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

**Expressão de genes relacionados ao metabolismo de vitamina D₃
mediante suplementação e estudo de associação com a maciez da
carne em bovinos da raça Nelore**

Lilian Ribeiro Rezende

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

**Piracicaba
2011**

Lilian Ribeiro Rezende
Zootecnista

**Expressão de genes relacionados ao metabolismo de vitamina D₃ mediante
suplementação e estudo de associação com a maciez da carne em bovinos da
raça Nelore**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

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

Piracicaba
2011

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

Rezende, Lilian Ribeiro

Expressão de genes relacionados ao metabolismo de vitamina D₃ mediante suplementação e estudo de associação com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore / Lilian Ribeiro Rezende . - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.

89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Cálcio 2. Carnes e derivados 3. Expressão gênica 4. Gado Nelore 5. Metabolismo de proteína 6. Reação em cadeia por polimerase 7. Suplementos vitamínicos para animais 8. Vitamina D₃ I. Título

CDD 636.291
R467e

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

A meus pais, Anízio e Iraima, às minhas irmãs Cláudia e Flávia, à meu lindo sobrinho

Eduardo e à Rodrigo Bertazzo

Com amor,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Luiz Lehmann Coutinho**, pela orientação, apoio, compreensão e pela grande oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Francisquine Delgado**, pela atenção, capacidade brilhante em formular idéias e pela presteza em que me atendeu nos momentos de urgência.

Ao Prof. Dr. **Gerson Barreto Mourão**, pela atenção na análise estatística.

Ao aluno de Doutorado **Adalfredo** e a equipe do **LAFA** pelo fornecimento das amostras.

À **CAPES** e **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal, **Nirlei** e **Jorge** pelo apoio e amizade durante estes anos.

Aos **amigos e colegas** da Esalq e Laboratório de Biotecnologia Animal: **Áurea, Erika, Clarissa, Millor, Kerli, Minos, Priscilla, Fernanda Saválio, Fernanda Elisa, Heloíze, Vivian, Ana Paula, Carolina, Luiza e Thaís** pela agradável convivência e troca de experiências durante estes anos.

Aos queridos amigos **Gustavo** e **Andrezza (Andrezza Conchita)** pela grande amizade e por tantas vezes me fazer rir e sorrir.

As queridas amigas, **Fê Zinsly, Cris Sitta, Dri Lessa, Déia Negreiros, MaFe Ferrari** pela grande amizade e momentos de descontração. A todas agradeço por tudo que vivemos e juntas aprendemos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

EPIGRAFE

"Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei demais,
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou
Nada sei, conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs.
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida, seja simplesmente
Compreender a marcha, ir tocando em frente,
Como um velho boiadeiro, levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou,
Estrada eu sou, conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora,
Cada um de nos compõe a sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz,
conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz
Pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir

Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei de mais,
Cada um de nos compõe a sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz, de ser feliz"

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biotecnologia e Genômica Bovina.....	19
2.2 Sistema proteolítico: Calpaína e Calpastatina.....	21
2.3 Vitamina D ₃ e seus metabólitos	25
2.4 Eficiência da suplementação com vitamina D ₃	26
2.5 Ensaio com PCR Quantitativo em Tempo Real	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Desenho experimental, animais e coleta de tecidos	31
3.2 Características fenotípicas avaliadas	31
3.2.1 Força de Cisalhamento (FC)	32
3.2.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)	32
3.3 Desenho dos Iniciadores	33
3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA	33
3.5 Otimização dos iniciadores por PCR.....	34
3.6 RT-PCR quantitativo	35
3.7 Análise Estatística dos dados.....	36
3.7.1 Delineamento Experimental.....	36
3.7.2 Eficiência de Amplificação	36
3.7.3 Normalização dos dados	39
3.7.4 Análise da Expressão Gênica.....	40
3.7.5 Análise Conjunta de Associação	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Desenho dos iniciadores	43
4.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA	47
4.3 Otimização dos iniciadores por PCR.....	50
4.4 Quantificação por RT-PCR quantitativo em tempo real.....	53
4.4.1 Especificidade dos iniciadores e eficiência de amplificação	53

4.4.2 Expressão de RNAm dos genes específicos de rim bovino.....	56
4.4.3 Expressão de RNAm dos genes específicos de músculo bovino	62
4.5 Análise de associação conjunta.....	69
5 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO	87

RESUMO

Expressão de genes relacionados ao metabolismo de vitamina D₃ mediante suplementação e estudo de associação com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore

A maciez da carne bovina é o resultado do processo de proteólise miofibrilar influenciado pelas calpaínas (*CAPN*), enzimas ativadas pelo cálcio. A calpastatina (*CAST*) constitui um regulador das calpaínas, atuando como substrato e degradando-se pela ação da própria calpaína. A suplementação com vitamina D₃ na dieta dos animais tem alterado positivamente a maciez da carne, por obter maior absorção e deposição de cálcio nos músculos. Tendo em vista a importância desses genes para a maciez da carne em bovinos e o metabolismo de vitamina D₃, o objetivo deste estudo foi verificar a expressão gênica de *1α-HYD*, *24-HYD*, *CAPN1* e *CAST* (Isoformas). Foram utilizados 42 machos castrados da raça Nelore que foram divididos em 6 tratamentos (7 animais por tratamento). Os animais foram alojados em baias individuais e os tratamentos foram: T1) sem suplementação de Vitamina D₃ + sem sombrite; T2) sem suplementação de Vitamina D₃ + com sombrite – filtração de 50% de UV; T3) com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por dois dias consecutivos pré-abate + sem sombrite; T4) com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por dois dias consecutivos pré-abate + com sombrite – filtração de 50% de UV; T5) com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate + sem sombrite; 6) com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate + com sombrite – filtração de 50% de UV. A expressão gênica foi analisada por PCR quantitativa em tempo real. O gene *1α-HYD* foi mais expresso nos tratamentos com 2 e 8 dias de suplementação com vitamina D₃, independente da exposição diferenciada aos raios ultravioleta. O gene *24-HYD* foi mais expresso no tratamento com 8 dias de suplementação pré-abate quando comparado ao tratamento controle, não diferindo do tratamento com suplementação por 2 dias consecutivos pré-abate. Portanto os resultados não corroboram com o mecanismo de regulação das atividades das enzimas modulada de forma oposta para regular os níveis circulantes de 1,25-di-hidroxi-vitamina D₃ (1,25 D). Quando a concentração de 1,25 D atinge níveis elevados um mecanismo de regulação inativa a 1,25 D e promove a diminuição da expressão de *1α-HYD*. Assim pode-se inferir que neste estudo esses fatores não exerceram influência sobre o gene *1α-HYD* que teve um aumento da expressão. A única possibilidade de verificar o aumento da expressão do gene da enzima *1α-HYD* parece envolver um hiperparatireoidismo secundário decorrente de hipocalcemia em algum momento do experimento. A suplementação com vitamina D₃ não exerceu influência na expressão de RNAm da *CAPN1*, isoforma I e isoforma total da *CAST*. A isoforma II do gene da calpastatina foi mais expressa no tratamento com 8 dias de suplementação pré-abate, onde parece que o aumento da expressão é devido a uma sinalização intracelular indicando que a calpastatina está sendo degradada pela ativação prolongada das calpaínas, em decorrência do aumento do influxo de cálcio. As análises de associação apontam para um possível descompasso entre abundância de RNAm e atividade da protease do sistema das calpaínas no processo de amaciamento da carne.

Palavras-chave: PCR quantitativo em tempo real; Expressão gênica; Cálcio; Maciez da carne; Protéolise *post-mortem*; Vitamina D₃

ABSTRACT

Expression analysis of genes associated with the metabolism of vitamin D₃ and their association with meat tenderness in Nellore breed.

The tenderness of beef is the result of the process of myofibrillar proteolysis influenced by calpains (*CAPN*), enzymes activated by calcium. The calpastatin (*CAST*) is a regulator of calpains, acting as a substrate and degraded by the action of calpain itself. Supplementation with vitamin D₃ in the diet has changed positively on meat tenderness, to obtain greater absorption and calcium deposition in muscle. Given the importance of these genes for meat tenderness in cattle and metabolism of vitamin D₃, the objective of this study was to investigate the gene expression of *1 α -HYD*, *HYD-24*, *CAPN1*, *CAST* (isoforms). We used 42 Nellore steers were divided into 6 treatments (seven animals per treatment). The animals were housed in individual pens and treatments were: T1) without vitamin D₃ feeding + without shadow; T2) without vitamin D₃ feeding + with black - 50% filtration of UV; T3) with 2x10⁶UI of vitamin D₃ for two days consecutive slaughter + without shadow; T4) with 2x10⁶UI vitamin D₃ for two days consecutive slaughter + with black - 50% filtration of UV; T5) with 2x10⁶UI vitamin D₃ for eight days consecutive slaughter + without shading; T6) 2x10⁶UI with vitamin D₃ for eight days consecutive slaughter + with black - 50% filtration of UV. Gene expression was analyzed by quantitative real-time. The *1 α -HYD* gene was more expressed in the treatments with 2 and 8 days of supplementation with vitamin D₃, independent of differential exposure to ultraviolet rays. The *24-HYD* gene was more expressed in the treatment with 8 days of pre-slaughter supplementation compared to control treatment, the treatment did not differ with supplementation for 2 consecutive days pre-slaughter. These findings do not corroborate the mechanism for regulating the activities of enzymes modulated so diametrically opposite to regulate the circulating levels of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ (1,25 D). When there is an overproduction of 1,25 D regulation mechanism inactivates 1.25 D and promotes the reduction of the expression of *1 α -HYD*. Thus we can infer that in this study, these factors did not influence the *1 α -HYD* gene that had increased expression. The only way to verify the increase of gene expression of the enzyme 1 α -HYD seems to involve a secondary hyperparathyroidism due to hypocalcemia sometime in the experiment. Supplementation with vitamin D₃ did not influence the mRNA expression of *CAPN1*, isoform I and isoform total of *CAST*. The isoform II of the calpastatin gene expression was higher in treatment with 8-day pre-slaughter supplementation, where it appears that increased expression is due to an intracellular signaling indicating that calpastatin is degraded by prolonged activation of calpain as a result of increased influx of calcium. The association analysis point to a possible mismatch between mRNA abundance and activity of the calpain system components in these physiological conditions.

Keywords: Quantitative real-time PCR; Gene expression; Calcium; Tenderisation; *Post-mortem* proteolysis; Vitamin D₃

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino no Brasil atingiu em 2010 a ordem de 176,6 milhões de cabeças, sendo aproximadamente 80% desse efetivo constituído de bovinos de corte apoiados em uma base genética *Bos taurus indicus*. A produção de carne no Brasil movimenta cerca de 17 bilhões de Reais do Produto Interno Bruto (PIB) gerando cerca de 430 mil empregos diretos, sendo que o consumo per capita de carne bovina no Brasil é da ordem de 32 kg/pessoa/ano. As exportações brasileiras de carne em equivalente carcaça, de acordo com previsão, irão atingir a ordem de 1,7 milhões de toneladas em 2010, sendo que a exportação de carne *in natura* processada ficou em 1,2 milhões de toneladas em 2009. Atualmente o Brasil é o primeiro exportador de carne *in natura* sendo seguido pela Austrália e Estado Unidos, e importando somente 29 mil toneladas de equivalente carcaça no ano de 2009 (FNP, 2010).

Apesar da posição de destaque da pecuária de corte no cenário econômico nacional, o país exporta seus produtos cárneos ainda sem valor agregado no mercado internacional. Um dos motivos mais consistentes deste fato inclui a falta de qualidade agregada na maioria dos produtos. Dentre as características ligadas à qualidade da carne bovina *in natura*, a maciez assume posição de destaque como a principal característica organoléptica desejada pelo consumidor final (PAZ; LUCHIARI FILHO, 2000). A maciez da carne é influenciada por fatores genéticos, ambientais e de interação genótipo-ambiente. Estudos realizados no Brasil mostram de forma clara a variação dentro e entre raças bovinas para características como índice de fragmentação miofibrilar e força de cisalhamento (MORALES et al., 2003; HADLICH, 2004a), que consistem em métodos utilizados para verificar a maciez da carne. Estudos de estimativas de parâmetros genéticos mostram que a herdabilidade média para maciez da carne é da ordem de 0.30, o que significa que cerca de 30% da variação na maciez da carne dentro de uma mesma raça é de origem genética, sugerindo que a seleção pode ser utilizada para o melhoramento dessa característica (KOOHMARAIE, 2003; OLIVEIRA, 2008). Os 70% restantes da variação tem cunho ambiental, e alguns fenótipos associados à qualidade da carne como maciez, sabor e cor, só podem ser mensurados após o abate do animal, não permitindo ser praticada a seleção direta para essas características.

Os fatores que afetam a maciez da carne podem ser divididos em dois grandes grupos: os fatores *ante-mortem* e os fatores *post-mortem* (SIROL, 2007). Entre os fatores post-mortem pode-se citar o processo de proteólise miofibrilar realizado pelas proteases neutras ativadas pelo íon cálcio, denominadas calpaínas (*CAPN*), que conduz a um aumento progressivo da maciez da carne (MORGAN et al., 1991; GOLL, 1991; KOOHMARAIE, 1992). Entretanto, a maior correlação com a maciez da carne conservada sob refrigeração tem sido associada ao efeito inibidor da proteólise mediada pela calpastatina, igualmente ativada pelo íon cálcio livre no sarcoplasma. Este sistema tem sido considerado um dos principais responsáveis pela maciez da carne e a importância da calpaína durante o processo de amaciamento da carne foi verificado em alguns estudos (KOOHMARAIE, 1992, 1994, 1996; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999) bem como a inibição mediada pela calpastatina no sistema (WHIPPLE et al., 1990; MORGAN et al., 1993; KOOHMARAIE, 1994; GEESINK; KOOHMARAIE; GEESINK et al., 2006).

A suplementação com vitamina D₃ [25(OH)D₃] e seus metabólitos fornecidos na dieta dos animais têm demonstrado resultados positivos nos índices de maciez da carne, por promover maior absorção e deposição de cálcio nos músculos (WERTZ et al., 2004; FOOTE et al., 2001, 2004; MONTGOMERY et al., 2000, 2002; SCANGA et al., 2001; KARGES et al., 2001; SWANEK et al., 1999b; BEITZ et al., 1997).

Foote et al. (2004) e Kotrla et al. (2001) relataram, como resultado da suplementação com vitamina D₃, a diminuição da força de cisalhamento no músculo *Longissimus dorsi*. Por outro lado, Wertz et al. (2004) testando, diferentes dosagens do metabólito 25(OH)D₃ não encontraram alteração na força de cisalhamento e nem na degradação de Troponina-T. De acordo com Montgomery et al. (2002) a possibilidade de interação entre animal e efeito da vitamina D₃ no processo de amaciamento pode ser cogitada, devido à melhora efetiva na maciez para animais com tendência a carne menos macia e nenhuma influência para animais com tendência a carne mais macia (MONTGOMERY et al., 2002). A vitamina D ativa estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos aumentando dessa forma as concentrações séricas de cálcio. A

suplementação de vitamina D₃ gera um aumento na absorção e transporte de cálcio pelas membranas mitocondrial, sarcoplasmática e plasmática do músculo esquelético (BEITZ et al.,1997).

O estudo da expressão de alguns genes que estão relacionados ao metabolismo de vitamina D₃, também podem ser candidatos funcionais no estudo da maciez da carne, juntamente com as calpaínas e calpastatina. Portanto, como resultado do presente estudo, será possível verificar a hipótese que preconiza a regulação da expressão gênica em nível renal das enzimas *1 α -HYD* e *24-HYD* quando os animais são expostos a níveis diferenciados de UV como forma suficiente para ditar a resposta do organismo à suplementação suprafisiológica com vitamina D₃ e seu impacto no músculo no processo de amaciamento da carne.

A hipótese do presente estudo é que existe regulação renal das enzimas *1 α -HYD* e *24-HYD* quando os animais são suplementados com vitamina D₃ e expostos a níveis diferenciados de UV, e que a resposta da suplementação seria suficiente para promover impacto no músculo de forma indireta no processo de amaciamento da carne.

