculo foram armazenadas em microtubos
146 criogênicos de 2 mL, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente
147 estocadas em ultra-freezer a -80°C até o momento da extração do RNA.

148 O processo de extração de RNA total foi realizado utilizando kit comercial a base
149 de trizol – Ambion PureLink™ RNA Mini Kit – seguindo as recomendações do
150 fabricante. Foi extraído RNA a partir de 200 mg de tecido muscular congelado e
151 macerado em nitrogênio líquido, e logo depois transferido em um tubo falcon de 15 mL
152 contendo 2,5 mL de trizol. O RNA extraído de cada amostra foi submetido ao
153 tratamento com 20 U da enzima DNase RQI RNase free (Promega), para garantir a
154 remoção de qualquer resquício de DNA, e em seguida ressuspensionado em água ultra-pura
155 livre de RNase.

156 Após a extração, o RNA total das amostras foi analisado utilizando o
157 espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies) para determinação da sua
158 concentração e pureza, avaliadas pela relação entre a absorbância em 260 e 280nm. Para
159 verificação da qualidade das amostras, as mesmas foram submetidas a análise de
160 eletroforese capilar no equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent).

161 Para a síntese de cDNA utilizou-se 3 µg de RNA total e o kit comercial
162 SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR seguindo o protocolo
163 fornecido pelo fabricante. O cDNA foi armazenado a -20°C.

164 Na técnica de PCR em Tempo Real foram utilizados seis genes alvo, sendo genes
165 da família do colágeno (COL1A1, COL1A2, COL3A1), gene da família da Matriz
166 Metaloproteinase (MMP2) e genes da família dos Inibidores Teciduais das
167 Metaloproteinases (TIMP1 e TIMP2) e três genes constitutivos (ACTB, HMBS e B2M)
168 para serem utilizados como normalizadores. Os *primers* para a realização da PCR em

Tempo Real foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0. Na Tabela 1, são apresentados os genes contendo a sequência dos oligonucleotídeos (direto e reverso) e os números de acesso do GenBank das sequências utilizadas para os desenhos dos primers.

Tabela 1. Genes, número de acesso no GenBank e sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em Tempo Real.

Gene	Nome completo	Tamanho amplicon	Temperatura de Melting	Número de acesso no GenBank	Sequência dos Oligonucleotídeos Direto e Reverso
COL1A1	Colágeno I Alfa 1	70 pb	84 °C	NM_001034039	(D) 5'- TGGCCATCCAGCTGACTTTC - 3' (R) 5'- TTGCAGTGGTAGGTGATGTTCTG - 3'
COL1A2	Colágeno I Alfa 2	68 pb	79 °C	NM_174520	(D) 5'- GCCTATCCTTGATATTGCACCTTT - 3' (R) 5'- GGCCAATGTTCAATCTGATTCT - 3'
COL3A1	Colágeno III Alfa 1	68 pb	77 °C	NM_001076831	(D) 5'- ACACCTCTTCCAATAACACTGCGTTA - 3' (R) 5'- AGCACCGTCATTGCTCTGAA - 3'
MMP2	Matriz Metaloproteinase 2	57 pb	80 °C	NM_174745	(D) 5'- AACCAAAGTCTGAAGAGCGTGAA - 3' (R) 5'- GCAGCCCAGCCAATCG - 3'
TIMP1	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 1	57 pb	83 °C	NM_174471	(D) 5'- TCATCCATCCCCTGCAAACT - 3' (R) 5'- CAGCTGGTCCGTCACAAAG - 3'
TIMP2	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 2	61 pb	82 °C	NM_174472	(D) 5'- ACTGGGTCACGGAGAAGAACA - 3' (R) 5'- CTCTTGATGCAGGCGAAGAAC - 3'
B2M	β - 2- microglobulina	109 pb	78 °C	NM_173893	(D) 5'- AGTAAGCCGCAGTGGAGGT - 3' (R) 5'- CGCAAAACACCCTGAAGACT - 3'
ACTB	β - actina	66 pb	77 °C	AY141970	(D) 5'- CCTCACGGAACGTGGTTACA - 3' (R) 5'- TCCTTGATGTCACGCACAATT - 3'
HMBS	Hidroximetilbilane sintase	80 pb	78 °C	BC108110	(D) 5'- CTTGGAGAGGAATGAAGTGG - 3' (R) 5'- AATGGTGAAGCCAGGAGGAA - 3'

A comparação da expressão dos genes estudados foi realizada pelo método de quantificação relativa em qPCR com a fluorescência tipo Syber Green. Na técnica do PCR em tempo real foi utilizada uma reação de PCR composta por 6,25 μ L do reagente 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 100 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso), 300 ng de cDNA e água ultra-pura para completar o volume de 12,5 μ L para cada reação. As reações foram conduzidas em aparelho Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e submetidas ao protocolo do equipamento. Para verificar a existência de amplificação inespecífica foi analisada a Curva de Melting ao final da qPCR.

185 Foi realizada uma curva-padrão para cada gene no intuito de avaliar a eficiência
186 da reação e de determinar um valor para o Ciclo Threshold (Ct) específico para cada
187 gene. A eficiência da reação foi aceitável entre 90% e 110%. Foi analisada a eficiência
188 de cada reação e para as curvas-padrão que não apresentaram eficiência de 100%, foram
189 ajustados os resultados para cada um dos genes.

190 Com os resultados devidamente corrigidos para eficiência, foi realizada uma
191 análise para verificar o melhor gene normalizador. Para esta finalidade foi definido o
192 valor de estabilidade de cada gene (HMBS, ACTB e B2M) utilizando-se os softwares
193 geNorm® e NormFinder®.

194 Os genes em estudo foram normalizados com o melhor gene normalizador e a
195 expressão gênica diferencial entre os grupos foi definida pelo método de delta-delta Ct
196 ($\Delta\Delta Ct$).

197 Com a finalidade de se verificar o efeito da expressão gênica para o fenótipo
198 maciez da carne, os animais foram redistribuídos em dois novos grupos GAFC (animais
199 com maiores valores de força de cisalhamento - > 9,77 Kgf) e GBFC (animais com
200 menores valores de força de cisalhamento - < 9,77 Kgf).

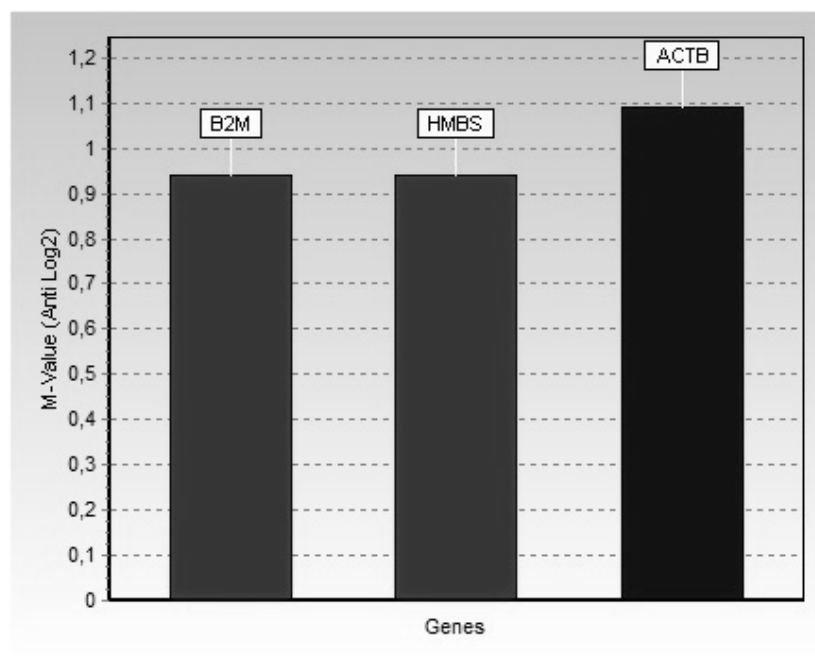
201 Para análise estatística foi utilizado um modelo no qual foram considerados como
202 efeito fixo a dieta e a idade dos animais, sendo a diferença estatística determinada pela
203 análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

204

205 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

206

207 Os resultados obtidos pelo geNorm® (Figura 1) indicam que os genes HMBS e
208 B2M apresentaram valores de estabilidade similares e menores (0,938734345) do que a
209 estabilidade apresentada pelo gene ACTB (1,090541632).



