

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Alexandre de Lima Oliveira

Efeitos epigenéticos sobre a diferenciação *in vitro* de mioblastos e a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em bovinos

**São Carlos
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

Alexandre de Lima Oliveira

Efeitos epigenéticos sobre a diferenciação *in vitro* de mioblastos e a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Dra. Simone Cristina Méo Niciura

**São Carlos
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48ee Oliveira, Alexandre de Lima.
Efeitos epigenéticos sobre a diferenciação *in vitro* de mioblastos e a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em bovinos / Alexandre de Lima Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
74 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética. 2. Epigenética. 3. *CAPN1*. 4. *CAST*. 5. 5-Aza-2'-desoxicitidina. 6. Tricostatina A. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

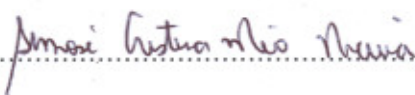
"Efeitos epigenéticos sobre a diferenciação *in vitro* de mioblastos e a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em bovinos"

Dissertação de Mestrado de

ALEXANDRE DE LIMA OLIVEIRA

Banca Examinadora

Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura


.....

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha


.....

Prof. Dr. Felipe Perecin


.....

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dra. Simone Cristina Meo Niciura pela orientação e pela grande ajuda que tem dado no desenvolvimento desse trabalho.

A Prof^a. Dra. Luciana Almeida Regitano pela ajuda no laboratório.

Ao Prof^o. Dr^o. Wilson Malagó Jr. e a Msc. Marina Ibelli Pereira Rocha pela ajuda no qPCR.

A Msc. Polyana Cristine Tizioto na ajuda com o gene ASAP1.

Ao Prof^o. Dr. Maurício Alvarenga Mudadu na genotipagem do gene ASAP1

Ao Dr. Flávio V. Meirelles e ao Dr. Felipe Perecin da USP de Pirassununga pela ajuda com o 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.

Ao Msc. Rodrigo Gigliotti, Msc. Talita Barban Bilhassi e a Dra Adriana Ibelli pela ajuda com os genes constitutivos.

A secretária do ppggev Ivanildes menezes.

A CAPES pelo financiamento.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos por permitir essa valiosa experiência.

Aos grandes amigos do laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste: Marina Ibelli, Suelen Scarpa Mello (grato pelo apoio nos experimentos), Vanessa Candiotti Buzatto, Flávia Bressani, Gilbertinho (obrigado pela ajuda na esterilização dos materiais), Andressa Oliveira Lima, Adriana Somavila, Priscila Oliveira, Polyana Tizioto, Marcela Maria, Vitor Catoia.

Ao Nicolas Martins do laboratório de citogenética pela amizade.

Aos meus pais Luiz Cláudio Rocha e Maria Elisa pelo apoio em todas as fases da minha vida e a quem eu devo a minha eterna gratidão. E a minha sobrinha Bianca Agatha.

Mais uma vez obrigado a todos e perdão se eu esqueci alguém.

Resumo

A epigenética pode ser definida como o estudo de mudanças herdáveis no fenótipo sem a ocorrência de mudanças na sequência de nucleotídeos. As modificações epigenéticas caracterizam-se por alterações químicas no DNA e em suas proteínas associadas, como a metilação no DNA e a acetilação nas proteínas histonas, respectivamente. A maciez da carne bovina tem ganhado interesse por todo mundo, e o setor pecuário tem se desenvolvido para produzir carne de qualidade que satisfaça a essa demanda. Vale destacar os papéis do sistema calpaína/calpastatina. A calpaína, codificada pelo gene *CAPN1*, desempenha um papel fundamental na proteólise posmorte pela clivagem de proteínas que constituem a fibra muscular. A calpastatina, codificado pelo gene *CAST*, por outro lado, age controlando essa clivagem pelo bloqueio da ação da calpaína. Além disso, esse sistema também está envolvido na diferenciação dos mioblastos em miotubos na embriogênese. A ação desse sistema ocorre pela proteólise controlada de proteínas que constituem a membrana plasmática e o citoesqueleto. Para reproduzir a formação de miotubos durante a embriogênese e estudar o controle epigenético na expressão dos genes *CAPN1* e *CAST*, foram estabelecidas culturas de células satélites de músculo bovino, que foram mantidas sem diferenciação (controle negativo) ou foram induzidas à diferenciação, por meio da incubação com meio de cultivo com 2% de soro fetal bovino, na ausência (controle positivo) e após o tratamento com os agentes modificadores epigenéticos como o 5-Aza-2'-desoxicitidina (Aza; desmetilante de DNA), por um período de 48 h á concentração de 10 μ M, e Tricostatina A (TSA; acetilante de histona), por um período de 24 h á concentração de 50 nM. Os resultados mostraram que não houve diferenças