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a expressão dos genes *1 α -HYD* (*25-hidroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase*), *24-HYD* (*vitamin D-24-hydroxylase*), *CAPN1*(Calpaína1) e *CAST* (Calpastatina) (isoformas) mediante interação da suplementação de vitamina D₃ na dieta com exposição solar, buscando a identificação de expressão diferencial desses genes de modo a possibilitar a sua associação com as características qualitativas da carne bovina.

Neste sentido, o estudo de expressão gênica juntamente com a elucidação do mecanismo de regulação das enzimas *1 α -HYD*, *24-HYD*, que apresentam papel de grande relevância no metabolismo da vitamina D₃, bem como a interação do íon cálcio com as enzimas calpaínas e calpastatina no músculo, trás a expectativa que os resultados deste estudo venham a contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos, bioquímicos e fisiológicos envolvidos no metabolismo da vitamina D₃. Permitindo dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias auxiliares que possam ser utilizadas nos programas de melhoramento genético e no desenvolvimento de produtos biotecnológicos que poderão ser de grande valia para o incremento da produtividade da pecuária de corte nacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biotecnologia e Genômica Bovina

A domesticação dos animais permitiu ao ser humano realizar seleção artificial em várias raças e linhagens de animais domésticos, a fim de aumentar a frequência de genes favoráveis economicamente. O conhecimento de que as características fenotípicas são herdáveis, levou o homem a controlar os acasalamentos nas espécies em domesticação, selecionando os melhores reprodutores para determinadas características (REED, 1984).

De acordo com Tautz (2000) a taxa de divergência em genomas de vertebrados que evoluem de forma independente é de apenas 0,1 – 0,5% por milhão de anos. No caso das duas subespécies bovinas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* a similaridade genética deve ser ainda maior, tendo em vista que estudos com o DNA mitocondrial estimaram que a divergência genética entre zebuínos e taurinos é aproximadamente de apenas 250 mil anos (BRADLEY et al., 1996; MIRETTI et al., 2002,) fato que permite inferir que estes dois genomas devam ser altamente semelhantes. Estas duas subespécies apresentam características fenotípicas bem distintas, apesar da proximidade filogenética, com reflexos marcantes na eficiência reprodutiva, produtiva e na qualidade de carne produzida. Dentro deste contexto, visando à identificação de genes diferencialmente expressos relacionados com a velocidade de crescimento e qualidade da carne, estas duas subespécies bovinas constituem-se num modelo biológico ideal para o desenvolvimento de estudos comparativos de genômica funcional.

Autores como Brown e Feder (2005) relataram que a variação na expressão gênica entre membros da mesma espécie é a matéria prima da evolução. Neste sentido, alguns trabalhos consideraram que diferenças de expressão gênica motivadas por alterações em regiões regulatórias e não às diferenças localizadas nas regiões codificantes, constituem a principal fonte de variação genética entre indivíduos (KOHN et al., 2004; WITTKOPP et al., 2004; STAMATOYANNOPOULOS, 2004).

No contexto da agricultura sustentável e criação de animais, a compreensão da fisiologia dos animais continua a ser um grande desafio na criação e produção de bovinos, principalmente para desenvolver sistemas de produção animal que respondem a demanda de consumo e consumo diversificado. Os processos fisiológicos dependem da expressão de vários genes atuando em concerto. Um esforço considerável tem sido dispendido nos últimos anos na análise dos mecanismos que controlam a expressão gênica e sua regulação por fatores biológicos e externos como determinantes de fatores genéticos e nutricionais (CASSAR-MALEK et al., 2008).

Segundo Ledur (2001) o avanço no conhecimento de como determinados genes influenciam características de interesse econômico é devido ao desenvolvimento de técnicas moleculares. Recentemente, a análise genética de animais tem se tornado mais acessível através da habilidade de clonagem e sequenciamento dos genes responsáveis pela expressão de características de produção, o que permitiu o reconhecimento e o uso de polimorfismos de DNA como marcadores genéticos. A geração de novas biotecnologias tem permitido a identificação e manipulação direta de sequências de DNA em grande escala possibilitando o aumento do conhecimento sobre o controle genético de características econômicas, permitindo dessa forma a complementação dos métodos quantitativos de melhoramento, visando ganhos genéticos adicionais (LEDUR, 2001).

O sequenciamento do genoma bovino trouxe novas perspectivas para a moderna produção animal. O primeiro genoma sequenciado em bovinos foi obtido a partir de uma fêmea da raça Hereford, em um trabalho realizado pelo Consórcio Internacional que contou com a participação de 300 pesquisadores de 25 países. De acordo com esses autores, esse conjunto de informações trará mais eficiência e rapidez às pesquisas que buscam identificar genes que afetam características de produção ou que causam enfermidades genéticas, permitindo a obtenção de conhecimentos que permitirão a geração de ferramentas biotecnológicas inovadoras para a pecuária bovina brasileira. De acordo com Kuhn et al. (2005) em estudos das características de qualidade de carne em bovinos, o sequenciamento traz uma grande contribuição para identificação rápida de marcadores genéticos que serão úteis para o melhoramento

animal, com o objetivo de melhorar as características organolépticas da carne em bovinos, previamente analisados.

Uma maior compreensão biológica do modo de ação dos principais genes é provável que forneça um valor extra considerável para produtores de carnes. O conhecimento do modo de ação dos genes para atributos particulares, e seus efeitos associados sobre fenótipo, pode levar a uma maior eficiência dos animais de produção através de mecanismos genéticos e ambientais (BURROW et al., 2001). Os conhecimentos gerados através do entendimento dos mecanismos de ação dos genes pode permitir o desenvolvimento de alternativas de gestão em programas de melhoramento genético como seleção assistida por marcadores moleculares, produtos biotecnológicos e regimes farmacêuticos como marcadores moleculares e drogas controladoras de expressão gênica ou nutricionais para otimizar a produção de animais. Além disso, o conhecimento do modo de herança de genes permitirá uma melhor compreensão das correlações genéticas entre as características (BURROW et al., 2001).

Para fins de produção animal, a expressão gênica global avaliada pelo RNA ou à níveis de proteínas, já demonstraram que alguns genes previamente estudados podem estar associados com o desenvolvimento muscular ou crescimento, e pode levar ao desenvolvimento de novos indicadores moleculares de maciez ou marmoreio. Alguns destes genes são especificamente regulados por fatores genéticos e fatores nutricionais ou diferir entre diferentes cortes de carne bovina (HOCQUETTE et al., 2007). Em reconhecimento ao potencial benefício econômico da genômica, instituições públicas de pesquisa, em associação com a indústria da carne, estão desenvolvendo projetos genômicos em bovinos em todo o mundo, apresentando grandes perspectivas para reformular a pesquisa sobre qualidade de carne, produzindo dessa forma produtos diferenciados (HOCQUETTE et al., 2007).

2.2 Sistema proteolítico: Calpaína e Calpastatina

A maciez da carne bovina é o resultado do processo de proteólise miofibrilar realizado pelas calpaínas (CAPN), enzimas ativadas pelo cálcio (MORGAN et al., 1991; GOLL, 1991; KOOHMARAIE, 1992). A calpastatina (CAST) constitui um

regulador das calpaínas, atuando como substrato e degradando-se pela ação da própria calpaína (DOUMIT; KOOHMARAIE, 1999). No *postmortem*, o nível inicial de calpastatina pode causar uma menor taxa e extensão de amaciamento (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; DELGADO et al., 2001). Este sistema degrada a estrutura miofibrilar e é caracterizado por três componentes: uma enzima que requer baixa concentração de cálcio (μ -calpaína – *CAPN1*), outra que requer alta concentração de cálcio (m-calpaína – *CAPN2*) e um inibidor específico das calpaínas, a calpastatina.

Segundo Koohmaraie (1995) devido à habilidade de modificação da densidade da linha-Z, as calpaínas receberam mais atenção que as catepsinas mesmo quando essa mudança não se correlaciona com a maciez. O sistema calpaínas não apresenta ação sobre os filamentos de actina e miosina em si e o sistema está localizado na linha Z (GOLL et al., 1992). De acordo com Dransfield (1994) a ação proteolítica da calpaína no *postmortem* ocorre pelo enfraquecimento da interação filamentos finos/disco-Z do sarcolema das fibras musculares. A ação das calpaínas no disco-Z concentra-se especificamente nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T, nas quais encontram seu sítio de ligação.

A calpastatina, inibidor endógeno de ambas as calpaínas, é considerada o maior modulador da ação proteolítica destas enzimas. Morgan et al. (2003) realizando estudos no músculo, verificaram que quando a degradação da proteína é reduzida, a atividade da calpastatina é aumentada, sugerindo que no processo *postmortem*, a calpastatina é o principal regulador da atividade proteolítica das calpaínas (KOOHMARAIE, 1994).

O gene da calpastatina contém vários promotores que geram vários transcritos de mRNAs em decorrência de *splicing* alternativo, formando dessa forma múltiplas isoformas da proteína (MEYERS; BEEVER, 2008; PARR; SENSKY; ARNOLD, BARDSLEY; BUTTERY, 2000; PARR et al., 2001, 2004; RAYNAUD et al., 2005a, 2005b). A heterogeneidade da calpastatina em diferentes células e tecidos podem determinar sua localização intracelular e seu papel fisiológico, sendo um potencial mecanismo pelo qual o gene da calpastatina pode regular a atividade dos múltiplos produtos do gene da calpaína. A calpastatina inibe tanto μ -calpaína quanto a m-calpaína e esse processo exige concentrações de cálcio. A quantidade de cálcio

requerido pelas calpastatinas para formar o complexo calpaína-calpastatina é aproximadamente a mesma requerida pela μ -calpaína (GOLL et al., 2003; HOPKINS; TAYLOR, 2004). No entanto, tem sido demonstrado que a calpastatina é degradada pela calpaína, mas a significância fisiológica desta degradação é ainda obscura, embora isto possa ser considerado como parte do processo regulatório do sistema proteolítico (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999).

A expressão gênica da calpastatina é regulada através de vários promotores associados com os exons 1xa e 1xb que estão em conjunto e o exon 1u na região 5'. (MEYERS; BEEVER, 2008; PARR et al., 2000; RAYNAUD et al., 2005a). Cada um destes fatores parece ser responsável pela expressão de diferentes mRNAs da calpastatina (codificação da calpastatina tipo I, II e III, respectivamente, apresentam o N-terminal diferentes) que apresentam potencial para ocorrência de *splicing* alternativo gerando as variedades de isoformas da proteína. A atividade das regiões promotoras em suínos e bovinos foram estudadas e parece que cada espécie tem diferentes atividades, com o promotor 1u e promotor 1xb sendo a mais ativa em suínos e bovinos, respectivamente (PARR et al., 2004; RAYNAUD et al., 2005a). Dentro do gene da calpastatina cada promotor tem uma resposta diferente às vias de segundo mensageiro, mediando a resposta aos fatores que estimulam o crescimento ou uma resposta ao estresse (PARR et al., 2004; SENSKY et al., 2006).

Recentes observações baseadas em cristalografia tem identificado a natureza da interação calpaína-calpastatina, em relação aos aspectos de um inibidor da proteína interagindo com a enzima proteolítica (CAMPBELL HANNA, DAVIES, 2008; MOLDOVEANU; GEHRING; GREEN, 2008). Calpastatina é uma proteína não-estruturada, mas quando se liga a calpaína adota uma estrutura que permite a ação inibitória. A isoforma predominante da calpastatina contém quatro domínios inibidores, cada um dos quais pode inibir a atividade de calpaína, sendo que uma molécula de calpastatina pode inibir 4 moléculas de calpaína. Dentro destes domínios, existem três regiões A, B e C, previstos para interagir com calpaína. A ligação de cálcio com a calpaína provoca alterações na molécula permitindo que ela se torne ativa, mas também permite sua interação com a calpastatina (GOLL et al., 2003).

A observação consistente da participação do sistema calpaína na maciez da carne é que altos níveis de calpastatina estão associados à carne menos macia. O modelo sugere que altos níveis de calpastatina reduzem a atividade de calpaína, reduzindo assim a proteólise necessária para a obtenção da carne macia. Em ruminantes existe uma relação entre atividade de calpastatina no músculo 24 h após o abate e o grau de maciez alcançado após o condicionamento, com diferenças na contabilização de calpastatina por 40% da variação da maciez (SHACKELFORD et al., 1994).

Estudos sobre uma amostra aleatória na seleção de suínos abatidos comercialmente têm mostrado que altos níveis de calpastatina (tanto a atividade e níveis de proteína) nas primeiras horas após o abate estão associados a uma incidência aumentada de resistência, ou seja, maior a força necessária para o corte da carne e, portanto menor a maciez (PARR et al., 1999b; SENSKY et al., 1998). Portanto, através do monitoramento da calpastatina nestes momentos seria potencialmente possível prever se ou não uma determinada carcaça será tenra a um nível aceitável. Apesar de várias abordagens baseadas na predição da qualidade da carne, foram descritos (GEESINK et al., 2006; VAN DER PALEN et al., 2005; GRANT et al., 2005) o uso de métodos de detecção da calpastatina baseados em anticorpos. Este método torna-se inviável pelo fato da existência considerável de heterogeneidade de isoformas da calpastatina que são geradas por *splicing* alternativo e fosforilação (PARR et al., 2000, 2001). A função de tal variabilidade pode ser o controle da atividade inibitória da calpastatina e, portanto, a identificação destas isoformas e as espécies de mRNAs que se originam pode conduzir a um prognóstico mais preciso em relação à qualidade da carne. O diferencial entre a atividade transcricional dos promotores do gene da calpastatina entre as espécies e suas diferentes respostas a estímulos provavelmente é em parte responsável pela variação na expressão da calpastatina entre as espécies, raças e indivíduos que constituem as variações encontradas na maciez da carne.

2.3 Vitamina D₃ e seus metabólitos

A vitamina D ocorre em duas formas na natureza: vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalfiferol). A vitamina D₂ é conhecida como sendo a forma sintética da vitamina, mas esta apresenta a mesma atividade que a vitamina natural (D₃). Nos tecidos animais, a incidência dos raios solares sobre o 7-di-hidro-colesterol, forma sob a pele, a vitamina D₃ (ROBERT et al., 2002; BLEZINGER, 2001; BONDI, 1988; GAMAN; SHERRINGTON, 1981). Uma das principais funções da vitamina D no organismo é a regulação e a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo, aumentando a captação intestinal, minimizando a perda renal, com a finalidade da mineralização normal dos ossos. Além dessa, outras funções são designadas a esta vitamina, como a absorção de cálcio e fósforo, reabsorção óssea quando necessário e efeitos imunomoduladores que são observados sobre a população de linfócitos, macrófagos e células citotóxicas naturais (BLEZINGER, 2001; WEISS, 1998; BONDI, 1988; GAMAN; SHERRINGTON, 1981).

A vitamina D₃ ingerida é absorvida no duodeno e jejuno superior, sendo transportada pelos vasos linfáticos, circulando no sangue ligada à proteína ligadora de vitamina D₃ (*DBP-D Binding Protein*) (ELLIS et al., 2000). Captada pelo fígado, a vitamina D₃ sofre ação de uma enzima do retículo endoplasmático, 25-vitamina D₃-hidroxilase, gerando 25 hidroxí-vitamina D₃ [25(OH)D₃]. A 25 hidroxí-vitamina D₃ [25(OH)D₃] unida à proteína transportadora (transcalciferina) é carregada aos rins onde ocorre a hidroxilação no C₁ por ação da enzima mitocondrial *1α-HYD* (*25-hidroxyvitamin D₃-1α-hydroxylase*), formando 1,25 di-hidroxí-vitamina D₃ [1,25-(OH)₂D₃], forma ativa da vitamina D (ROBERT et al., 2002). A *1α-HYD* é uma enzima de origem renal, também encontrada nos ossos e na placenta, ativada diretamente pelo hormônio paratireoideo (PTH) em função da queda do fosfato sérico, ou indiretamente devido à diminuição da concentração do íon cálcio no plasma (BARRAL, 2007). A ação biológica da 1,25-(OH)₂D₃ é desencadeada a partir da conexão entre os receptores celulares específicos (*VDR - vitamin D receptor*), predominantemente nucleares, com afinidade mil vezes maior por esse metabólito, se comparado ao princípio biológico 25-(OH)D₃. O estrógeno parece ter atividade indutora da síntese desses receptores, uma vez que, analogamente

aos demais hormônios esteróicos, o $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ circulante age nas células-alvo ligando-se ao receptor nuclear *VDR* (Figura 1).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do metabolismo de vitamina D₃ via oral ou via exposição à luz solar no animal. Adaptado de Omdahl (2002)

Depois de formado esse complexo, ocorre uma interação com o elemento de resposta da vitamina D (*VDRE*) no DNA. Essa interação leva à síntese de RNAm para várias proteínas, tais como, a fosfatase alcalina nos osteoblastos, osteocalcina e a proteína específica *calbindin* que tem afinidade pelo cálcio ao nível das células intestinais, resultando no aumento da captação deste íon. A presença de polimorfismos no gene *VDR* parece ser um fator determinante nas diferentes respostas à forma ativa de vitamina D₃ em relação à absorção intestinal do cálcio (BARRAL, 2007).

