

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTENIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MINOS ESPERÂNDIO CARVALHO

**Caracterização da frequência de polimorfismos em genes
ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore**

Pirassununga – SP

2008

MINOS ESPERÂNDIO CARVALHO

Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Joanir Pereira Eler

Pirassununga – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

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

C331c	<p>Carvalho, Minos Esperândio Caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore / Minos Esperândio Carvalho – Pirassununga, 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Joanir Pereira Eler.</p> <p>Unitermos: 1. Calpaína 2. Calpastatina 3. Carne 4. Marcadores moleculares 5. Maciez 6. Nelore. I. Título.</p>
-------	--

AGRADECIMENTOS

Aqui vão meus agradecimentos a todos que me ajudaram até aqui, e aos que de alguma forma colaboraram para conclusão de mais etapa da vida.

Em primeiro lugar agradeço **meus pais e irmãos**, pelo apoio incondicional em todos os momentos do meu caminho, Obrigado!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Joanir Pereira Eler** por oferecer a oportunidade de aprendizagem, pela confiança depositada nos trabalhos, mesmo o incomodando nos momentos de muito trabalho e concentração!

Ao grande amigo, professor e também orientador **Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro**, que pouco me conhecendo, acolheu e abraçou responsabilidade de um trabalho sério e de resultados. Agradeço pelas piadas quando surgiam bons resultados, e pela força e incentivo quando esbarrava nas dificuldades. Ah! Também pela disposição em ajudar até mesmo quando se tornava pai de família, Valeu...

Ao Prof. **Dr. José Bento Sterman Ferraz** que sempre auxiliou no que estava ao seu alcance, e ao ser questionado sobre a viabilidade do projeto junto ao grupo de pesquisa, disse: “põe no papel que o projeto vai sair”...

A amiga e pesquisadora **Dr^a Luciana Correia de Almeida Regitano**, pelas grandes idéias e incentivo deste projeto, e sempre disposta a ajudar em momentos de dúvidas com sugestões práticas e eficientes...

Ao **Prof. Dr. Flávio Meirelles** por abrir as portas do laboratório para realização dos trabalhos e a aproximação dos grandes e competentes pesquisadores já citados acima.

A **Elisangela**, que mesmo ocupadíssima num feliz momento de sua vida, sempre se dispôs a ajudar em dúvidas e identificações nos bancos de dados, obrigado!!

A **Giovana**, que também cheia de trabalhos sempre esteve disposta a ajudar com sugestões de laboratório e nas compras de material de pesquisa, Grato!!

Ao **Fernando** por ajudar e esclarecer dúvidas nas técnicas de genotipagem, o que foi de muita valia, obrigado mesmo!

A **Rachel** por me incentivar e ajudar no possível, mesmo estando distante. As meninas, **Aline** são paulina roxa, a **Marina** pelo sempre bom humor, a super amiga **Ligia**, pelas “ratições” desde os tempos de graduação e informações de bastidores

haha!, a **Andrezza**, a **kika**, a **Sandra**, a **Jane**, a **Fernanda**, a **Heloísa**, pela ajuda nos estudos e no ótimo convívio!!

A todos os amigos **Cuccão**, **Preto**, **o Gordinho**, **Roulber**, **Chico**, **Saulo**, **Luis**, **Boi**, **Thiago**, **Marcos**, agradeço pelas ótimas conversas e pelo excelente convívio durante esse período.

Ao amigo e bolsista de iniciação **André Zica**, que também participou dos trabalhos, estando sempre pronto para empreitadas laboratoriais com hora para começar, mas sem hora para terminar, afinal *“o que é mais uma ferida para o leproso”*, não é André!!

A todos os amigos do Grupo de Melhoramento Animal gostaria de agradecer em especial, pois sem ajuda de vocês, tudo se tornaria mais difícil !!

A minha amiga e hoje **Dr^a Paula Ripamonte**, pelos primeiros conhecimentos e disciplina, adquiridos no laboratório, meus agradecimentos!!

Ao amigo Prof. **Dr. Gerson Barreto Mourão**, pelas conversas e esclarecimentos de dúvidas pertinentes ao estudo e vida acadêmica.

A FAPESP, por proporcionar minha bolsa de estudos, o apoio financeiro necessário para realização deste trabalho e também colaborar com minha formação acadêmica.

Ao frigorífico **Marfrig** por permitir a coleta de amostras e dispor de funcionários para auxiliar.

A empresa **Merial** por estar conduzindo trabalhos de pesquisas relacionados à qualidade de carne, e proporcionar ajuda na condução dos trabalhos.

RESUMO

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

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de utilização de marcadores moleculares em genes candidatos da calpaína (CAPN) e calpastatina (CAST) como ferramenta auxiliar para programas de melhoramento de características relacionadas ao crescimento e maciez da carne. Foram avaliados 605 bovinos da raça Nelore, pertencentes à Agropecuária CFM Ltda, com idade média ao abate de 24 meses. Após a extração do DNA de amostras de sangue, por desproteinização em presença de NaCl, a identificação e determinação do polimorfismo para os marcadores moleculares CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGACAST1, foi realizada pelo sistema de detecção TaqMan™ utilizando-se PCR em Tempo Real. A análise de maciez da carne, aos 7, 14 e 21 dias de maturação, foi realizada com amostras de carne do *Longissimus dorsi*, retiradas entre a 12^a e 13^a costela e cisalhadas utilizando-se um *Warner Bratzler Shear Force*. Nenhum efeito significativo dos marcadores avaliados foi observado para as características de crescimento. Foi verificado efeito significativo, em relação à maciez da carne, para os seguintes polimorfismos: aos 7, 14 e 21 dias de maturação para o marcador CAPN4751; aos 21 dias para o marcador CAPN4753 e aos 14 e 21 dias para o marcador UOGACAST1. Em relação aos efeitos das combinações genóticas para os marcadores dois a dois, os resultados foram significativos para a combinação CAPN4751/UOGACAST1 nos três tempos de maturação. Para a combinação de marcadores CAPN4753/UOGACAST1 também foram verificados resultados significativos para carnes maturadas aos 14 e 21 dias. Os resultados observados neste trabalho sugerem a possibilidade da utilização de seleção assistida por marcadores (MAS), visando o aumento da qualidade da carne em bovinos da raça Nelore.

Palavras Chaves: calpaína; calpastatina; marcadores moleculares; raça Nelore.

ABSTRACT

CARVALHO, M. E. **Polymorphism frequencies characterization in candidate genes for meat tenderness in Nellore beef cattle**. 2008. 56 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

The objective of this study was to evaluate the potential utilization of molecular markers on candidate calpain and calpastatin genes as an auxiliary tool for breeding programs on traits related to growth and meat tenderness. A total of 605 Nellore animals, raised by CFM Agro-pecuária Ltda, were used in this study and slaughtered with 24 months in average. After DNA blood samples extraction, by desproteinization in presence of NaCl, the polymorphism (CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 and UOGCAST1) identification and determination was realized by TaqMan™ detection system using real time PCR. The meat tenderness analysis, at the 7, 14 and 21 days of maturation was realized with *Longissimus dorsi* meat samples, taken at the 12th and 13th rib interval and *Warner Bratzler Peak Shear Force* measurements were used. There were no significant effects of molecular markers in growth traits. There were significant effects, regarding to meat tenderness, for following polymorphisms: at 7, 14 and 21 days of maturation, for CAPN4751 marker; at 21 days of maturation, for CAPN4753, and finally, at 14 and 21 days of maturation, for UOGCAST1 marker. In respect to genotypic combination effects analysis for pair-wise marker, the results were significant for CAPN4751/UOGCAST1 in three days of maturation. In combination effects for CAPN4753/UOGCAST1 markers, significant effects were also observed for meat tenderness at 14 and 21 days. Theses results suggest that marked selection assisted (MAS) can be used to improve meat quality in Nellore beef cattle.

Key words: calpain; calpastatin; molecular markers; Nellore beef cattle .

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Produção Nacional e a Raça Nelore.....	2
2.2. Maciez da Carne e o Sistema Proteolítico das Calpaínas e Calpastatina.....	4
2.3. Marcadores Moleculares no Gene da Calpaína e da Calpastatina....	7
3. OBJETIVOS	11
4. HÍPOTESES	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1. Animais avaliados e extração de DNA das amostras de sangue.....	13
5.2. Distribuição da progênie por reprodutor.....	14
5.3. Amplificação e identificação dos polimorfismos.....	14
5.4. Descrição dos genes investigados.....	16
5.5. Coleta de Amostras de carne para análise da maciez (Shear force). ..	17
5.6. Análises de maciez da carne.....	19
5.7. Caracterização das informações fenotípicas avaliadas e da estrutura genética da população.....	21
5.8. Efeito dos marcadores SNP sobre a maciez da carne	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6.1. Caracterização das informações fenotípicas avaliadas.....	23
6.2. Estrutura genética da população para os marcadores avaliados.....	25
6.3. Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição para os marcadores nas características de desenvolvimento ponderal.....	28
6.4. Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição para os marcadores na característica maciez de carne.....	29

ÍNDICE

	Página
6.5. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de desenvolvimento ponderal e de maciez da carne	33
6.5.1. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de desenvolvimento ponderal.....	33
6.5.2. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de maciez da carne.....	36
6.6. Efeito das combinações genóticas dos marcadores SNP sobre a maciez da carne.....	40
6.6.1. Efeito das combinações genóticas para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 obtidos em análises simultâneas.....	40
6.6.2. Efeito das combinações genóticas para os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1 obtidos em análises simultâneas.....	43
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Representação de um sarcômero.....	5
Figura 2 - Localização genômica dos marcadores SNP no gene CAPN1.....	8
Figura 3 - Extração de DNA de cartões através da retirada de fragmento de cartão contendo amostra de sangue impregnado com o auxílio de lâmina de bisturi.....	13
Figura 4 - Extração de DNA de cartões através de precipitação em NaCl.....	14
Figura 5 - Equipamento ABI Prism® 7500 <i>Sequence Detection System</i> (Applied Biosystems) utilizado para PCR em tempo real.....	14
Figura 6 - Resultado de discriminação alélica por classificação automática. Os pontos verdes representam indivíduos heterozigotos para o polimorfismo em questão, o ponto vermelho e os pontos azuis representam os indivíduos homozigotos para ambas formas alélicas. Os sinais em X representam amostras que não amplificaram suficientemente e o retângulo cinza representa o teste negativo NTC.....	15
Figura 7 - Carcaças identificadas em resfriamento.....	17
Figura 8 - Corte transversal do longissimus dorsi (contra filé) identificado para o corte dos bifes.....	18
Figura 9 - Coleta dos três bifes de 2,5 cm de espessura do músculo <i>Longissimus dorsi</i> , entre a 12 ^a e 13 ^a costela em direção caudal. As etiquetas com cores distintas indicaram os dias de maturação (branco=7 dias de maturação; rosa=14 dias de maturação e verde 21 dias).....	18
Figura 10 - Forno utilizado para cocção das amostras até 72°C	19
Figura 11 - Detalhe dos bifes sendo deixados à temperatura ambiente, em sala climatizada a \pm 21°C, por 2 horas, a fim de resfriarem.....	20

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 12 - Cilindros do músculo <i>Longissimus dorsi</i> cisalhados no Warner Bratzler Shear Force (WBSF).....	20
Figura 13 - Distribuição para variável MAC7D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.....	24
Figura 14 - Distribuição para variável MAC14D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.....	24
Figura 15 - Distribuição para variável MAC21D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.....	25
Figura 16 - Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4751 para 14 dias de maturação da carne.....	30
Figura 17 - Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4751 para 21 dias de maturação da carne.....	31
Figura 18 - Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4753 para 21 dias de maturação da carne.....	31
Figura 19 - Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador UOGCAST1 para 14 dias de maturação da carne.....	32
Figura 20 - Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador UOGCAST1 para 21 dias de maturação da carne.....	32
Figura 21 - Médias de quadrados mínimos para pesos a desmama, aos 18 meses e ganho de peso até 345 dias pós desmama dos indivíduos, em cada genótipo para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 22 - Médias de quadrados mínimos para pesos a desmama, aos 18 meses e ganho de peso até 345 dias pós desmama dos indivíduos, em cada genótipo para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1	39
Figura 23 - Estimativas dos efeitos de <i>Shear force</i> para as combinações genótípicas dos marcadores CAPN4751 e UOCAST1 para 7, 14 e 21 dias de maturação da carne	42
Figura 24 - Estimativas dos efeitos de <i>Shear force</i> para as combinações genótípicas dos marcadores CAPN4753 e UOCAST1 para 7, 14 e 21 dias de maturação da carne	44

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Marcadores investigados, número de acesso no GenBank, bem como as respectivas referências.....	16
Tabela 2- Descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos, exons e introns, inversão de nucleotídeos, bem como suas posições.....	16
Tabela 3- Seqüência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (<i>primers</i>) para cada marcador estudado.....	17
Tabela 4- Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação, mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas.....	23
Tabela 5- Freqüências genóticas observadas para os marcadores avaliados em bovinos da raça Nelore.....	26
Tabela 6- Freqüências alélicas estimadas para os marcadores avaliados em bovinos da raça Nelore.....	27
Tabela 7- Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição.....	29
Tabela 8- Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição.....	30
Tabela 9- Estimativas de médias de quadrados mínimos (LSM) e os erros padrão (EP), bem como, os valores de probabilidade observados nos testes F associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores avaliados para características de desenvolvimento ponderal.....	33
Tabela 10- Estimativas de médias de quadrados mínimos (LSM) e os erros padrão (EP), bem como, os valores de probabilidade observados nos testes F associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores avaliados para características à maciez aos 7, 14 e 21 dias de maturação.....	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 11- Distribuição dos animais (N), estimativas para os contrastes (EST) e os erros padrão (EP) associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4751 e UOGCAST1, avaliados simultaneamente, para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias.....	41
Tabela 12- Distribuição dos animais (N), estimativas para os contrastes (EST) e os erros padrão (EP) associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4753 e UOGCAST1, avaliados simultaneamente, para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias.....	43
Tabela 13- Distribuição das progênes por reprodutores.....	55

1. INTRODUÇÃO

O rebanho efetivo de bovinos no Brasil em 2005, segundo o MAPA (2008), contava com aproximadamente 207 milhões de cabeças, efetivo este que colocou o Brasil como o maior rebanho comercial do mundo. A origem *Bos indicus* neste efetivo, chega a representar 80% dos animais criados no Brasil, os quais têm sido preferidos nas regiões tropicais, devido a sua resistência às doenças e grande tolerância ao calor.

Entretanto, em relação à característica maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal. Particularmente neste aspecto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à redução da variação da maciez da carne. Trabalhos têm evidenciado que as proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *pos mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez da carne. Todavia, a dificuldade em obter dados fenotípicos relacionados à maciez, constitui o principal entrave da seleção e, por esse motivo, o melhoramento genético para essa característica foi, até agora, muito pouco trabalhado. A Seleção Assistida por Marcadores (MAS) possui grande potencial para melhorar características historicamente relatadas como de difíceis mensurações. Recentemente, alguns marcadores do gene da calpaína (CAPN) e da calpastatina (CAST), denominados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) já foram analisados e polimorfismos foram associados favoravelmente com maciez da carne bovina.