($p > 0,05$) no índice de fusão dos mioblastos entre os grupos Aza, TSA e controle positivo, mas que houve diferença ($p < 0,05$) desses grupos em comparação ao controle negativo, que apresentou menor índice de fusão. Também não houve diferença ($p > 0,05$) nas taxas de viabilidade das células entre os grupos, mostrando que o Aza e TSA não foram citotóxicos nas concentrações usadas. Em relação à expressão gênica, o gene *CAST* foi mais expresso ($p < 0,05$) no grupo controle positivo em comparação ao controle negativo; mas não foram observadas diferenças de expressão ($p > 0,05$) entre os grupos controle positivo, 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A. Para o gene *CAPN1*, não foi observada diferença ($p > 0,05$) de expressão entre os grupos controle negativo e positivo, mas o gene *CAPN1* foi mais expresso ($p < 0,05$) nos tratamentos 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A em comparação ao grupo controle positivo. Quando a razão de expressão *CAST/CAPN1* foi comparada entre os tratamentos, foi observada maior expressão ($p < 0,05$) no grupo controle positivo, tanto em comparação ao grupo controle negativo, quanto aos tratamentos 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A. Podemos concluir que os tratamentos com agentes modificadores epigenéticos não afetaram a diferenciação de mioblastos bovinos em miotubos e nem a expressão do gene *CAST*, mas afetaram a expressão do gene *CAPN1* e a razão de expressão *CAST/CAPN1*.

Palavras-chave: *CAPN1*. *CAST*. 5-aza-2'-desoxicitidina. Tricostatina A. Células satélites. PCR em tempo real.

Abstract

Epigenetics can be defined as the study of heritable changes in phenotype without the occurrence of changes in nucleotide sequence. Epigenetic modifications occur by the chemical changes in DNA and their associated proteins, such as DNA methylation and histone acetylation, respectively. Meat tenderness is a trait of great interest worldwide, resulting in the development of the beef livestock sector to produce meat of quality. It is worth to highlight the role of the calpain/calpastatin system on tenderness. Calpain encoded by the *CAPN1* gene plays a role in proteolysis postmortem by cleaving proteins from muscle fiber. The calpastatin encoded by the *CAST* gene, on the other hand, acts controlling this cleavage by blocking the action of calpain. In addition, this system is also involved in myoblast differentiation into myotubes during embryogenesis. This system controls the proteolysis of proteins that constitute the cytoskeleton and the plasma membrane. To mimic the myotube formation during embryogenesis and to study the epigenetic control of *CAPN1* and *CAST* gene expression, satellite cell cultures established from bovine muscle were kept undifferentiated (negative control) or were induced to differentiate by incubation with culture medium containing 2% fetal bovine serum in the absence (positive control) or after treatment with epigenetic modifiers like 5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza, DNA demethylating) for 48 h at 10 μ M, and Trichostatin A (TSA, histone acetylating) for 24 h at 50 nM. The results showed no differences ($p>0.05$) in myoblast rate fusion between Aza, TSA and positive control groups, but there were differences ($p>0.05$) when these groups were compared to the negative control, which showed lower fusion rates. There was no difference ($p>0.05$) in cell viability among the four groups, showing that Aza and TSA were not cytotoxic at the

used concentrations. Concerning the gene expression, the gene *CAST* was more expressed ($p < 0,05$) in the positive control group than the negative one; but no differences were seen in the expression ($p > 0,05$) between positive control, 5-Aza-2'-deoxycytidine and Trichostatin A groups. For the *CAPN1* gene, no difference was seen in the expression ($p > 0,05$) between negative and positive control groups, but the *CAPN1* gene was more expressed ($p < 0,05$) in the 5-Aza-2'-deoxycytidine and Trichostatin A treatments relative to the positive control group. When the expression ratio of *CAPN1/CAST* were compared between treatments, was seen more expression ($p < 0,05$) in the positive control group both comparing with negative control group and with 5-Aza-2'-deoxycytidine and Trichostatin A treatments. We may conclude that the treatments with the epigenetic modifier agents didn't affect both the bovine myoblast differentiation into myotubes and the *CAST* gene expression, but did in the *CAPN1* gene expression and so did in the expression ratio of *CAPN1/CAST*.