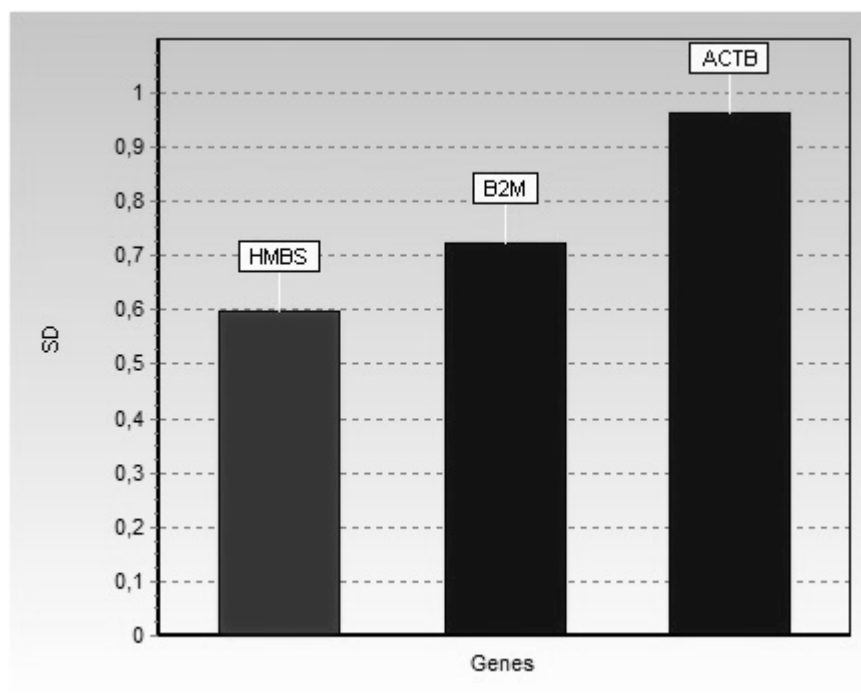
210

211 **Figura 1.** Resultado do programa geNorm® referente a análise de estabilidade dos
 212 genes constitutivos B2M, HMBS e ACTB para expressão relativa em qPCR.

213

214 Pérez et al. (2008) investigaram o valor de estabilidade de genes referência em
 215 tecido muscular bovino, *Longissimus dorsi*, e utilizando o software geNorm®
 216 encontraram o valor de estabilidade de 0,78 para o gene HMBS, 0,83 para o ACTB e
 217 0,98 para o B2M. Esses resultados demonstram que o gene HMBS apresentou uma
 218 melhor estabilidade, condizendo com os resultados apresentados no presente trabalho,
 219 apesar das divergências de valores.

220 Os valores de normalidade fornecido pelo programa NormFinder® indicaram que
 221 o melhor gene normalizador seria o HMBS apresentando o valor de estabilidade de
 222 0,5975, enquanto que os genes B2M e ACTB apresentaram valores de estabilidade de
 223 0,724 e 0,9624, respectivamente, conforme pode ser visualizado na Figura 2.



224

225

226 **Figura 2.** Resultado do programa normFinder® referente a análise de estabilidade dos
 227 genes constitutivos HMBS, B2M e ACTB para expressão relativa em qPCR.

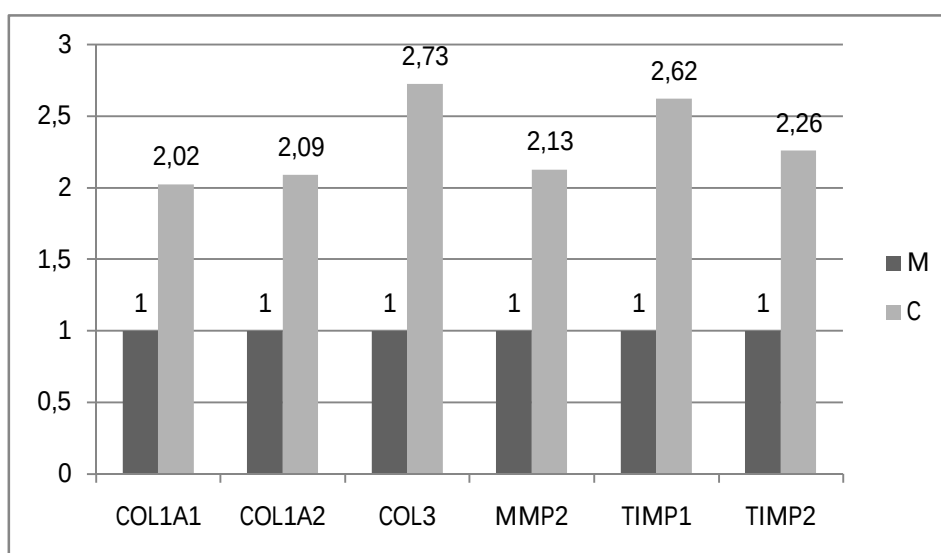
228

229 No trabalho de Pérez et al. (2008), o NormFinder® também indicou um melhor
 230 valor de estabilidade para o gene HMBS (0,39) do que para os genes ACTB (0,48) e
 231 B2M (0,61), ao utilizar músculo esquelético bovino.

232 O GeNorm® e Normfinder® geram uma medida da estabilidade do gene
 233 referência classificando, dessa forma, os genes (VANDESOMPELE et al., 2002). O
 234 GeNorm® gera um valor M para cada gene que é arbitrariamente sugerido para ser
 235 inferior a 1,5 (com um menor valor indicando aumento na estabilidade do gene) e uma
 236 medida de estabilidade do pareamento de genes para determinar o benefício da adição
 237 de genes referência para a normalização do processo (novamente com um valor menor
 238 indicando uma maior estabilidade do fator de normalização) (PÉREZ et al., 2008).
 239 Genes com os menores M têm a expressão mais estável (VANDESOMPELE et al.,
 240 2002). O NormFinder® calcula automaticamente o valor de estabilidade do gene

241 controle, em que um menor valor indica aumento na estabilidade na expressão gênica e
 242 permite uma estimativa direta da variação da expressão (ANDERSEN et al., 2004;
 243 PÉREZ et al., 2008). O NormFinder® é capaz de identificar um único gene com a
 244 expressão mais estável, enquanto que GeNorm® detecta os dois genes cuja expressão
 245 mostram menor variação das dos outros genes testados (PÉREZ et al., 2008). Além
 246 disso, para calcular o valor de estabilidade é possível determinar para que o programa
 247 NormFinder® leve em consideração os tratamentos utilizados gerando um valor mais
 248 confiável. Desta forma, com base nos resultados encontrados pelo programa
 249 NormFinder® o gene escolhido como normalizador foi o HMBS.

250 Após a normalização dos dados, a expressão relativa dos genes estudados foi
 251 calculada utilizando o grupo manutenção como referência. Os resultados estão
 252 apresentados na Figura 3. Todos os genes analisados apresentaram maior expressão
 253 gênica no grupo de ganho compensatório, apresentando diferença estatística
 254 significativa ($p < 0,05$).



255

256 **Figura 3.** Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os tratamentos
 257 compensatório e manutenção.

258

259 Com base nos resultados, pode-se perceber que os animais que passaram por
260 ganho compensatório, após um período de restrição alimentar, obtiveram uma
261 renovação protéica expressiva, comparado com os animais que estavam no grupo
262 manutenção.