Assim, face à escassez de informações a respeito do potencial da utilização de marcadores moleculares e da caracterização da frequência de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em animais da raça Nelore, este estudo teve como objetivos principais à caracterização das frequências de polimorfismos em genes candidatos relacionados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore, bem como, associar os genótipos para os diferentes marcadores, com a maciez da carne e algumas características de desenvolvimento ponderal comumente avaliadas em programas de melhoramento de bovinos da raça Nelore.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção Nacional e a Raça Nelore

O rebanho efetivo de bovinos no Brasil em 2006, contava com aproximadamente 165 milhões de cabeças, segundo o ANUALPEC (2007). Este efetivo qualificou o Brasil como o maior rebanho comercial do mundo. Estima-se que a produção brasileira foi de 9,9 milhões de toneladas de equivalente carcaça em 2006 e produzirá 13,2 milhões de toneladas em 2017 (MAPA, 2007). Todavia, deste volume, o mercado interno consome aproximadamente 75%, sendo 25% destinados ao mercado externo.

O Brasil é hoje o maior exportador de carne bovina no mundo, seguido de países como: Austrália, Índia, Nova Zelândia e Estados Unidos (ANUALPEC, 2007). A projeção do MAPA em 2007, é que até o ano de 2017 o Brasil se mantenha como o maior produtor de carne mundial. Este panorama tem provocado mudanças de rumos nos conceitos e critérios de seleção de animais geneticamente superiores, os quais podem ser demonstrados pela preocupação por parte dos criadores em adotar e/ou participar de algum dos programas de melhoramento e avaliações genéticas de bovinos de corte no Brasil.

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

Os animais *Bos indicus* têm sido preferidos nas regiões tropicais devido à sua resistência às doenças e grande tolerância ao calor. Tal fato culmina numa pecuária nacional dominada pelos animais de origem *Bos indicus*, em especial a raça Nelore e seus cruzamentos. Segundo Santiago (1985), tanto nos plantéis altamente selecionados, como nas criações em regime extensivo, os representantes da raça Nelore normalmente superam os concorrentes de outras raças indianas, no que se refere à resistência, rusticidade, prolificidade e precocidade. A abrangência de animais zebuínos, termo zootécnico utilizado para animais de origem *Bos indicus*, chega a ser 80% da produção brasileira.

Na história evolutiva, tem-se que as subespécies, *Bos taurus* e *Bos indicus* fazem parte do gênero *Bos*. Del Lama em 1991 classificou os *Bos taurus* como

bovinos europeus sem cupim, e os *Bos indicus*, bovinos indianos ou africanos portadores do cupim, corcova dorsal utilizada como reserva energética pelos animais.

Em relação à característica maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal (CROUSE et al., 1989). A questão da pior textura da carne dos animais de origem *Bos indicus*, quando comparados com animais *Bos taurus*, não é nova e já foram bem reportadas nos trabalhos de RAMSEY et al. (1963), SHACKELFORD et al. (1991) e GALLINGER et al. (1992).

O menor nível enzimático das calpaínas e o maior nível da calpastatina em animais *Bos indicus*, seria umas das razões para menor maciez da carne nesses animais (WHIPPLE et al., 1990). Também foram descritas as relações de maior porcentagem de genes de origem *Bos indicus*, com a menor maciez da carne maturada (CUNDIFF et al., 1993; WHEELER et al., 1994).

O'Connors et al. (1997) comparando animais indicus compostos com animais taurus quanto à maciez, observaram maior maciez da carne em animais taurus. Os autores ainda sugeriram que o uso de genética *Bos indicus* não deveria ultrapassar de 25%, com vista a obter carne de maior maciez.

No Brasil, a grande diversidade da raça Nelore é resultado da sua própria origem, formada pela fusão de raças indianas, pelos diferentes ambientes geográficos e pelas atitudes dos criadores, que possuem pontos divergentes ao selecionar (SANTIAGO, 1985). Para Andersson (2001), a seleção entre os próprios animais zebuínos é interessante, pois o rebanho base apresenta uma elevada variação fenotípica e, conhecer as bases genéticas da variação do fenótipo pode contribuir em muito para a seleção. Este conceito passa a ser mais fundamentado, depois dos resultados obtidos por Hadlich et al. (2006), que observaram maciez desejável na carne, de animais jovens da raça Nelore com apenas sete dias de maturação.

Portanto, a avaliação da existência de variabilidade para característica maciez dentro da raça Nelore, seria uma forte justificativa para seleção e melhoramento da mesma, a despeito da dificuldade de obtenção das informações fenotípicas.

2.2. Maciez da Carne e o Sistema Proteolítico das Calpaínas e Calpastatina

A maciez da carne (*shear force*) é uma característica crítica, uma vez que está diretamente relacionada à satisfação do consumidor. Dentre as características ligadas à qualidade da carne *in natura*, a maciez se destaca por ser a mais desejada pelo consumidor (KOOHMARAIE et al., 2002). Koohmaraie (2003) descreve que 46% das variações na maciez da carne se devem à genética do animal e 54% a variações ambientais, quando comparadas raças diferentes. Dentro de raça, a genética seria responsável por 30% da variação. Particularmente neste aspecto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à redução da variação da maciez da carne (PAGE et al., 2004).

A maciez da carne pode ser avaliada pela análise sensorial, medida subjetiva e realizada por degustadores, bem como, pela força mecânica de cisalhamento, medida objetiva e realizada pelo aparelho *Warner Bratzler*, como descrito por Wheeler et al. (1995), sendo ambos os métodos altamente correlacionados. Outra forma para se avaliar a maciez é a partir do índice de fragmentação miofibrilar (MFI), em que maiores valores indicam maior fragmentação miofibrilar, e portanto, seria um indicador de maior maciez (CULLER et al., 1978).

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

As calpaínas existem em pelo menos duas formas, calpaínas I e II, que são inibidas por uma terceira proteína: calpastatina. As calpaínas também são referidas por μ -calpaínas e m-calpaínas. Essa diferenciação ocorre pelo fato delas necessitarem de concentrações micromolares e macromolares de íons cálcio para sua ativação, respectivamente (MURACHI et al., 1981).

A ação destas enzimas tem despertado grande interesse, visto que a característica da maciez da carne é uma das mais importantes dentre os atributos da qualidade sensorial da carne bovina (MORGAN, 1992; KOOHMARAIE, 1994). Koohmaraie (1996) reporta que a protease μ -calpaína degrada as proteínas miofibrilares do músculo no *pos mortem* e que, este fato por si só, já justificaria ser um dos mais importantes alvos na investigação para entendimento do complexo mecanismo que estaria associado à característica maciez.

De uma forma mais pontual, Penny e Dransfield (1979) e, mais tarde, Nishimura, Hattori e Takahashi (1996) demonstraram que, durante o condicionamento dos músculos bovinos, a troponina T sofre proteólise, com produção concomitante de quatro peptídeos. Anteriormente, Locker (1976) demonstrou que as calpaínas degradam também os “filamentos do espaço vazio”, descritos por Maruyama et al. (1979), como sendo a conectina e titina. Assim, quando os músculos estirados são maturados, o cozimento subsequente provoca o desaparecimento dos “filamentos do espaço vazio”, enquanto as linhas Z aparecem intactas (DAVEY e GRAAFHUIS, 1976b). A linha Z é formada por um padrão característico em zigzag da proteína de actina (GUIMARÃES e ADELL, 1995). É importante salientar que o sistema calpaína não tem ação sobre a actina ou a miosina em si (PENNY, 1974; ROBSON et al., 1974). De acordo com Lawrie (2004), os sítios estruturais importantes para ação das enzimas calpaínas são: a troponina T (pH acima de 6); a desmina; a conectina e titina (filamentos dos espaço vazio), as proteínas da linha “M” e a tropomiosina. A Figura 1 ilustra um sarcômero e alguns de seus filamentos proteicos.

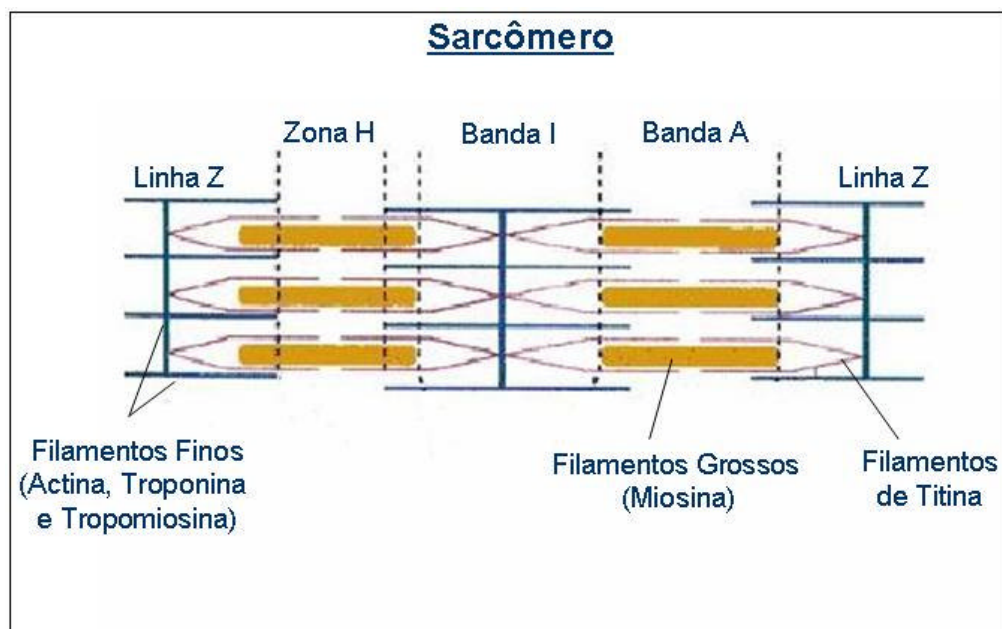


Figura 1. Representação de um sarcômero.

Um dos modelos aceitos para elucidar a ação reduzida das calpaínas, seria com o pH até 6,1, em que as calpaínas estão ligadas ao seu inibidor, a calpastatina, mas esta ação inibitória diminui à medida que o pH reduz. Quando o pH cai de 6,0

para 5,5, estas calpaínas ativadas hidrolisam a calpastatina. O amaciamento é devido, no início, à ação da calpaína I. Subseqüentemente, a calpaína II é a responsável, e o amaciamento cessa à medida que as calpaínas entram em autólise (DRANSFIELD, ETHERINGTON e TAYLOR, 1992; DRANSFIELD, 1993). Dransfield (1994) reporta que a ação proteolítica das calpaínas enfraquece a interação dos filamentos finos no disco Z, do sarcolema das fibras musculares. Hughes et al. (2001), relatam que a ação das calpaínas ocorre nas proteínas tropomiosina, desmina, titina, nebulina, filamina e troponina T, onde encontram seu sítio de ligação específico.

A calpastatina, enzima inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *postmortem* (KOOHMARAIE, 1988). As seqüências helicoidais da calpastatina impedem as calpaínas de se ligarem às membranas (MELLGREN, LANE e MERICLE, 1989). No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (MORGAN et al., 1993). Ainda com relação à atividade da calpastatina, Pringle et al. (1997) observaram o aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos.

Riley et al. (2003), avaliaram 87 progênies de 9 reprodutores da raça Brahman e constataram efeitos significativos da fonte de variação reprodutor para atividade da μ -calpaína ($P=0,040$), atividade da calpastatina ($P=0,002$), índice de fragmentação de miofibrila aos 14 dias de maturação ($P=0,020$), força de cisalhamento aos 7 dias de maturação ($P=0,050$) e força de cisalhamento aos 14 dias de maturação ($P=0,040$). Os autores concluíram que diferenças na atividade da μ -calpaína no *pos mortem* podem ser usadas como alternativa nos programas de melhoramento para característica de maciez da carne.

Geesink et al. (2006) afirmaram que a μ -calpaína é a principal enzima proteolítica responsável pela proteólise miofibrilar *pos mortem* e, juntamente com as demais proteínas, deveriam ser o foco de futuras pesquisas para o entendimento do processo de maciez da carne.

Smith et al. (2000) relataram a identificação do gene da protease neutra ativada por cálcio (CAPN), o qual codificaria a enzima proteolítica μ -calpaína no cromossomo 29. Bishop et al. (1993) relataram a identificação do gene da calpastatina no cromossomo 7. Tal fato, e a função fisiológica dessas enzimas,

torna-os genes candidatos para pesquisas ligadas à qualidade de carne, visando a seleção de animais superiores para tais características.

2.3. Marcadores Moleculares no Gene da Calpaína e Calpastatina

No Brasil, as iniciativas de utilização de marcadores moleculares associadas a QTLs (*loci* que afetam características quantitativas) em bovinos de corte, foram reportadas por Machado et al. (2003) que trabalharam com bovinos da raça Canchim, Vasconcellos et al. (2003) com Aberdeen Angus, Paro de Paz et al. (2004), com bovinos F₁ Canchim-Nelore, Angus-Nelore e Simental-Nelore, Pereira et al. (2005) também com a raça Canchim e Marson et al. (2005) avaliando populações compostas. Verifica-se, que a maioria destes trabalhos, independente das características avaliadas, foram realizados com populações sintéticas, *Bos taurus*, F₁'s e compostas, não sendo ainda relatadas na literatura informações pormenorizadas em animais *Bos indicus*, principalmente relacionadas à raça Nelore.

White et al. (2005) destacaram que, a dificuldade em se obter dados fenotípicos relacionados à maciez, seria o principal entrave da seleção e, por esse motivo, o melhoramento genético para essa característica foi, até agora, muito pouco trabalhado. Entretanto, com o desenvolvimento de biotecnologias, estão sendo disponibilizadas ferramentas para elucidar o controle genético de características quantitativas complexas, como é o caso das características de difícil mensuração. Várias ferramentas tem sido propostas visando a identificação, desde regiões cromossômicas associadas a QTLs, até mutações funcionais (causais). Neste contexto, a genética molecular surge como complemento aos métodos tradicionalmente empregados, viabilizando a utilização da seleção assistida por marcadores (MAS), para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento.

Estudos recentes mostram que a seleção assistida por marcadores possui grande potencial para melhorar características historicamente relatadas como de difíceis mensurações (WHITE et al., 2005). Os marcadores moleculares denominados SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são a forma mais freqüente de variação de DNA em mamíferos e possuem características favoráveis em relação à sua determinação, pois são abundantes, geralmente envolvem dois alelos e são facilmente detectáveis por método automático adequado (HOCQUETTE et al., 2007).

Alguns marcadores SNP do gene CAPN já foram analisados e associados com maciez, como o CAPN316 e CAPN530, os quais produzem substituições dos aminoácidos Glicina/Alanina posição 316 e Valina/Isoleucina na posição 530, e particularmente nos exons 9 e 14, respectivamente, como reportado por Page et al, (2002), em populações de origem *Bos taurus*.