Keywords: *CAPN1*. *CAST*. 5-Aza-2'-deoxycytidine. Trichostatin A. Satellite cells. real time PCR.

Lista de figuras

Figura 1. Micrografia de fluorescência mostrando a presença da proteína desmina em todas as células. Em cada coluna estão as duplicatas de cada animal a partir do qual foram feitas as culturas primárias. Barra: 50 μ m. Magnitude de 10x.

Figura 2. Análise da formação de miotubos em células bovinas *in vitro*. As células satélites musculares foram plaqueadas em placas de 35 mm a 1×10^4 células/mL e coradas por May-Grünwald-Giemsa. 0d, controle; 2d, 4d e 6d - dias após a indução de diferenciação. As setas indicam três ou mais núcleos incorporados nos miotubos. Barra: 50 μ m. Magnitude: 10x.

Figura 3. Índice de fusão (média \pm erro padrão) de mioblastos bovinos após 0, 2, 4 e 6 dias da indução da diferenciação. NS: não significativo. * $p < 0,05$ em comparação a 0d.

Figura 4. Viabilidade (média \pm erro padrão) de mioblastos bovinos submetidos ou não à diferenciação e aos tratamentos com Aza e TSA. NS: não significativo.

Figura 5. Formação de miotubos em mioblastos bovinos não submetidos à diferenciação (controle negativo), submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) após tratamento com 10 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h. Os mioblastos foram plaqueados em placas de 60 mm à densidade de $3,5 \times 10^4$ células/mL e corados por May-Grünwald-Giemsa. As setas indicam três ou mais núcleos incorporados nos miotubos. Barra: 50 μ m. Magnitude: 10x.

Figura 6. Índice de fusão (média \pm erro padrão) dos mioblastos bovinos não submetidos à diferenciação (controle negativo), submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h. NS: não significativo. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Figura 7. Amplificação dos genes *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19* e *RPL-27* em cinco diluições seriadas de cDNAs sintetizadas a partir de RNA extraído de mioblastos bovinos não induzidos à diferenciação e sem nenhum tratamento prévio.

Figura 8. Classificação dos genes de referência mais estáveis pelos métodos Delta Cq, Bestkeeper, Genorm e Normfinder.

Figura 9 - Expressão do gene *CAST* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias

sem nenhum tratamento prévio (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem a indução da diferenciação como calibrador. * Diferença significativa entre o controle negativo e positivo.

Figura 10 - Expressão do gene *CAST* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. NS: diferenças não-significativas entre os grupos controle positivo, 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.

Figura 11 - Expressão do gene *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias sem nenhum tratamento prévio (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem a indução da diferenciação como calibrador. NS: diferença não significativa entre o controle negativo e positivo.

Figura 12 - Expressão do gene *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. * Diferença significativa entre o grupo 5-Aza-2'-desoxicitidina e o controle positivo; ** diferença significativa entre o grupo Tricostatina A e o controle positivo; e NS: diferença não significativa entre 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.

Figura 13- Razão de expressão entre os genes *CAST* e *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizados com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem indução de diferenciação como calibrador. * Diferença significativa na razão de expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* entre o grupo controle negativo e o positivo.

Figura 14 - Razão de expressão entre os genes *CAST* e *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizados com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. * Diferença significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre o grupo 5-Aza-2'-desoxicitidina e o controle positivo; ** diferença significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre o grupo Tricostatina A e o controle positivo; e NS: diferença não significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre os grupos

tratados com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A não apresentou diferença significativa.

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequência dos *primers*, tamanhos dos fragmentos, localização no gene e no cromossomo e acesso no Ensembl dos genes *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, em bovinos.

Tabela 2. Características físicas (comprimento, temperatura de *melting*, conteúdo de GC, temperatura de hibridação, estabilidade 3' e *rating*) dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, em bovinos.