263 Therkildsen (2005) ao trabalhar com bezerros que foram separados em dois
264 grupos, no qual, a um deles era fornecida uma alimentação *ad libitum* e no outro grupo
265 houve um período de restrição alimentar seguida por uma alimentação *ad libitum*,
266 proporcionou aos animais do segundo grupo o ganho compensatório. Foi constatado no
267 referido trabalho que as atividades enzimáticas diminuíram quando houve restrição
268 alimentar, e quando os bezerros tinham acesso a uma dieta *ad libitum*, a taxa de
269 crescimento e a renovação protéica aumentavam. Também foi observado que o pico de
270 renovação protéica por meio da análise do músculo *Longissimus dorsi* coincidiu com o
271 pico de RNA e DNA e também com o pico da velocidade de ganho de peso. Dessa
272 forma, o autor concluiu que a renovação protéica muscular é afetada por estratégias de
273 restrição/re-alimentação e apresenta-se aumentada em animais submetidos a ganho
274 compensatório quando comparado com os animais que apresentaram ganho de peso
275 normal, o que condiz com os resultados do presente trabalho.

276 Millward et al. (1975), observaram que a taxa de renovação da proteína muscular
277 diminuía quando ratos eram alimentados com uma dieta de baixa proteína. Porém, após
278 a realimentação para uma dieta adequada, o rápido crescimento ocorreu
279 concomitantemente com altas taxas de síntese e quebra de proteína muscular. O trabalho
280 de Jones et al. (1990), seguiu a mesma tendência ao avaliar bovinos com estratégias
281 alimentares distintas, sendo, *ad libitum* e restrição/re-alimentação, concluindo que os
282 animais com ganho compensatório apresentaram maiores taxas de renovação protéica.

283 Quanto aos genes estudados no presente trabalho parece haver uma modulação
284 conjunta desses genes durante a renovação protéica muscular. De fato, o resultado de
285 correlação entre a expressão dos genes demonstrou uma correlação alta e positiva entre
286 todos os genes estudados (dados não mostrados).

287 Apesar de haver uma maior expressão dos três genes colágenos observa-se que o
288 COL3A1 tendeu a ser o mais expresso entre eles no grupo compensatório, o que pode
289 ser explicado pelo estudo de Burson & Hunt (1986a), que determinaram uma maior
290 porcentagem de colágeno do tipo III no músculo *Longissimus dorsi* em bovinos
291 alimentados com dieta concentrada. Apesar dos animais do presente estudo terem sido
292 alimentados com uma dieta diferente, eles apresentaram a mesma tendência quanto a
293 expressão do gene colágeno do tipo III.

294 Por muito tempo, tem-se acreditado que o processo de degradação do colágeno
295 seja dependente da presença de duas enzimas: collagenases e gelatinases. Porém, os
296 dados do estudo de Aimes & Quigley (1995), comprovam que a MMP2 é capaz de
297 degradar o colágeno do tipo I na ausência das collagenases. A MMP2 foi capaz de clivar
298 a tripla-hélice do colágeno do tipo I, apesar de serem necessárias duas a quatro vezes
299 mais MMP2 do que de MMP1 para gerar as mesmas quantidades de fragmentos
300 clivados. Essa atividade não é comum para as gelatinases, uma vez que, a MMP9 não
301 foi capaz de clivar o colágeno no mesmo estudo. Com isso, os autores concluíram que a
302 MMP2 também atua como uma collagenase.

303 Da mesma forma, Kjaer (2004), relatou que embora existam algumas preferências
304 das MMPs em relação aos tipos de colágenos, a especificidade de certas MMPs pelos
305 tipos de colágeno pode ser menor do que se pensava até agora, confirmando a teoria de
306 que a MMP2 também pode degradar o colágeno do tipo I.

307 Segundo Cha & Purslow (2012), o aumento da atividade de MMP2 extracelular é
308 contrabalanceado pela presença aumentada de TIMP1. Por outro lado a MMP2 também
309 pode ser controlada pelo TIMP2, que age tanto na ativação quanto na inibição dessa
310 metaloproteinase (WANG et al., 2000; HIJOVA, 2005 e BILJANA et al., 2011),
311 havendo, segundo Kandasamy et al. (2010), uma especificidade do TIMP2 com o
312 MMP2. De modo geral, uma relação entre TIMPs e MMPs foi reportada por Visse &
313 Nagase (2003), que afirmaram que a expressão dos TIMPs são reguladas durante o
314 desenvolvimento e remodelação dos tecidos, sendo associadas à atividade das MMPs.
315 Da mesma forma, Biljana et al. (2011) e Araújo et al. (2011), estabeleceram que é
316 necessário haver um balanço dinâmico entre as MMPs e os TIMPs para que seja
317 garantido a integridade do tecido.

318 Trabalhos que envolvam a expressão desses genes em músculo bovino ainda são
319 precários. Sylvestre et al. (2002), ao estudar o efeito da taxa de crescimento (alto e
320 baixo) em cordeiros, avaliaram que os animais que tiveram alta taxa de crescimento
321 foram acompanhados por maiores níveis de MMP2, sugerindo uma renovação protéica
322 nesses animais.

323 Outros resultados de expressão dos genes analisados no presente trabalho não
324 foram encontrados na literatura. Porém, Therkildsen et al. (2008), trabalhando com a
325 expressão dos genes μ -calpaína, calpastatina ou p94 não encontraram diferenças
326 estatísticas nos níveis de mRNA em amostras de animais submetidos a diferentes
327 estratégias de alimentação (*ad libitum* e ganho compensatório). Segundo os autores, os
328 animais que foram submetidos ao ganho compensatório obtiveram um aumento da
329 renovação protéica no músculo *Longissimus dorsi*, porém, os resultados não sugerem
330 que essa renovação protéica tenha sido maior do que nos animais com alimentação *ad*
331 *libitum*.

332 Da mesma forma Chaosap et al. (2011), não encontraram diferença significativa
333 na atividade da calpaína e nem em seus níveis de mRNA ao se comparar amostras de
334 carne suína provenientes de animais submetidos a duas estratégias alimentares,
335 restrição/re-alimentação e *ad libitum*. Porém, os autores perceberam certa tendência de
336 aumento do mRNA da caspase 3 nos animais que passaram por ganho compensatório.
337 Segundo os autores, fatores hormonais podem atuar sobre a expressão gênica,
338 diminuindo a expressão de determinados genes.

339 De acordo com a literatura, períodos de restrição alimentar resultam em uma
340 baixa renovação protéica comparado com uma estratégia de alimentação com acesso *ad*
341 *libitum* (THERKILDSEN et al., 2004). Sendo observado que, a taxa de crescimento
342 afeta a maciez da carne porque as propriedades do tecido conjuntivo intramuscular são
343 alteradas. O aumento da taxa de crescimento observado durante o ganho compensatório
344 é devido ao aumento das taxas de síntese e degradação de proteína, com um aumento
345 relativamente maior da taxa de síntese protéica (MILLWARD et al., 1975; FISHELL et
346 al., 1985; JONES et al., 1990). No presente trabalho, independente da dieta fornecida,
347 não foi observada diferença estatística com relação à maciez da carne dos animais
348 (dados não mostrados).

349 Segundo Soria & Corva (2004), os animais que possuem crescimento rápido
350 produzem carne mais macia do que os animais que crescem de forma lenta, sendo este
351 fato atribuído a maior renovação protéica apresentada pelos primeiros.

352 Kristensen et al. (2002), observou que leitoas expressando ganho compensatório
353 tenderam a ter um aumento na proteólise no momento do abate e uma taxa mais rápida
354 de amaciamento da carne do que suínos com acesso *ad libitum* à dieta ou suínos
355 alimentados restritivamente durante todo o período de crescimento. Para Kristensen et

al. (2004), o ganho compensatório em leitoas representa uma forma de aumentar a maciez da carne suína sem comprometer o peso ao abate ou a porcentagem de carne.