Os polimorfismos verificados por Page et al. (2002) apresentaram resultados significativos em relação à maciez e confirmaram a existência de QTL para alelos favoráveis em duas populações distintas anteriormente estudadas por Casas et al., (2000) e Morris et al. (2001). Posteriormente, Casas et al. (2005) avaliaram os marcadores CAPN316, CAPN4753 e CAPN5331, em população de animais da raça Brahman, verificando a baixa frequência na segregação do CAPN316, associadas, porém, significativamente ($P=0,023$) com maciez. Para os marcadores CAPN4753 e CAPN5331, estes mesmos autores relataram resultados não significativos ($P=0,460$ e $P=0,199$, respectivamente), sendo considerados não informativos.

White et al. (2005) avaliaram a utilização dos marcadores CAPN316, 530, 5331, 4753 e 4751 em 504 progênies de 22 reprodutores da raça Brahman e duas populações de cruzados *Bos taurus* e *Bos indicus*, oriundas dos ciclos 7 (N=554 progênies de 149 reprodutores) e 8 (N=597 progênies de 127 reprodutores) pertencentes ao Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em Clay Center/Nebraska. A Figura 2 ilustra o posicionamento genômico dos marcadores SNP no gene CAPN1.

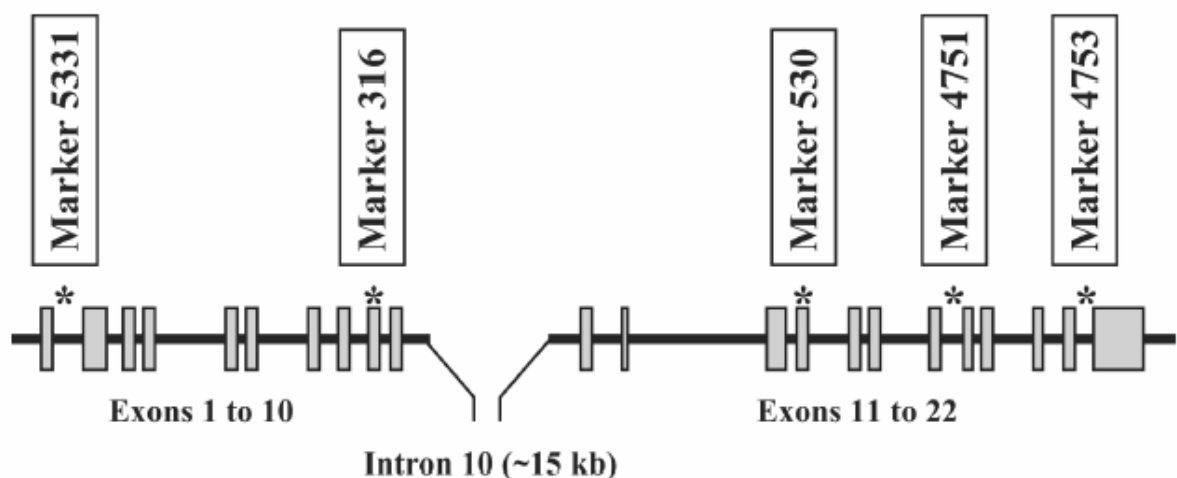


Figura 2. Localização genômica dos marcadores SNP no gene CAPN1 (WHITE et al., 2005).

Na população Brahman avaliada, o marcador CAPN530 foi considerado pouco informativo. O marcador CAPN316 não segregou apreciavelmente na raça Brahman, sugerindo os autores sua utilização em populações com pouca influência *Bos indicus*. Após trabalhar com animais de origem *Bos taurus*, Corva et al. (2007) relataram resultados significativos para os dois marcadores, em carne não maturada. Para o marcador CAPN4751, verificou-se resultados significativos ($P=0,015$) relacionados à maciez para todas as populações avaliadas. Ainda no mesmo estudo, White et al. (2005) analisaram os marcadores CAPN5331 e CAPN4753, demonstrando resultados informativos e significativos nas populações oriundas dos ciclos 7 e 8.

Para animais da raça Brahman, Casas et al. (2005) verificaram efeitos significativos para a segregação do marcador CAPN5331, mas nenhuma relação com maciez (*shear force*) foi observada. Na análise do marcador CAPN4753, White et al. (2005) observaram a segregação com o alelo "A" com frequência de 6,1% e associação significativa com *shear force* ($P=0,041$) nas populações compostas. Para o marcador CAPN4751, na posição equivalente a 6545 (C/T), os autores observaram segregação em animais de origem *taurus*, *indicus* e ainda nos cruzados. Para este marcador em especial, resultados significativos foram detectados em todas as populações avaliadas para *shear force*, com o alelo C sendo favorável para essa característica.

Schenkel et al. (2006) associaram genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOGCAST1) com a maior maciez da carne, quando o alelo favorável C substitui o alelo G. Por ser um inibidor específico das calpaínas, o aumento da atividade da calpastatina é correlacionado com a redução da maciez da carne (KOOHMARAIE et al., 1995; PRINGLE et al., 1997).

Casas et al. (2006) embasados na relação calpaína/calpastatina, demonstraram a interação dos possíveis genótipos entre marcadores genéticos existentes no gene da calpaína (CAPN) e a calpastatina (CAST), os quais influenciaram significativamente a maciez da carne bovina. Os autores trabalharam com os mesmos dados fenotípicos de White et al. (2005), porém utilizando somente as populações dos Ciclos 7 e 8, e a população Brahman (STARS) referentes ao Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em *Clay Center/Nebraska*. O marcador para o gene da calpastatina foi associado

significativamente ($P < 0,01$) com força de cisalhamento (*shear force*) aos 14 dias de maturação e escores de maciez avaliados por análise sensorial. O marcador do gene da calpaína utilizado, CAPN4751 com alteração de base na posição 6545 (C/T), foi associado significativamente ($P < 0,05$) com escores de maciez, suculência e sabor/aroma (*flavor*) para as populações do ciclo 7 e 8. Não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as características da análise sensorial para a população Brahman avaliada. Nas análises de interação entre os genes da calpaína e calpastatina, resultados significativos foram observados apenas para a população do Ciclo 8, para a característica força de cisalhamento aos 14 dias de maturação.

Van Eenennaam et al. (2006) avaliaram populações oriundas do Projeto de Mérito de Carcaças Americano, com o uso dos marcadores da μ -calpaína CAPN316 e CAPN4751 em animais Brahman, Hereford, Angus, F1 Charolês-Angus, dentre outros e observaram resultados significativos ($P < 0,01$).

Recentemente, Barendse et al. (2007) avaliaram marcadores SNP relacionados à calpaína e calpastatina em diferentes raças de bovinos de corte. Foram avaliados dois marcadores moleculares associados à calpaína (CAPN1c947 e CAPN1g6545) e cinco à calpastatina (CASTc143, CASTc155, CASTc856, CASTc1487 e CASTc2832). Para os marcadores relacionados à calpaína CAPN1c947 e CAPN1g6545 foram verificados efeitos significativos ($P < 0,01$) entre os genótipos avaliados. Para CAPN1c947, que é correspondente ao CAPN316 reportado por Page et al. (2002), os efeitos de redução no *shear force* (em kg) entre os genótipos avaliados foram C/C=-0,16, C/G=-0,04 e G/G=0,05, respectivamente. Para CAPN1g6545, que é correspondente ao CAPN4751 relatado por White et al. (2005) e o mesmo utilizado neste estudo, os efeitos de redução no *Shear force* (em kg) entre os genótipos avaliados foram C/C=-0,08, C/T=-0,02 e T/T=0,14, respectivamente.

3. OBJETIVOS

- (i) Caracterizar as frequências de polimorfismos em marcadores dos genes candidatos da calpaína e da calpastatina, relacionados à maciez da carne, em bovinos da raça Nelore;

- (ii) Relacionar os genótipos dos diferentes marcadores com a maciez da carne e algumas características avaliadas de desenvolvimento ponderal, em bovinos da raça Nelore.

4. HIPÓTESES

As hipóteses relacionadas às características de desenvolvimento ponderal foram:

H₀: As frequências dos polimorfismos nos genes da μ -calpaína e da calpastatina, não influenciam significativamente as características de desenvolvimento ponderal em animais da raça Nelore;

H₁: As frequências dos polimorfismos nos genes da μ -calpaína e da calpastatina influenciam significativamente as características de desenvolvimento ponderal em animais da raça Nelore;

As hipóteses relacionadas à característica da maciez da carne maturada aos 7, 14, e 21 dias foram:

H₀: As frequências dos polimorfismos nos genes da μ -calpaína e da calpastatina, não influenciam significativamente a maciez da carne em animais da raça Nelore;

H₁: As frequências dos polimorfismos nos genes da μ -calpaína e da calpastatina, não influenciam significativamente a maciez da carne em animais da raça Nelore;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais avaliados e extração de DNA das amostras de sangue

Os animais utilizados na extração de DNA e amostras de carne para as análises de maciez foram provenientes das fazendas pertencentes à empresa Agropecuária CFM Ltda. O rebanho está localizado na região oeste do Estado de São Paulo. Os dados referentes às características de desenvolvimento ponderal foram obtidos junto ao Laboratório de Melhoramento Genético *Drº Gordon Dickerson*, pertencente ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (ZAB-FZEA/USP), em Pirassununga, São Paulo.

Foi extraído o DNA de 605 progênies (machos), a partir de amostras de sangue coletados com EDTA e de sangue impregnadas em cartões FTA (Figura 3), empregando-se o método de extração e precipitação em NaCl (Figura 4), seguindo o protocolo descrito por Olerup e Zetterquist (1992).

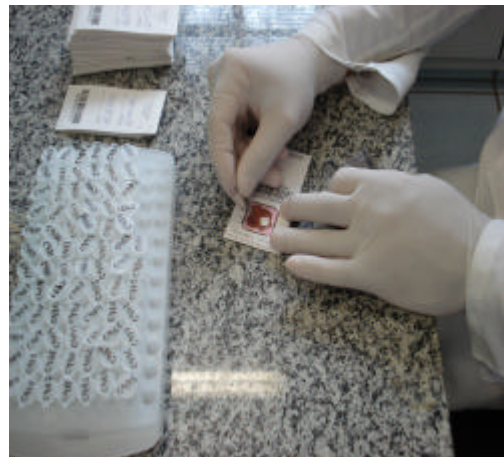


Figura 3. Extração de DNA por meio da retirada de fragmento de cartão, contendo amostra de sangue impregnado com o auxílio de lâmina de bisturi.

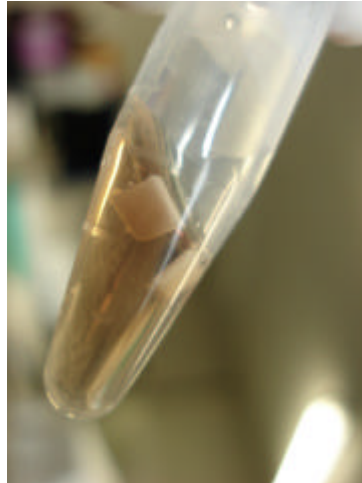


Figura 4. Extração de DNA de cartões a partir da precipitação em NaCl

5.2. Distribuição da progênie por reprodutor

O número de reprodutores e a distribuição da progênie por reprodutor, que contempla os animais que foram avaliados estão na Tabela 13 (ANEXO 1). A distribuição mínima determinada pelo presente estudo foi de três descendentes por reprodutor.

5.3. Amplificação e identificação dos polimorfismos

A caracterização e determinação dos 605 genótipos para cinco marcadores, dos cinco polimorfismos SNP avaliados, foi realizada por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* da *Applied Biosystems* (Figura 5).

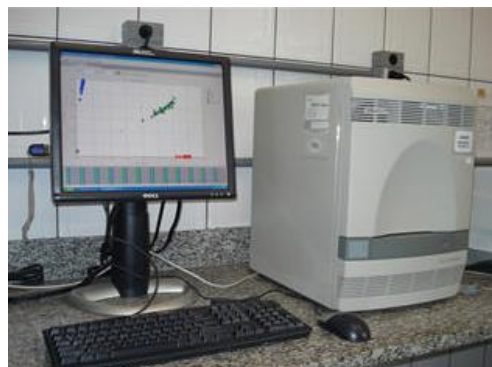


Figura 5. Equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) utilizado para PCR em tempo real

Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan™ em que *primers* e sonda que pareiam na região alvo do DNA, permitem a identificação dos diferentes alelos.

Foram sintetizadas sondas de forma a parear seletivamente no DNA molde onde se encontra o polimorfismo de interesse. Os polimorfismos já descritos em outras populações por estudos anteriores são alvo das sondas, que possuem a seqüência depositada no *GenBank*, junto de seus respectivos *primers*. A proporção de indivíduos heterozigotos e homozigotos para um de seus genótipos são estimadas por meio das leituras de fluorescências das sondas (Figura 6).

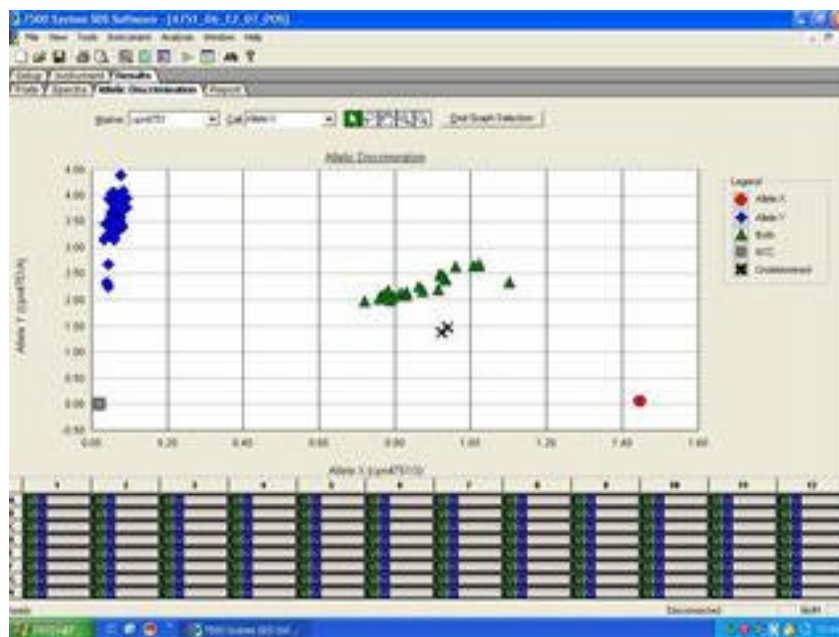


Figura 6. Resultado de discriminação alélica por classificação automática. Os pontos verdes representam indivíduos heterozigotos para o polimorfismo em questão, o ponto vermelho e os pontos azuis representam os indivíduos homozigotos para ambas formas alélicas. Os sinais em X representam amostras que não amplificaram suficientemente e o retângulo cinza representa o teste negativo NTC.

Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 15 ng de DNA, para uma reação de 10 µl, contendo 0,25 µl de Assay Mix® (*Applied Biosystems*), 5,0 µl de Taqman® Marter Mix Univerisal PCR (*Applied Biosystems*) em 10 minutos a 95° C e 45 ciclos de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C.