Tabela 3. Indução da diferenciação de mioblastos bovinos por 0, 2, 4 e 6 dias e índice de fusão de mioblastos em miotubos (%), determinado pela coloração May-Grünwald-Giemsa.

Tabela 4. Resultado das quantificações e das razões de absorvância 260/280 nm do RNA extraído de mioblastos bovinos.

Tabela 5. Eficiência e regressão linear (R^2) dos *primers* utilizados para amplificação dos genes bovinos *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, nos experimentos de PCR em tempo real.

Tabela 6. Classificação dos genes de referência nos métodos Delta Ct, Bestkeeper, Normfinder e Genorm.

Lista de abreviaturas

Acetil CoA - acetil coenzima A

Aza- 5-Aza-2'-desoxicitidina

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Esalq, USP)

Cq - ciclo de quantificação

DAC - decitabina

DMR- metilação diferencial do DNA

DNMT1- DNA metiltransferase do tipo 1

HAT - histona acetiltransferase

HDAC - histona desacetilase

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PCR - reação em cadeia de polimerase

PIB - produto interno bruto

ncRNA- RNA não-codificante

TSA- tricostatina A

VBP - valor bruto da produção

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Justificativa	16
3. Objetivos	17
4. Revisão bibliográfica	17
4.1. <i>O agronegócio e a pecuária no Brasil</i>	17
4.2. <i>Maciez da carne bovina</i>	18
4.3. <i>Gene CAPN1</i>	19
4.4. <i>Gene CAST</i>	21
4.5. <i>Desenvolvimento muscular, cultura de mioblastos e o envolvimento do sistema calpaína/calpastatina na formação dos miotubos</i>	22
4.6. <i>Epigenética</i>	23
4.6.1. <i>Metilação no DNA</i>	24
4.6.1.1. <i>Desmetilação passiva do DNA pela 5-aza-2'-desoxicitidina</i>	27
4.6.2. <i>Modificações de histonas</i>	28
4.6.2.1. <i>Inibição das HDACs pela Tricostatina A</i>	29
5. Materiais e métodos	29
5.1. <i>Coleta de tecido muscular bovino e estabelecimento de cultura de células satélites</i>	29
5.2. <i>Imunofluorescência indireta anti-desmina</i>	31
5.3. <i>Criopreservação das culturas primárias de células satélites</i>	32
5.4. <i>Descongelamento das culturas primárias</i>	32
5.5. <i>Contagem celular e teste de viabilidade por exclusão de azul de trypan</i> ..	33
5.6. <i>Coloração por May-Grünwald-Giemsa</i>	34
5.7. <i>Determinação do tempo de diferenciação dos mioblastos em miotubos</i> ...	35
5.8. <i>Tratamento das células satélites com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A</i>	36
5.9. <i>Extração de RNA</i>	37
5.10. <i>Tratamento do RNA com DNase</i>	38
5.11. <i>Síntese de cDNA</i>	39

5.12. Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real ou quantitativo	39
5.12.1 Desenho de primers	39
5.12.2. Eficiência de amplificação	41
5.12.3. Validação de genes de referência	42
5.12.4. Expressão gênica relativa	43
6. Resultados e discussão	44
6.1. <i>Imunofluorescência anti-desmina</i>	44
6.2. <i>Determinação do tempo de diferenciação dos mioblastos em miotubos</i> ...	45
6.3. <i>Viabilidade dos mioblastos após os tratamentos</i>	48
6.4. <i>Morfologia dos mioblastos após os tratamentos</i>	51
6.5. <i>Expressão gênica</i>	54
6.5.1. Extração de RNA.....	54
6.5.2. Eficiência de amplificação	55
6.5.3. Validação do gene de referência.....	56
6.5.4. Expressão gênica relativa	58
7. Conclusão	67
8. Referências bibliográficas	68

1. Introdução

O Brasil nas últimas décadas tem se tornado um grande produtor e exportador de carne. O setor pecuário tem se desenvolvido muito e exerce um papel muito forte no produto interno bruto (PIB) do país. Essa produção é o reflexo do aumento do consumo de carne vermelha e, com o aumento dessa procura, os consumidores, cada vez mais exigentes, têm buscado por carnes que apresentem suculência, maciez e sabor (NETO, 2011).