Segundo Aberle et al. (1981), a taxa de crescimento dos bovinos é uma importante variável que afeta a maciez da carne. Segundo os autores, ocorre uma menor estabilidade do colágeno recém sintetizado, sendo que, este representaria uma proporção maior do colágeno muscular total em animais com elevada taxa de crescimento, o que tornaria a carne mais macia.

Fishell et al. (1985), observaram que novilhos de origem européia alimentados com dieta concentrada, apresentaram uma taxa de crescimento rápida o que ocasionou um aumento da renovação do colágeno, diminuindo as ligações cruzadas das moléculas de colágeno, o que contribuiu para melhorar a maciez da carne. Cranwell et al. (1996), concluíram que vacas de descarte de origem européia confinadas por 28 ou 56 dias antes do abate apresentaram maior quantidade de colágeno solúvel e carne mais macia quando comparado com vacas não confinadas. Entretanto, este efeito de mudança na maciez da carne não foi observado no presente estudo mesmo que o efeito de renovação tecidual tenha sido evidente.

Cabe ressaltar que, tanto no trabalho de Fishell et al. (1985) como o de Cranwell et al. (1996) os animais com ganho acelerado foram alimentados com dieta concentrada. Segundo Santos et al. (2008), o sistema de terminação é o que mais afeta a maciez da carne de vaca de descarte, pois, os sistemas alimentares mais intensivos durante a fase de terminação demonstram melhora nessa característica. Portanto, uma hipótese por não ter havido diferença nos resultados apresentados quanto à maciez da carne dos animais do grupo compensatório ou manutenção, pode ter sido o fato das vacas terem sido mantidas predominantemente a pasto durante todo o período experimental.

Os resultados aqui apresentados também discordam com o apresentado por Therkildsen et al. (2002a), que ao estudarem a taxa de crescimento alto e moderado em bezerras de raça européia, concluíram que as correlações entre parâmetros de síntese de proteína muscular (RNA e DNA) e características de maciez tendiam a ser significante no músculo *Longissimus dorsi*, mas não no músculo *Supraspinatus*. As correlações indicaram que a alta capacidade de síntese de proteína no músculo é positivamente relacionada com maior maciez, sendo que, animais com taxa de crescimento alta apresentaram carne com menor força de cisalhamento, portanto, maior maciez.

Aberle et al. (1981), ao utilizar bezerros de origem européia abatidos com 15 meses de idade, encontraram um maior índice de fragmentação miofibrilar na carne de animais com taxa de crescimento rápido e sugeriram que houve uma maior quebra de proteína no *post mortem* como consequência de uma alta renovação protéica antes do abate. Os autores concluíram que a taxa de crescimento dos animais antes do abate tem um importante efeito na maciez da carne, devido à síntese de novo colágeno que afeta a estabilidade do tecido conjuntivo.

É importante mencionar que, nos trabalhos de Aberle et al. (1981), Fishell et al. (1985), Cranwell et al. (1996) e Therkildsen et al. (2002a) foram utilizados animais de origem européia, lembrando que, no presente estudo foi utilizada a raça Nelore, de origem indiana. Há relatos na literatura que demonstram que a carne de *Bos taurus indicus* (zebuíno, origem indiana) apresenta menor maciez comparada a carne de *Bos taurus taurus* (taurina, origem européia) (CROUSE et al., 1989; RUBENSAM et al., 1998). Dentre os vários mecanismos propostos para explicar as diferenças raciais está o efeito do estado de ativação do sistema enzimático calpaína-calpastatina, que é responsável pelo amaciamento da carne no *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1994). Whipple et al. (1990) identificaram que raças zebuínas apresentam esse sistema

405 enzimático menos ativo por apresentarem maiores teores da enzima calpastatina, que
406 atua inibindo a atividade da calpaína, reduzindo a proteólise de proteínas miofibrilares
407 no *post-mortem*.

408 Cabe ressaltar também que, nos trabalhos de Aberle et al. (1981), Fishell et al.
409 (1985) e Therkildsen et al. (2002a) foram utilizados animais jovens, em que, aqueles
410 que tinham elevada taxa de crescimento eram alimentados com uma dieta com alta
411 energia. Convém salientar que animais jovens possuem fisiologia muscular diferenciada
412 quando comparada com animais mais velhos. Segundo Cabral et al. (2012), tanto a
413 síntese quanto a degradação de proteínas são altas durante a fase inicial da vida de um
414 animal, o que contribui para a remodelação do tecido muscular que ocorre durante esta
415 fase da vida, havendo uma maior síntese em relação à degradação. Além do que, Bailey
416 (1985), Santos et al. (2008) e Nishimura (2010), demonstraram que animais de maior
417 idade apresentam carne mais dura, estando este efeito relacionado ao aumento da
418 estabilidade das ligações cruzadas do colágeno pelo avanço da idade. Quanto à dieta,
419 Pacheco et al. (2005) e Alves & Mancio (2007) elucidam que, sempre que o nível
420 energético da ração excede as exigências mínimas para o desenvolvimento muscular,
421 verificam-se acúmulos de gordura na carcaça. Segundo Alves & Mancio (2007),
422 carcaças com melhor acabamento, além de afetar a velocidade de resfriamento, tendem
423 a apresentar um maior teor de gordura intramuscular, sendo que, sua presença
424 proporciona maior maciez na carne. Portanto, face às justificativas explanadas, fatores
425 como idade, raça e alimentação representam possíveis elementos que interferiram nos
426 resultados obtidos.

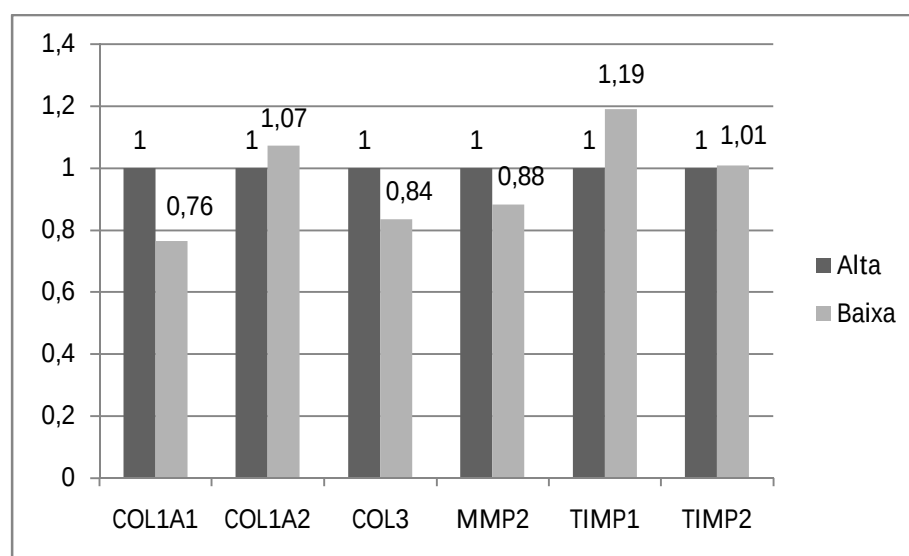
427 Por outro lado, concordando com os resultados do presente trabalho, Therkildsen
428 et al. (2002b), não observou efeito do ganho compensatório em suínos machos ou
429 fêmeas em relação a maciez da carne, sendo que, como justificativa para esta falta de

efeito do tratamento alimentar, foi sugerido que houve um período muito curto de acesso *ad libitum* ao alimento, após o período de restrição alimentar, o que também pode ter ocorrido no presente estudo.

Da mesma forma, outros trabalhos que avaliaram o efeito do regime de alimentação compensatório em suínos, não observaram diferença significativa nos valores de força de cisalhamento ao comparar amostras de carne de animais que passaram por ganho compensatório e alimentação *ad libitum* (HEYER & LEBRET, 2007; CHAOSAP et al., 2011).