5.4. Descrição dos genes investigados

Dos cinco marcadores do gene da μ -calpaína inicialmente selecionados para o estudo, quatro permaneceram no estudo e um foi substituído pelo marcador associado à calpastatina. Os marcadores utilizados são apresentados na Tabela 1, os quais foram previamente escolhidos em virtude dos relatos de Casas et al (2005), White et al (2005) e Schenkel et al. (2006). A descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos, exons e introns, inversões de nucleotídeos, bem como suas posições estão na Tabela 2. Os *primers* e sondas a serem utilizados na amplificação e discriminação alélica, respectivamente, estão na Tabela 3.

Tabela 1. Marcadores investigados, número de acesso no GenBank, bem como as respectivas referências

Marcadores	Nº de acesso no GenBank	Referências
CAPN 316	AF252504	CASAS et al (2005)
CAPN 530	AF248054	CASAS et al (2005)
CAPN 4751	AF248054	WHITE et al (2005)
CAPN 4753	AF248054	CASAS et al (2005)
UOGCAST1	AY008267	SCHENKEL et al (2006)

Tabela 2. Descrição dos marcadores investigados, seus respectivos cromossomos, exons e introns, substituição de nucleotídeos, bem como suas posições

Marcadores	Cromossomos	Exons / Introns	Substituição de Nucleotídeo	Posição do Nucleotídeo
CAPN 316	29	Exon 9	G/C	5709
CAPN 530	29	Exon 14	A/G	4558
CAPN 4751	29	Intron 18	C/T	6545
CAPN 4753	29	Intron 21	A/C	8676
UOGCAST1	07	Intron 5	C/G	282

Tabela 3. Seqüência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada marcador estudado

Marcador	Seqüência	Sondas
CAPN316	F: GCAGTGCCGTTTTCTACAG R: AGCTGCTCCC GCATGTAAG	CCACGGCGTTCCA CCACGCCGTTCCA
CAPN530	F: TTGACTGGCCCCTCTCTCT R: GGCAGGGCACGTACCT	ATGACCAGGTCCAGGC ATGACCAGATCCAGGC
CAPN4751	F: TGGCATCCTCCCCTTGACT R: CCCCCGTCACCTTGACACA	CTGCGCCTCGGTTT CTGCGCCTCAGTTT
CAPN4753	F: GGGTCCCTCTCCCTCCTG R: CGCCTCCCAGCTCCAT	TCCTCCCTCTGTCAAGG TCCTCCCTCTTCAAGG
UOGCAST1	F: GGAAGGAAGGAATTGCATTGTTTCA R: CACTTGTGTTTTATGTAGTCAATTGTGAGAA	CTTTGGGTA GAAAATT TTGGGTA CAAAATT

5.5. Coleta das amostras de carne para análise de maciez (*Shear force*)

A coleta das amostras de carnes em bifes foi realizada no frigorífico Marfrig Group, à medida que os animais atingiam o peso e eram encaminhados ao abate. O procedimento para coleta iniciava-se no acompanhamento dos animais no momento da linha de abate, junto da sua imediata identificação pelo número do brinco do animal e colocando a identificação correspondente na carcaça (Figura 7).



Figura 7. Carcaças identificadas em resfriamento.

Após as carcaças permanecerem 24 horas na câmara de resfriamento, o longissimus dorsi (contra filé) de meia carcaça foi retirado, acompanhado da identificação para o corte dos bifes (Figura 8).



Figura 8. Corte transversal do longissimus dorsi (contra filé) identificado para o corte dos bifes.

Foram coletados de 605 animais, três bifes de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12ª e 13ª costela em direção caudal. Os bifes foram identificados individualmente (Figura 9), embalados a vácuo (embaladora Selovac M160) em filme flexível de alta barreira, Polyfilm (marca registrada).



Figura 9. Coleta dos três bifes de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12ª e 13ª costela em direção caudal. As etiquetas com cores distintas indicaram os dias de maturação (branco=7 dias de maturação; rosa=14 dias de maturação e verde 21 dias).

5.6. Análises de maciez da carne (*Shear force*)

As amostras sofreram processo de maturação a 2°C por 7, 14 e 21 dias *pos mortem*, respectivamente. As amostras foram avaliadas quanto a maciez, conforme os procedimentos adotados por Koochmaraie et al. (1994) e também utilizados por White et al. (2005). Inicialmente, os bifes foram pesados, em papel alumínio previamente tarado, em uma balança semi-analítica (modelo A2000, marca Marte), e colocados cada qual em uma forma pequena de alumínio em forno elétrico (mod. Luxo2.4 Classic Marca Lary) à temperatura de 170°C (Figura 10), e uma distância de aproximadamente 21cm da resistência superior.



Figura 10. Forno utilizado para cocção das amostras até 71°C.

As temperaturas internas (próxima ao eixo geométrico) dos bifes foram acompanhadas com termômetros digitais (mod.Th1200C, marca Haenni) com sondas (finas) metálicas de perfuração. Os bifes foram retirados do forno quando as temperaturas internas atingiram 71°C, e pesados na mesma balança com papel alumínio previamente tarado. Após o cozimento, os bifes foram deixados à temperatura ambiente em sala climatizada a $\pm 21^{\circ}\text{C}$ por 2 horas (Figura 11) aproximadamente, a fim de resfriarem.



Figura 11. Detalhe dos bifes sendo deixados à temperatura ambiente, em sala climatizada a $\pm 21^{\circ}\text{C}$, por 2 horas, a fim de resfriarem.

Em seguida, foram retirados 6 cilindros de cada bife de aproximadamente treze milímetros de diâmetro, no sentido das fibras, com o auxílio de um vazador elétrico. Esses cilindros foram cisalhados em um *Warner Bratzler Shear Force* (Figura 12). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Carnes da FZEA/USP.



Figura 12. Cilindros do músculo *Longissimus dorsi* cisalhados no *Warner Bratzler Shear Force* (WBSF).

5.7. Caracterização das informações fenotípicas avaliadas e da estrutura genética da população

As informações fenotípicas relacionadas a maciez da carne maturada avaliada aos 7, 14 e 21 dias, bem como das características de desenvolvimento ponderal, peso a desmama, ganho de peso da desmama ao sobreano e do peso ao sobreano, foram submetidas a verificação das pressuposições de análises de dados (normalidade, homogeneidade das variâncias, dentre outras). Estas análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 2002), utilizando os procedimentos PROC MEANS e UNIVARIATE.

As frequências alélicas e genóticas dos resultados obtidos por PCR em Tempo Real foram estimadas para cada loco, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer e Mackay (2001).

5.8. Efeito dos marcadores SNP sobre a maciez da carne

Para avaliar as implicações dos resultados moleculares sobre as características relacionadas à maciez da carne e as de desenvolvimento ponderal, foram utilizadas as informações obtidas dos testes de maciez (*Shear Force*), bem os desempenhos dos animais como variáveis dependentes.

Os efeitos dos genótipos encontrados para os diferentes marcadores, considerando os diferentes dias de maturação, e as características de desenvolvimento ponderal foram avaliados a partir do modelo utilizado por Casas et al. (2005), White et al. (2005) e Casas et al. (2006), especificado a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mathbf{m} + C_i + S_j + M_k + \mathbf{b}_1(I_{ijkl} - \bar{I}) + e_{ijkl}$$

em que,

Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para a característica maciez;

\mathbf{m} = é uma constante inerente a todas as observações;

C_i = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos;

S_j = é o efeito aleatório de reprodutor, com média 0 e variância s^2_s ;

M_k = é o efeito fixo do genótipo para marcador (CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1);

b_1 = é coeficientes de regressão linear da característica Y_{ijkl} em relação ao desvio da idade do animal ao abate, incluído no modelo como covariável;

I_{ijkl} = é a idade do animal à mensuração ou ao abate;

\bar{I} = é a média de idade à mensuração ou ao abate dos animais avaliados;

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

A composição dos grupos contemporâneos para as variáveis relacionadas a maciez aos 7, 14, 21 dias e as de desempenho ponderal, caracterizaram-se por animais nascidos em mesmo rebanho, no mesmo ano, na mesma estação, de mesmo sexo, de mesmo grupo de manejo até a desmama e pertencentes ao mesmo grupo de manejo da desmama ao sobreano. Para a característica peso a desmama, foi incluído no modelo acima, o efeito da classe de idade da mãe ao parto.

Para testar outros efeitos das combinações genotípicas, considerando dois *locus* simultaneamente em relação à maciez da carne, também foi adotado o mesmo modelo estatístico anteriormente citado, apenas trocando o efeito M_k por G_k , onde G_k representará a $k^{\text{ésima}}$ combinação genotípica para os dois *loci*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização das informações fenotípicas avaliadas

Os números de observações e as estimativas de médias, desvios padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo para as características relacionadas à maciez aos 7 (MAC7D), aos 14 (MAC14D) e aos 21 (MAC21D) dias, e características de desenvolvimento ponderal, peso a desmama (PESDES), peso ao sobreano (PES18), ganho de peso da desmama ao sobreano (GP345) e idade ao abate dos animais (ID ABATE) após as análises críticas e de consistência do arquivo, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX) para as características avaliadas

Características	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
MAC7D*	590	5,94	1,46	24,56	1,82	9,99
MAC14D*	590	4,95	1,31	26,39	1,32	9,34
MAC21D*	594	4,38	1,12	25,64	1,61	8,53
PESDES**	604	196,82	24,66	12,53	89,00	272,00
P18M**	588	321,25	32,63	10,16	231,00	451,00
GP345**	588	125,37	28,10	22,42	60,00	213,00
ID ABATE***	580	24,25	1,66	6,86	21,00	34,00

*Maciez em kilogramas/força; ** Peso em kilogramas ; *** Idade em meses .

Verifica-se na Tabela 3 que, entre as 605 amostras coletadas, 590 amostras foram utilizadas nas análises das variáveis MAC7D e MAC14D, e 594 amostras para a avaliação da variável MAC21D. Essa pequena diferença pode ser explicada por algumas perdas no procedimento de avaliação da maciez, principalmente por algumas embalagens danificadas e conseqüentemente não maturação das amostras. No entanto, podem ser consideradas perdas aceitáveis, o que não chegam a representar 2,5% do total de amostras coletadas para cada variável.

Com relação à diferença das informações de desenvolvimento ponderal, advindas dos mesmos animais que forneceram amostras de carne para maturação, são dados de poucos indivíduos, perdidos pela própria fazenda e que também não interferiu nas análises por representar uma diferença pequena do total de informações.

Nas Figuras 13, 14 e 15, encontram-se os histogramas e os comportamentos das distribuições para variáveis MAC7D, MAC14D e MAC21D, quando assumida a pressuposição de que as variáveis seguem distribuição Normal.

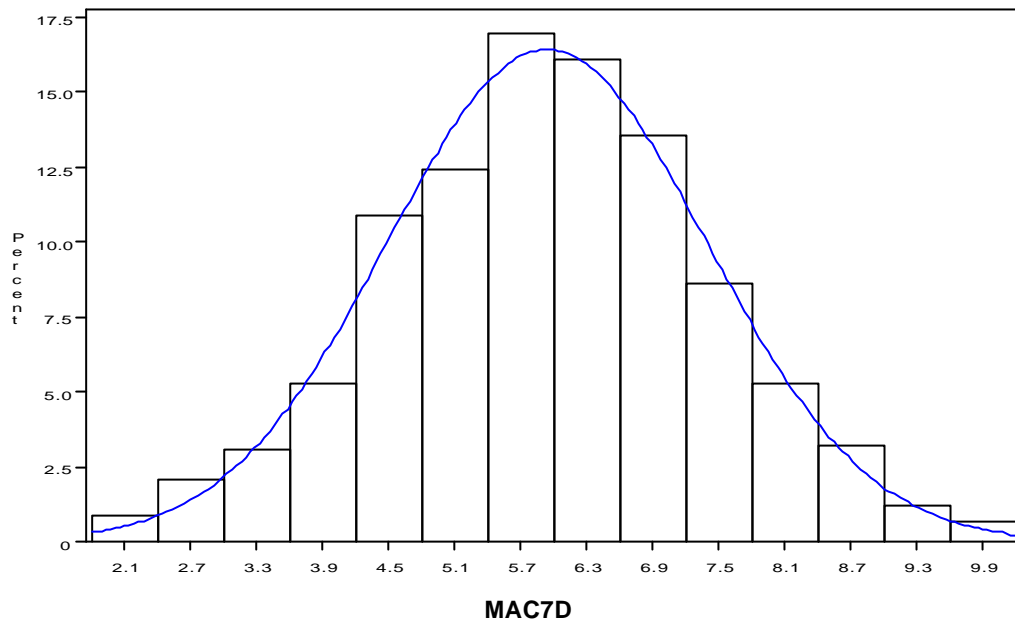


Figura 13. Distribuição para variável MAC7D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.

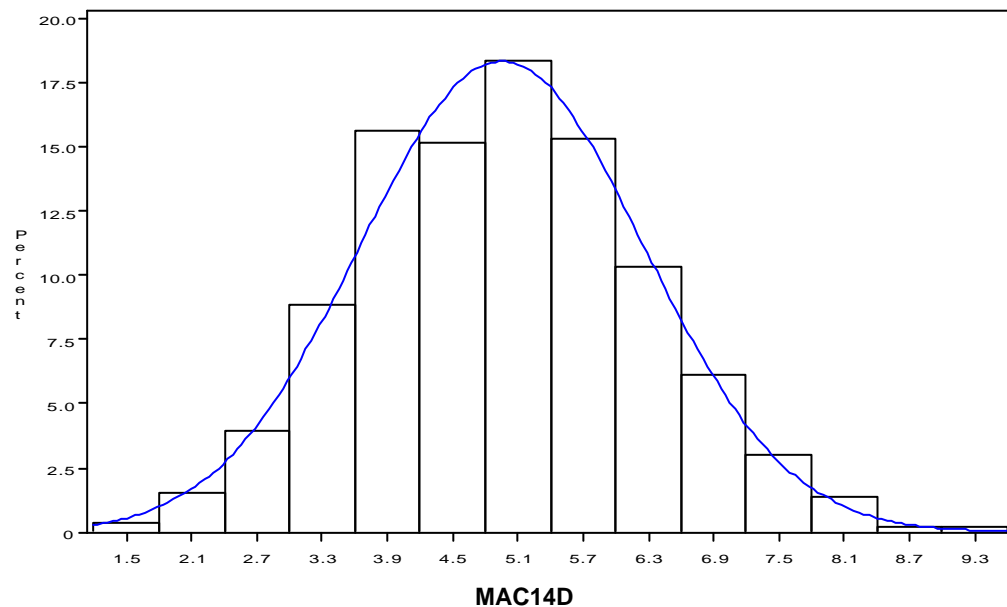


Figura 14. Distribuição para variável MAC14D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.