Devido ao crescimento da demanda, a área da genética animal também se desenvolveu, e muitos genes que influenciam a qualidade da carne foram investigados. Vale destacar a influência de genes como o *CAST* que codifica a calpastatina, e o *CAPN1*, que codifica a μ -calpaína. Eles estão envolvidos no processo de amaciamento da carne no período pós morte pela degradação das proteínas que constituem a fibra muscular. A μ -calpaína é a enzima efetora desse processo, enquanto que a calpastatina age como um regulador negativo de sua atividade (BOEHM et al, 1998). Esses dois genes também estão envolvidos no desenvolvimento do músculo do animal na fase embrionária e adulta, através da degradação limitada de proteínas que constituem o citoesqueleto e a membrana da célula. Isso favorece a fusão dos mioblastos e a formação dos miotubos que irão constituir a fibra muscular (DEDIEU et al, 2002).

Atualmente muitas pesquisas têm sido focadas no controle epigenético da expressão gênica, mas poucos estudos têm sido realizados em animais de produção e para os genes que influenciam a qualidade da carne. Por definição, a epigenética pode ser descrita como o estudo de mudanças herdáveis na expressão gênica sem a ocorrência de mudanças na sequência de nucleotídeos no material genético. Essas mudanças são mitoticamente e, em alguns casos, meioticamente herdáveis e podem ser explicadas por alterações químicas no DNA e em suas proteínas associadas. Essas modificações incluem a metilação no DNA, as modificações químicas nas

proteínas histonas, as mudanças na conformação da cromatina e a ação de RNA não-codificantes (nc-RNA) (TOST, 2010).

Por não constituírem uma modificação permanente, muitos fármacos naturais e sintéticos foram desenvolvidos para estudar os eventos epigenéticos que modulam a expressão gênica. Dentre eles vale destacar o 5-Aza-2'-desoxicitidina (AZA) ou decitabina (DAC), um análogo de nucleotídeo que causa a desmetilação passiva do DNA pelo aprisionamento da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1), favorecendo a expressão de genes antes metilados (SI et al, 2010). Outro fármaco amplamente usado é a Tricostatina A (TSA), que promove a acetilação de histonas através do bloqueio da ação das histonas desacetilases (HDAC). A acetilação de histonas favorece a expressão gênica por manter a cromatina em um estado relaxado ou “aberto”, o que favorece o acesso de fatores de transcrição e de proteínas reguladoras aos genes alvo (NAIR et al, 2001).

Com isso em mente, o presente trabalho busca avaliar os efeitos de tratamentos que promovem alterações epigenéticas sobre a diferenciação de mioblastos bovinos em miotubos e sobre a expressão dos genes *CAPN1* e *CAST*.

2. Justificativa

Os genes *CAPN1* e *CAST* foram escolhidos, pois uma vez que caracteres quantitativos, como a maciez de carne em bovinos e outras características de produção animal, são bastante influenciados pelo ambiente, mecanismos de controle epigenético podem estar envolvidos na determinação do fenótipo dos animais. Assim, além da contribuição científica, a melhor compreensão dos efeitos epigenéticos sobre a diferenciação muscular e a expressão de genes de interesse comercial poderá trazer grandes benefícios econômicos, ao permitir o desenvolvimento de estratégias de alimentação animal ou de tratamentos que afetem o padrão de metilação e acetilação dos

genes de maneira a melhorar características de carcaça e qualidade da carne bovina.

3. Objetivos

Avaliar os efeitos dos tratamentos com agentes que promovem modificações epigenéticas, como a desmetilação causada pelo 5-Aza-2'-desoxicitidina e a acetilação de histonas pela Tricostatina A sobre a viabilidade, o índice de fusão dos mioblastos em miotubos e a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em células satélites bovinas precursoras de mioblastos induzidas à diferenciação *in vitro*.