2.4 Eficiência da suplementação com vitamina D₃

A eficiência desta suplementação pode depender do nível de exposição dos animais aos raios ultravioletas (HIDIROGLOU et al., 1979; WERTZ et al., 2004). Componentes de variância ambientais importantes como, estação do ano, horas luz dia,

latitude geográfica e altitude influenciam na intensidade de radiação ultravioleta (UV) (HOLICK, 2002). Embora o aporte exógeno seja um importante fator para manutenção de níveis considerados ideais, a vitamina D dispõe de uma via endógena de formação na ação da radiação ultra-violeta da luz solar sobre o colesterol na pele.

A conversão da pró-vitamina D₃ na pele de bovinos, para seu composto ativo pode ser limitada por causa da insuficiente radiação UV (HIDIROGLOU et al., 1979). Devido à maior exposição solar, Hidiroglou et al. (1979) verificou que animais criados a pasto apresentaram maior concentração de 25(OH)D₃ no plasma (49 ng/mL) em relação aos animais criados em área coberta (19 ng/mL). Esta maior concentração de 25(OH)D₃ no plasma para os animais a pasto pode ser um indicativo de maior concentração de cálcio nos tecidos, já que a hipercalcemia é resultado da elevada concentração de 25(OH)D₃ no plasma (FOOTE et al., 2004).

Durante períodos de exposição exagerada aos raios UV, dificilmente ocorre hipervitaminose D₃ em mamíferos, visto que estes animais apresentam um mecanismo metabólico renal para converter o excesso de 25(OH)D₃ em uma molécula inativa 24,25-di-hidroxi-vitamina D₃ [24,25(OH)₂D₃] devido ao aumento da atividade da enzima renal *24-HYD (vitamin D-24-hydroxylase)* (OMDAHL et al., 2002; COMBS, 1992). Além disso promove a redução da hidroxilação na posição 1 do metabólito 25(OH)D₃, com a supressão da atividade da enzima *1α-HYD (25-hydroxyvitamin D₃-1α-hydroxylase)* (OMDHAL et al., 2002). No entanto, durante a exposição limitada aos raios UV, os mecanismos metabólicos dos bovinos não estão condicionados a converter o excesso de 25(OH)D₃ em 24,25(OH)₂D₃, esses animais podem responder de forma mais eficiente a suplementação de 25 (OH)D₃ (WERTZ et al., 2004). A interferência negativa na absorção e reabsorção do cálcio pode ser causada pela interação da dose do metabólito com a exposição solar, tendo como consequência a ineficiência da suplementação de 25(OH)D₃ em alterar a degradação de Troponina-T e força de cisalhamento (WERTZ et al., 2004).

2.5 Ensaios com PCR Quantitativo em Tempo Real

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês

Polymerase chain reaction). A PCR é uma técnica laboratorial que reproduz artificialmente a forma como o DNA é replicado na natureza. Apresentada à comunidade científica num encontro em 1984, a PCR foi adotada como uma ferramenta de pesquisa essencial dado sua potencialidade de utilização na área de biologia molecular. A facilidade de uso da RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq) tem revolucionado a investigação da ciência molecular. A sua eficácia na amplificação e quantificação de baixos níveis de ácidos nucleicos tem impulsionado o surgimento de inúmeras aplicações (BUSTIN et al., 2009).

Com a descoberta da PCR, numerosas aplicações vêm sendo descritas para quantificação da expressão de RNAm. A introdução dessa nova metodologia baseada na cinética de fluorescência possibilita a quantificação do produto de PCR quantitativo em tempo real, processo que combina em um só procedimento amplificação e detecção (VANDESOMPELE et al., 2009; NOLAN et al., 2006; CIKOS et al., 2008).

A técnica pode ser empregada para inferir qual a quantidade inicial de um determinado produto (cDNA/DNA) através do comportamento da cinética de amplificação, ou seja, através da análise das diferentes fases de um ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR pode ser dividida basicamente em três fases: fase geométrica, fase linear e platô. A fase geométrica é caracterizada por apresentar alta precisão na duplicação do número de moléculas da reação. Todos os reagentes (nucleotídeos, *primers*, enzimas, $MgCl_2$, etc) estão presentes em quantidade suficiente para todas as moléculas iniciarem sua replicação.

Na fase linear a taxa de produção de novas cadeias de DNA via PCR passa gradualmente de uma progressão geométrica para uma progressão linear. Isto ocorre devido à crescente escassez de um ou mais reagentes, geralmente *primers*. A eficiência de amplificação cai no platô drasticamente para níveis insignificantes, com baixa ou nenhuma produção de novas cadeias de DNA. É nesta fase que geralmente são interrompidas as PCRs para serem visualizadas em gel de agarose. A detecção do aumento do produto de PCR ao longo de cada ciclo é possível devido ao DNA amplificado ser marcado com algum tipo de molécula fluorescente. A emissão crescente de sinal luminoso caracterizará as curvas de amplificação típicas da PCR quantitativo.

Entre os sistemas utilizados para a detecção da fluorescência destaca-se o sistema *SYBR Green*. No sistema de detecção *SYBR Green* o corante se liga ao DNA dupla-fita emitindo fluorescência. Este método de detecção tem sido bastante utilizado em ensaios de PCR quantitativo, pois apresenta a vantagem de apresentar um custo mais baixo em relação à construção de sondas marcadas. Um fator importante que deve ser levado em consideração na utilização deste sistema é que os iniciadores utilizados na reação de PCR devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros de iniciadores, uma vez que esse corante se liga a qualquer DNA dupla fita (GIULIETTI et al., 2001; GINZINGER, 2002).

Independente do sistema de detecção utilizado, o aumento na emissão de fluorescência pode ser lido por um detector em tempo real durante a reação de PCR e é uma consequência direta da amplificação da sequência de DNA/cDNA de interesse. O método de PCR quantitativo em tempo real tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância na quantificação de RNAs mensageiros, tornando a quantificação mais rápida e acurada (GIULIETTI et al., 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; GINZINGER, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental, animais e coleta de tecidos

A fase experimental de suplementação dos animais, abate e coleta dos tecidos foi realizada pelo responsável do projeto FAPESP n° 06/06963-1. Estes tecidos foram utilizados no presente trabalho para análise de expressão dos genes propostos.

São objeto de estudo do presente projeto 42 machos castrados da raça Nelore com peso médio inicial de 435 kg e idade média inicial de 26 meses, que foram divididos em 6 tratamentos (7 animais por tratamento). Estes animais são provenientes de um rebanho comercial e foram confinados por 40 dias para adaptação fisiológica à exposição diferenciada aos raios UV e à suplementação com vitamina D₃.

Os animais foram alojados em baias individuais para permitir o controle do consumo, especialmente da vitamina D₃ e receberam os seguintes tratamentos: 1) **SVSS** (**S**em suplementação de **V**itamina D₃ + **S**em **S**ombrite); 2) **SVCS** (**S**em suplementação de **V**itamina D₃ + **C**om **S**ombrite – filtração de 50% de UV); 3) **D2SS** (com 2x10⁶UI de vitamina **D**₃ por **2** dias consecutivos pré-abate + **S**em **S**ombrite); 4) **D2CS** (com 2x10⁶UI de vitamina **D**₃ por **2** dias consecutivos pré-abate + **C**om **S**ombrite – filtração de 50% de UV); 5) **D8SS** (com 2x10⁶UI de vitamina **D**₃ por **8** dias consecutivos pré-abate + **S**em **S**ombrite) e 6) **D8CS** (com 2x10⁶UI de vitamina **D**₃ por **8** dias consecutivos pré-abate + **C**om **S**ombrite – filtração de 50% de UV). O fornecimento da vitamina D₃ foi realizado por via oral, misturado ao concentrado. Após o abate dos animais, amostras de tecidos dos rins e porções entre a 12^a costela e a 5^a vértebra lombar foram coletados e congelados em nitrogênio líquido, estas amostras foram mantidas à -80°C até extração do RNA total de todas as amostras.

3.2 Características fenotípicas avaliadas

Os dados fenotípicos referentes às características qualitativas da carne como, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar foram coletados junto ao projeto FAPESP n° 06/06963-1 e equipe do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (LAFA) da ESALQ/USP. Estes dados foram utilizados no presente estudo para a

verificação de possível expressão diferencial dos genes propostos mediante os tratamentos e associação com as características avaliadas.

3.2.1 Força de Cisalhamento (FC)

As análises de força de cisalhamento nos dias 1, 7 e 21 *postmortem* foram realizadas imediatamente após os tempos de maturação, exceto para carnes no dia 1 que foram congeladas. Os procedimentos para estas análises seguiram as recomendações do Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USDA (procedimento padrão seguido por laboratórios certificados para analisar a maciez da carne de bovinos em programas de melhoramento genético) e American Meat Science Association - AMSA (1978). Os bifes foram cozidos na grelha elétrica da marca EDANCA® até atingirem a temperatura interna de 40°C, quando então foram virados, aguardando atingirem a temperatura interna de 71°C (monitoradas por termômetro). Após retornarem a temperatura ambiente, os bifes foram colocados na câmara fria ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) por onde ficaram toda a noite. No dia seguinte, as extremidades e os tecidos conjuntivos foram retirados dos bifes. Entre 6 e 8 cilindros com diâmetro de 1,25 cm foram selecionados por bife no sentido paralelo às fibras. Por fim, os cilindros foram submetidos ao aparelho Warner Bratzler para medir a força necessária para rasgar o cilindro. A medida utilizada foi expressa em Kgf.

3.2.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

As análises de MFI foram realizadas de duas maneiras diferentes. Na primeira, as análises foram realizadas com carnes frescas nos dias 7 e 21 de maturação. Na segunda maneira, as análises foram realizadas com carnes congeladas em Nitrogênio líquido (-197°C) nos dias 1 e 21 de maturação. Para o procedimento foram necessários 4g de tecido muscular de cada animal, seguindo o protocolo descrito por Culler et al. (1978), onde o músculo é colocado em um tampão e homogeneizado em liquidificadores “Waring”, sendo feita a leitura do MFI em espectrofotômetro a 540 nm. Este método permite verificar a fragmentação miofibrilar causada pelas proteases durante os dias de maturação.

3.3 Desenho dos Iniciadores

Os genes *1 α -HYD*, *24-HYD*, *CAPN1* e *CAST* (Isoformas Iso_I, Iso_II e Iso_all) que foram estudados nesse projeto, foram escolhidos por estarem diretamente envolvidos com o metabolismo de vitamina D₃ e apresentarem relação com o processo de amaciamento da carne no processo *postmortem*. A partir das sequências bovinas previamente publicadas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) de cada um dos transcritos, foram desenhados iniciadores para reação em cadeia da polimerase utilizando o programa *Primer3Input* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) (ROZEN; SKALETISKY, 2000). Os iniciadores foram avaliados quanto à especificidade utilizando-se o programa *Net Primer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.htm1>), o qual fornece alguns parâmetros de qualidade, como a possível formação de dímeros, *hairpins*, e também estima a atividade óptica, temperatura de anelamento, conteúdo de CG (%), entre outros; fornecendo também uma nota máxima de 100 para cada par de iniciadores analisado.

O ideal é que as notas cheguem próximas a 100 e que as temperaturas e conteúdo de GC (%) não estejam muito altos e nem muito baixos ficando por volta de 50 a 60°C e 50 a 60% respectivamente. Além disso, para confirmar a especificidade dos *primers* para espécie *Bos taurus*, foi feito a comparação das sequências dos *primers* com as sequências disponíveis no banco de dados não redundante do *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) pelo programa *BLASTN* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Foram extraídos RNA total de amostras de músculo e amostras de rim para realização dos testes de otimização e quantificações.

O RNA total foi isolado dos tecidos utilizando-se o reagente TRIzol® (*Invitrogen*) conforme protocolo fornecido pelo fabricante (*Invitrogen*), que corresponde a uma adaptação da metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). Os tecidos foram macerados em 1 mL de TRIzol e incubados por cinco minutos a temperatura

ambiente. A esta mistura adicionou-se 200 μL de clorofórmio, sendo incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi recuperada em um tubo novo. A este foram adicionados 500 μL de isopropanol seguindo-se de incubação por dez minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por dez minutos a 4°C e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10000 x g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi desidratado a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μL de água-DEPC (0,01%) para posterior determinação da concentração de RNA total por espectrofotômetro.

As amostras de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para comprovação de sua integridade. A quantificação das amostras foi realizada por meio de espectrofotometria no comprimento de onda de 260nm e sua qualidade estimada na razão 260/280nm, sendo considerados adequados valores entre 1,7 a 2,0. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para a concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % para a verificação da integridade do RNA total e confirmação da concentração.

A síntese de cDNA foi realizada segundo protocolo do *Kit ImProm-II^{TM} Reverse Transcription System* (Promega). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1 μg de RNA total das amostras de tecido, foram utilizados 1 μL de *primer* oligo (dT) – 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 2 μL de água livre de RNase/DNase. Posteriormente foram incubadas à 70°C por 5 minutos, resfriando-a em gelo por 5 minutos. Depois de retiradas do gelo as amostras receberam 4 μL de *ImProm-II^{TM} 5X reaction buffer*, 1,2 μL de MgCl_2 (25mM), 1,0 μL de dNTP mix (10mM cada dNTP), 0,5 μL de RNasin, 1,0 μL da enzima RT, completando o volume com água livre de RNase/DNase (volume final de 20 μL). A transcrição reversa foi realizada a 25°C por 5 minutos, seguindo de 42°C durante 1 hora e procedendo-se à inativação da enzima a 70°C durante 15 minutos.

3.5 Otimização dos iniciadores por PCR

Os iniciadores foram otimizados por meio da reação de PCR, a fim de se estabelecer as condições ótimas de amplificação para cada par de iniciadores.

A reação padrão de amplificação de 2 µL de cDNA foi estabelecida em 10 mM de dNTP, 10 µM de iniciador direto, 10 µM de iniciador reverso, 2 mM de MgCl₂, 5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR (10X), completando para um volume final de 25 µL. O programa básico de amplificação seguiu uma desnaturação inicial à 95°C por 1 min; seguindo-se de uma nova desnaturação por 1 minuto a 95°C. Para as condições de anelamento foi feito um gradiente de temperatura a 50, 53, 55, 57 e 60°C por 1 minuto. A extensão foi realizada por 1 min à 72°C, seguindo-se de uma extensão final de 72°C por 10 minutos por 30 ciclos.

A especificidade dos produtos amplificados para cada gene foi verificada em gel de agarose a 2% para visualização do tamanho dos fragmentos amplificados.

3.6 RT-PCR quantitativo

A PCR quantitativa se baseia na detecção e quantificação de um marcador fluorescente (*SYBR® Green, Molecular Probes*), cujo sinal está em proporção direta com a quantidade de produto de PCR em uma reação. O *SYBR® Green* se liga à fita dupla de cDNA e ao sofrer excitação luminosa, emite luz. Desta maneira, com o acúmulo de produto de PCR, a fluorescência aumenta.

Para as reações de RT-PCR quantitativo foram utilizados: 3,2 µL de água, 0,4 µL de *primer* direto e reverso (concentração inicial de 8µM e concentração final de 0,4µM) e 5 µL do *Kit Syber Green*. As reações foram preparadas adicionando-se 9µL do *mix* em cada pocinho da placa, seguidos de 1 µL de cDNA em cada reação. A placas foram centrifugadas à 700Xg por 5 segundos e o equipamento utilizado para as análises foi *LightCycler 480 II* da Roche. As condições de amplificação foram: 96°C por 10 minutos para desnaturação do DNA no primeiro ciclo da PCR. Para os demais ciclos 96°C por 10 segundos, 60°C por 10 segundos para anelamento e 72°C por 20 segundos para extensão.

Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada gene entre as temperaturas 75°C a 95°C. Todo o experimento de PCR em tempo real incluiu uma amostra como controle negativo (sem cDNA) e um calibrador, que foi a amplificação de um gene conhecido (GAPDH) a partir de uma alíquota do *pool* de cDNA

das 42 amostras. Os resultados da expressão gênica foram gerados e registrados como valores de Ct (*Cycle Threshold*).

3.7 Análise Estatística dos dados

3.7.1 Delineamento Experimental

Para análise dos dados foi implementado um delineamento experimental em blocos casualizados (três diferentes categorias de peso vivo inicial após período de adaptação à dieta de alto concentrado) com arranjo fatorial 3 x 2, sendo 3 esquemas de suplementação com vitamina D₃ e 2 sistemas de exposição à luz solar, resultando em 6 tratamentos com 7 repetições para os dados de expressão dos genes específicos de músculo bovino (totalizando 42 animais). Para os dados de expressão dos genes específicos de rim bovino, 3 tratamentos apresentaram 2 parcelas perdida/cada restando 5 repetições/cada e 1 tratamento apresentou uma parcela perdida restando 6 repetições (totalizando 35 animais).

3.7.2 Eficiência de Amplificação

Foi realizada a curva padrão dos genes propostos através de uma curva de diluição em série de cDNA constituída de um *pool* das 42 amostras para músculo bovino e um *pool* de 35 amostras para rim, sendo composta de duplicatas de quatro diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). A curva padrão foi utilizada apenas como uma curva de calibração para determinar qual diluição de cDNA seria utilizada nos experimentos de quantificação.

A eficiência individual de cada amostra foi determinada utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os dados de fluorescência obtidos no equipamento *LightCycler® 480 (Roche)* foram exportados para o programa LingReg. Este programa utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de RNAm e a eficiência de amplificação.

O método da curva padrão proposto por Rasmussen (2001) adota que todas as amostras apresentam eficiência de amplificação única e constante. No método proposto por Ramakers et al. (2003) a fluorescência medida por ciclo de cada amostra individual pode ser usada. Esta aproximação alternativa está baseada na linearização da fórmula básica para amplificação exponencial da PCR, levando o logaritmo para ambos os lados da equação (Equação 1).

$$\text{Log } (N_c) = \text{Log } (N_o) + \text{Log } (Eff) \times C \quad (1)$$

Em que: N_c = medida dos dados de fluorescência;

N_o = número inicial de moléculas;

Eff = Eficiência;

C = número de ciclos.

A análise de regressão é então usada para calcular o intercepto e o coeficiente angular da reta, $\text{Log } (N_o)$ e $\text{Log } (Eff)$ respectivamente, da linha direta que ajusta melhor para os pontos de dados incluídos. A concentração inicial decorre diretamente da interceptação desta linha de regressão linear ($N_o = 10^{\text{intercept}}$) e é expressa em termos de fluorescência. A eficiência da PCR individual resulta da inclinação da linha de regressão linear ($Eff = 10^{\text{slope}}$) e pode ser usada como um controle de qualidade para excluir possíveis amostras contaminadas. Para garantir que não haja seleção equivocada dos pontos de dados dentro da janela de linearidade, um algoritmo iterativo é formulado para procurar linhas que consiste de no mínimo 4 e no máximo 6 pontos com um coeficiente de determinação (R^2) alto e um declive próximo da inclinação máxima (RAMAKERS et al., 2003).

Amostra por amostra, cada curva de regressão foi ajustada para conter no mínimo 4 e no máximo 6 pontos onde foi aceito um coeficiente de determinação de no mínimo 0,9999. Para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, a linha de *threshold* foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, que corresponde à fase em que as amostras estão sofrendo amplificação exponencial. A janela de linearidade foi

determinada pelos valores mínimos (limite inferior) e máximos (limite superior) de fluorescência utilizadas para estimar a eficiência da PCR (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Curva de regressão linear para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR. Os pontos incluídos entre os limites superior e inferior da janela de linearidade foram utilizados nos cálculos da eficiência e da correlação da curva

Figura 3 – Curvas de amplificação por PCR quantitativo e linha de *threshold* (definido como o ponto médio da janela de linearidade). O ponto em que as curvas de amplificação cruzam a linha corresponde ao *threshold cycle* (Ct). Ciclo da PCR no qual foi detectado o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal

Foi adotado um procedimento geral onde usando as eficiências individuais das amostras, obtidas pelo LingReg, foram realizados ajustes para uma eficiência geral, definida como 2.0 (Equação 2). Assim, todas as análises seguintes têm a mesma base 2.0 de eficiência.

$$Ct_{2ij} = \log_2 (E_{\text{gene}_{ij}}^{Ct_{\text{gene}(ij)}})$$

Em que:

Ct_{2ij} é Ct da amostra ij corrigido para eficiência 2.0;

$Gene_{ij}^{Ct_{\text{gene}(ij)}}$ é a eficiência real calculada pelo LingReg PCR elevado ao Ct da amostra para o gene ij.

3.7.3 Normalização dos dados

Os valores de Ct corrigidos (CtC) dos 3 genes referência (GAPDH, RPL-19, EEF1A) foram expressos em quantidade relativa (Q) usando a equação (3).

$$Q = E^{(Ct_{\text{mínimo}} - Ct_{\text{amostra}})} \quad (3)$$

Em seguida os valores de CtC dos genes referência (GAPDH, RPL-19, EEF1A) foram estimados, considerando um modelo matemático misto, com efeito aleatório associado à variabilidade natural do indivíduo amostrado. Uma abordagem de modelos mistos, usando a equação 4.

$$Y_{ij} = \mu + g_i + a_j + e_{ij} \quad (4)$$

Em que:

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

μ é a média geral dos Ct;

g_i é o efeito fixo do ith gene referência ($i=1, \dots, 5$);

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

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

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

3.7.4 Análise da Expressão Gênica

Para a quantificação relativa, os dados de expressão dos genes alvos (*1α-HYD*, *24-HYD*, *CAPN1* e *CAST* (Isoformas Iso_I, Iso_II e Iso_all)); foram submetidos à análise de variância (Modelo Algébrico – equação 5) seguido pelo teste Tukey para comparação de médias.

As equações utilizadas para ilustrarem os métodos de quantificação relativa assim como a equação direta de Ct foram implementadas via SAS (*Statistical Analysis System*) versão 2000. As análises de variâncias foram obtidas via o procedimento *PROC GLM* do SAS (2000). Em seguida os dados foram submetidos ao teste Tukey e a diferença entre os tratamentos foi considerada significativa se os valores de probabilidade de $P < 0,05$.

$$Y_{ijkl} = \mu + v_i + s_j + vs_{ij} + b_k + e_{ijkl} \quad (5)$$

Em que:

Y_{ijkl} = observações de expressões gênicas (valores Ct = Ct_{gene de interesse} – Ct_{normalizador}) de *1α-HYD*, *24-HYD*, *CAPN1* e *CAST* (Isoformas Iso_I, Iso_II e Iso_all);

μ = constante associada ao modelo;

v_i = efeito da vitamina D₃; sendo i = 0, 2 e 8;

s_j = efeito da exposição ao sol; sendo j = 0 e 1;

vs_{ij} = interação entre vitamina D₃ e exposição ao sol;

b_k = efeito de bloco; sendo k = 1, 2 e 3;

e_{ijkl} = erro associado a cada observação.

3.7.5 Análise Conjunta de Associação

Com a finalidade de avaliar as implicações dos resultados associados a RT-PCR em relação aos fenótipos para características maciez da carne maturada aos 1, 7 e 21 dias e índice de fragmentação miofibrilar aos 1 e 21 dias, as medidas fenotípicas foram utilizadas como variáveis dependentes.

Para análise de associação da quantificação das expressões dos genes *CAPN1*, *CAST* (iso_I, iso_II e iso_all), foram aplicados duas abordagens. A primeira análise considera a expressão de dois genes no modelo, *CAPN1* e *CAST* (iso_all), aqui denominada de análise conjunta (modelo 6). A segunda análise considera as expressões de dois genes simultaneamente no modelo, porém um deles com as duas isoformas *CAPN1*, *CAST* (iso_I) e *CAST* (iso_II), também denominada de análise conjunta (Modelo 7).

Modelo 6:

$$y_{ijkl} = \mu + v_i + s_j + vs_{ij} + b_k + \beta_1 (E_{ijkl1} - \bar{E}_1) + \beta_2 (E_{ijkl2} - \bar{E}_2) + e_{ijk} \quad (6)$$

Em que:

y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado da característica maciez;

μ = é a constante associada ao modelo;

v_i = é o efeito da vitamina D₃; sendo i = 0, 2 e 8;

s_j = é o efeito da exposição ao sol; sendo j = 0 e 1;

vs_{ij} = é a interação entre vitamina D₃ e exposição ao sol;

b_k = é o efeito de bloco; sendo k = 1, 2 e 3;

β_1, β_2 = são os coeficientes de regressão linear para o efeito da expressão gênica para o gene da calpaina 1 e isoforma total, respectivamente

E_{ijkl1} = é a expressão do gene da calpaina 1

$\bar{E}_1$ = é a média da expressão do gene da calpaina 1

E_{ijkl2} = é a expressão do gene da isoforma total

$\bar{E}_2$ = é a média da expressão do gene da isoforma total

e_{ijk} = é o erro associado a cada observação.

Modelo 7:

$$Y_{ijkl} = \mu + v_i + s_j + vs_{ij} + b_k + \beta_1 (E_{ijkl1} - \bar{E}_1) + \beta_2 (E_{ijkl2} - \bar{E}_2) + \beta_3 (E_{ijkl3} - \bar{E}_3) + e_{ijkl} \quad (7)$$

Em que:

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

μ = é a constante associada ao modelo;

v_i = é o efeito da vitamina D₃; sendo i = 0, 2 e 8;

s_j = é o efeito da exposição ao sol; sendo j = 0 e 1;

vs_{ij} = é a interação entre os tratamentos vitamina D₃ com a exposição ao sol;

b_k = é o efeito de bloco; sendo k = 1, 2 e 3;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = são os coeficientes de regressão linear para o efeito da expressão gênica para os genes calpaina 1 e isoforma I e isoforma II, respectivamente;

E_{ijkl1} = expressão gene da calpaina 1;

$\bar{E}_1$ = é a média da expressão do gene da calpaina I;

E_{ijkl2} = é a expressão do gene da isoforma I;

$\bar{E}_2$ = é a média da expressão do gene da isoforma I;

E_{ijkl3} = é a expressão do gene da isoforma II;

$\bar{E}_3$ = é a média da expressão do gene da isoforma II;

e_{ijkl} = é o erro associado a cada observação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores para os estudos da expressão foram desenhados conforme descrito no item 4.3. Para o genes *1 α -HYD* e *24-HYD* específicos de rim, foram desenhados dois pares de *primers*, sendo o primeiro localizado numa região entre os exons 6 e 7, flanqueando uma região de 221pb e o segundo localizado entre os exons 3 e 5, flanqueando uma região de 140pb. Para o gene da Calpaína1 foi desenhado um par de *primers*, sendo o *primer* direto localizado no exon 4 e o *primer* reverso localizado no exon 5, flanqueando uma região de 122pb. O desenho dos *primers* em exons diferentes tem a finalidade de verificar o tamanho do fragmento amplificado durante a PCR. Caso ocorra no momento da extração de RNA total contaminação por DNA genômico, o tamanho do fragmento amplificado será maior por ter amplificado o intron juntamente com as regiões flanqueadoras. Os três pares de *primers* desenhados tiveram notas 100 no programa *Net primer* e, conseqüentemente, os parâmetros avaliados estavam satisfatórios para a síntese.

As sequências dos iniciadores e o tamanho da região flanqueada podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de *primers* desenhados e tamanho da região flanqueada

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5'----- 3')	Exons	Tamanho
<i>1α-HYD</i>	D: TCTCCTGGGCTCTGTATGAA R: TTCACCCACACAAATGTCTC	6 e 7	221pb
<i>24-HYD</i>	D: TGGACGACAAAATCAACGAG R: CTCATACAGCACAAGGCAGA	3 e 5	140pb
Calpaína1	D: CGCCTCCCTTACCCTCAA R: CATCCACCCACTCACCAAAC	4 e 5	122pb
Calpastatina (Iso_I)	D: TGCCCGCCACACCCAGGA R: ACTGCTCCCAAGGCTTGTT	-	109pb
Calpastatina (Iso_II)	D: TGCGTCTCTCGGAACACAT R: AAGGCGATCCACTGGTTTTT	-	91pb
Calpastatina (Iso_all)	D: ATGAGGAAACAGTCCCATCG R: GGGCTTGGGTTTTTCTTCAG	-	95pb

Alguns estudos demonstraram a existência de isoformas de calpastatina em camundongos, ratos, humanos, suínos e bovinos (TAKANO et al., 1999, 2000; PARR et al., 2000, 2001). Existe uma forma maior contendo todos os exons, isto é traduzida normalmente e outras com deleções de exons na região denominada XL e do exon 3, que faz parte da ligação entre o domínio XL com outro domínio da proteína identificado como L, mostrando a existência de *splicing* alternativo. De acordo com Raynaud et al. (2005) apesar de todos os dados disponíveis relativo à calpastatina, pouco se sabe como este gene é regulado, particularmente em bovinos. Uma diferença na extremidade 5' presente no mRNA de bovinos, suínos e ratos promove a existência de quatro tipos de transcritos (Tipo I, II, III, e IV), sendo que a isoforma tipo I, II e III são específicas de músculo enquanto que a tipo IV é específica de testículo. A região XL é composta pelos exons 1xa, responsável pela transcrição da isoforma tipo I, 1xb responsável pela isoforma tipo II, exons 1y e 1x e o exon 1u responsável pela transcrição da isoforma tipo III. A figura abaixo mostra a representação esquemática do gene da calpastatina bovina e os produtos preditos que geram diferentes RNAm.

Figura 4 – Representação esquemática do gene da Calpastatina bovina e os produtos preditos que geram RNAm diferentes. Exons são representados através de caixas pretas. Setas sobre os exons indicam os locais de começo de transcrição e são indicados os iniciadores utilizados. Adaptado de Raynaud et al. (2005)

Os iniciadores descritos na literatura para as isoformas bem como a estrutura do gene da Calpastatina citado acima, não conferem com as sequências de RNAm depositadas no banco de dados do *NCBI*. Além disso, não foi possível identificar nas sequências de RNAm de bovinos os exons 1xa, 1xb e 1u. No entanto, optou-se por realizar o alinhamento das sequências disponíveis das variantes da calpastatina com a utilização do programa *BioEdit* e com base no alinhamento, foram desenhados três pares de iniciadores em regiões que diferenciavam as três isoformas (Figura 5). Entretanto, foi possível diferenciar somente duas isoformas (Iso_I e Iso_II), sendo a terceira denominada Iso_all por amplificar um região que engloba as três isoformas.

Figura 5 – Alinhamento das variantes de RNAm do gene da Calpastatina realizada pelo *BioEdit*, na qual é possível observar os iniciadores das isoformas em regiões que diferenciam as três isoformas

Com o auxílio da opção *BLASTN* (*nucleotide blast*) do *NCBI*, foi possível confirmar que todos os iniciadores desenhados são específicos para região escolhida, ou seja, eles estão amplificando somente as sequências desejadas na espécie *Bos taurus*.

A utilização da metodologia de RT-PCR quantitativo requer correção para variações ambientais para obtenção de resultados confiáveis. A quantificação de um gene controle ou referência permite a normalização de diferenças na quantidade de RNA ou cDNA em amostras individuais geradas por diferenças na quantidade e qualidade do material inicial, diferenças no preparo do RNA e eficiência da síntese de cDNA. Diferenças na transcrição reversa podem resultar em quantidades de cDNA que não correspondem à quantidade de RNA inicial (HUGGETT et al., 2005).

A normalização para um gene controle é atualmente o método mais aceitável para corrigir tais variações. De acordo com Huggett et al. (2005) recentemente vários relatos têm demonstrado que os genes de referência clássicos podem variar extensivamente tornando-se inadequados para propósitos de normalização devido às grandes variações observadas. Por isso, torna-se necessário testar diferentes genes

controle para encontrar o gene que apresente o melhor resultado para cada experiência individual.