Os resultados de Bruce et al. (1991), também condizem com os resultados encontrados no presente trabalho, em que, ao avaliar o efeito do ganho compensatório em bovinos concluiu que a maciez da carne não foi afetada pelo crescimento compensatório.

Na Figura 4 podem-se observar os resultados de diferença de expressão dos genes levando-se em consideração os grupos separados pela força de cisalhamento. Não houve diferença significativa de expressão de nenhum dos genes estudados ($p>0,05$).



445

Figura 4. Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os grupos com diferentes forças de cisalhamento.

448

449 Apesar de não haver diferença estatística significativa na expressão de nenhum
450 dos genes, cabe ressaltar que os genes COL1A1, COL3A1 e MMP2 tenderam a ser mais
451 expressos no grupo com alta força de cisalhamento. Devido ao fato de ter sido utilizado
452 no experimento vacas de descarte, torna-se compreensível essa maior expressão dos
453 genes COL1A1 e COL3A1, visto que, o colágeno é considerado um dos responsáveis
454 pela dureza de um corte cárneo, a partir do momento que este colágeno possui ligações
455 cruzadas estáveis. O fato do gene MMP2 atuar sobre o colágeno justifica sua maior
456 expressão no grupo com alta força de cisalhamento, o que remete a confirmação de que
457 os genes COL1A1, COL3A1 e MMP2 possuem uma alta correlação, estando
458 intimamente relacionados.

459 Tem sido relatada na literatura, a estreita relação dos colágenos do tipo I e III com
460 a maciez da carne. Bailey (1985), Purslow (2005) e Blanco & Alonso (2007),
461 elucidaram em seus trabalhos haver grandes quantidades de colágeno do tipo I e III no
462 músculo esquelético, relacionando-os com a maciez da carne.

463 De acordo com o apresentado por Burson & Hunt (1986b) os colágenos do tipo I e
464 III, que estão predominantemente no músculo esquelético, podem afetar a maciez da
465 carne e os mesmos podem ser afetados diferentemente pelo calor. O colágeno do tipo III
466 pode ser menos solúvel ao aquecimento do que o colágeno do tipo I. Segundo os
467 autores, a explicação para tal acontecimento é o fato de que, o colágeno do tipo I
468 apresenta mais ligações cruzadas lábeis ao calor, enquanto que o colágeno do tipo III
469 apresenta ligações dissulfeto intramoleculares, aumentando a estabilidade das fibras ao
470 calor.

471 Em contrapartida, Miller et al. (2001), estabeleceu que o colágeno do tipo I, é
472 formado por fibras mais grossas, estando associado com a rigidez, enquanto que o
473 colágeno do tipo III é constituído por fibras mais finas. Esta informação também é

474 descrita por Blanco & Alonso (2010), sugerindo que o colágeno do tipo III poderia
475 apresentar menor força de cisalhamento.

476 No trabalho de Burson et al. (1986c), a porcentagem de colágeno do tipo III não
477 foi correlacionado com os valores de força de cisalhamento, mas foi correlacionado com
478 a porcentagem de colágeno solúvel ao calor. Segundo os autores, essa relação sugere
479 que, quando uma maior porcentagem de colágeno do tipo III está presente, uma menor
480 porcentagem de colágeno intramuscular é solubilizada pelo aquecimento. Portanto,
481 ainda é controversa a verdadeira relação dos colágenos do tipo I e III em relação à
482 participação na maciez ou dureza da carne.

483 Pesquisas que relacionam o gene MMP2 com a maciez da carne ainda são
484 escassas, sendo descrita apenas a atuação deste gene sobre o colágeno. Torres & Botero
485 (2012), afirmaram que as MMPs estão envolvidas no processo de renovação da matriz
486 extracelular, sendo sua importância relacionada à sua capacidade de degradação da
487 matriz do tecido conjuntivo, o que favoreceria a maciez da carne. No trabalho de
488 Sylvestre et al. (2002), foi observado que, em músculos de cordeiros, a degradação do
489 colágeno até a forma de aminoácidos livres ocorre no *post-mortem* e que existem altos
490 níveis de MMP2 ativas simultaneamente presentes que podem ser responsáveis por esse
491 catabolismo. Kjaer (2004), também relata que a degradação do colágeno é iniciada
492 extracelularmente pelas MMPs.

493 Da mesma forma, trabalhos que relacionam o gene TIMP1 e TIMP2 com o
494 fenótipo maciez não são relatados, sendo estes principalmente citados como inibidores
495 das MMPs.

496

497

498

499 **4 CONCLUSÕES**

500

501 Estratégias que envolvem o ganho de peso acelerado, seguido de um período de
502 restrição alimentar, denominado ganho compensatório, representam uma via eficiente
503 para promover o processo de renovação protéica do tecido conjuntivo intramuscular de
504 vacas de descarte. Essa renovação protéica foi constatada pela expressão aumentada dos
505 genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, MMP2, TIMP1 e TIMP2 nos animais que
506 apresentaram ganho compensatório. Apesar desse resultado satisfatório, não foi possível
507 detectar diferença estatística para força de cisalhamento quanto à expressão dos genes.
508 Estudos que envolvam a expressão desses genes na maciez da carne ainda são escassos,
509 sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de novos estudos que possam confrontar
510 com os resultados encontrados.

511 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

512

513 ABERLE, E.D.; REEVES, E.S.; JUDGE, M.D.; HUNSLEY, R.E.; PERRY, T.W.
 514 Palatability and muscle characteristics of cattle with controlled weight gain: time on
 515 a high energy diet. **Journal of Animal Science**, v.52, n.4, p.757-763, 1981.

516

517 AIMES, R.T.; QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase.
 518 **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.11, p.5872-5876, 1995.

519

520 ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina – uma revisão. **Revista da**
 521 **FZVA**, v.14, n.1, p.193-216, 2007.

522

523 ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of Real-Time
 524 Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation
 525 Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon
 526 Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245-5250, 2004.

527

528 ARAÚJO, R.V.S.; SILVA, F.O.; MELO-JÚNIOR, M.R.; PORTO, A.L.F.
 529 Metaloproteínas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na
 530 cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.1, p.82-88, 2011.

531

532 ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; MANDELL, I.B.; PURSLOW, P.P. Phenotypic
 533 differences in matrix metalloproteinase 2 activity between fibroblasts from 3 bovine
 534 muscles. **Journal of Animal Science**, v.88, p.4006-4015, 2010.

535

536 BAILEY, A.J. The role of collagen in the development of muscle and its relationship to
 537 eating quality. **Journal of Animal Science**, v.60, n.6, p.1580-1587, 1985.

538

539 BILJANA, E.; BORIS, V.; CENA, D.; VELESKA-STEFKOVSKA, D. Matrix
 540 metalloproteinases (with accent to collagenases). **Journal of Cell and Animal**
 541 **Biology**. v.5, n.7, p.113-120, 2011.

542

543 BLANCO M.R.; ALONSO, C.R. Collagen type I and III in bovine muscles. **Archivos**
 544 **de Zootecnia**, v.56, n.214, p.253-256, 2007.

545

546 BLANCO, M.R.; ALONSO, C.R. Collagen types I and III in bovine muscles: influence
 547 of age and breed. **Journal of Muscle Foods**, v.21, p.417-423, 2010.

548

549 BRUCE, H.L.; BALL, R.O.; MOWAT, D.N. Effects of compensatory growth on
 550 protein metabolism and meat tenderness of beef steers. **Canadian Journal of**
 551 **Animal Science**, v.71, p.659-668, 1991.

552

553 BURSON, D.E.; HUNT, M.C. Heat-induced changes in the proportion of types I and III
 554 collagen in bovine Longissimus dorsi. **Meat Science**, v.17, p.153-160, 1986b.