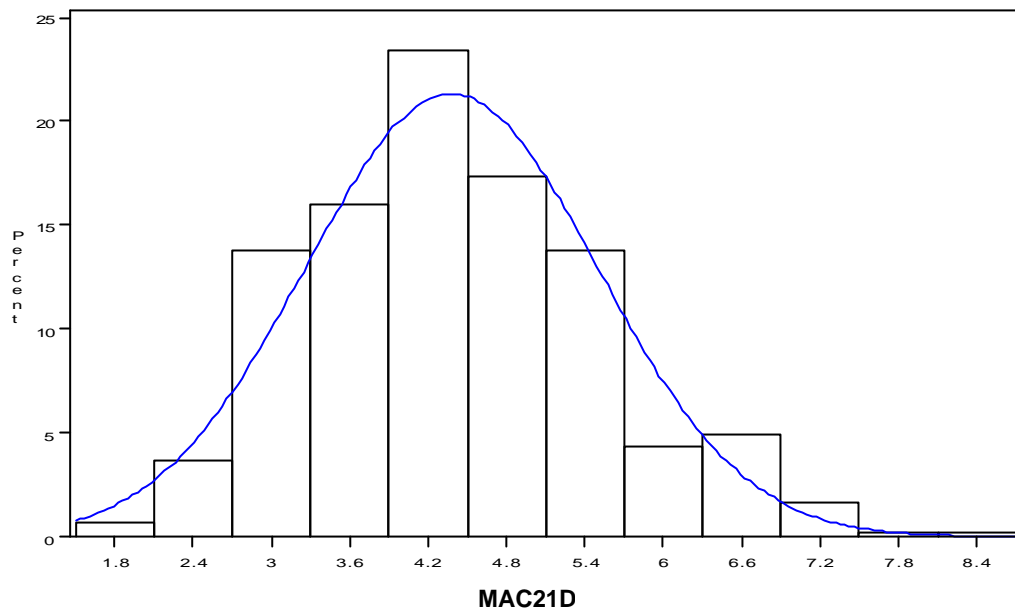


Figura 15. Distribuição para variável MAC21D, quando assumida a pressuposição de Normalidade.

Pelas Figuras 13, 14 e 15, nota-se que a pressuposição de normalidade foi atendida para as variáveis MAC7D, MAC14D e MAC21D, as quais apresentaram resultados não significativos para o Teste de Normalidade.

6.2. Estrutura genética da população para os marcadores avaliados

As frequências genóticas associadas aos cinco polimorfismos dos marcadores avaliados estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Freqüências genótípicas observadas para os marcadores avaliados em bovinos da raça Nelore

Marcadores	Genótipos	Freqüências	Percentagens	Freqüências Acumuladas	Percentagens Acumuladas
CAPN316	C/C	0	0,00	0	0,00
	C/G	10	1,66	10	1,66
	G/G	593	98,34	603	100,00
Número de amostras que não amplificaram = 02					
CAPN530	A/A	2	0,33	2	0,33
	A/G	85	14,12	87	14,45
	G/G	515	85,55	602	100,00
Número de amostras que não amplificaram =03					
CAPN4751	C/C	19	3,16	19	3,16
	C/T	175	29,07	194	32,23
	T/T	408	67,77	602	100,00
Número de amostras que não amplificaram = 03					
CAPN4753	A/A	106	19,00	106	19,00
	A/C	169	30,29	275	49,28
	C/C	283	50,72	558	100,00
Número de amostras que não amplificaram = 47					
UOGCAST1	C/C	232	38,73	232	38,73
	C/G	280	46,74	512	85,48
	G/G	87	14,52	599	100,00
Número de amostras que não amplificaram =06					

A distribuição dos genótipos dentro da população para os marcadores CAPN316 e CAPN530 mostrou-se bastante irregular. Esta irregularidade impossibilitou a análise consistente dos dados para esses dois marcadores e, no caso do CAPN316, a ausência do genótipo C/C determinou a não associação com as variáveis de desenvolvimento ponderal e maciez da carne. Corva et al. (2007) analisaram animais da raça Angus, Hereford e Limousin, e observaram distribuição menos irregular para todos os genótipos em comparação com o presente estudo. Os demais marcadores apresentaram freqüências de seus genótipos satisfatórias ou suficientemente bem distribuídas, para a realização das análises dos marcadores individualmente e combinados dois a dois, quando conveniente.

As freqüências gênicas ou alélicas associadas aos cinco polimorfismos avaliados estão apresentadas na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6. Frequências alélicas estimadas para os marcadores avaliados em bovinos da raça Nelore

Marcadores	Frequências Alélicas	
	(p)	(q)
CAPN316	f(C) =0,0083	f(G) =0,9917
CAPN530	f(A) =0,0739	f(G) =0,9261
CAPN4751	f(C) =0,1769	f(T) =0,8231
CAPN4753	f(A) =0,3414	f(C) =0,6586
UOCAST1	f(C) =0,6210	f(G) =0,3790

Nos animais avaliados, a frequência gênica observada para o marcador CAPN316 demonstra que o alelo “G”, encontra-se praticamente fixado nesta população, fato este concordante com Casas et al. (2005), os quais relataram frequências associadas ao alelo “C” de 0,0012 em 470 animais da raça Brahman. Estas baixas frequências do alelo (C), podem sugerir a hipótese de que o polimorfismo pode ter surgido apenas nos animais de origem *Bos taurus* depois da separação das subespécies *Bos indicus* e *Bos taurus*. Outra hipótese que não deve ser descartada seria que, os raros alelos “C” observados nesta população da raça Nelore, podem ter sido introgrididos ao longo de acasalamentos durante a fase de formação do rebanho atual.

Para o marcador CAPN530, a frequência do alelo considerado favorável “A” foi baixa, em relação à forma alélica “G”, sendo considerado pouco informativo, e concorda com White et al. (2005), quando analisaram animais da raça Brahman com o mesmo marcador. Os autores ainda relataram frequência do alelo favorável “A” de 0,137 para animais do Ciclo 8 do Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em Clay Center/Nebraska.

A baixa frequência dos dois marcadores CAPN316 e CAPN530 obtidos neste trabalho demonstram a ineficácia desses marcadores para serem utilizados em populações da raça Nelore. Este fato é reforçado junto aos relatos de outros autores já citados, os quais reportaram frequências próximas as encontradas no presente estudo. Pelo exposto, não se recomenda a utilização dos marcadores CAPN316 e CAPN530 em animais de origem *Bos indicus*, como ferramentas para identificar animais geneticamente superiores para as características consideradas.

As frequências gênicas observadas para o marcador CAPN4751, demonstraram que o alelo favorável “C” encontra-se com frequência inferior a outra forma alélica “T”. White et al. (2005) reportaram frequências do alelo “C” de 0,096

para raça Brahman, inferiores às verificadas neste estudo. Os autores reportaram ainda freqüências do alelo “C” de 0,576 para animais cruzados do Ciclo 7 e 0,640 para animais cruzados do Ciclo 8 do Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em Clay Center/Nebraska. Destaca-se que os animais do Ciclo 7 e 8 do referido projeto são animais compostos, fruto de cruzamentos somente entre animais de origem taurina.

Para o marcador CAPN4753, a freqüência do alelo considerado favorável “A”, foi inferior quando comparada à forma alélica “C”. Casas et al. (2005) relataram a freqüência do alelo “A” superior ($f(A)=0,675$), para animais da raça Brahman criados na Flórida. Já White et al. (2005) observaram freqüência de 6,1% para o mesmo alelo “A” em populações compostas.

As freqüências gênicas observadas para o marcador UOGCAST1, demonstraram que o alelo favorável “C” encontra-se com freqüência superior a forma alélica “G”. Schenkel et al. (2006) reportaram freqüência do alelo “C” de 0,629 para 628 animais oriundos de cruzamentos entre raças taurinas Angus, Limousin, Charolês, Simental, dentre outros. No caso do presente estudo, é importante ressaltar que a população estudada é de origem *Bos indicus* e, no entanto a freqüência gênica foi bem próxima da encontrada pelos autores em animais taurinos. Estes achados sugerem que o marcador da calpastatina teria maior aplicabilidade, podendo ser utilizado em animais de ambas as origens, visando identificar animais que possuam a característica de maior maciez da carne.

6.3. Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição para os marcadores nas características de desenvolvimento ponderal

Na Tabela 7, são apresentadas as estimativas de efeito da aditividade, desvio da aditividade e efeito médio de substituição para as características de desenvolvimento ponderal.

Para os resultados obtidos dos quatro marcadores descritos, não foram observadas estimativas significativas ($P>0,05$) para as três variáveis relacionadas ao desempenho ponderal.

Tabela 7. Efeito de aditividade, desvio de aditividade e efeito médio de substituição

Marcadores	Caract.*	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito médio de substituição		
		Estimativa	EP	P > t	Estimativa	EP	P > t	Estimativa	EP	P > t
CAPN530	PESDES	3,72	12,80	0,7714	4,72	6,68	0,4804	2,20	2,17	0,3100
	P18M	16,45	15,64	0,2932	7,37	8,17	0,3675	-1,26	2,66	0,6359
	GP345	14,88	13,60	0,2744	5,74	7,10	0,4191	-1,68	2,30	0,4670
CAPN4751	PESDES	0,46	4,26	0,9147	1,48	2,55	0,5603	0,40	1,44	0,7786
	P18M	-2,11	5,17	0,6837	1,76	3,13	0,5735	1,87	1,76	0,2870
	GP345	-2,32	4,52	0,6073	-0,13	2,73	0,9613	1,11	1,53	0,4690
CAPN4753	PESDES	-0,72	2,15	0,7381	-0,13	1,76	0,9407	0,38	1,06	0,7217
	P18M	0,83	2,63	0,7533	-1,36	2,16	0,5302	-0,48	1,29	0,7090
	GP345	1,62	2,27	0,4764	-0,77	1,87	0,6791	-0,81	1,10	0,4664
UOGCAST1	PESDES	0,97	2,32	0,6753	1,18	1,58	0,4555	-0,95	1,14	0,4064
	P18M	0,84	2,86	0,7692	0,31	1,93	0,8733	-0,82	1,41	0,5580
	GP345	0,29	2,50	0,9065	-0,75	1,69	0,6576	-0,15	1,22	0,9009

*Caract. = Características de desenvolvimento ponderal

6.4. Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos médios de substituição para os marcadores na característica maciez de carne

A Tabela 8 apresenta as estimativas de efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeitos de substituição para as características de maciez da carne aos 7 (MAC7D), 14 (MAC14D) E 21 (MAC21D) dias de maturação.

Para o marcador CAPN530, as estimativas dos efeitos de aditividade, desvio de aditividade e efeitos de substituição não apresentaram resultados significativos. Para os demais marcadores foram observadas algumas estimativas significativas para aditividade e efeito de substituição. Com relação ao marcador CAPN4751, o efeito aditivo foi significativo para variável MAC21D e o efeito de substituição foram observados para MAC14D e MAC21D. O marcador da calpaína CAPN4753 apresentou efeito aditivo significativo para MAC14D e MAC21D, além do efeito médio de substituição para MAC21D.

Com relação ao marcador da calpastatina UOGCAST1, os efeitos de desvio de dominância e substituição foram significativos para MAC14D e MAC21D.

Tabela 8. Efeito de aditividade, desvio de aditividade e efeito médio de substituição

Marcadores	Caract*	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito médio de substituição		
		Estimativa	EP	P > t	Estimativa	EP	P > t	Estimativa	EP	P > t
CAPN530	MAC7D	-1,14	1,03	0,2708	-0,56	0,54	0,3025	-0,08	0,17	0,6240
	MAC14D	0,05	0,92	0,9563	0,13	0,48	0,7812	0,01	0,15	0,9223
	MAC21D	0,40	0,80	0,6213	0,36	0,42	0,3967	0,07	0,13	0,5723
CAPN4751	MAC7D	0,12	0,34	0,7297	-0,31	0,20	0,1332	-0,19	0,11	0,0968
	MAC14D	0,39	0,31	0,1999	-0,08	0,18	0,6547	-0,22	0,10	0,0246
	MAC21D	0,53	0,26	0,0440	-0,18	0,16	0,2493	-0,31	0,08	0,0003
CAPN4753	MAC7D	-0,32	0,17	0,0655	-0,24	0,14	0,0989	0,08	0,08	0,3209
	MAC14D	-0,31	0,15	0,0424	-0,14	0,13	0,2870	-0,11	0,07	0,1316
	MAC21D	-0,35	0,13	0,0093	-0,19	0,11	0,0772	-0,12	0,06	0,0455
UOGCAST1	MAC7D	0,18	0,19	0,3598	0,18	0,13	0,1569	-0,16	0,09	0,0823
	MAC14D	0,52	0,17	0,0026	0,02	0,11	0,8500	-0,26	0,08	0,0007
	MAC21D	0,40	0,15	0,0068	0,17	0,10	0,0954	-0,25	0,07	0,0003

*Caract = Características de Maciez da carne para ao três tempos de maturação

Os gráficos a seguir ilustram as estimativas significativas para os efeitos médios de substituição dos marcadores CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1. A Figura 16 mostra a estimativa de -0,22 kg para o efeito médio de substituição alélica aos 14 dias de maturação para o marcador CAPN4751. Portanto, o efeito da presença de um alelo “C” proporcionou em média 0,22 kg de maior maciez para os indivíduos heterozigotos e aproximadamente 0,44 kg de maior maciez para os indivíduos homozigotos C/C.

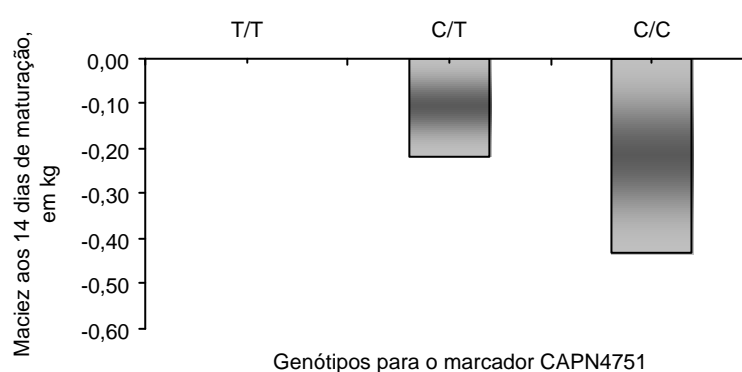


Figura 16. Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4751 para 14 dias de maturação da carne.

O gráfico da Figura 17 também ilustra o efeito significativo de substituição para o marcador CAPN4751 aos 21 dias de maturação da carne. Nota-se que a

estimativa do efeito médio de substituição de um alelo “C” foi de -0,31 kg. Assim, em média, os indivíduos heterozigotos têm a carne 0,31 kg mais macia, e os homozigotos C/C aproximadamente 0,62 kg mais macia, em relação aos que não possuem o alelo favorável.