Dentro deste contexto, em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP, foram desenhados iniciadores para três genes controle: *RPL-19* (*Proteína ribossomal L-19*), *GADPH* (*Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*) e *EEF1A2* (*Eukaryotic translation elongation factor-1-alpha-2*). Os iniciadores foram testados de modo a verificar qual apresenta a menor variação de expressão em relação aos tratamentos. As sequências dos iniciadores e o tamanho da região flanqueada podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de *primers* e tamanho da região flanqueada para os genes referência

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5'----- 3')	Exons	Tamanho
<i>RPL-19</i>	D: GAAATCGCCAATGCCAAC R: GAGCCTTGTCTGCCTTCA	1 e 2	410pb
<i>GAPDH</i>	D: GCGGTGAACACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT	1 e 2	194pb
<i>EEF1A2</i>	D: GCAGCCATTGTGGAGATG R: ACTTGCCCGCCTTCTGTG	6 e 7	196pb

4.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A partir do protocolo de extração de RNA total de tecido muscular e amostras de rim, procedeu-se a quantificação das amostras de RNA através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Foi feito o cálculo da razão entre a DO (densidade óptica) em 260 e 280 nm. Todas as amostras apresentaram valores de razão entre 1,6 e 2,0 conforme recomendado para verificar-se o grau de pureza do material (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987).

As figuras abaixo mostram a integridade das bandas estruturais de RNA ribossômico 28S, 18S e 5,8S de músculo e rim bovino visualizados por eletroforese em gel.

Figura 6 – Gel de agarose a 1%, bandas referentes às subunidades do RNA ribossômico 28S, 18S e 5,8S de músculo bovino

Figura 7 – Gel de agarose a 1%, bandas referentes às subunidades do RNA ribossômico 28S, 18S e 5,8S de rim bovino

A fórmula utilizada para calcular a concentração de RNA em cada amostra encontra-se abaixo (equação 1):

$$\text{Equação 1: } [\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{L} = \frac{\text{Absorbância à 260 nm} \times \text{Diluição} \times 40}{1000}$$

Na tabela 3 estão apresentados os valores da razão entre densidade óptica em 260 e 280nm e a concentração do RNA total de cada uma das amostras.

Tabela 3 – Quantificação do RNA total extraído de músculo e rim bovino

Amostras Músculo Bovino			Amostras Rim Bovino	
Animal	Razão	Concentração de RNA (µg/µL)	Razão	Concentração de RNA (µg/µL)
A1	1,80	1,394	2,02	3,343
A2	1,74	0,768	1,89	1,678
A3	1,73	0,834	2,00	1,957
A4	1,75	1,042	1,99	2,142
A5	1,71	0,634	2,06	3,912
A6	1,76	1,484	2,01	2,457
A7	1,73	1,484	2,02	4,091
A8	1,84	1,068	1,99	1,813
A9	1,74	1,482	1,92	1,456
A10	1,80	1,282	2,02	3,288
A11	1,72	1,416	2,05	4,321
A12	1,78	0,476	2,02	3,176
A13	1,72	0,858	-	-
A14	1,74	0,650	1,98	1,821
A15	1,77	0,808	2,04	4,105
A16	1,74	0,402	1,99	1,821
A17	1,73	1,422	1,99	2,188
A18	1,75	0,704	1,94	2,578
A19	1,70	1,136	2,01	2,393
A20	1,97	2,326	2,06	3,278
A21	1,73	1,128	2,02	3,330
A22	1,70	1,284	-	-
A23	1,76	1,372	1,98	1,987
A24	1,74	1,186	1,87	2,876
A25	1,72	1,124	2,03	3,437
A26	1,70	1,432	1,97	2,765
A27	1,74	0,808	2,03	3,688
A28	1,78	1,156	1,98	2,084
A29	1,74	0,998	2,02	7,959
A30	1,73	0,794	2,04	3,232
A31	1,75	2,074	1,98	2,083
A32	1,76	0,526	1,97	1,936
A33	1,77	1,556	1,88	0,987
A34	1,80	2,642	2,03	4,552
A35	1,76	1,840	-	-
A36	1,85	2,472	-	-
A37	1,80	2,602	2,04	5,139
A38	1,75	1,016	1,89	0,876
A39	1,73	1,200	1,97	2,245
A40	1,75	3,080	-	-
A41	1,70	0,792	-	-
A42	1,78	2,204	-	-

Depois de realizada a quantificação e diluição, a partir de 1 µg de RNA total foi realizada a síntese de cDNA para as amostras, segundo protocolo do *Kit ImProm-II^{TM} Reverse Transcription System* (Promega) descrito no item 4.4.

4.3 Otimização dos iniciadores por PCR

Foram feitos vários testes para otimização das condições de amplificação para os *primers* desenhados. As otimizações para os genes foram todas referentes a gradientes de temperatura de anelamento, para descobrir a ideal para cada par de *primers*. Foi possível verificar presença dos *amplicons* de tamanho esperada em todas as temperaturas testadas, porém nas temperaturas mais baixas (50°C) foi possível observar, para alguns genes, fragmentos inespecíficos.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% para verificação dos produtos da PCR (Figura 8).

Figura 8 – Gel de agarose a 2%, corado com Gel Red. **Linha 1** marcador molecular Ø X 174 RF DNA/*Hae* III *Fragments*; **Linhas 2 a 6** presença de bandas de 122 pb para o Gene Calpaína1 em condições de temperatura a 50, 53, 55, 58 e 60°C respectivamente; **Linha 7** controle negativo da reação de PCR; **Linha 8** controle positivo (RPL19) banda 410pb

Para as isoformas do gene da Calpastatina, foi possível verificar presença das bandas esperadas em todas as temperaturas testadas, porém nas temperaturas de 53°C para isoforma II e temperaturas de 53 e 58°C para isoforma all foi possível observar fragmentos inespecíficos.

Figura 9 – Gel de agarose a 2%, corado com Gel Red. **Linha 1** marcador molecular Ø X 174 RF DNA/*Hae* III *Fragments*; **Linhas 2 a 6** presença de bandas de 109pb para a isoforma I do Gene da Calpastatina em condições de temperatura a 50, 53, 55, 58 e 60°C; **Linha 7** controle negativo da reação de PCR; **Linhas 8 a 12** presença de bandas de 91pb para a isoforma II ; **Linha 13** controle negativo da reação de PCR; **Linhas 14 a 18** presença de bandas de 95pb para a isoforma all; **Linha19** controle negativo da reação de PCR; **Linha 20** controle positivo (RPL19) banda 410pb

Após a amplificação do gene *1α-HYD* em cinco temperaturas, foi possível verificar a presença da banda esperada de 221pb e também a presença de outra banda inespecífica de aproximadamente 400 pb em todas as temperaturas testadas (Figura 10).

Figura 10 – Gel de agarose a 2%, corado com Gel Red. **Linha 1** marcador molecular Ø X 174 RF DNA/*Hae* III *Fragments*; **Linhas 2 a 6** presença de bandas de 221pb para o Gene *1α-HYD* e bandas de aproximadamente 400pb em condições de temperatura a 50, 53, 55, 58 e 60°C respectivamente; **Linha 7** controle negativo da reação de PCR.

Verificando o tamanho do intron localizado entre os exons no banco de dados do *NCBI*, sugeriu-se que as amostras de RNA total de rim bovino estão contaminadas com DNA genômico. O tamanho do intron presente entre os exons 6 e 7

para o gene *1 α -HYD* é de 199 pb e somando com o tamanho do fragmento de 221 pb amplifica um fragmento de 420 pb como pode ser observado na figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da constituição dos exons e introns do gene *1 α -HYD*

Após feita a verificação de contaminação com DNA optou-se por fazer o tratamento das amostras extraídas com DNase I (*Invitrogen*) cujo protocolo encontra-se no anexo I. As amostras tratadas com DNase I (Deoxyribonuclease I) foram utilizadas para a síntese de cDNA e com uma amostra de RNA total sem tratamento com DNase I foi feito o controle negativo que consiste no mesmo protocolo de síntese de cDNA do *Kit ImProm-II^{TM} Reverse Transcription System* (Promega), porém sem a enzima RT (Transcriptase Reversa). Em seguida foi realizada a PCR para amplificação dos genes *1 α -HYD* e *24-HYD* nas temperaturas de 55, 58 e 60°C (amostras tratadas). A PCR também foi realizada utilizando o controle negativo com os *primers 1 α -HYD* (PCR feita com o RNA total sem tratamento com DNase I, cuja a síntese de cDNA foi feita sem a utilização da enzima RT, caso ocorra amplificação, este foi feito através do molde de DNA contaminante) nas temperaturas 55, 58 e 60°C.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação dos produtos da PCR. De acordo com os resultados, foi possível verificar para o gene *1 α -HYD* a presença da banda de 221 pb e a ausência da banda inespecífica de 420 pb, o mesmo pode ser observado para o gene *24-HYD* onde observamos somente o fragmento específico de 140pb. Para as amostras do

controle negativo do *kit* de cDNA, pode-se observar a presença de bandas amplificadas através do molde de DNA contendo 420 pb, comprovando a contaminação do RNA total com DNA genômico. (Figura 12).

Figura 12 – Gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red. **Linha 1** marcador molecular Ø X 174 RF DNA/*Hae* III *Fragments*; **Linhas 2 a 4** presença de bandas de 221pb para o Gene *1α-HYD* em condições de temperatura a 55, 58 e 60°C; **Linha 5** controle negativo da reação de PCR; **Linhas 6 a 8** presença de bandas de 140pb para o Gene *24-HYD*; **Linha 9** controle negativo da reação de PCR; **Linha 10** controle positivo (RPL19) banda 410pb; **Linhas 11 a 13** controle negativo do kit de cDNA indicando presença de bandas amplificadas através do molde de DNA, comprovando a contaminação do RNA total com DNA genômico

4.4 Quantificação por RT-PCR quantitativo em tempo real

4.4.1 Especificidade dos iniciadores e eficiência de amplificação

A análise da curva de *melting* é um método preciso e rápido para verificar a especificidade dos produtos da PCR. A temperatura de *melting* avalia a dissociação da fita dupla de DNA com o aumento da temperatura, e o produto presente na reação é considerado específico quando apenas um pico ou temperatura de *melting* é gerado. Uma reação específica deverá apresentar um único pico, correspondente à temperatura na qual 50% das moléculas encontra-se em fita simples e 50% em fita dupla. A presença de um segundo pico, ou seja, uma segunda temperatura de desnaturação seria indicativo de reação inespecífica por contaminação de DNA genômico ou excesso de iniciadores.

Pela análise da curva de *melting* pode-se verificar que os produtos amplificados desnaturaram na mesma temperatura e que não ocorreram amplificações

inespecíficas e nem a formação de dímeros de iniciadores. Uma representação das curvas de *melting* é apresentada na Figura 13. A especificidade de amplificação para os genes controle e genes alvo foi verificada e os detalhes das temperaturas correspondentes de cada gene estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Sequência dos genes e suas respectivas temperaturas de *Melting*

Genes	Temperatura de <i>Melting</i>
<i>GAPDH</i>	84,5°C
<i>RPL-19</i>	86°C
<i>EEF1A</i>	90°C
<i>CAPN1</i>	84,5°C
<i>CAST (Iso_I)</i>	80°C
<i>CAST (Iso_II)</i>	81°C
<i>CAST (Iso_all)</i>	80°C
<i>1α-HYD</i>	88°C
<i>24-HYD</i>	80°C

Figura 13 – Representação da curva de *melting* do gene da *CAST (Iso_all)* juntamente com o gene calibrador *GAPDH*

A eficiência de amplificação individual de cada amostra dos genes *GAPDH*, *RPL-19*, *EEF1A*, *CAPN1*, *CAST (Iso_I)*, *CAST (Iso_II)*, *CAST (Iso_all)*, *1 α -HYD* e *24-HYD* foi calculada utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os valores de eficiência para a *CAPN1* variaram de 1,7 a 2,0, sendo que para todos os outros genes os valores variaram de 1,8 a 2,0. Uma representação contendo as 42 amostras e 1 amostra para o gene *GAPDH*, cuja eficiência foi determinada pelo programa LinRegPCR é apresentada nas Figuras 14 e 15.

Segundo Meijerink et al. (2001), para que a RT-PCR quantitativa seja confiável e reprodutível, as amplificações devem apresentar perto de 100% de eficiência a cada ciclo de reação. O valor da eficiência deve ser de aproximadamente 2.0 significando a duplicação do material genômico a cada ciclo de amplificação e correspondendo a 100% de eficiência. No presente estudo observou-se que o programa LinRegPCR gerou eficiências satisfatórias. Cikos et al. (2007) testando diferentes métodos para estimar a eficiência da quantificação relativa com base na fluorescência, incluindo o programa LinRegPCR, verificaram que todos os métodos testados forneceram valores quantitativos que refletem a quantidade de RNAm, mas diferem em sua exatidão e reprodutibilidade. Entretanto, a seleção do método apropriado vai depender da concepção de um experimento em particular como tipo de tecido, abundância de genes, número de grupos experimentais entre outros.

Figura 14 – Curva de regressão linear para cálculo das eficiências individuais das reações de PCR demonstrada pelo programa LinRegPCR para o gene *GAPDH*

Figura 15 – Curva de regressão linear para cálculo da eficiência individual da amostra 39 de músculo bovino, indicando o valor da eficiência de 1,932 para o gene *GAPDH*

O programa LinRegPCR tem sido amplamente utilizado em diversos trabalhos científicos para estimar a eficiência de amplificação, pois é rápido e utiliza as mesmas amostras cuja expressão foi quantificada, sendo ideal para experimentos que possuem quantidade limitada de RNA. No entanto, o método da curva de diluição deve ser mantido, sendo utilizado como um controle positivo e ajuda a definir as variações e os limites de detecção do equipamento. Neste estudo utilizou-se a correção da eficiência de amplificação individual de cada amostra, gerada pelo programa LinRegPCR, para uma eficiência 2,0.

4.4.2 Expressão de RNAm dos genes específicos de rim bovino

O método de quantificação relativa descrito por PFAFFL (2001) é o método no qual se deseja saber a diferença de expressão entre os grupos estudados. Esse método é baseado na quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle denominado referência ou controle interno, para minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de RNA utilizada inicialmente e eficiência na transcrição reversa. A razão da expressão relativa é baseada na eficiência (E) de amplificação dos iniciadores e na variação do ciclo no início da detecção do produto amplificado (C_t) de

uma amostra do grupo controle versus uma amostra do grupo tratamento, corrigidos para o gene referência.

A partir do cDNA sintetizado realizou-se as reações de PCR quantitativo, onde se obteve os valores de Ct. Foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos para o genes controle *GAPDH*, *RPL-19*, *EEF1A* e genes alvo *1 α -HYD* e *24-HYD* específicos para rim bovino. A estatística descritiva do banco de dados foi realizada para verificar o nível de variação dos genes referência e alvos (Tabelas 5 a 9).