555

556 BURSON, D.E.; HUNT, M.C. Proportion of collagen types I and III in four bovine
 557 muscles differing in tenderness. **Journal of Food Science**, v.51, n.1, p.51-53, 1986a.

558

- BURSON, D.E.; HUNT, M.C.; UNRUH, J.A.; DIKEMAN, M.E. Proportion of types I and III collagen in Longissimus collagen from bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.453-456, 1986c.
- CABRAL, C.H.A.; ALMEIDA, D.M.; MARTINS, L.S.; MENDES, R.K.V. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no turnover protéico: deposição e degradação de proteína muscular. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.1185-1203, 2012.
- CHA, M.C.; PURSLOW, P.P. Expressions of matrix metalloproteinases and their inhibitor are modified by beta-adrenergic agonist Ractopamine in skeletal fibroblasts and myoblasts. **Canadian Journal of Animal Science**, v.92, n.2, p.159-166, 2012.
- CHAOSAP, C.; PARR, T.; WISEMAN, J. Effect of compensatory growth on forms of glycogen, postmortem proteolysis and meat quality in pigs. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2231-2242, 2011.
- CRANWELL, C.D.; UNRUH, J.A.; BRETHOUR, J.R.; SIMMS, D.D. Influence of Steroid Implants and concentrate feeding on carcass and Longissimus muscle sensory and collagen characteristics of cull beef cows. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1777-1783, 1996.
- CROUSE, J.D.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M.; KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S.C. Comparisons of Bos indicus and Bos taurus inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2661-2668, 1989.
- FISHELL, V.K.; ABERLE, E.D.; JUDGE, M.D.; PERRY, T.W. Palatability and muscle properties of beef as influenced by pre-slaughter growth rate. **Journal of Animal Science**, v.61, n.1, p.151-157, 1985.
- HANSEN, S.; THERKILDSEN, M.; BYRNE, D.V. Effects of a compensatory growth strategy on sensory and physical properties of meat from young bulls. **Meat Science**, v.74, p.628-643, 2006.
- HEYER, A.; LEBRET, B. Compensatory growth response in pigs: Effects on growth performance, composition of weight gain at carcass and muscle levels, and meat quality. **Journal of Animal Science**, v.85, p.769-778, 2007.
- HIJOVA, E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. **Bratislavske Lekarske Listy**, v.106, n.3, p.127-132, 2005.
- HOCQUETTE, J. F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v.1, p.159-173, 2007.
- JONES, S.J.; STARKEY, D.L.; CALKINS, C.R.; CROUSE, J.D. Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2707-2715, 1990.

- 609 KANDASAMY, A.D.; CHOW, A.K.; ALI, M.A.M.; SCHULZ, R. Matrix
610 metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix.
611 **Cardiovascular Research**, v.85, p.413-423, 2010.
612
- 613 KJAER, Michael. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal
614 Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**, v.84, p.649-698, 2004.
615
- 616 KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p. 93 –
617 104, 1994.
618
- 619 KRISTENSEN, L.; THERKILDSEN, M.; AASLYNG, M.D.; OKSBJERG, N.;
620 ERTBJERG, P. Compensatory growth improves meat tenderness in gilts but not in
621 barrows. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3617-3624, 2004.
622
- 623 KRISTENSEN, L.; THERKILDSEN, M.; RIIS, B.; SORENSEN, M.T.; OKSBJERG,
624 N.; PURSLOW, P.P.; ERTBJERG, P. Dietary-induced changes of muscle growth
625 rate in pigs: Effects on in vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality.
626 **Journal of Animal Science**, v.80, p.2862-2871, 2002.
627
- 628 LEPETIT, J. A theoretical approach of the relationships between collagen content,
629 collagen cross-links and meat tenderness. **Meat Science**, v.76, p.147-159, 2007.
630
- 631 LEPETIT, J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. **Meat**
632 **Science**, v.80, p.960-967, 2008.
633
- 634 MILLER, T.A.; LESNIEWSKI, L.A.; MULLER-DELP, J.M.; MAJORS, A.K.;
635 SCALISE, D.; DELP, M.D. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in
636 the soleus muscle of the rat. **American Journal of Physiology**, v.281, p.1710-1717,
637 2001.
638
- 639 MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; STEWART, R.J.C.; NNANYELUGO, D.O.;
640 WATERLOW, J.C. Skeletal-muscle growth and protein turnover. **Biochemical**
641 **Journal**, v.150, p.235-243, 1975.
642
- 643 NAGASE, H.; WOESSNER JÚNIOR, J.F. Minireview: matrix metalloproteinases. **The**
644 **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.
645
- 646 NISHIMURA, Takanori. The role of intramuscular connective tissue in meat texture.
647 **Animal Science Journal**, v.81, p.21-27, 2010.
648
- 649 PACHECO, P.S.; RESTLE, J.; SILVA, J.H.S.; BRONDANI, L.L.P.; ALVES FILHO,
650 D.C.; ARBOITTE, M.Z.; FREITAS, A.K. Composição física da carcaça e qualidade
651 da carne de novilhos jovens e superjovens de diferentes grupos genéticos. **Revista**
652 **Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1691-1703, 2005.
653
- 654 PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference
655 genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular**
656 **Biology**, v.9, n.79, 2008.
657

- PURSLOW, P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, v.70, p.435-447, 2005.
- PURSLOW, P.P.; ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; CHA, M.C. Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. **Journal of Animal Science**, v.90, p.950-959, 2012.
- RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E. de; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo bos indicus na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.405-409, 1998.
- SANTOS, A.P.; BARCELLOS, J.O.J.; KUSS, F.; LÓPEZ, J.; CHRISTOFARI, L.F.; REINHER, C.; BRANDÃO, F.S. Revisão: Qualidade da carne de vacas de descarte. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.1, p.35-45, 2008.
- SORIA, L.A.; CORVA, P.M. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.12, n.2, p.73-88, 2004.
- SYLVESTRE, M.N.; BALCERZAK, D.; FEIDT, C.; BARACOS, V.E.; BELLUT, J.B. Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1871-1878, 2002.
- THERKILDSEN, M. Muscle protein degradation in bulls calves with compensatory growth. **Livestock Production Science**, v.98, p.205-218, 2005.
- THERKILDSEN, M.; HOUBAK, M.B.; BYRNE, D.V. Feeding strategy for improving tenderness has opposite effects in two different muscles. **Meat Science**, v.80, p.1037-1045, 2008.
- THERKILDSEN, M.; LARSEN, L. M.; BANG, H. G.; VESTERGAARD, M. Effect of growth rate on tenderness development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, v.74, p. 253-264, 2002a.
- THERKILDSEN, M.; RIIS, B.; KARLSSON, A.; KRISTENSEN, L.; ERTBJERG, P.; PURSLOW, P.P.; AASLYNG, M.A.; OKSBJERG, N. Compensatory growth response in pigs, muscle protein turn-over and meat texture: Effects of restriction/realimentation period. **Animal Science**, v.75, p.367-377, 2002b.
- THERKILDSEN, M.; VESTERGAARD, M.; BUSK, H.; JENSEN, M.T.; RIIS, B.; KARLSSON, A.H.; KRISTENSEN, L.; ERTBJERG, P.; OKSBJERG, N. Compensatory growth in slaughter pigs – In vitro muscle protein turnover at slaughter , circulating IGF-I, performance and carcass quality. **Livestock Production Science**, v.88, p.63-75, 2004.
- TORRES, J.O.; BOTERO, M.F.A. El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina. **Revue de Médecine Vétérinaire**, n.23, p.83-96, 2012.

