

### Expressão de genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup>

Minos Esperândio Carvalho<sup>2</sup>, Gustavo Gasparin<sup>2</sup>, Saulo da Luz e Silva<sup>3</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>4</sup>, Gerson Barreto Mourão<sup>2</sup>, Luiz Lehmann Coutinho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado do primeiro autor do Programa de Pós-Graduação "Ciência Animal e Pastagem" – ESALQ-USP, Piracicaba, SP. Bolsista CNPq. e-mail: [minovisk@hotmail.com.br](mailto:minovisk@hotmail.com.br)

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, ESALQ-USP, Piracicaba, SP

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, - FZEA-USP, Pirassununga, SP

<sup>4</sup>Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP

**Resumo:** Dentre as características da carne, a maciez é a mais desejada pelo consumidor. Bovinos de origem *Bos taurus indicus* são conhecidos por produzirem carne de menor maciez quando comparado às raças de origem taurina. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão dos genes codificadores de proteínas da família "heat shock" (*CRYAB*, *HSPB1* e *DNAJ1*) em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A expressão do gene *CRYAB* foi associada à maciez aos sete ( $P=0,003$ ) e 14 dias ( $P=0,01$ ) de maturação, e do gene *HSPB1* associado à força de cisalhamento 24 horas ( $P=0,04$ ) após abate e aos 7 ( $P=0,003$ ) e 14 dias ( $P=0,003$ ) de maturação. Baseado nos resultados, é possível sugerir que os genes *CRYAB* e *HSPB1* podem ser potenciais marcadores de maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*, expressão gênica, Nelore, maciez

### Expression of gene associated with meat tenderness in Nellore Cattle

**Abstract:** Among the meat traits, tenderness is the most desirable by the consumer. *Bos taurus indicus* cattle origin are known to produce less tender meat when compared to taurine origin cattle breeds. The aim of the study was to evaluate the expression levels of genes that encode proteins from the "heat shock" family: *CRYAB*, *HSPB1* and *DNAJ1* in Nellore (*Bos taurus indicus*). The *CRYAB* gene expression was associated with the shear force to seven ( $P = 0.003$ ) and 14 days ( $p = 0.01$ ) ageing, and the gene associated with the shear force *HSPB1* 24 hours ( $P = 0.04$ ) after slaughter 7 ( $P = 0.003$ ) and 14 days ( $P = 0.003$ ) of maturation. As to gene expression *DNAJ1*, had no effect. Based on the results is possible to suggest that the differential expression of genes *CRYAB* and *HSPB1* may be potential markers to meat tenderness in Nellore.

**Keywords:** *Bos taurus indicus*, gene expression, Nelore, tenderness

### Introdução

A maciez da carne, mensurada através da força de cisalhamento (FC) é uma característica crítica, uma vez que está diretamente relacionada à satisfação do consumidor.

Alguns genes codificadores das proteínas da família "heat shock" estão descritos na literatura como tendo relação com a maciez da carne. Bernard et al. (2007) associaram a expressão do gene *DNAJ1* (*Dnaj homolog, subfamily A, member 1*) com a maciez da carne de bovinos de origem taurina. Esse gene é conhecido por ter função anti-apoptótica, o que poderia contribuir para retardar a morte celular durante a conversão do músculo em carne, e com isso influenciar a qualidade da carne no *post-mortem* (Bernard et al., 2007).

O gene *HSPB1* (*Heat shock protein beta 1*), é outro alvo importante por ser responsável pela resistência ao stress e organização da actina. Bernard et al. (2007) sugerem que a regulação da sua expressão pode estar associada à desorganização da actina e interferir na maciez da carne. Já o gene *CRYAB* (*Crystallin alpha B*) possui a função de proteger os filamentos intermediários e estabilizar as proteínas dos miofilamentos, como a desmina (WANG et al., 2003). Seu nível de expressão pode regular a estabilização dos filamentos intermediários e por conseguinte, também estar associado à maciez da carne (BERNARD et al., 2007). Assim, objetivou-se com este estudo relacionar o nível da expressão de genes envolvidos na proteção celular com os valores da força de cisalhamento, visando obter um melhor entendimento dos processos relacionados com maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

### Material e Métodos

**Animais avaliados.** Foram utilizados 66 animais da raça Nelore, com aproximadamente 24 meses de idade, criados a pasto e terminados em confinamento por 90 dias antes do abate. Os animais já haviam sido previamente genotipados para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST, localizados nos genes que codificam a calpaína e a calpastatina, respectivamente (Tabela 1). Uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* foi coletada logo após o abate e armazenada em nitrogênio líquido até ser processada. O RNA total foi extraído a partir da homogeneização do tecido em reagente Trizol<sup>®</sup>, segundo protocolo do fabricante. Depois de extraídas, as amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro e visualizadas em gel de agarose 1,5% para verificação da integridade do material. **Análise de maciez.** Foi realizada de acordo com o protocolo da AMSA (1995), em amostras coletadas do músculo *Longissimus dorsi*.