Tabela 5 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *GAPDH* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>GAPDH</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	6	25,0033	0,9452	0,8934	3,7804
T2 (SVCS)	7	24,5700	0,7214	0,5204	2,9362
T3 (D2SS)	5	24,1020	0,6959	0,4843	2,8876
T4 (D2CS)	5	23,7820	0,4557	0,2077	1,9164
T5 (D8SS)	7	23,9871	0,64452	0,4163	2,6899
T6 (D8CS)	5	23,4740	0,8106	0,6572	3,4535

Tabela 6 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *RPL-19* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>RPL-19</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	6	27,5650	0,5992	0,3591	2,1741
T2 (SVCS)	7	27,2957	1,0262	1,0531	3,7595
T3 (D2SS)	5	27,1640	1,1766	1,3843	4,3314
T4 (D2CS)	5	27,2020	0,5987	0,3584	2,2010
T5 (D8SS)	7	27,8529	0,3826	0,1463	1,3736
T6 (D8CS)	5	27,6160	0,7455	0,5558	2,6997

Tabela 7 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *EEF1A* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>EEF1A</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	6	33,7683	1,3888	1,9288	4,1128
T2 (SVCS)	7	33,2286	1,2291	1,5106	3,6988
T3 (D2SS)	5	33,0840	0,7850	0,6162	2,3727
T4 (D2CS)	5	31,0940	2,0901	4,3684	6,7218
T5 (D8SS)	7	31,5571	0,9443	0,8917	2,9924
T6 (D8CS)	5	31,4200	1,3265	1,7596	4,2218

Tabela 8 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *1 α -HYD* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>1α-HYD</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	6	34,7083	1,7857	3,1887	5,1449
T2 (SVCS)	7	33,3157	1,8384	3,3798	5,5181
T3 (D2SS)	5	32,0740	1,7697	3,1319	5,5176
T4 (D2CS)	5	30,5100	2,0083	4,0332	6,5824
T5 (D8SS)	7	31,8100	1,8914	3,5775	5,9460
T6 (D8CS)	5	29,1560	1,9489	3,7984	6,6845

Tabela 9 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *24-HYD* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>24-HYD</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	6	33,2650	1,0237	1,0481	3,0776
T2 (SVCS)	7	33,4086	1,9872	3,9493	5,9484
T3 (D2SS)	5	31,5980	2,1758	4,7342	6,8860
T4 (D2CS)	5	33,3220	2,0510	4,2067	6,1552
T5 (D8SS)	7	32,9371	1,1974	1,4337	3,6354
T6 (D8CS)	5	31,8280	2,5239	6,3705	7,9301

O teste F para o quadro de análise de variância dos genes específicos de rim bovino estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 – Teste F para o quadro de análise de variância

Dependente FV	Var.	<i>1α-HYD</i>	<i>24-HYD</i>
		Pr>F	
Vita		0,0050**	0,0399*
Sol		0,0614	0,7914
Vita*Sol		0,7118	0,0965

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

Com base nos resultados da Tabela 10 pode-se observar que ao comparar os tratamentos para verificar o efeito da exposição diferenciada dos animais aos raios ultravioleta, observar-se que não houve diferença na expressão dos genes *1α-HYD* e *24-HYD*. Também não houve diferença na expressão dos genes analisados quando o objetivo foi avaliar a interação da suplementação com vitamina D₃ com a exposição diferenciada aos raios solares.

Com a finalidade de verificar o efeito da suplementação de vitamina D₃ houve diferença significativa na expressão do gene *1α-HYD*. A expressão do gene *1α-HYD* foi significativamente maior quando os animais receberam suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por dois e oito dias consecutivos pré-abate, independente da exposição aos raios ultravioletas (Tabela 11).

Tabela 11 – Expressão de RNAm e erro padrão dos genes *1α-HYD* e *24-HYD*

Efeitos	Genes	<i>1α-HYD</i>	<i>24-HYD</i>
		Pr>t	
Vita 0¹		29,9005 (0,5578)a	30,4342 (0,4661)a
Vita 2²		28,0594 (0,4867)b	29,7440 (0,5327)ab
Vita 8³		26,9706 (0,6219)b	28,6042 (0,4989)b

¹Sem suplementação de vitamina D₃; ²suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por dois dias consecutivos pré-abate; ³suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate

Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna dentro de gene não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

A expressão do gene *1α-HYD* foi 7,62 vezes maior nos animais que receberam suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-

abate quando comparado aos animais que não receberam suplementação. Quando a comparação é realizada entre os animais que receberam suplementação por dois dias consecutivos pré-abate com os animais que não receberam suplementação, o gene *1 α -HYD* foi 3,58 vezes mais expresso nos animais que receberam suplementação por dois dias.

Em relação ao gene *24-HYD*, a expressão foi 3,55 vezes superior nos animais que receberam suplementação com 2×10^6 UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate quando comparado aos animais que não receberam suplementação e não diferiram daqueles que receberam suplementação por apenas 2 dias. Quando a comparação é realizada entre os animais que receberam suplementação por dois dias consecutivos pré-abate com os animais que não receberam suplementação, apesar da média do Ct ter diminuído, não houve efeito significativo da suplementação. É importante salientar que quanto mais baixo o valor do Ct, mais cedo ocorreu a detecção do RNAm do gene, consequentemente havendo maior expressão gênica.

O aumento concomitante da expressão dos genes das enzimas *1 α -HYD* e *24-HYD* com suplementação de vitamina D₃ por oito dias não corrobora com o mecanismo de regulação das atividades das enzimas modulada de forma diametralmente oposta para regular os níveis circulantes de 1,25-di-hidroxi-vitamina D₃ (1,25 D). Anderson et al. (2003) analisando a expressão dos genes *1 α -HYD*, *24-HYD* e *VDR* (receptor de vitamina D) em ratos que foram alimentados com dietas contendo níveis deferentes de cálcio, verificaram que os níveis séricos de 1,25 D caiu com o aumento de cálcio na dieta e foram correlacionados positivamente com os níveis de RNAm de *1 α -HYD* e negativamente com os níveis de RNAm *24-HYD* no rim. Neste mesmo estudo foi realizado uma análise de regressão linear múltipla que indicou queda nos níveis séricos de 1,25 D devido tanto a uma redução na síntese de 1,25 D pelo *1 α -HYD* quanto pelo aumento no catabolismo de 1,25 D por *24-HYD*. Isto sugere que *1 α -HYD* e *24-HYD* são igualmente importantes na regulação do metabolismo da vitamina D.

Embora a concentração sérica de cálcio nos animais submetidos às diferentes condições de exposição solar ou suplementação com vitamina D₃ não tenha

sido modificada nos momentos amostrados para verificação de calcemia (LOBO JR, 2008), a única possibilidade de verificar o aumento da expressão do gene da enzima *1 α -HYD* parece envolver um hiperparatireoidismo secundário decorrente de hipocalcemia em algum momento do experimento. Em casos de hipocalcemia, a concentração plasmática elevada do hormônio da paratireóide (PTH) induz a expressão do gene *1 α -HYD* e atividade enzimática renal (BOOTH et al., 1985; GAO et al., 2002), todavia diminui a expressão de RNAm da *24-HYD* e atividade da enzima renal (ARMBRECHT et al., 1998; MATSUMOTO et al., 1985; SHIGEMATSU et al., 1986; SHINKI et al., 1992; ZIEROLD et al., 2000). Estas modificações devidas ao aumento da concentração do hormônio da paratireóide (PTH) permitem ao rim aumentar a reabsorção de cálcio e estimular a produção de 1,25 D, que por sua vez estimula a absorção de cálcio no intestino para estabilizar a calcemia (O'LOUGHLIN; MORRIS, 1998).

Quando ocorre superprodução de 1,25 D um mecanismo de regulação por um citocromo P450 que consiste na enzima 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase (*24-HYD*), que através da hidroxilação da cadeia lateral, inativa a 1,25 D (OMDAHL et al., 2002). Assim pode-se inferir que neste estudo esses fatores não exerceram influência sobre o gene *1 α -HYD* que teve um aumento da expressão na ordem de 7,62 vezes nos animais que receberam suplementação com 2×10^6 UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate quando comparado aos animais que não receberam suplementação. Esse resultado não era esperado, não se apresentando condizente com o modelo fisiológico, onde à medida que se aumenta a quantidade de vitamina D₃ fornecida esperava-se que houvesse um mecanismo de regulação da enzima *1 α -HYD* já que foi observado aumento da expressão de RNAm de *24-HYD*.

A identificação dos fatores responsáveis pela regulação da transcrição dos genes *1 α -HYD* e *24-HYD* no rim é de considerável interesse. O PTH é um estimulador importante da transcrição do gene *1 α -HYD* (MURAYAMA et al., 1999). No entanto, no estudo realizado por Anderson et al. (2003) nenhuma correlação significativa foi encontrada entre PTH e os níveis renais de RNAm do gene *1 α -HYD*. Estes dados apoiam a proposta de Shinki et al. (1999) de que a transcrição de *1 α -HYD* in vivo é regulada pelo PTH apenas em animais com hipocalcemia e não durante calcemia

normal. Estes autores propuseram que, sob essas condições, a calcitonina é o principal regulador da expressão de mRNA de *1 α -HYD*. Por outro lado, um efeito direto de cálcio sobre a expressão de mRNA de *24-HYD* não pode ser excluída (BLAND et al., 1999). Como ambas as enzimas parecem ser reguladas por fatores como o PTH, cálcio e calcitonina, pesquisas futuras devem monitorar tais fatores de controle das enzimas responsáveis pela síntese e catabolismo de vitamina D, sob diferentes condições fisiológicas.

4.4.3 Expressão de RNAm dos genes específicos de músculo bovino

Foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos para o genes *GAPDH*, *RPL-19*, *EEF1A*, *CAPN1*, *CAST (Iso_I)*, *CAST (Iso_II)* e *CAST (Iso_all)* específicos para músculo bovino. A estatística descritiva do banco de dados foi realizada para verificar o nível de variação dos genes referência *GAPDH*, *RPL-19* e *EEF1A* e dos genes alvo *CAPN1*, *CAST (Iso_I)*, *iso_II* e *iso_all*) (Tabelas 12 a 18).

Tabela 12 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *GAPDH* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>GAPDH</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	20,2042	0,5301	0,2809	2,6236
T2 (SVCS)	7	20,1385	0,6136	0,3765	3,0469
T3 (D2SS)	7	20,1871	0,6918	0,4787	3,4274
T4 (D2CS)	7	20,2228	0,7288	0,5311	3,6039
T5 (D8SS)	7	19,7457	0,6459	0,4172	3,2715
T6 (D8CS)	7	19,8657	0,7696	0,5923	3,8741

Tabela 13 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *RPL-19* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>RPL-19</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	32,5983	1,7052	2,9078	5,2310
T2 (SVCS)	7	31,1886	0,3789	0,1436	1,2151
T3 (D2SS)	7	31,1100	0,4517	0,2040	1,4519
T4 (D2CS)	7	30,7171	0,8504	0,7233	2,7687
T5 (D8SS)	7	30,3400	0,6745	0,4549	2,2231
T6 (D8CS)	7	30,3343	1,1001	1,2102	3,6265

Tabela 14 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene referência *EEF1A* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>EEF1A</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	24,2186	0,9579	0,9176	3,9553
T2 (SVCS)	7	24,3643	0,7330	0,5373	3,0087
T3 (D2SS)	7	24,6014	0,8788	0,7722	3,5721
T4 (D2CS)	7	24,1814	1,0596	1,1228	4,3820
T5 (D8SS)	7	24,2729	0,6720	0,4515	2,7685
T6 (D8CS)	7	23,5900	0,8878	0,7883	3,7638

Tabela 15 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *CAPN1* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>CAPN1</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	29,8557	0,6656	0,4431	2,2295
T2 (SVCS)	7	29,2985	0,4559	0,2078	1,5560
T3 (D2SS)	7	29,1557	0,8626	0,7441	2,9587
T4 (D2CS)	7	28,9171	0,5251	0,2758	1,8161
T5 (D8SS)	7	29,1071	0,6087	0,3705	2,0912
T6 (D8CS)	7	29,0728	0,4799	0,2303	1,6508

Tabela 16 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *CAST (Iso_I)* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>CAST (Iso_I)</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	32,5728	1,1051	1,2212	3,3927
T2 (SVCS)	7	32,4757	0,7941	0,6307	2,4454
T3 (D2SS)	7	32,6842	0,6854	0,4698	2,0971
T4 (D2CS)	7	31,5100	0,9225	0,8511	2,9277
T5 (D8SS)	7	30,8014	1,4946	2,2338	4,8524
T6 (D8CS)	7	30,7571	1,9458	3,7863	6,3265

Tabela 17 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *CAST (Iso_II)* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>CAST (Iso_II)</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	34,9814	1,9560	3,8261	5,5916
T2 (SVCS)	7	36,1929	0,3820	0,1459	1,0554
T3 (D2SS)	7	35,5429	1,4768	2,1801	4,1550
T4 (D2CS)	7	34,8514	0,8277	0,6851	2,3749
T5 (D8SS)	7	34,1186	1,3322	1,7746	3,9045
T6 (D8CS)	7	33,1500	0,9869	0,9740	2,9771

Tabela 18 – Médias, desvio padrão, variância e coeficiente de variação da expressão do gene alvo *CAST (Iso_all)* descritas em unidades Ct não normalizados

<i>CAST (Iso_all)</i>	N	Média	DP	Variância	CV
T1 (SVSS)	7	26,7429	0,7769	0,6036	2,9052
T2 (SVCS)	7	26,6329	0,4195	0,1759	1,5751
T3 (D2SS)	7	26,6286	0,5941	0,3529	2,2309
T4 (D2CS)	7	26,1671	0,4213	0,1774	1,6100
T5 (D8SS)	7	26,3714	0,5542	0,3071	2,1015
T6 (D8CS)	7	26,3900	0,5079	0,2580	1,9247

O teste F para o quadro de análise de variância dos genes específicos de músculo bovino está representado na Tabela 19.

Tabela 19 – Teste F para o quadro de análise de variância

Var. Dependente FV	<i>CAPN1</i>	<i>CAST (Iso_I)</i>	<i>CAST (Iso_II)</i>	<i>CAST (Iso_all)</i>
	Pr>F			
Vita	0,1905	0,3458	0,0038**	0,1419
Sol	0,3827	0,2504	0,1146	0,1860
Vit * Sol	0,3426	0,8240	0,3442	0,6831

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

A exposição diferenciada dos animais aos raios ultravioleta ou sua interação com a suplementação com vitamina D₃ não alteraram a expressão dos genes *CAPN1* e *CAST* em suas diferentes isoformas (Tabela 19). Embora a suplementação com vitamina D₃ tenha sido inefetiva na expressão dos genes *CAPN1* e das isoformas de *CAST Iso_I* e *Iso_all*, houve uma modificação da expressão da *Iso_II*. A expressão desta isoforma foi significativamente maior quando os animais receberam suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate, independente da exposição aos raios ultravioletas (Tabela 20).

Tabela 20 – Expressão de RNAm e erro padrão do gene da Calpastatina (Isoforma II)

Gene Efeitos	<i>CAST (Iso_II)</i>
	Pr>t
Vita 0¹	32,9207 (0,3746)a
Vita 2²	32,3992 (0,3746)a
Vita 8³	31,0944 (0,3746)b

¹Sem suplementação de vitamina D₃; ²suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por dois dias consecutivos pré-abate; ³suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate

Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna dentro de gene não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

A expressão do gene da *CAST (Iso_II)* foi 3,5 vezes maior nos animais que receberam suplementação com 2x10⁶UI de vitamina D₃ por oito dias consecutivos pré-abate quando comparado aos animais que não receberam suplementação. Quando a comparação é realizada entre os animais que receberam suplementação por dois e

oito dias consecutivos pré-abate, o gene da *CAST (Iso_II)* foi 2,47 vezes mais expresso nos animais que receberam suplementação por período mais prolongado pré-abate.

A ausência de diferença na expressão da *CAPN1* somada ao aumento da expressão da *CAST (Iso_II)* em animais suplementados com vitamina D₃ desafia a hipótese de promoção do processo de amaciamento da carne pela vitamina devido à alteração na expressão das proteases musculares cálcio dependentes. Por outro lado, o relato de aumento da concentração de RNAm tanto da *μ-calpaína (CAPN1)* quanto da *m-calpaína (CAPN2)* na ordem de 400 e 497% respectivamente em vacas suplementadas com vitamina D₃ e ainda diminuição da expressão da *CAST* na ordem de 14 a 29% (CHO et al., 2006), são compatíveis com o favorecimento ao amaciamento devido a uma maior proteólise *postmortem* resultante de uma relação calpaína/calpastatina favorável. O amaciamento da carne pode ser incrementado quando doses de vitamina D₃ são aplicadas perto do abate, todavia estas respostas parecem depender do genótipo do animal ou da variação individual existente entre animais (LAWRENCE et al., 2006), o que explicaria as discrepâncias dos resultados discutidos.

Prolongada ativação das calpaínas promove a degradação da calpastatina e a flutuação da concentração de calpastatina na fração solúvel da célula é acompanhada por uma inicial diminuição da expressão do gene da calpastatina, seguido por um aumento na expressão quando o inibidor da proteína é degradado em cultura de células (AVERNA et al., 2003). A quantidade de calpastatina diretamente disponível no citossol está sob o controle de concentrações de cálcio e AMP cíclico. Este processo pode ser conceituado como um mecanismo para regular a disponibilidade de calpastatina na célula. Esta conclusão é corroborada pelo fato de que a calpaína, o outro componente deste sistema proteolítico, sofre alterações em seus níveis de expressão de forma muito mais limitada.