- 708 VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.;
709 DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative
710 RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome**
711 **Biology**, v.3, n.7, 2002.
712
- 713 VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of
714 metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Journal of the American**
715 **Heart Association**, Baltimore, v.92, n.8, p.827-839, 2003.
716
- 717 WANG, Z.; JUTTERMANN, R.; SOLOWAY, P.D. TIMP-2 is required for efficient
718 activation of proMMP-2 in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275,
719 n.34, p.26411-26415, 2000.
720
- 721 WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.;
722 KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in
723 Bos taurus and Bos indicus cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2716-2728,
724 1990.
725
- 726 WOESSNER JÚNIOR, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective
727 tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v.5, p.2145-2154, 1991.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos atuais entraves enfrentados pela pecuária de corte, a maciez da carne tem sido objeto de constantes estudos, já que ela representa uma das características mais apreciada pelo consumidor. Sendo o colágeno a principal proteína constituinte do tecido conjuntivo e um dos responsáveis pelo endurecimento da carne de animais abatidos na idade adulta, tem-se como alternativa sua manipulação por meio do ganho compensatório, havendo dessa forma, uma renovação protéica, o que o tornará mais solúvel. Diante do colágeno recém sintetizado, as ligações intermoleculares responsáveis por sua termo-estabilidade são diminuídas, o que torna a carne mais macia. Neste estudo foi detectada a renovação protéica, porém, não houve diferença quanto à maciez da carne. Os resultados obtidos neste estudo colaboram na identificação de genes associados à renovação do tecido conjuntivo intramuscular durante o ganho compensatório. Essa informação torna-se útil na elucidação do processo biológico que ocorre em animais sob essa condição, e também contribui para elucidar a renovação tecidual como um todo, auxiliando no progresso científico.

APÊNDICE
(METODOLOGIA DETALHADA)

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 FASE DE CAMPO

Os animais pertenceram ao rebanho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte, localizada em Campo Grande – MS. Os animais foram provenientes de um projeto que utilizou 38 vacas de descarte da raça Nelore, sendo que, foram utilizados para o presente experimento 25 animais entre 4 e 11 anos de idade.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram abatidos no Laboratório de Carcaças da Embrapa Gado de Corte seguindo o fluxo normal do estabelecimento. Ao final da linha de abate, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi* (contrafilé) que foram armazenadas em microtubos de 2 mL, para posterior extração de RNA total. Os microtubos foram mantidos em nitrogênio líquido durante o abate e logo depois foram armazenados em ultra-freezer a -80°C.

2.3 EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras dos animais foram selecionadas para o experimento levando-se em consideração a alta ou a baixa porcentagem de colágeno dos grupos manutenção e compensatório, sendo utilizadas 25 amostras.

A extração foi realizada com a utilização de kit comercial a base de trizol – Ambion PureLink™ RNA Mini Kit – seguindo as recomendações do fabricante. Foram pesadas 200 mg de tecido muscular congelado e macerado em nitrogênio líquido, utilizando para tal procedimento cadinho e pistilo. O produto macerado foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 2,5 mL de trizol e posteriormente homogeneizado em vórtex e colocado no gelo. Após a homogeneização de todas as amostras, os tubos eram colocados por 8 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4.400 xg a 4°C para que houvesse a separação das fases (tecido – trizol). Em seguida foram transferidos 1 mL da parte líquida em 2 tubos de eppendorf, sendo posteriormente adicionado em cada tubo 200µL de clorofórmio e

homogeneizado com leves movimentos até ficar uma solução com coloração rosácea. Os tubos eppendorfs foram deixados em temperatura ambiente por 3 minutos. Passado esse tempo, foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 xg a 4°C. Transferiu-se 500 µL da fase superior (porção transparente) para um novo tubo de eppendorf e acrescentado 500µL de etanol 70%. A solução foi homogeneizada rapidamente para evitar a formação de precipitados e logo após foi transferida 700 µL para a coluna do kit devidamente identificada. Procedeu-se a centrifugação a 12000 xg por 15 segundos e repetido o processo até que toda solução presente nos dois tubos de cada amostra passasse pela coluna. Feito isso, foi adicionado 350 µL de Wash Buffer I na coluna e centrifugado a 12000 xg por 15 segundos a temperatura ambiente. Após essa primeira lavagem, para garantir que não houvesse contaminação com DNA foi feito um tratamento com 20U da enzima DNase RQ1 RNase Free (Promega) por amostra, com seu respectivo tampão de reação. Colocou-se 80 µL do mix de DNase em cada coluna e acondicionados em banho Maria a 37°C por pelo menos 30 minutos. Após essa etapa, realizou-se a lavagem com 350 µL de Wash Buffer I na coluna e a centrifugação a 12000 xg por 15 segundos a temperatura ambiente. A coluna foi transferida para um novo tubo e adicionado 500 µL de Wash buffer II devidamente preparado com etanol. O tubo foi centrifugado a 12000 xg por 15 segundos. O líquido do fundo foi descartado e realizado novamente a lavagem com 500 µL de Wash Buffer II e o tubo centrifugado a 12000g por 15 segundos. Foi realizada novamente a centrifugação pelo tempo de 1 minuto a 12000 xg para secar bem a coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo devidamente identificado e adicionado 55 µL de H₂O free aquecida a 46°C. Posteriormente o tubo foi incubado a temperatura ambiente por 2 minutos, e centrifugado a 12000 xg por 2 minutos para obtenção do RNA ligado à coluna. Os tubos foram mantidos no gelo para posterior análise em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies), utilizando 1,5 µL de RNA extraído, para determinação da concentração e pureza. Após essa análise, os tubos de eppendorf contendo o RNA foram armazenados no ultra-freezer a -80°C aguardando o momento da precipitação.

2.4 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR PRECIPITAÇÃO

Pelo fato das amostras estarem altamente diluídas foi preciso fazer a concentração das mesmas para que fosse possível realizar a síntese de cDNA. As amostras foram retiradas do ultra-freezer e armazenadas no gelo para descongelarem. Por meio do espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies) foi mensurada a quantidade de RNA que cada amostra possuía e depois determinado o volume das mesmas. Ajustou-se o volume das amostras com H₂O free para que todos possuíssem o mesmo volume com o intuito de facilitar o momento da pipetagem. Foi adicionado acetato de sódio no tubo de eppendorf, sendo sempre 10% do volume total de amostra. Foi feita a homogeneização e adicionou-se Isopropanol gelado, sendo acrescentado sempre a quantidade de volume total de solução que já contém no eppendorf. Os tubos foram homogeneizados e armazenados a -20°C por no mínimo 2 horas. No presente experimento optou-se por deixar as amostras a -20°C de um dia para o outro, sendo os trabalhos prosseguidos no dia seguinte. Passado esta etapa, os tubos foram centrifugados na velocidade máxima (16000 xg) por 15 minutos a 4°C. O líquido foi retirado com cuidado para não pipetar o pellet erroneamente. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado que tem como função lavar o pellet. O tubo de eppendorf foi centrifugado à velocidade máxima (16000 xg) por 6 minutos a 4°C. O líquido foi novamente retirado com o devido cuidado para não retirar o pellet. Os tubos foram colocados no fluxo da capela por 10 minutos para secarem. Verificou-se se estava totalmente seco e adicionou-se 8 µL de água ultra pura para dissolver o pellet. Os tubos foram acondicionados no gelo. Foi realizada uma nova mistura por meio da pipetagem para dissolver bem o pellet e obter uma completa homogeneização. Logo após realizou-se a mensuração da quantidade de RNA por meio do espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies). As amostras foram armazenadas no ultra-freezer a -80°C aguardando o momento para a realização da síntese de cDNA.