4. Revisão bibliográfica

4.1. O agronegócio e a pecuária no Brasil

Na economia brasileira, o setor do agronegócio tem sido muito importante na geração de saldos positivos na balança comercial. Seu PIB alcançou, em 2009, um valor de R\$ 735,3 bilhões. A pecuária e os setores da cadeia produtiva associados são responsáveis por aproximadamente um terço do valor da produção do agronegócio brasileiro, e segundo dados do CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada- Esalq, USP), o valor bruto da produção (VBP) da pecuária em 2009 foi de R\$ 85,8 bilhões. O setor “dentro da porteira” é caracterizado pelos sistemas de produção e por tudo aquilo relacionado com a entrada de insumos, ocupação do solo, tecnologia de processos, criação e resultado econômico. O setor “fora da porteira” refere às atividades de transporte, armazenamento, industrialização, embalagem e consumo (NETO, 2011).

A carne tem posição de destaque entre os produtos agropecuários exportados pelo Brasil, sendo um alimento importante quando se trata da geração de superávits na balança comercial (NETO, 2011).

O aumento das exportações brasileiras de carne bovina ocorreu de forma mais expressiva a partir de 2000, como consequência do crescimento da bovinocultura nas décadas de 80 e 90. Ao longo dessas décadas o setor se modernizou e alcançou a marca de exportação dos países do MERCOSUL, como a Argentina. Outros fatores que favoreceram o aumento da exportação foram a queda da valorização do real e a consequente valorização do dólar (uma vez que todos os produtos exportados são cotados em dólar) a queda da atuação do mercado europeu devido à doença da vaca louca (encefalopatia espongiforme bovina) e o surto de febre aftosa na Argentina (POLAQUINI et al, 2006).

Quanto às exportações de carne bovina frente a outros países, o Brasil está em segundo lugar, atrás da Austrália, com 1,325 milhão de toneladas exportadas. Esse volume representa aumento de 295,5% em relação ao volume exportado há 20 anos, que foi de 335 mil toneladas. As exportações brasileiras de carne bovina representaram 16,8% do total da produção mundial de 7,869 milhões de toneladas em 2011 (BEEF POINT, 2012).

Segundo o último censo, a Região Centro-Oeste respondeu por 38,5% do abate de bovinos, no 1º trimestre de 2012, ficando à frente das Regiões Norte (20,8%), Sudeste (19,2%) e Sul (11,4%). A Região Nordeste é a que menos abate animais (10,2%), o que pode estar relacionado a fatores como falta de técnica e incentivos fiscais (IBGE, 2012).

4.2. Maciez da carne bovina

Animais da produção pecuária apresentam um papel muito importante no desenvolvimento econômico mundial. Com o objetivo de aumentar a rentabilidade, gados com características superiores de importância comercial, tais como qualidade da carne e da carcaça têm sido selecionados e usados em programas de criação (YUAN et al, 2013). De todas as características, a maciez é considerada a mais importante (HOCQUETTE et al,

2012) e, por sua influência na satisfação do consumidor, atrai grande interesse na produção de gado de corte (LI et al, 2013).

A maciez é resultado da contribuição de dois principais fatores: o tecido conjuntivo e a perda posmorte da integridade estrutural dentro do sarcolema (membrana plasmática do tecido muscular), a maquinaria contrátil fundamental do músculo esquelético (SAWDY et al, 2004).

O tecido conjuntivo, que é composto principalmente de colágeno, mostra pouca mudança durante o período posmorte. Entretanto, a perda posmorte da integridade estrutural apresenta grande influência na maciez, começa quase que imediatamente após o abate e envolve enzimas proteolíticas dependentes de cálcio, como o sistema calpaína/calpastatina (SAWDY et al, 2004).

O sistema calpaína/calpastatina tem sido considerado como o principal mecanismo envolvido na maciez da carne. A μ -calpaína, codificada pelo gene *CAPN1* localizado no cromossomo bovino 29 e a m-calpaína, codificada pelo gene *CAPN2* localizado no cromossomo bovino 16, são as principais enzimas responsáveis tanto pelo amaciamento do músculo esquelético no período posmorte quanto no desenvolvimento muscular (BOEHM et al, 1998; DEDIEU et al, 2002). Elas são proteases ativadas por cálcio, que degradam proteínas chave do músculo como nebulina, titina, troponina T e desmina (KEMP et al, 2010). Por outro lado, a calpastatina, codificada pelo gene *CAST* e localizado no cromossomo 7, atua como um inibidor endógeno das calpaínas (GOLL et al, 2003) e reduz a taxa e diminui a extensão da proteólise no músculo esquelético (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999).