As propriedades da calpastatina controladas pela ação coordenada de AMP cíclico (AMPC) e proteína quinase dependente (PKA) apóia a formação de agregados de calpastatina, diminuindo o número de moléculas de inibidor diretamente disponível para a interação com calpaína (AVERNA et al., 2001). O efeito inverso, a qual é mediada por uma proteína fosfatase, induz a liberação de moléculas de

calpastatina de agregados. Além disso, calpastatina pode ser degradado tanto *in vitro* quanto em condições *in vivo* por calpaínas, produzindo um desequilíbrio deste sistema proteolítico, levando a digestão descontrolada de estruturas intracelulares (NAKAMURA et al., 1989; SALAMINO et al., 1991; NIXON et al., 1994; SORIMACHI et al., 1997; JAMES et al., 1998; BLOMGREN, 1999; BLOMGREN et al., 1999; DE TULLIO et al., 2000; RAY et al., 2003). Mesmo que seja geralmente aceito que a ativação ocorra na sequência de calpaína através de um aumento de cálcio livre intracelular, é também conhecido que as mesmas condições promovam a formação do complexo calpaína-calpastatina, impedindo a translocação da calpaína para a membrana, sua ativação e expressão da atividade catalítica.

A regulação da proteólise dependente de cálcio intracelular é realizada principalmente por alterações na concentração de cálcio e também pela calpastatina, inibidor natural da proteína calpaína. No entanto, vários relatos têm demonstrado que a calpastatina sofre modificações pós-translacionais e mudanças na localização celular que afetam tanto a especificidade quanto sua capacidade inibitória (CROALL; DEMARTIN, 1991; SAIDO et al., 1994; TAKAHASHI, 1990; WANG, 2000; PONTREMOLI, 1992; SALAMINO, 1997).

De acordo com Aversa et al. (2003) a síntese da calpastatina também está diretamente relacionada com os níveis e distribuição celular do inibidor. Essas observações indicam que a expressão da calpastatina de alguma forma está ligada à capacidade inibitória requerida pela célula. Nas células em repouso, quando nenhuma proteólise cálcio dependente é requerida, a calpastatina é quase completamente indisponível para a inibição da calpaína e está associada a grandes agregados, provavelmente representando armazenamento intracelular. A calpastatina torna-se disponível no citosol somente em resposta a um aumento de íons cálcio. Esta mudança de localização é totalmente reversível e sob o controle de AMPc mediada por fosforilação. O aumento nas moléculas de calpastatina livre no citosol está diretamente relacionado a uma diminuição na sua expressão. Daí a redistribuição da calpastatina, na fração solúvel da célula não só representa um aumento na capacidade inibitória neste compartimento celular, mas também está relacionada à expressão do gene da calpastatina. Uma abundância de moléculas de inibidor parece o sinal para redução de

sua expressão. No entanto, se a calpastatina é degradada devido à ativação prolongada das calpaínas, a inibição na síntese de seu RNAm é removido e a transcrição é aumentada em até cinco vezes.

Um estudo realizado (AVERNA et al., 2003) com a finalidade de analisar a expressão de calpastatina em células enriquecidas com cálcio, verificaram que após dois dias de incubação com cálcio-ionóforo o RNAm da calpastatina diminuiu cerca de três vezes comparados com os valores do tratamento controle, indicando que sua expressão é em grande parte reprimida. No entanto, após 8 dias de tratamento, o montante de RNAm de calpastatina foi aproximadamente cinco vezes maior em relação ao tratado de células PC12. Em conjunto, estes dados sugerem que a expressão do gene da calpastatina foi de alguma forma relacionados com a disponibilidade desta proteína no citoplasma. Assim, sob condições que causam um grande consumo de calpastatina observado após 8 dias de exposição ao cálcio-ionóforo, ocorreu um aumento de cinco vezes o taxa de síntese de RNAm de calpastatina. Uma situação similar foi observada nos rins de ratos hipertensos, em que degradação de calpastatina é associada a altos níveis de expressão (AVERNA et al., 2001).

Estes achados sugerem que níveis citossólicos de calpastatina são monitorados de alguma forma para controlar a expressão dessa proteína. Quando a calpastatina é liberada de agregados de armazenamento, sua expressão é diminuída sendo que quando ela é consumida para proteger a célula da digestão da calpaína, sua expressão é significativamente reforçada. Neste mesmo estudo todos os outros componentes do sistema proteolítico, tais como μ e m-calpaína, não sofreram alterações na expressão comparáveis aos observados para calpastatina. Assim, a extensão da variação na expressão de calpastatina e as condições fisiológicas em que ocorre indicam que este processo é um mecanismo de regulação necessário para definir a real capacidade inibitória da célula.

Por outro lado, Stifanese et al. (2010) estudando o estado funcional do sistema calpaína-calpastatina no músculo de camundongos transgênicos sob persistentes alterações da homeostase do cálcio, verificaram que níveis de RNAm de *CAPN2* se manteve inalterados após 2 ou 8 dias de tratamento com cálcio-ionóforo e a quantidade de RNAm de *CAPN1* diminuiu ligeiramente (25-30%) após dois dias, e

depois houve um aumento de até 60% seguindo 8 dias de tratamento. Embora este aumento na expressão de *CAPN1* pode ser atribuído à alta taxa de utilização desta proteinase que ocorreram sob essas condições, essas modificações parecem menos importantes do que aqueles observados para calpastatina. Estes resultados juntamente com os encontrados no presente estudo, fornecem uma evidência de que mesmo sob condições de alta elevação de cálcio, uma ativação da calpaína é impedida pela sua associação com o inibidor da proteína. Além disso, Stifanese et al. (2010) através da detecção de produtos da degradação de calpastatina e medindo o nível de expressão de RNAm da calpastatina, demonstraram que, apesar de sua degradação proteolítica contínua, a capacidade inibitória global da calpastatina sobre calpaína foi sustentada por dois mecanismos independentes, porém integrados. A primeira envolveu uma degradação conservativa de calpastatina em fragmentos ativos de 15kDa, enquanto a segunda constou de uma aumento da expressão do inibidor de até 4 vezes no nível de RNAm de calpastatina

A modificação da expressão do gene da calpastatina pode representar uma ferramenta para o controle da regulação necessária para a modulação da proteólise cálcio dependente. As mudanças observadas na expressão da isoforma II da *CAST* mediante suplementação de vitamina D₃ parecem fazer parte de uma regulação de um processo complexo ou uma adaptação às alterações nos níveis de *CAPN1* devido ao influxo de cálcio.

4.5 Análise de associação conjunta

Na análise conjunta de associação o modelo contempla a expressão de dois genes ao mesmo tempo, para obter as estimativas do valor fenotípico da maciez aos 1, 7 e 21 dias de maturação da carne para força de cisalhamento e ao 1 e 21 dias de maturação para índice de fragmentação miofibrilar. Essas análises se fazem importante, pelo envolvimento dos dois genes considerados (*CAPN1* e *CAST*) no processo proteolítico. A μ -calpaína participa como promotor da proteólise, e a calpastatina é o inibidor específico da enzima μ -calpaína, portanto as respectivas

expressões de seus genes, na mesma análise, podem ajudar a estimar os possíveis efeitos na maciez.

A maciez da carne pode ser avaliada objetivamente através da medida de força de cisalhamento (FC) a qual indica que quanto maior a força necessária para cortar a carne, maior será a dureza da mesma, ou pelo índice de fragmentação das miofibrilas (MFI), que indica que quanto maior o índice, maior será a fragmentação das miofibrilas musculares e, portanto, mais macia é a carne. Cabendo ressaltar que estes dois métodos de análise apresentam boa correlação dos resultados.

Tabela 21 – Estimativas, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez força de cisalhamento ao 1, 7 e 21 dias de maturação

Gene	FC1 ¹			FC7 ²			FC21 ³		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
CAPN1	0,028	0,163	0,860	-0,331	0,135	0,024*	-0,077	0,154	0,619
CAST_T	-0,056	0,245	0,819	-0,062	0,175	0,732	-0,111	0,235	0,641

¹FC1 = força de cisalhamento com 1 dia pós abate, ²FC7 = força de cisalhamento com 7 dias de maturação e ³FC21 = força de cisalhamento com 21 dias de maturação

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

Tabela 22 – Estimativas, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez força de cisalhamento ao 1, 7 e 21 dias de maturação

Gene	FC1 ¹			FC7 ²			FC21 ³		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
CAPN1	0,016	0,114	0,989	-0,237	0,135	0,089	-0,098	0,116	0,408
CAST_I	0,193	0,145	0,201	0,133	0,158	0,417	0,211	0,153	0,179
CAST_II	0,909	0,196	0,0001**	0,470	0,193	0,028*	0,833	0,189	0,0002**

¹FC1 = força de cisalhamento com 1 dia pós abate, ²FC7 = força de cisalhamento com 7 dias de maturação e ³FC21 = força de cisalhamento com 21 dias de maturação

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

Na análise conjunta considerando dois genes simultaneamente no modelo, o gene *CAST* (iso_all), não apresentou efeito associado aos valores de maciez. O gene *CAPN1* apresentou um fato não esperado, efeitos associados à maciez aos 7 dias de maturação da carne, com estimativa negativa para aumento de força de cisalhamento. O resultado mostra que à medida que se aumenta 1 ciclo no valor do Ct, ou seja diminuição da expressão do gene da calpaína1, observa-se uma diminuição de 0,331 Kilogramas na força de cisalhamento (Tabela 21). Este efeito não é condizente com os processos proteolíticos já que aos 7 dias de maturação não esperava-se um efeito inverso na expressão na maciez.

Na segunda abordagem consideraram-se as expressões de dois genes simultaneamente no modelo, porém um deles com as duas isoformas, *CAST* (iso_I) e *CAST* (iso_II). Com relação à expressão do gene *CAPN1* e *CAST* (iso_I) não foi observado efeitos associados a maciez da carne. Com relação ao gene *CAST* (iso_II), efeitos foram observados para 1, 7 e 21 dias de maturação (Tabela 22). De acordo com os resultados, em relação à força de cisalhamento ao 1 dia de maturação observa-se que a medida que aumenta-se 1 ciclo no valor do Ct, ou seja diminui a expressão do gene da isoforma II da calpastatina, observa-se um aumento de 0,909 kilogramas força. O mesmo é observado para 7 e 21 dias de maturação onde a medida que aumente 1 ciclo no valor do Ct há um aumento de 0,470 e 0,833 kilogramas na força de cisalhamento respectivamente. Esse resultado não era esperado, pois também não se apresenta condizente com os processos proteolíticos.

De acordo com Geesink e Koohmaraie (1999) e Geesink et al. (2006), o aumento do nível de atividade da *CAST* resulta na redução da taxa de proteólise mediada pelas calpaínas e, conseqüentemente, uma diminuição da maciez da carne, sugerindo que este fato comprovaria a inibição do processo de proteólise por esta enzima. No entanto, a medida que aumenta-se o valor do Ct, ou seja, diminui a expressão gênica da isoforma II da calpastatina, esperava-se que houvesse diminuição da força de cisalhamento e não aumento como foi observado.

Tabela 23 – Estimativas, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez índice de fragmentação miofibrilar ao 1 e 21 dias de maturação

Gene	MFI ¹ (dia1)			MFI ² (dia 21)		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
CAPN1	-0,2895	0,2110	0,1820	0,5573	0,2105	0,0165*
CAST_T	-0,2347	0,3107	0,4574	-0,1419	0,3288	0,6718

¹MFI = índice de fragmentação miofibrilar com 1 dia pós abate, ²MFI = índice de fragmentação miofibrilar com 21 dias de maturação

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

Tabela 24 – Estimativas, erros padrão e probabilidades dos efeitos das expressões dos genes, associados aos fenótipos de maciez índice de fragmentação miofibrilar ao 1 e 21 dias de maturação

Gene	MFI ¹ (dia1)			MFI ² (dia 21)		
	Estimativa	EP	Valor de P	Estimativa	EP	Valor de P
CAPN1	-0,2987	0,2045	0,1584	0,5934	0,2057	0,0132*
CAST_I	-0,0529	0,2507	0,8350	0,0836	0,2454	0,7424
CAST_II	-0,1856	0,3191	0,5675	-0,0787	0,3295	0,8147

¹MFI = índice de fragmentação miofibrilar com 1 dia pós abate, ²MFI = índice de fragmentação miofibrilar com 21 dias de maturação

*Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,05)

** Estatisticamente diferentes, teste F (P<0,01)

O procedimento de MFI reflete a intensidade da proteólise das miofibrilas explicando mais de 50% da variação na maciez da carne normalmente maturada. Apresenta-se altamente correlacionada com os índices de maciez como força de cisalhamento, pois à medida que aumenta o MFI diminuem os valores obtidos pela força de cisalhamento (CULLER et al., 1978; CROUSE; KOOHMARAIE, 1990; OLSON; PARRISH, 1977).

Na análise conjunta de associação ao 1 e 21 dias de maturação para índice de fragmentação miofibrilar, não foi observado efeito associado aos valores de

maciez para a calpastatina total (Tabela 23) e nem na segunda abordagem para as duas isoformas da calpastatina (iso_I) e (iso_II) (Tabela 24). O gene *CAPN1* apresentou uma associação inesperada, onde os efeitos associados para índice de fragmentação miofibrilar aos 21 dias de maturação da carne, nas duas abordagens, apresentaram uma estimativa de relação inversa com aumento do índice (Tabela 23 e 24). De acordo com os resultados observa-se que à medida que se aumenta 1 ciclo no valor do Ct, ou seja diminuição da expressão do gene da calpaína1, observa-se um aumento de 0,5573 no índice. O mesmo é observado na segunda abordagem aos 21 dias de maturação onde à medida que aumenta 1 ciclo no valor do Ct há um aumento de 0,5934 no índice de fragmentação miofibrilar. Este efeito também não se apresenta condizente com os processos proteolíticos já que aos 21 dias de maturação ocorrem importantes mudanças químicas e estruturais como degradação da linha Z, degradação de desmina, degradação e desaparecimento de troponina-T, degradação de titina e nebulina, entre outras transformações, que vão influenciar a maciez da carne de forma positiva (GOLL et al., 1991; KOOHMARAIE, 1992). Diante do exposto esperava-se um efeito inverso na expressão na maciez.

Tomando os resultados em conjunto e com base nos dados de associação de *CAPN1* e FC/MFI, que refletiria o quanto os valores de expressão poderiam influenciar nas estimativas do valor fenotípico de maciez, pode-se observar que houve diminuição da FC ao mesmo tempo em que foi observado aumento do MFI à medida que se diminui a expressão da *CAPN1* apresentando um efeito inverso. Embora nenhum efeito ($P < 0,05$) de suplementação de vitamina tenha sido observado na expressão de RNAm de *CAPN1* somada ao aumento da expressão da *CAST iso_II*, tal fato poderia ser explicado por já existir calpaína suficiente no sistema atuando no processo de proteólise *postmortem*. Este fato é reforçado pela observação que o aumento da expressão da calpastatina devido a uma sinalização intracelular indicando que a calpastatina está sendo degradada seria devido à ativação prolongada das calpaínas (AVERNA et al., 2003; STIFANESE et al., 2010).

As associações aparentemente contraditórias devem ser consideradas com certo cuidado, pois não existem dados de atividade das enzimas para determinar a relação causa/efeito entre as expressões gênicas e o processo de amaciamento.