Tabela 1. Número de animais por genótipo

Marcadores		CAPN14751			UOGCAST		
Genótipo	CC	CT	TT	CC	CG	GG	
N	3	22	41	14	16	36	

**Avaliação da expressão gênica.** O cDNA foi sintetizado com o kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* da Roche<sup>®</sup> a partir de 1 µg de RNA total. A determinação da expressão dos genes-alvo (calpastatina e calpaína) e do gene referência *EEF-1* (*Eukaryotic elongation factor 1*) foi realizada por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento *LigthCycler 480* (Roche<sup>®</sup>) e reagente *SYBR<sup>®</sup> Green*. **Análise dos Resultados.** Os valores de expressão das amostras para os genes *DNAJ1*, *HSPB1* e *CRYAB* e *EEF-1* foram determinados em valores de Ct (*Threshold cycle* - ciclo de corte). As eficiências de amplificação das amostras para os genes foram determinadas através de transformação logarítmica da fluorescência das amostras na fase linear de amplificação pelo programa *LinRegPCR* e foram utilizadas para pré-ajustar os valores de Ct de cada uma das amostras. A normalização foi realizada utilizando-se o efeito aleatório de amostragem, obtido a partir dos genes alvo e referência. A análise de associação entre a maciez da carne e a expressão gênica foi feita usando um modelo misto considerando a maciez da carne como variável resposta, com os efeitos de abate e genótipos dos marcadores como fixos e o efeito de pai como aleatório.

### Resultados e Discussão

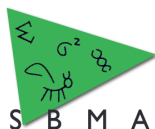
Os dados descritivos de FC com 0, 7 e 14 dias de maturação estão apresentados na tabela 2. As médias dos valores diminuíram ao longo das datas de análise, condizentes com o processo esperado de maturação, no qual a proteólise da carne no processo de maturação permite uma queda desse valor se o processo for satisfatório.

Tabela 2. Informações descritivas dos dados fenotípicos analisados

Características	MÉDIA*	DP <sup>4</sup>	MIN	MAX
FC0 <sup>1</sup>	10,16	2,23	3,35	15,65
FC7 <sup>2</sup>	8,69	2,16	4,06	13,88
FC14 <sup>3</sup>	6,98	2,03	3,82	13,23

\*valores em kgf, <sup>1</sup>FC0 = média do valor da força de cisalhamento no dia 0 pos abate, FC7 = média do valor de força de cisalhamento com 7 dias de maturação, FC14 = média do valor de força de cisalhamento com 14 dias de maturação e <sup>4</sup>DP = desvio padrão.

Para estimar os efeitos da expressão dos genes na maciez da carne foi realizada a verificação se havia efeito dos genótipos dos marcadores CAPN4751 e UOGCAST nos valores de maciez 24 horas



após abate, 7 e 14 dias de maturação. Foi observado efeito dos genótipos sobre maciez aos 7 dias de maturação do genótipo CC para o marcador CAPN4751e aos 14 dias de maturação do genótipo CC para o marcador UOGCAST1. Portanto, os genótipos dos marcadores foram incluídos nos modelos para análise de associação da expressão com a maciez. Na análise apresentada na Tabela 3, apenas a expressão de um gene foi considerado no modelo por vez. O gene DNAJA1 não apresentou efeito associado aos valores de FC. O gene *CRYAB* apresentou efeito associado à maciez aos 7 e 14 dias de maturação da carne, com estimativas positivas para aumento do *shear force* (Tabela 3). Esse resultado está de acordo com a hipótese de Morzel et al. (2007), em que, genes que possuem a função de proteger e manter a estabilidade dos filamentos intermediários (*CRYAB* e *HSPB1*), em especial do gene *CRYAB* de proteger a desmina, poderia no primeiro momento após abate retardar o início da proteólise, mas ao continuar o processo de proteólise na maturação da carne, a maior ação desse gene poderia ser benéfica por limitar a agregação dos filamentos intermediários no *pos mortem* e com isso favorecer a ação proteolítica nos agregados menores. A expressão do gene *HSPB1* teve um perfil semelhante a do gene *CRYAB*. No entanto, o efeito negativo na estimativa dos valores de FC 24 horas após abate da expressão do *HSPB1* foi significativo. Para o *shear force* 7 e 14 dias, o efeito foi igual ao da expressão do gene *CRYAB*. A expressão do gene *HSPB1* no tempo de 24 horas após o abate indica aumento nos valores da FC, mas posteriormente para 7 e 14 dias de maturação há um efeito oposto sobre a maciez, estando também de acordo com o reportado por Morzel et al., (2007) citado no parágrafo anterior, em que o *HSPB1* tem a função de proteger e estabilizar os miofilamentos, em específico do *HSPB1*, da actina (Bernard, et al., 2007), e portanto pode também favorecer a proteólise na maturação.

Tabela 3. Estimativas para FC baseada no Ct de cada gene, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez 0, 7 e 14 dias de maturação

Gene	FC0 <sup>1</sup>			FC7 <sup>2</sup>			FC14 <sup>3</sup>		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
<b>CRYAB</b>	-0,171	0,217	0,43	0,626	0,20	0,003*	0,475	0,19	0,01*
<b>DNAJA1</b>	0,003	0,13	0,98	-0,165	0,13	0,230	-0,106	0,12	0,39
<b>HSPB1</b>	-0,546	0,266	0,04*	0,782	0,25	0,003*	0,529	0,24	0,03*

<sup>1</sup>FC0 = força de cisalhamento no dia 0 pos abate, <sup>2</sup>FC7 = força de cisalhamento e com 7 dias de maturação e <sup>3</sup>FC14 = força de cisalhamento e com 14 dias de maturação.

### Conclusões

Os resultados de associação da expressão dos genes *CRYAB* e *HSPB1* com a FC, são os primeiros reportados em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Foi possível quantificar e observar a diferença de expressão dos genes citados para o fenótipo de FC. O efeito da maior expressão dos genes *CRYAB* e *HSPB1* está associado à maior maciez na carne aos 7 e 14 dias de maturação.

### Literatura citada

- AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of meat. Chicago: American Meat Science Association (1995).
- BERNARD, C. et al. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 55, p. 5229-5237, 2007.
- MORZEL, M. et al. Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, v. 78, p. 297-304, 2007.
- WANG, X. et al.  $\alpha$ B-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. **Circulation Research**, v. 93, p. 998-1005, 2003.