4.3. Gene *CAPN1*

O gene que codifica a μ -calpaína é expresso de forma ubíqua (expressão constante em todos os tecidos). Essa proteína difere da m-calpaína pela concentração de cálcio necessária para a sua ativação: μ -calpaína requer

micromol por litro de cálcio para sua ativação, enquanto que a m-calpaína necessita de milimol por litro de cálcio. Essa proteína consiste de duas subunidades: uma subunidade menor reguladora e outra maior catalítica. A subunidade menor, de massa molecular de ~30 kDa, é codificada pelo gene *CAPN4* e é compartilhada pelas duas calpaínas. Ela é constituída pelos domínios V e VI. O domínio V é um domínio rico em glicina localizado na extremidade N-terminal. O domínio VI, localizado na extremidade COOH⁻, contém cinco subdomínios do tipo *EF-hand* que modulam a atividade da proteína por serem especializados em se ligar ao cálcio. O quinto subdomínio, no entanto, é responsável em manter unidas as duas subunidades (GOLL et al, 2003; SUZUKI et al, 2004). A subunidade maior, codificada pelo gene *CAPN1*, apresenta massa molecular de ~80 kDa e é constituída de quatro domínios (I-IV). O domínio II é subdividido em IIa e IIb e representa o sítio proteolítico da enzima. O domínio I é uma α -hélice N-terminal de ancoragem das subunidades. O domínio III liga-se ao cálcio e atua no processo de dissociação. O quarto domínio, assim como o domínio VI da subunidade de 30 kDa, apresenta cinco subdomínios do tipo *EF-hand* sendo o quinto deles responsável pela interação com sua réplica no subdomínio de 30 kDa, para manter as subunidades unidas no estado inativo (SORIMACHI et al, 2011).

A μ -calpaína é localizada no citoplasma quando inativa, na forma heterodimérica. O processo de ativação envolve a quebra das interações entre os domínios que mantêm a repressão da atividade da calpaína e união das subunidades. Essa quebra ocorre quando a μ -calpaína é liberada do seu repressor, a calpastatina, em resposta ao aumento na concentração de cálcio citoplasmático. A autólise quebra a interação entre o domínio I e VI e favorece a dissociação das duas subunidades. A ligação do cálcio no domínio III é responsável na translocação da calpaína às membranas, uma vez que esse domínio apresenta afinidade com fosfolípídeos (SUZUKI et al, 2004). Uma vez na membrana, a μ -calpaína exerce a degradação de proteínas localizadas na membrana da célula e do citoesqueleto (KEMP et al, 2010).

4.4. Gene CAST

O sequenciamento do gene da calpastatina em bovinos mostrou que esse gene contém ~130 kb em 35 éxons. Embora um único gene CAST mapeado no cromossomo 7 codifique a calpastatina, um grande número de isoformas dessa proteína existe devido ao uso de diferentes promotores ou a mecanismos de recomposição (*splicing*) alternativa. No mínimo oito isoformas da proteína foram identificados, e normalmente mais de uma isoforma é encontrada em um único tecido. Dentre essas isoformas, quatro são devidas a diferenças na região N-terminal XL, um sítio alvo de fosforilação por cinases. Essas diferenças são devidas ao uso alternativo de promotores (GOLL et al, 2003; JUSZCZUK-KUBIAK et al, 2008).

Em bovinos o gene CAST apresenta os éxons 1xa, 1xb, 1u e 14t, responsáveis na variação N-terminal do domínio XL. Os éxons 1xa e 1xb são localizados em tandem na ponta 5'. Cada um deles apresenta um promotor localizado à montante do códon iniciador de tradução AUG e o uso alternativo desses promotores é responsável pela produção das isoformas I e II, respectivamente. O éxon 1u é distal aos dois primeiros éxons na direção 3'. Ele não possui um iniciador de tradução AUG e codifica uma sequência 5' não traduzida. Na transcrição, esse éxon é unido ao éxon 2, que contém um AUG iniciador e é responsável na produção da isoforma III (RAYNAUD et al, 2005; KEMP et al, 2010). Entre os éxons 14 e 15 localiza-se um promotor e um éxon, designado como 14t, contendo um códon iniciador de tradução AUG. A transcrição feita a partir desse promotor é responsável pela produção da isoforma IV encontrada principalmente nos testículos (LI; GOLDBERG, 2000; PARR et al, 2004).