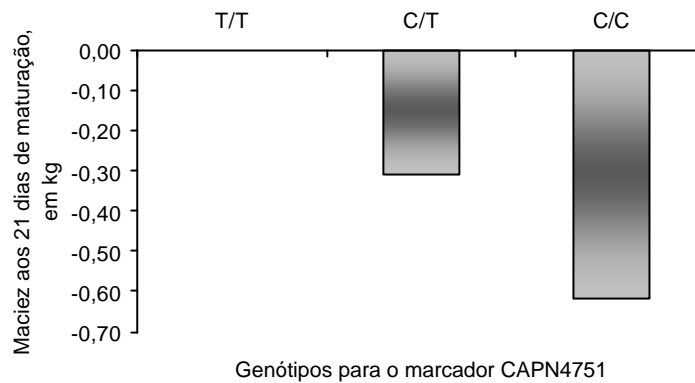


Figura 17. Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4751 para 21 dias de maturação da carne.

Para o marcador CAPN4753, a Figura 18 apresenta o efeito médio de substituição significativo aos 21 dias de maturação. A estimativa do efeito da presença de um alelo “C” foi de -0,12 kg. Neste caso, os indivíduos heterozigotos apresentaram, em média, carnes mais macias em 0,12 kg e os homozigotos C/C, com 0,24 kg, quando comparados aos indivíduos de genótipo A/A.

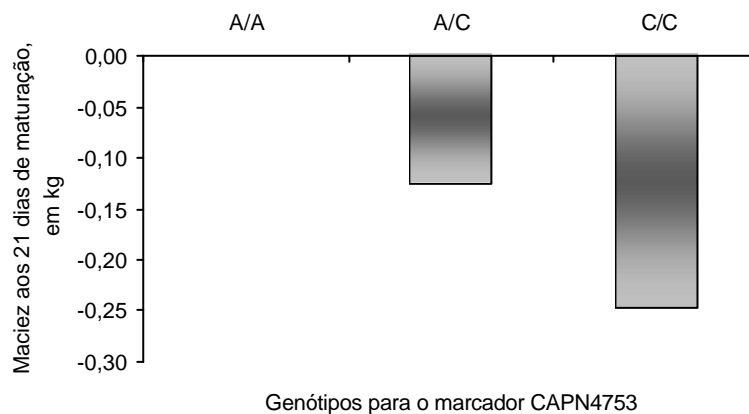


Figura 18. Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador CAPN4753 para 21 dias de maturação da carne.

Para o marcador UOGCAST1, a Figura 19 ilustra as estimativas do efeito médio de substituição significativo aos 14 dias de maturação. A presença do alelo favorável “C” apresentou uma estimativa de -0,26 kg. Portanto, os indivíduos heterozigotos apresentaram em média, carne mais macia em 0,26 kg e os homozigotos C/C aproximadamente 0,52 kg, em relação aos indivíduos de genótipo G/G.

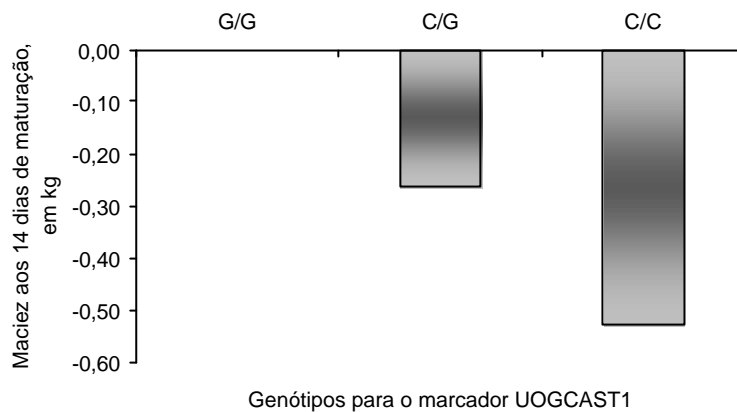


Figura 19. Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador UOGCAST1 para 14 dias de maturação da carne .

O gráfico da Figura 20 apresenta as estimativas para o efeito médio de substituição significativo do marcador UOGCAST1 aos 21 dias de maturação. A estimativa do efeito de substituição para o “C” foi de -0,25 kg. Neste caso, os indivíduos heterozigotos apresentaram em média, carne mais macia em 0,25 kg e os heterozigotos C/C aproximadamente 0,50 kg, do que os indivíduos que possuíam o genótipo G/G.

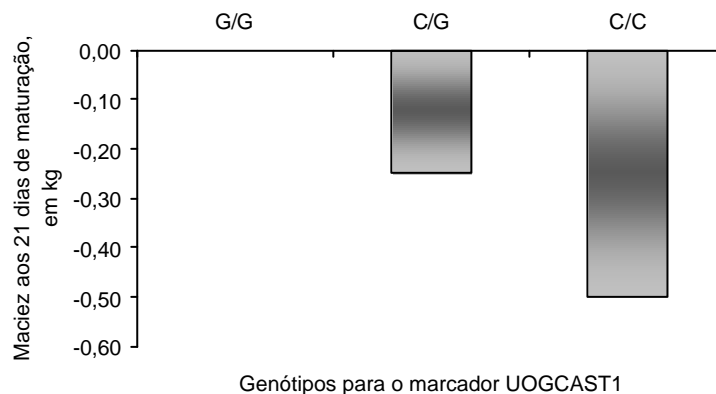


Figura 20. Estimativas do efeito médio de substituição para o marcador UOGCAST1 para 21 dias de maturação da carne .

6.5. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de desenvolvimento ponderal e de maciez da carne

Os efeitos dos marcadores SNP avaliados sobre as características de desenvolvimento ponderal e da maciez da carne foram avaliados apenas para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1, uma vez que, estes apresentaram variabilidade genotípica para serem utilizados nas análises dos efeitos dos marcadores sobre as características de interesse.

6.5.1. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de desenvolvimento ponderal

Para as características de desenvolvimento ponderal, as estimativas de médias de quadrados mínimos e os erros padrão associados aos efeitos dos genótipos para os marcadores avaliados, bem como os valores de probabilidade observados nos Testes F das análises de variância, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Estimativas de médias de quadrados mínimos (LSM) e os erros padrão (EP), bem como, os valores de probabilidade observados nos testes F associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores avaliados para características de desenvolvimento ponderal

Marcadores	Genótipos avaliados			Pr > F ¹
	LSM±EP	LSM±EP	LSM±EP	
CAPN530	A/A	A/G	G/G	
PESDES	188,27±12,98	194,84±3,09	191,99±2,55	0,3986
PES18	304,35±15,66	319,95±2,98	320,80±1,76	0,5525
GP345	115,32±13,62	128,51±2,55	130,20±1,50	0,4334
CAPN4751	C/C	C/T	T/T	Pr > F
PESDES	191,68±4,84	193,39±2,80	192,13±2,58	0,7463
PES18	321,83±5,33	322,53±2,28	319,72±1,85	0,3977
GP345	131,88±4,63	130,59±1,97	129,56±1,57	0,7736
CAPN4753	A/A	A/C	C/C	Pr > F
PESDES	193,06±3,10	192,57±2,88	192,34±2,71	0,9454
PES18	320,31±2,68	319,36±2,30	321,14±2,01	0,7204
GP345	129,31±2,28	129,34±1,95	130,92±1,72	0,6310
UOGCAST1	C/C	C/G	G/G	Pr > F
PESDES	191,86±2,69	193,53±2,69	192,84±3,09	0,5944
PES18	319,88±2,06	320,61±2,04	320,72±2,81	0,9243
GP345	130,11±1,77	129,51±1,74	130,41±2,42	0,9061

¹ Pr > F = valores de probabilidade observados nos testes F das análises de variâncias para a fonte de variação Marcador

Verifica-se pela Tabela 9 que, para todas as características de desempenho ponderal analisadas, não foram obtidos resultados significativos dos genótipos para os marcadores avaliados.

Neste estudo, as características de desenvolvimento ponderal exibiram comportamento similar aos relatados por Casas et al. (2005), os quais demonstraram que as características, ganho de peso médio diário e peso vivo ao abate, não foram influenciadas significativamente na análise de associação para os marcadores CAPN316, e CAPN4753 em animais da raça Brahman.

Na Figura 21 podem ser observados os comportamentos das médias de pesos a desmama, aos 18 meses e aos 345 dias, em cada genótipo e para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1.

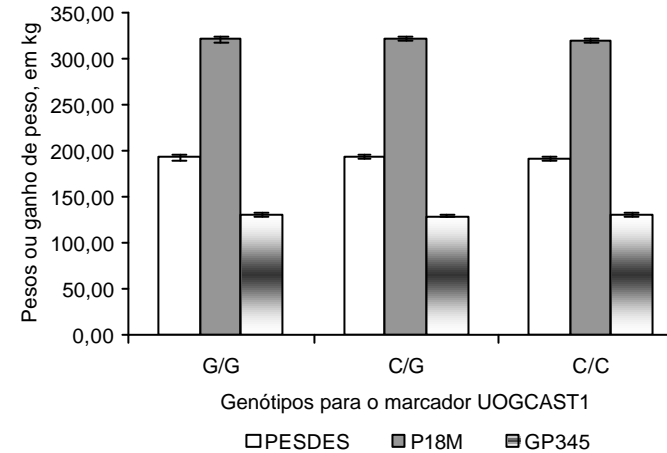
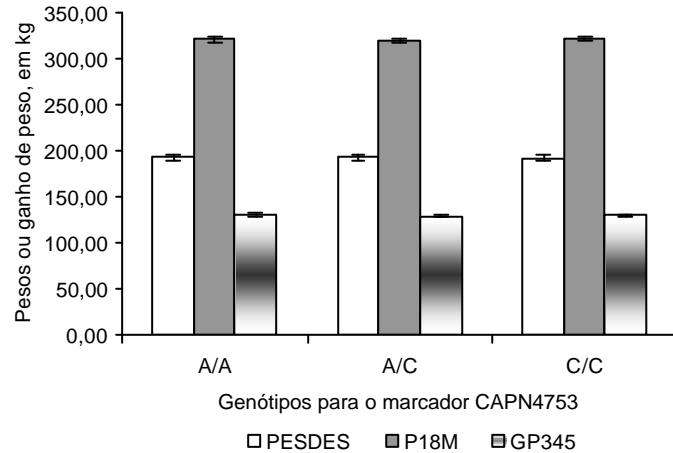
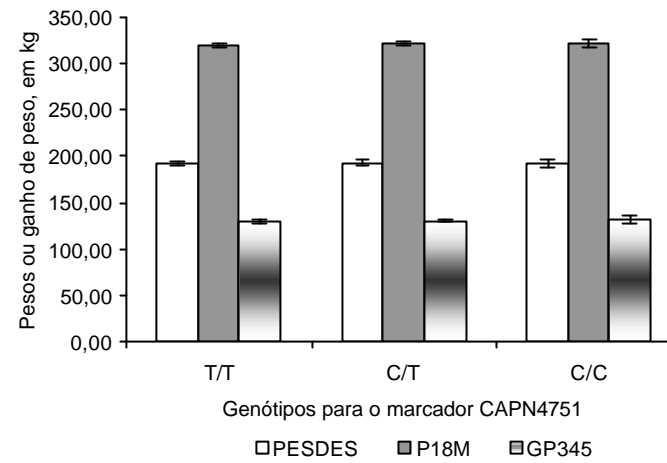
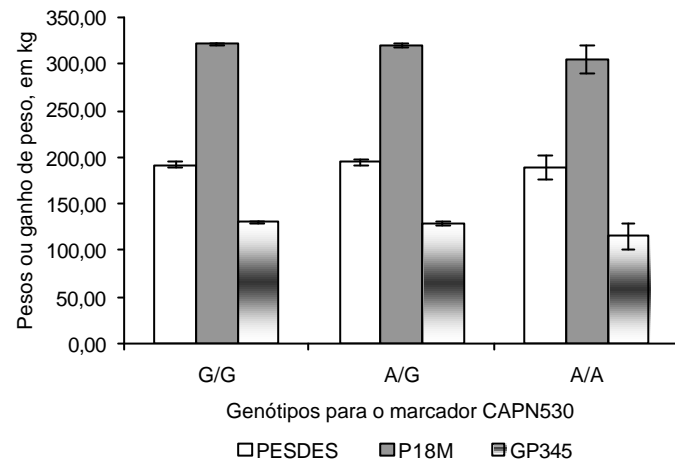


Figura 21. Médias de quadrados mínimos para pesos a desmama, aos 18 meses e ganhos de peso até 345 dias pós-desmama dos indivíduos, em cada genótipo para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1.

6.5.2. Efeito dos marcadores SNP avaliados sobre as características de maciez da carne

As estimativas de médias de quadrados mínimos e os erros padrão associados aos efeitos dos genótipos para os marcadores avaliados, bem como os valores de probabilidade observados nos Testes F das análises de variâncias individuais, para as características relacionadas à maciez aos 7, 14 e 21 dias de maturação (MAC7D, MAC14D e MAC21D), estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Estimativas de médias de quadrados mínimos (LSM) e os erros padrão (EP), bem como, os valores de probabilidade observados nos testes F associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores avaliados para características maciez aos 7, 14 e 21 dias de maturação

Marcadores	Genótipos avaliados			Pr > F ¹
	LSM±EP	LSM±EP	LSM±EP	
CAPN530	A/A	A/G	G/G	
MAC7D	7,30±1,03	6,18±0,20	6,17±0,13	0,5448
MAC14D	5,04±0,93	5,20±0,18	5,09±0,12	0,7850
MAC21D	4,13±0,81	4,68±0,15	4,52±0,10	0,4371
CAPN4751	C/C	C/T	T/T	Pr > F
MAC7D	6,17±0,35	5,92±0,16	6,29±0,14	0,0293
MAC14D	4,82±0,32	4,93±0,14	5,21±0,12	0,0486
MAC21D	4,19±0,27	4,27±0,12	4,72±0,11	<0.0001
CAPN4753	A/A	A/C	C/C	Pr > F
MAC7D	6,38±0,18	5,99±0,16	6,06±0,14	0,0907
MAC14D	5,32±0,16	5,03±0,14	5,00±0,13	0,1116
MAC21D	4,85±0,14	4,48±0,12	4,50±0,11	0,0188
UOGCAST1	C/C	C/G	G/G	Pr > F
MAC7D	6,02±0,15	6,29±0,15	6,20±0,20	0,1158
MAC14D	4,92±0,13	5,20±0,13	5,43±0,18	0,0045
MAC21D	4,35±0,11	4,72±0,11	4,75±0,16	0,0006

¹ Pr > F = valores de probabilidade observados nos testes F das análises de variâncias para a fonte de variação Marcador

Observa-se pela Tabela 10 que, para o marcador CAPN530, não foram verificados resultados significativos dos genótipos em relação as variáveis MAC7D, MAC14D e MAC21D. Corva et al. (2007) não observaram a ocorrência do genótipo A/A, no entanto, obtiveram efeitos significativos para maciez da carne não maturada entre os

genótipos A/G e G/G, em animais de origem *Bos taurus*. As observações a respeito deste marcador são totalmente concordantes com White et al. (2005), os quais relataram que este marcador não segregou significativamente ($P < 0,05$) para os genótipos avaliados na população de animais cruzados do ciclo 8 do Projeto de Avaliação de Germoplasma do MARC, em Clay Center/Nebraska. Entretanto para os demais marcadores, esses autores detectaram significâncias específicas, as quais estão discriminadas a seguir.