2.5 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Foram retiradas as amostras de RNA do ultra-freezer a -80°C e descongeladas no gelo. Foi utilizado 3 µg de RNA total, ao qual foi adicionado 1 µL de Oligo dT₁₈ primer, 1 µL de tampão de anelamento e completando a reação com H₂O free para obter um volume final de 8 µL. O termociclador foi ligado e esperou-se a temperatura atingir 65° C e logo depois as reações foram colocadas no termociclador. O protocolo prosseguiu, sendo, 65°C por 5 minutos e 20°C por 5 minutos. Passada essa fase, o aparelho é interrompido para a adição em cada reação de 12 µL do master mix (10 µL de 2x First Strand Reaction Mix e 2 µL de Super Script III/RNase OUT Enzyme Mix). A reação foi homogeneizada, e os tubos foram recolocados no termociclador dando seguimento ao protocolo. O aparelho atingiu a temperatura de 50°C por 60 minutos, 80°C por 5 minutos e 37°C por 22 minutos. Quando a temperatura atingiu 37°C esperou-se passar 2 minutos e o termociclador foi interrompido para a adição de 1 µL do master mix (0,5 µL de RNase H e 0,5 µL de H₂O RNase Free) em cada reação. Colocou-se os tubos novamente no termociclador e o protocolo seguiu os 20 minutos finais. Os tubos foram retirados e adicionado 1 µL de 0,5M EDTA (pH 8.0) diluído 1:3 (1 µL de EDTA + 3 µL de H₂O RNase Free) em cada tubo. Os tubos foram vortexados rapidamente para uma completa homogeneização e logo depois armazenados a -20°C até o momento da sua utilização na PCR em tempo real.

2.6 REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

Na técnica de PCR em tempo real foram utilizados seis genes alvo, sendo genes da família do colágeno (COL1A1, COL1A2, COL3A1), genes da família da Matriz Metaloproteínase (MMP2) e genes da família dos Inibidores Teciduais das Metaloproteínases (TIMP1 e TIMP2) e três genes constitutivos (ACTB, HMBS e B2M) para serem utilizados como normalizadores. Os primers para a realização da PCR em tempo real foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0. Na Tabela 1 são apresentados os genes

contendo a sequência dos oligonucleotídeos (direto e reverso) e os números de acesso do GenBank das sequências utilizadas para os desenhos dos primers.

Tabela 1. Genes, número de acesso no GenBank e sequência dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Nome completo	Tamanho amplicon	Temperatura de Melting	Número de acesso no GenBank	Sequência dos Oligonucleotídeos Direto e Reverso
COL1A1	Colágeno I Alfa 1	70 pb	84 °C	NM_001034039	(D) 5'- TGGCCATCCAGCTGACTTTC - 3' (R) 5'- TTGCAGTGGTAGGTGATGTTCTG - 3'
COL1A2	Colágeno I Alfa 2	68 pb	79 °C	NM_174520	(D) 5'- GCCTATCCTTGATATTGCACCTTT - 3' (R) 5'- GGCCAATGTTCAATCTGATTCT - 3'
COL3A1	Colágeno III Alfa 1	68 pb	77 °C	NM_001076831	(D) 5'- ACACTCTTCCAATAACACTGCGTTA - 3' (R) 5'- AGCACCGTCATTGCTCTGAA - 3'
MMP2	Matriz Metaloproteinase 2	57 pb	80 °C	NM_174745	(D) 5'- AACCAAAGTCTGAAGAGCGTGAA - 3' (R) 5'- GCAGCCCAGCCAATCG - 3'
TIMP1	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 1	57 pb	83 °C	NM_174471	(D) 5'- TCATCCATCCCCTGCAAAC - 3' (R) 5'- CAGCTGGTCCGTCCACAAG - 3'
TIMP2	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 2	61 pb	82 °C	NM_174472	(D) 5'- ACTGGGTCACGGAGAAGAACA - 3' (R) 5'- CTCTTGATGCAGGCGAAGAAC - 3'
B2M	β - 2- microglobulina	109 pb	78 °C	NM_173893	(D) 5'- AGTAAGCCGACGTGGAGGT - 3' (R) 5'- CGCAAAACACCCTGAAGACT - 3'
ACTB	β - actina	66 pb	77 °C	AY141970	(D) 5'- CCTCACGGAACGTGGTTACA - 3' (R) 5'- TCCTTGATGTCACGCACAATTT - 3'
HMBS	Hidroximetilbilane sintase	80 pb	78 °C	BC108110	(D) 5'- CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG - 3' (R) 5'- AATGGTGAAGCCAGGAGGAA - 3'

A comparação da expressão dos genes estudados foi realizada pelo método de quantificação relativa em qPCR com a utilização da curva-padrão, sendo a expressão gênica diferencial entre os grupos definida pelo método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Na técnica do PCR em tempo real foi utilizada uma reação composta por 6,25 μ L do reagente 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,42 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso) específico para cada gene estudado, a uma concentração de 100 nM, 3 μ L de cDNA (sendo a concentração de 100 ng/ μ L, totalizando 300 ng de cDNA por reação) e água ultra-pura para completar o volume de 12,5 μ L para cada reação.

As reações foram conduzidas em aparelho Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e submetidas ao protocolo descrito a seguir: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento 60° C por 1 minuto. Após os ciclos de amplificação, foi adicionada uma etapa em temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos

da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Para cada gene estudado, foi construída uma curva-padrão específica.

2.7 ANÁLISE DE THRESHOLD E EFICIÊNCIA DAS CURVAS-PADRÃO

Os valores de Ct para cada gene foram obtidos pelo StepOne™ software v.2.2.2 (Applied Biosystems). As curvas-padrão foram ajustadas pelo threshold buscando o melhor r^2 e eficiência mais próxima de 100%. Foi realizada uma curva-padrão para cada gene a fim de se avaliar a eficiência da reação e de determinar um valor para o Ciclo Threshold (Ct) específico para cada gene.

2.8 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

Para se obter os valores da expressão relativa, os valores obtidos devem ser normalizados a partir de um gene constitutivo no intuito de corrigir os erros do procedimento experimental e que podem interferir nos resultados finais. Existem diversos softwares que foram desenvolvidos com a finalidade de se obter o melhor valor de estabilidade e desta forma indicar qual o melhor gene de referência. Dentre eles pode-se citar o geNorm® e NormFinder®.

O geNorm® desenvolve uma medida da estabilidade do gene para determinar a estabilidade de expressão dos genes controle, com base nos níveis de expressão não normalizados. Esta medida baseia-se no princípio de que a razão de expressão de dois genes ideais de controle interno é idêntico em todas as amostras, independente da condição experimental ou do tipo de célula. Desta maneira, a variação das proporções de expressão de dois genes controle reflete o fato de que um dos genes não é expresso constantemente, com variação crescente na proporção correspondente à redução da estabilidade de expressão (VANDESOMPELE *et al.* 2002).

Dessa forma, o geNorm® determina para cada gene controle a variação de expressão, medindo a estabilidade do gene, denominado M. Genes com os menores M têm a expressão mais estável. A exclusão gradual do gene com o mais alto valor de M resulta em uma combinação de dois genes controles expressos constitutivamente e que têm a expressão mais estável. O

geNorm® calcula automaticamente a medida de estabilidade M para todos os genes controle, elimina o gene controle com pior pontuação (isto é, aquele com o maior valor de M) e realiza um novo cálculo de novos valores de M para os genes restantes (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

O NormFinder® calcula automaticamente o valor de estabilidade do gene controle, medindo a variação de um gene endógeno e estabelecendo um ranqueamento entre os genes de referência, buscando o melhor gene endógeno, ou seja, aquele com menor variação (ANDERSEN *et al.*, 2004).

No presente estudo, com o auxílio do software GENEX®, os valores de Ct foram ajustados para eficiência de 100%. Com os resultados devidamente corrigidos para eficiência, foi feita uma análise para verificar o melhor gene normalizador. Para esta finalidade foi definido o valor de estabilidade de cada gene (HMBS, ACTB e B2M) utilizando-se os softwares geNorm® e NormFinder®. Posteriormente todos os genes em estudo foram normalizados com o melhor gene normalizador e a expressão gênica diferencial entre os grupos foi definida pelo método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado um modelo na qual foram considerados como efeito fixo a dieta e a idade dos animais, sendo a diferença estatística determinada pela análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).