Todavia, os resultados apontam para um possível descompasso entre abundância de RNAm e atividade dos componentes do sistema das calpaínas em determinadas condições fisiológicas. As expressões dos genes *CAPN1* e *CAST* juntamente com suas isoformas e os valores de força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar no tecido muscular de bovinos devem ser avaliadas em um número maior de amostras, visando à confirmação dos resultados do presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

- O gene *1 α -HYD* foi mais expresso nos tratamentos com 2 e 8 dias de suplementação com vitamina D₃, independente da exposição diferenciada aos raios ultravioleta.
- O gene *24-HYD* foi mais expresso no tratamento com 8 dias de suplementação pré-abate quando comparado ao tratamento controle, não diferindo do tratamento com suplementação por 2 dias consecutivos pré-abate.
- A suplementação com vitamina D₃ não exerceu influência na expressão de RNAm da *CAPN1*, isoforma I e isoforma total da *CAST*.
- A isoforma II do gene da Calpastatina foi mais expressa no tratamento com 8 dias de suplementação pré-abate, onde parece que o aumento da expressão é devido a uma sinalização intracelular indicando que a calpastatina está sendo degradada pela ativação prolongada das calpaínas, em decorrência do aumento do influxo de cálcio.
- As análises de associação apontam para um possível descompasso entre abundância de RNAm e atividade dos componentes do sistema das calpaínas nessas condições fisiológicas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Guidelines for cookery and sensory evaluation of meat**. Illinois: National Livestock and Meat Board, 1978. 24 p.

ANDERSON, P.H.; O'LOUGHLIN, P.D.; MAY, B.K.; MORRIS, H.A. Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 31, p. 123-132, 2003.

ARMBRECHT, H.J.; HODAM, T.L.; BOLTZ, M.A.; PARTRIDGE, N.C.; BROWN, A.J.; KUMAR, V.B. Induction of the vitamin D 24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is regulated by parathyroid hormone in UMR106 osteoblastic cells2 [see comments]. **Endocrinology**, Baltimore, v. 139, p. 3375–3381, 1998.

AVERNA, M.; TULLIO, R. de; CAPINI, P.; SALAMINO, F.; PONTREMOLI, S.; MELLONI, E. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 2669-2678, 2003.

BEITZ, D.; TRENKLE, A.; PARRISH, F.; MONTGOMERY, J.; HORST, R. Feeding of vitamin D₃ is a potential method to improve tenderness of beef. **1997 Dairy Report**, Ames: Iowa State University, 1997. Disponível em: <<http://extension.iastate.edu/Pages/dairy/report97/products/dsl-145.pdf>>. Acesso: 21 jan. 2002.

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

BLAND, R.; WALKER, E.A.; HUGHES, S.V.; STEWART, P.M.; HEWISON, M. Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, p. 2027–2034, 1999.

BONDI, A.A. **Nutricion animal**. Zaragoza: Acribia, 1988.

BOOTH, B.E.; TSAI, H.C.; MORRIS JR., R.C. Vitamin D status regulates 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and its responsiveness to parathyroid hormone in the chick. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 75, p. 155–161, 1985.

BRADLEY, D.G.M; HUGH, D.E.; CUNNINGHAM, P.; LOFTUS, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, p. 5131-5135, 1996.

BROWN, E.M.; MACLEOD, R.J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling. **Physiological Reviews**, Bern, v. 81, p. 240-285, 2001.

BROWN, R.T.; FEDER, M.E. Reverse transcriptional profiling: non-correspondence of transcript level variation and proximal promoter polymorphism. **BMC Genomics**, San Diego, v. 6, p. 110, 2005.

BURROW, H.M.; MOORE, S.S.; JOHNSTON, D.J.; BARENDSE, W.; BINDON, B.M. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 41, p. 893–919, 2001.

BUSTIN, S.A. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 217-226, 2009.

CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B.; BERNARD, C.; HOCQUETTE, J, F. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 48, p.701-710, 2008.

CHO, Y.M.; CHOI, H.; HWANG, H.I.; KIM, Y. K.; MYUNG, K. H. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ and manipulated dietary cation-anion difference on the tenderness of beef from cull native Korean cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1481-1488, 2006.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, p. 156-159, 1987.

CIKOS, S.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, London, v. 20, p. 8-13, 2007.

CROALL, D.E.; MARTINO, G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: Structure, function and regulation. **Physiology Reviews**, Bern, p. 813-847, 1991

CROUSE, J.D.; KOOHMARAIE, M. Effect of time of sampling postmortem on myofibril fragmentation index of meat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 254-256, 1990.

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

DELGADO, E.F.; GEESINK, G.H.; MARCHELLO, J.A.; GOLL, D.E.; KOOHMARAIE, M. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 398, 2001.

DOUMIT, M.E.; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1467, 1999.

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

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **ANUALPEC**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo, 2010.

FOOTE, M.R.; BEITZ, D.C.; HORST, R.L.; HUFF-LONERGAN, E.J.; TRENKLE, A.H.; PARRISH JR., F.C. Use of vitamin D3 and its metabolites to improve beef tenderness. **2001 beef research report**. Ames: Iowa State University, 2001. p. 133-137. (A.S. Leaflet, R1765).

FOOTE, M.R.; HORST, R.L.; HUFF-LONERGAN, E.J.; TRENKLE, A.H.; PARRISH, JR., F.C.; BEITZ, D.C. The use of vitamin D3 and its metabolites to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 242-249, 2004.

FORTES, M.R.S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores de qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem**. 2007. 87 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GAMAN, P.M.; SHERRINGTON, K.B. **Science of food**: an introduction to food science nutrition and microbiology. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 1981. 103 p.

GAO, X.H.; DWIVEDI, P.P.; CHOE, S.; ALBA, F.; MORRIS, H.A.; OMDAHL, J.L. Basal and parathyroid hormone induced expression of the human 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase gene promoter in kidney AOK-B50 cells: role of Sp1, Ets and CCAAT box protein binding sites. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 4, p. 921-930, 2002.

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

GEESINK, G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H.; KOOHMARAIE, M. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2834-2840, 2006.

GOLL, D.E. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 44., 1991. **Proceedings...** p. 25-33.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, Paris, v. 74, p.225–237, 1992.

HADLICH, J.C. **Metodologias de análise de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idades**. 2004. 94 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.

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

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 6, p. 279-284, 2005.

JONES, G.; STRUGNOLL, S.A.; DE LUCA, M.F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiological Reviews**, Bern, v. 78, p. 1193-1231, 1998.

KARGES, K.; BROOKS, J.C.; GILL, D.R.; BREAZILE, J.E.; OWENS, F.N.; MORGAN, J.B. Effects of supplemental vitamin D3 on feed intake, carcass characteristics, tenderness, and muscle properties of beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 11, p. 2844-2850, 2001.

KOHN, M.H.; FANG, S.; WU, C.I. Inference of positive and negative selection on the 5' regulatory regions of Drosophila genes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 2, p. 374-383, 2004.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in *postmortem* proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, Paris, v. 74, p. 239, 1992.

_____. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, Nebraska, p. 36-93, 1994.

_____. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science Suppl.**, Nebraska, v. 43, p. 193-201, 1996.

_____. 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.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 3596-3607, 1995.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHAKELFORD, S. D.; BISHOP, M. Eliminating inconsistent beef tenderness with calcium-activated tenderization. In: WORKSHOP OF NEBRASKA CATTLEMANS ASSOCIATION, 1993, Kearney. **Proceedings...**

KOTRLA, L.A.; STANKO, R.L.; TIPTON, N.C.; PASCHAL, J.C. Effect of vitamin D₃ supplementation on carcass tenderness in Brahman-based cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 9-10, 2001.

KUHN, C.H.; LEVEZIEL, H.; RENAND, G.; GOLDAMMER, T.; SCHWERIN, M.; WILLIAMS, J. Genetic markers for beef quality. In: HOCQUETTE, J.F.; GIGLI, S. (Ed.). **Indicators of milk and beef quality**. Wageningen: Wageningen Academic, 2005. p. 23-32, 2005. (EAAP Publication, 112).

LAWRENCE, R.W.; DOYLE, J.; ELLIOT, R. LOXTON, I.; MCMENIMAN, J.P.; NORTON, B.W.; REID, D.J.; TUME, R.W. The efficacy of a vitamin D₃ metabolite for improving the myofibrillar tenderness of meat from *Bos indicus* cattle. **Meat Science**, Nebraska, v. 72, n. 1, p. 69-78, 2006.

LEDUR, M.C. O uso de marcadores moleculares na produção de aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 620-633.

LOBO JÚNIOR, A.R. **Suplementação de vitamina D₃ na dieta e exposição à luz solar alteram cor e fragmentação miofibrilar da carne de *Bos indicus* sem causar impacto no desempenho e maciez**. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MATSUMOTO, T.; KAWANOBE, Y.; OGATA, E. Regulation of 24,25-dihydroxy-vitamin D-3 production by 1,25-dihydroxyvitamin D-3 and synthetic human parathyroid hormone fragment 1–34 in a cloned monkey kidney cell line (JTC-12). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 845, p. 358–365, 1985.

MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TÖNNISSEN, E.; GOODSID, F.; RAEMAEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 3, p. 55-61, 2001.

MILLER, R.K. Avaliação instrumental da qualidade da carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CARNE, 1., 2001, São Pedro. **Anais...** São Pedro: CTC; ITAL, 2001. p. 179-186.

MIRETTI, M.M.; PEREIRA JR., H.A.; POLI, M.A.; CONTEL, E.P.B.; FERRO, J.A. African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): Evidence of a new taurine mitochondrial lineage. **The American Genetic Association**, Washington, v. 93, p. 323–330, 2002.

MONTGOMERY, J.L.; PARRISH, JR., F.C.; BEITZ, D.C.; HORST, R.L.; HUFFLONERGAN, E.J.; TRENKLE, A.H. The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 2615–2621, 2000.

MONTGOMERY, J.L.; CARR, M.A.; KERTH, C.R.; HILTON, G.G.; PRICE, B.P.; GALYEAN, M.L.; HORST, R.L.; MILLER, M.F. Effect of vitamin D3 supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 971–981, 2002.

MORALES, D.C.; CHARDULO, L.A.L.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.N. de; ARRIGONI, M.D.B.; MARTINS, C.L.; CERVIERI, R.C. Avaliação da qualidade de carne em bovinos de diferentes grupos genéticos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 171-175, 2003.

MORGAN, J.B.; MILLER, R.K.; MENDEZ, F.M.; HALE, D.S.; SAVELL, J.W. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 4469-4476, 1991.

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

MURAYAMA, A.; TAKEYAMA, K.; KITANAKA, S.; KODERA, Y.; KAWAGUCHI, Y.; HOSOYA, T.; KATO, S. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 alpha, 25(OH)2D3 in intact animals. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, p. 2224–2231, 1999.

OLIVEIRA, H.N. **Com cara de produto e com a marca do Brasil**. Disponível em: <<http://www.feedfood.com.br/revista/reportagens.php?&busca=36>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

O'LOUGHLIN, P.D.; MORRIS, H.A. Oestrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in the rat. **Journal of Physiology**, Paris, v. 511, p. 313–322, 1998.

OLSON, D.G.; PARRISH JR., F.C. Relationship of myofibril fragmentation index to measures of beefsteak tenderness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p. 506-509, 1977.

OMDAHL, J.L.; MORRIS, H.A.; MAY, B.K. Hydroxylase enzymes of the vitamin d pathway: expression, function, and regulation. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 139-166, 2002.

PARR, T.; SENSKY, P. L.; ARNOLD, M.K. Effects of epinephrine infusion on expression of calpastatin in porcine cardiac and skeletal muscle. **Archives Biochemistry Biophysics**, London, v. 374, p. 299-305, 2000.

_____. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v. 395, p. 1-13, 2001.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 339, p. 62-63, 2003.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle Real time PCR: methods and applications**. Heidelberg: Springer Press, 2001. p. 21-34.

RAYNAUD, P.; GILLARD, M.; PARR, T.; BARDSLEY, R.; AMARGER, V.; LEVÉZIEL, H. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 440, p. 46-53, 2005.

REED, C.A. The beginnings of animal domestication. In: MANSON, I.L. (Ed.). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p. 1-6.

ROBERT, K.M.; PETER, A.M.; DARYL, K.G. **Harper bioquímica**. 9. ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2002.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, p. 405-409, 1998.

SCANGA, J.A.; BELK, K.E.; TATUM, J.D.; SMITH, G.C. Supranutritional oral supplementation with vitamin D3 and calcium and the effects on beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 912-918, 2001.

SHIGEMATSU, T.; HORIUCHI, N.; OGURA, Y.; MIYAHARA, T.; SUDA, T. Human parathyroid hormone inhibits renal 24-hydroxylase activity of 25-hydroxyvitamin D3 by a mechanism involving adenosine 3,5monophosphate in rats. **Endocrinology**, Baltimore, v. 118, p.1583–1589, 1986.

SHINKI, T.; UENO, Y.; DELUCA, H.F.; SUDA, T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 8253–8258, 1999.

SHINKI, T.; JIN, C.H.; NISHIMURA, A.; NAGAI, Y.; OHYAMA, Y.; NOSHIRO, M. Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D3–24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in rat kidney but not in intestine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 13757–13762, 1992.

SIROL, M.L.F.G. **Fatores genéticos que afetam a qualidade da carne**: material didático apresentada na disciplina Métodos de Avaliação da Qualidade de Carnes do prof. Prof. Roberto de Oliveira Roça. Disponível em: <<http://dgta.fca.unesp.br/carnes/materialparadownload.php>, 2007>. Acesso em: 12 set. 2007.

SMITH, T.P.L.; CASAS, E.; REXROAD III, C.E.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 2589-2594, 2000.

STIFANESE, R.; AVERNA, M.; DE TULLIO, R.; PEDRAZZI, M.; BECCARIA, F.; SALAMINO, F.; MILANESE, M.; BONANNO, G.; PONTREMOLI, S.; MELLONI, E. Adaptive modifications in the Calpain/Calpastatin system in brain cells after persistent alteration in Ca^{2+} homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, p. 631–643, 2010.

SWANEK, S.S.; MORGAN, J.B.; OWENS, F.N.; GILL, D.R.; STRASIA, C.A.; DOLEZAL, H.G.; RAY, F.K. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases *Longissimus* tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 874-881, 1999b.

TAKANO, J.; WATANABE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specific by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 128, p. 83-92, 2000.

TAKANO, J.; KAWAMURA, T.; MURASE, M.; HITOMI, K.; MAKI, M. Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 260, p. 339-345, 1999.

TAUTZ, D. Evolution of transcriptional regulation. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 5, p. 575-579, 2000.

WERTZ, A.E.; KNIGHT, T.J.; TRENKLE, A.; SONON, R.; HORST, R.L.; HUFFLONERGAN, E.J.; BEITZ, D.C. Feeding 25-hydroxyvitamin D3 to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 1410-1418, 2004.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM, R. D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 2394, 1990.

WILKENING, S.; BADER, A. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: Methodical Analysis and mathematical Model. **Journal of Biomolecular Technology**, Utah, v.15, p. 107-111, 2004.

WITTKOPP, P.J.; HAERUM, B.K.; CLARK, A.G. Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. **Nature**, London, v. 430, p. 85-88, 2004.

ZIEROLD, C.; MINGS, J.A.; DELUCA, H.F. Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 13572–13576, 2001.

ZIEROLD, C.; REINHOLZ, G.G.; MINGS, J.A.; PRAHL, J.M.; DELUCA, H.F. Regulation of the porcine 1,25-dihydroxyvitamin D3–24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone in AOK-B50 cells. **Arch Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v. 381, p.323–327, 2000.

ANEXO

I) Protocolo de tratamento de RNA total com DNaseI

Fazer um *pool* de RNA total (6 animais)

6,0µl de RNA total (1µl de cada animal)

13,0µl de água DEPC

1,0 µl de DNaseI

Volume final de 20,0µl

1. Placa aquecedora 37°C por 15 minutos;
  2. Completar o volume para 200µl com água DEPC;
  3. Colocar 200µl de Fenolclorofórmio;
  4. Vortex e centrifugar em temperatura ambiente a 13.000 rpm por 5 minutos;
  5. Separação de fases, pegar a superior e colocar em um tubo limpo;
  6. Centrifugar;
  7. Remover a fase superior e transferir para um tubo limpo;
  8. Adicionar 10% de NaCl a 5M para RNA (20 µl);
  9. Adicionar 2,5 vol. ETOH absoluto (600 µl);
  10. Deixar no freezer -20°C por 1 hora;
  11. Centrifugar a 4°C a 13.000 rpm por 20 minutos;
  12. Descartar o ETOH;
  13. Lavar com ETOH 70% (200 µl);
  14. Centrifugar a 4°C a 13.000 rpm por 5 minutos;
  15. Descartar o ETOH 70%;
  16. Secar o *pellet* e ressuspender com 5 µl de água DEPC;
- Em seguida correr o RNA total em gel de agarose a 1% para verificar a presença do RNA.