Para o marcador CAPN4751, foram notados efeitos significativos para MAC7D e MAC14D ($P < 0,05$), bem como para MAC21D ($P < 0,01$). Estes resultados concordam com White et al. (2005), que também observaram efeitos significativos para o marcador em animais *Bos indicus*, *Bos taurus* e cruzados. Os autores detectaram, respectivamente, para as populações citadas, diferenças de maciez da ordem de -0,40 kg, -0,27 kg e -0,44 kg entre os animais de genótipos T/T (desfavoráveis) em relação aos C/C (favoráveis), para carnes com 14 dias de maturação.

Os resultados significativos para as populações de diferentes origens, permitem sugerir que este marcador pode ter uma aplicabilidade geral para os bovinos, podendo ser considerado uma alternativa muito interessante para identificar animais com carne mais macia.

Com relação ao marcador CAPN4753, efeitos significativos foram apontados apenas para a variável MAC21D ($P < 0,01$), sendo as características MAC7D e MAC14D consideradas não-significativas ($P > 0,05$). Os resultados para o marcador CAPN4753 deste trabalho são discordantes dos reportados por Casas et al. (2005), os quais não verificaram diferenças significativas ($P > 0,05$) de maciez, avaliadas também por meio de *Warner Bratzler Shear Force*, para carnes com 7, 14 e 21 dias de maturação em animais da raça Brahman. Porém, White et al. (2005) observaram a segregação com o alelo "A" com frequência de 6,1% e associação significativa com *Shear force* ($P = 0,041$) nas populações compostas.

A comparação dos resultados deste estudo e o relatado por outros autores, salienta a segregação de alelos com efeitos favoráveis em animais de origem *Bos indicus*, que até o momento, era disponibilizado na literatura apenas para animais compostos de origem taurina.

Para o marcador UOGCAST1, resultados significativos também foram confirmados para MAC14D e MAC21D ($P < 0,01$), enquanto que para MAC7D, não foram detectados resultados significativos ($P > 0,05$). Estes resultados observados para as características relacionadas à maciez, corroboram parcialmente com os obtidos por SCHENKEL et al. (2006), os quais verificaram diferenças significativas ($P < 0,05$) de maciez, avaliadas por meio de *Warner Bratzler Shear Force*, para carnes com 21 dias de maturação. Neste estudo, os resultados foram até surpreendentes, uma vez que se detectou diferenças significativas ($P < 0,01$) para este marcador em carnes com 14 e 21 dias de maturação.

Os gráficos da Figura 20 apresentados a seguir, ilustram o comportamento das médias de maciez da carne dos indivíduos para cada genótipo, nos três tempos de maturação para as análises individuais dos marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1. Nota-se apenas para os dados do marcador CAPN530, que não apresentou efeitos significativos, possivelmente devido aos elevados erros padrão observados nos genótipos A/A. A explicação para tal fato foi a irregularidade na distribuição dos genótipos. O genótipo A/A apresentou uma frequência muito baixa na população, como pôde ser verificado na Tabela 10.

A respeito da maturação da carne, foi possível observar também a regularidade nas informações. A queda nos valores de maciez para os três tempos de maturação verificados nos gráficos (Figura 22), ilustra que não houve nenhum tipo de discrepância nos resultados da maturação da carne.

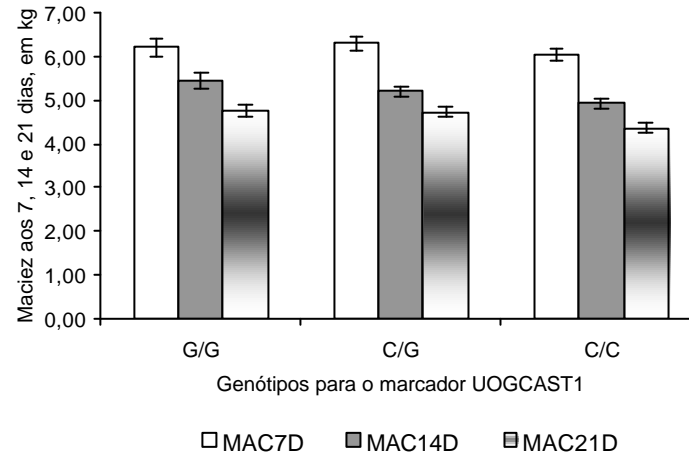
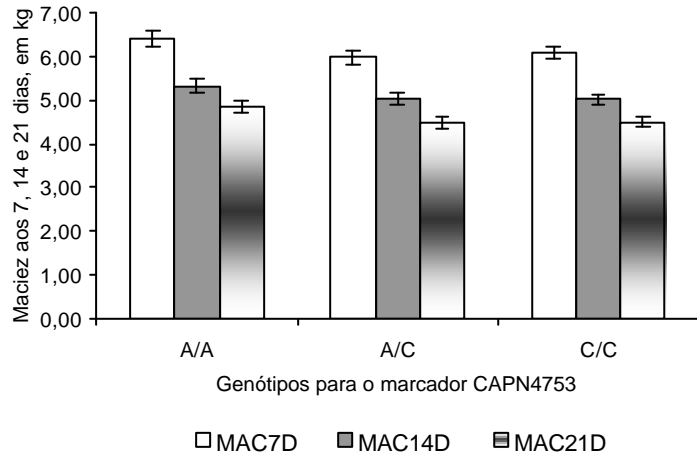
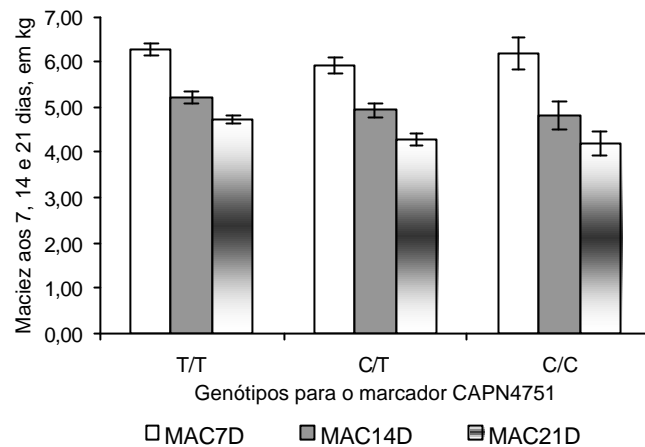
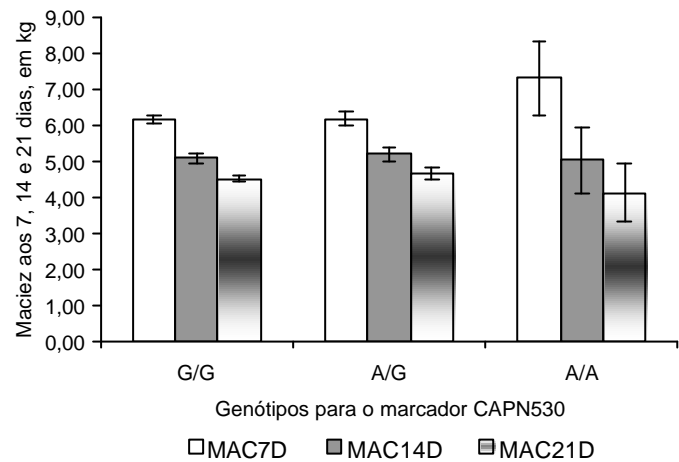


Figura 22. Médias de quadrados mínimos para maciez da carne aos 7 (MAC7D), 14 (MAC14D) e 21 (MAC21D) dias de maturação dos indivíduos, em cada genótipo para os marcadores CAPN530, CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1.

6.6. Efeito das combinações genóticas dos marcadores SNP sobre a maciez da carne

Os efeitos das combinações genóticas avaliadas sobre a característica da maciez da carne para 7, 14 e 21 dias de maturação foram avaliados para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1, bem como, para CAPN4753 e UOGCAST1, os quais apresentaram frequências de ocorrências de todos os genótipos quando organizados dois-a-dois.

6.6.1. Efeito das combinações genóticas para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 obtidos em análises simultâneas

A Tabela 11 apresenta a distribuição dos animais, estimativas para os contrastes, erros padrão associados aos efeitos dos genótipos para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST, e valores de probabilidade observados nos Testes F das análises de variâncias conjuntas. Estes resultados foram obtidos em avaliações simultâneas dos marcadores para as características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias (MAC7D, MAC14D e MAC21D).

As informações apresentadas na Tabela 11 demonstraram que o alelo “C” é favorável para marcadores da μ -calpaína e calpastatina, propiciando menores valores de “*Shear Force*” (expressos os desvios em kilogramas) indicando, portanto, maior maciez da carne.

As nove possíveis combinações genóticas encontradas nos indivíduos avaliados, demonstraram para as três datas de maturação, a existência de efeitos significativos das combinações genóticas em relação às características MAC7D, MAC14D e MAC21D. À medida que as combinações dos genótipos incluem as formas alélicas favoráveis, nesse caso os alelos “C”, foram verificadas quedas nas estimativas de “*Shear Force*”, em kilogramas, caracterizando o aumento da maciez nos diferentes dias de maturação da carne.

Tabela 11. Distribuição dos animais (N), estimativas para os contrastes (EST) e os erros padrão (EP) associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4751 e UOCAST1, avaliados simultaneamente, para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias

Característica Avaliada ^a	Marcador CAPN4751	Marcador UOCAST1					
		CC		CG		GG	
		EST±EP	N	EST±EP	N	EST±EP	N
MAC7D ^b	CC	-0,712±0,84	3	-0,542±0,44	11	-0,371±0,65	5
	CT	-0,526±0,18	70	-0,356±0,17	75	-0,186±0,30	24
	TT	-0,341±0,12	153	-0,170±0,11	185	0,000±0,22	46
Pr=0,0163							
MAC14D ^c	CC	-1,017±0,71	3	-0,743±0,37	11	-0,469±0,55	5
	CT	-0,783±0,15	70	-0,509±0,15	75	-0,234±0,25	24
	TT	-0,548±0,10	153	-0,274±0,09	185	0,000±0,18	46
Pr<0,0001							
MAC21D ^d	CC	-1,179±0,63	3	-0,916±0,33	11	-0,652±0,49	5
	CT	-0,853±0,13	70	-0,590±0,13	75	-0,326±0,22	24
	TT	-0,527±0,09	153	-0,264±0,08	185	0,000±0,16	46
Pr<0,0001							

^a Expressa em desvios para força de cisalhamento obtidas por *Warner Bratzler Shear Force (WBSF)*, em kilogramas;

^b MAC7D = maciez da carne com sete dias de maturação;

^c MAC14D = maciez da carne com quatorze dias de maturação,;

^d MAC21D = maciez da carne com vinte e um dias de maturação.

White et al. (2005) e Schenkel et al. (2006), relataram efeitos significativos para maciez da carne quando analisaram os dois marcadores em análises individuais (*single markers analysis*). A associação significativa da maciez da carne, com combinações genóticas para outros dois diferentes polimorfismos da calpaína também já foram relatados por Page et al. (2004), em estudo com animais de origem taurina. Ainda na Tabela 11, observa-se que a textura da carne foi reduzida, em média, 0,7 kg para MAC7D, 1,02 kg para MAC14D e 1,18kg para MAC21D, quando quatro alelos favoráveis estão presentes em comparação às combinações genóticas que não possuem alelos favoráveis para ambos os marcadores.

Análises de combinações genóticas, compostas de outros marcadores da calpastatina também são relatadas por outros autores. Neste tipo de análise, mesmo os alelos favoráveis dos diferentes marcadores tendo pesos diferentes, aumentaram os valores médios das estimativas de maciez da carne. Este aumento de maciez reforça as recomendações da Seleção Assistida por Marcadores como ferramenta eficaz na identificação de genótipos preteridos.

No entanto, dependendo da população que se deseja avaliar pode-se esbarrar na dificuldade de se encontrar genótipos com todos os alelos favoráveis para característica desejável. No caso deste estudo, a população apresentou todas as combinações genotípicas possíveis, o que também permitiu uma análise de dados com maior consistência, dado a existência de todas as classes genotípicas entre os marcadores. White et al. (2005), por exemplo, não conseguiram encontrar todas combinações genotípicas em estudos simultâneos para os marcadores CAPN316 e CAPN 4751.

O gráfico da Figura 23 ilustra o comportamento das estimativas de médias do *Shear force* para todas combinações genotípicas possíveis aos 7 (MAC7D), 14 (MAC14D) e 21 (MAC21D), no caso dos marcadores CAPN4751 e UOGCAST1.

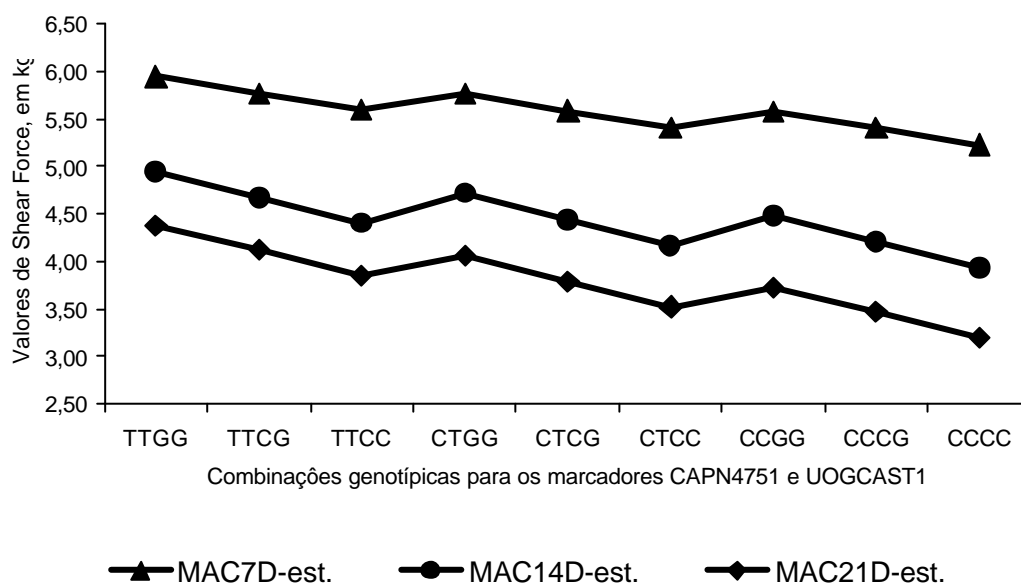


Figura 23. Estimativas dos efeitos de *Shear force* para as combinações genotípicas dos marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 para 7, 14 e 21 dias de maturação da carne.

Nota-se a existência de oscilações nos valores de *Shear force* para algumas combinações, enquanto se caminha para as combinações mais favoráveis. Isto pode ser explicado pela diferença nos efeitos dos alelos de cada marcador, os quais assumem estimativas diferentes. Caso os alelos favoráveis dos dois marcadores

possuísem o mesmo efeito, ter-se-ia uma redução bastante linear nos valores até chegar ao valor mínimo de *Shear force* para a combinação C/C/C/C.

6.6.2. Efeito das combinações genóticas para os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1 obtidos em análises simultâneas

A Tabela 12 apresenta a distribuição dos animais, estimativas para os contrastes, erros padrão associados aos efeitos dos genótipos e valores de probabilidade observados nos Testes F das análises de variâncias para os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1. Estes resultados também foram obtidos em avaliações simultâneas dos marcadores para as características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias (MAC7D, MAC14D e MAC21D), encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Distribuição dos animais (N), estimativas para os contrastes (EST) e os erros padrão (EP) associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4753 e UOGCAST1, avaliados simultaneamente, para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias

Característica Avaliada ^a	Marcador CAPN4753	Marcador UOGCAST1					
		CC		CG		GG	
		EST±EP	N	EST±EP	N	EST±EP	N
MAC7D	CC	-0,478±0,15	102	-0,321±0,13	139	-0,163±0,26	32
	AC	-0,396±0,20	56	-0,239±0,17	78	-0,082±0,30	25
	AA	-0,314±0,21	49	-0,157±0,23	40	0,000±0,42	32
Pr=0.0641							
MAC14D	CC	-0,765±0,13	102	-0,501±0,11	139	-0,237±0,22	32
	AC	-0,647±0,17	56	-0,383±0,14	78	-0,119±0,26	25
	AA	-0,528±0,18	49	-0,264±0,20	40	0,000±0,36	32
Pr=0.0005							
MAC21D	CC	-0,778±0,11	102	-0,5175±0,10	139	-0,257±0,20	32
	AC	-0,650±0,15	56	-0,3892±0,13	78	-0,128±0,22	25
	AA	-0,522±0,16	49	-0,2609±0,17	40	0,000±0,32	32
Pr<0.0001							

^a Expressa em desvios para força de cisalhamento obtidas por *Warner Bratzler Shear Force (WBSF)*, em kilogramas;

^b MAC7D = maciez da carne com sete dias de maturação;

^c MAC14D = maciez da carne com quatorze dias de maturação;

^d MAC21D = maciez da carne com vinte e um dias de maturação.

Nestas análises, os efeitos dos alelos “C” também se manifestaram de forma favorável e significativa para as características MAC14D e MAC21D nos marcadores da μ -calpaína e calpastatina.

Por meio da Tabela 12, verifica-se ainda que, da combinação genotípica sem nenhum alelo “C”, para combinação com quatro alelos “C” favoráveis, houve aumento da maciez da carne com 14 e 21 dias de maturação, em média, de aproximadamente 0,76 kg e 0,78 kg, respectivamente.

Destaca-se que, análises simultâneas envolvendo os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1, não foram encontradas na literatura.

O gráfico da Figura 24 apresenta o comportamento das estimativas de médias do *Shear force* para todas as combinações genotípicas possíveis aos 7 (MAC7D), 14 (MAC14D) e 21 (MAC21D), para os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1.

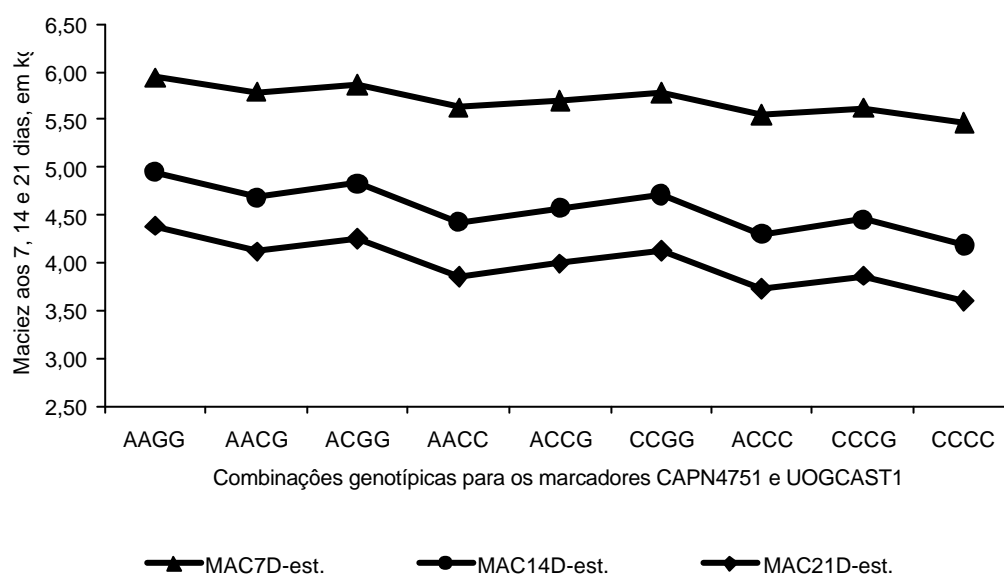


Figura 24. Estimativas dos efeitos de *Shear force* para as combinações genotípicas dos marcadores CAPN4753 e UOGCAST1 para 7, 14 e 21 dias de maturação da carne.

Nesta segunda combinação que envolveu o marcador CAPN4753, nota-se que a amplitude da redução do *Shear force* foi menor. Este fato ocorreu em virtude do marcador CAPN4753 já possuir um efeito menor de *Shear force*, quando

comparado com ao CAPN4751 (Tabela 10). Neste caso, as diferenças de efeitos dos alelos em cada *locus* avaliado também explicam as oscilações nos valores de *Shear force* para as combinações genóticas, enquanto se caminha em direção à combinação mais favorável C/C/C/C.

7. CONCLUSÕES

O marcador CAPN316 encontra-se praticamente fixado na população avaliada, sendo verificada a presença do alelo favorável “C” em frequência extremamente baixa.

Os marcadores avaliados não apresentaram resultados significativos para as características de desenvolvimento ponderal avaliadas.

Diferenças na maciez da carne em relação aos genótipos de cada marcador e das combinações genotípicas, para os polimorfismos da μ -calpaína e da calpastatina, indicam a viabilidade da utilização dos marcadores CAPN4751, CAPN4753 e UOGCAST1 como ferramentas moleculares, visando o aumento da qualidade da carne em bovinos da raça Nelore.

A seleção para qualidade da carne com base nesses marcadores não deve trazer conseqüências sobre o desenvolvimento ponderal, visto que não se observou efeito dos mesmos sobre as medidas de desenvolvimento.

8. REFERÊNCIAS

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2007. p. 61-62.

BARENDSE, W. et al. Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. **Genetics**, Baltimore, v.176, n.8, p.2601-2610, 2007.

BIASE, F.H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine tissues. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.3, p.313-315, 2002.

BISHOP, M. D. et al. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatina gene. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.71, p.2277, 1993.

CARVALHO, M. E. et al. Avaliação de diferentes combinações genóticas para polimorfismos no gene da μ -calpaína e calpastatina associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas, 2007. p.253-255.

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

CARVALHO, M. E. et al. Análise de associação do marcador CAPN4753 no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ, 2008. No prelo.

CASAS E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.83, n.1, p.2661-2668, 2005.

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

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

CORVA, P. et al. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos Taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.4, p.1064-1069, 2007.

CROUSE, J. D. et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos Taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.67, p.2661-2668, 1989.

CULLER, R. D. et al. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, Iowa, v.43, p.1177-1180, 1978.

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

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization -V: Inactivation of calpains. **Meat Science**, Oxon, v.37, p.391-409, 1994.

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

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

GALLINGER, M.M. et al. Meat quality of zebu crossbred: sensory and mechanical evaluation. In: ICoMST, 38., 1992, Clermont-Ferrand, France. **Proceedings...** Clermont-Ferrand, 1992. p.45-48.

GEESINK, G. H. et al. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.84, p.2834-2840, 2006.

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

GRANGER, B. L; LAZARIDES, E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. **Cell**, Cambridge, v.15, p.1253-1268, 1978.

HADLICH, J. C. et al. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **Acta Science Animal Science**, v.28, n.1, p.57-62, 2006.

HOCQUETTE, J. F. et al. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v.1, p.159-173, 2007.

HUGHES, M. C. et al. Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by m-calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. **Meat Science**, Oxon, v.59, p.61-69, 2001

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulations the toughening and tenderization process of meat. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.43, p.193-201, 1996.

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

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

KOOHMARAIE, M. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2003. 1 CD-ROM.

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

KOOHMARAIE, M. et al. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. In: OUALI, A; DEMEYER, D; SMULDERS, F. .) **Expression, Regulation and Role of Proteinases in Muscle Development and Meat Quality**, Utrecht, 1995. p.395-412.

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

LOCKER, R. H; DAINES, G. J. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v.14, p.244, 1976.

MACHADO, M. B. B. et al. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.3, p.259-265, 2003.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO BRASIL. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/PROJECoes_AGRONEGOCIO/RESUMO%20EXECUTIVO%20PROJECoes%20AGRONEGOCIO%20%202006-07%20A%202017-18.PDF>. Acesso em: 25/04/2008.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO BRASIL. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PECUARIA/3.1.XLS>>. Acesso em:25/04/2008.

MARSON, E.P. et al. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.4, n.3, p.496-505, 2005.

MARUYAMA, K. et al. in: PARRY, D. A. D.; CREAMER, L. K. **Fibrous Proteins: Scientific, Industrial and Medical Aspects**. New York: Acad. Press, 1979. v.2.

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

MORGAN, J. B. Tenderness problems and potential solutions. In: **THE FINAL Report of the National Beef Quality Audit – 1991**. Englewood: National Cattlemen's Beef Assoc,1992. p.180-187.

MORGAN, J. B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.71, p.1471-1476, 1993.

MORRIS, C. A. et al. Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand and Australia. In: ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 14., 2001, Queenstown. **Proceedings...** Queenstown, 2001. p.17–22.

MURACHI, T. et al. Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). **Advance in Enzyme Regulation**, v.19, p.407-424, 1981.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Relationship Between Degradation of Proteoglycans and Weakening of the Intramuscular Connective Tissue During Post-mortem Ageing of Beef **Meat science**, Oxon, v.42, p.251, 1996.

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

PAGE, B. T. et al. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.82, n.12, p.3474-81, 2004.

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

PARO DE PAZ, C. C. et al. Adjustment of nonlinear models in study of association between genetic polymorphisms and growth in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1416-1425, 2004.

PENNY, L. F. *Developments in Meat Science*, ed by R. Lawrie, Applied Science Publishers, Englewood, v.1, p.115-143, 1980.

PENNY, L. F.; DRANSFIELD, E. Relationship Between Toughness and Troponin T in Conditioned Beef. **Meat Science**, Oxon, v.3, p.135, 1979.

PEREIRA, A. et al. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.2, p.133-137, 2005.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.9, 2001.

PRINGLE, T. D. et al. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.75, p.2955-2961, 1997.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Clare, v.339, p.62-66, 2003.

RAMSEY, C.B. et al. Effects of type and breed of British, zebu and dairy cattle on production, palatability and composition. II. Palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.22, n.4, p.1001-1008, 1963.

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

REGITANO, L. C .A. Extração de DNA para aplicação em reação de cadeia da polimerase. In: REGITANO L.C.A.; COUTINHO L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.179-186.

RILEY, D. G. et al. Effect of sire on {micro}- and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.81, p.2440-2447, 2003.

SANTIAGO, A. A. **O Zebu: origem, formação e evolução do rebanho**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985.

SAS. User's Guide: basic and statistic. Cary: SAS, 1965. p.1686.

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

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

SLINDE, E; KRYVI, H. Z-Disc Digestion of Isolated Bovine Myofibrils by an Endogenous Calcium Activated Neutral Proteinase. **Meat Science**, Oxon, v.16, p.45, 1986.

SMITH, T. P. et al. Bovine CAPN maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.78, n.10, p.2589-2594, 2000.

VAN EENENNAAM, A. L. et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.85, p.891, 2006

VASCONCELLOS, L. P. M. K. et al. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.2, p.133-137, 2003.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. Disponível em: http://192.133.74.26/MRU_WWW/protocol/WBS.html. Acesso em: 25/04/2008, 1995.

WHIPPLE, G. et al. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.74, p.2394, 1990.

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

ANEXO 1

Tabela 13. Distribuição das progênes por reprodutores

Reprodutor	Frequência da Progênie	Percentil	Frequência da Progênie Acumulada	Percentil Acumulado
1	3	0,0050	3	0,005
2	3	0,0050	6	0,010
3	3	0,0050	9	0,015
4	3	0,0050	12	0,020
5	3	0,0050	15	0,025
6	3	0,0050	18	0,030
7	3	0,0050	21	0,035
8	3	0,0050	24	0,040
9	3	0,0050	27	0,045
10	3	0,0050	30	0,050
11	3	0,0050	33	0,055
12	3	0,0050	36	0,060
13	4	0,0066	40	0,067
14	4	0,0066	44	0,073
15	4	0,0066	48	0,080
16	4	0,0066	52	0,086
17	4	0,0066	56	0,093
18	4	0,0066	60	0,100
19	4	0,0066	64	0,106
20	4	0,0066	68	0,113
21	4	0,0066	72	0,119
22	4	0,0066	76	0,126
23	4	0,0066	80	0,133
24	4	0,0066	84	0,139
25	4	0,0066	88	0,146
26	4	0,0066	92	0,152
27	4	0,0066	96	0,159
28	4	0,0066	100	0,166
29	4	0,0066	104	0,172
30	4	0,0066	108	0,179
31	5	0,0083	113	0,187
32	5	0,0083	118	0,195
33	5	0,0083	123	0,204
34	5	0,0083	128	0,212
35	5	0,0083	133	0,220
36	5	0,0083	138	0,229
37	5	0,0083	143	0,237
38	5	0,0083	148	0,245
39	6	0,0099	154	0,255
40	6	0,0099	160	0,265
41	6	0,0099	166	0,275
42	6	0,0099	172	0,285

Continua...

Tabela 13. (continuação)

Reprodutor	Frequência da Progênie	Percentil	Frequência da Progênie Acumulada	Percentil Acumulado
43	6	0,0099	178	0,295
44	6	0,0099	184	0,305
45	6	0,0099	190	0,315
46	7	0,0116	197	0,326
47	7	0,0116	204	0,338
48	7	0,0116	211	0,349
49	7	0,0116	218	0,361
50	7	0,0116	225	0,373
51	7	0,0116	232	0,384
52	7	0,0116	239	0,396
53	7	0,0116	246	0,407
54	8	0,0132	254	0,421
55	8	0,0132	262	0,433
56	9	0,0149	271	0,449
57	9	0,0149	280	0,464
58	9	0,0149	289	0,478
59	11	0,0182	300	0,497
60	11	0,0182	311	0,515
61	11	0,0182	322	0,533
62	11	0,0182	333	0,551
63	11	0,0182	344	0,569
64	12	0,0198	356	0,589
65	17	0,0281	373	0,617
66	17	0,0281	390	0,645
67	18	0,0298	408	0,675
68	23	0,0380	431	0,713
69	23	0,0380	454	0,751
70	27	0,0446	481	0,796
71	27	0,0446	508	0,840
72	46	0,0760	554	0,916
73	51	0,0843	605	1,001