Além da região XL, a calpastatina é composta de um domínio L de função desconhecida, localizado adjacente à região XL, e de quatro domínios inibidores de aproximadamente 140 aminoácidos, cada um dos quais capazes de inibir uma molécula de calpaína. Em cada domínio existem três subdomínios: A, B e C. O subdomínio B tem o potencial de inibir as calpaínas

pela ligação no sítio ativo, e, os subdomínios A e C ligam-se à enzima e potencializam a inibição. Esse processo requer concentrações de cálcio que são próximos ou abaixo daquelas que são necessárias para a ativação das calpaínas (TAKANO et al, 2000; JUSZCZUK-KUBIAK et al, 2008; KISS et al, 2008).

4.5. Desenvolvimento muscular, cultura de mioblastos e o envolvimento do sistema calpaína/calpastatina na formação dos miotubos

As fibras do músculo esquelético são constituídas de células altamente diferenciadas. O seu desenvolvimento envolve uma via de muitos passos, nos quais as células precursoras do mesoderma são selecionadas para se diferenciarem em mioblastos, que apresentam alta capacidade de proliferação e de fusão. Durante o desenvolvimento embrionário, muitos mioblastos fundem-se para formar os miotubos e, conseqüentemente, a fibra muscular. Uma vez que a fusão tenha ocorrido, os miotubos perdem a capacidade de sofrer divisão celular. Entretanto, uma pequena porcentagem de células persiste no músculo esquelético maduro como células precursoras satélites, que se localizam entre a lâmina basal e a membrana plasmática do miotubo (sarcolema). Essas células são mantidas quiescentes na fase G_0 do ciclo celular, mas podem ser ativadas, diferenciadas em mioblastos e fundidas em miotubos após lesões no tecido muscular no animal adulto (KAISTO, 2003; TORTORA; DERRICKSON, 2009; YIN et al, 2013).

As culturas de células satélites fornecem um conveniente sistema para estudar os mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação – proliferação das células satélites, diferenciação em mioblastos, fusão e formação dos miotubos. Em cultura, as células satélites inicialmente proliferam-se até que sejam retirados do ciclo celular. Uma vez que a divisão é cessada, os mioblastos migram e alinham-se, processo que é seguido por adesão e produção de um miotubo multinucleado. A partir dessas observações surge a possibilidade de que a proteólise, e mais especificamente aquela dependente

de cálcio, tenha papel importante durante a fusão dos mioblastos (BALCERZAK et al, 1998).

Evidências sugerem o envolvimento de atividade proteolítica dependente de cálcio no processo de fusão dos mioblastos, como as calpaínas ubíquas μ - e m-calpaína. Grandes alterações na superfície dos mioblastos são observadas durante a fusão. Além do mais, os componentes do citoesqueleto tais como a talina e a desmina são degradadas pelas calpaínas durante o processo. Levando isso em consideração, é possível que as calpaínas exerçam papel essencial na fusão dos mioblastos através do seu envolvimento na reorganização dos componentes do citoesqueleto e da membrana plasmática (DEDIEU et al, 2002).

Em culturas celulares primárias de músculo foi provado que a calpastatina está presente nos estágios iniciais da diferenciação e que a diminuição tanto do mRNA quanto da proteína calpastatina ocorre antes do início da fusão dos mioblastos induzindo aumento significativo, mas temporário na atividade das calpaínas (BALCERZAK et al, 1998). Dessa forma, a calpastatina, que exerce importante papel na regulação da atividade das calpaínas e, subseqüentemente, controla a degradação limitada de proteínas constituintes do citoesqueleto e da membrana, regula a fusão dos mioblastos (BARNOY et al, 2000).

4.6. Epigenética

Todas as células de organismos multicelulares carregam o mesmo material genético codificado em suas sequências de DNA, mas as células naturalmente demonstram uma ampla diversidade morfológica e funcional e essa heterogeneidade é causada pela expressão diferencial de genes. Essa expressão diferencial é explicada pela epigenética, que pode ser definida como o estudo de mudanças herdáveis na expressão gênica sem a ocorrência de mudanças na sequência de nucleotídeos no material genético. Essas mudanças são causadas por modificações químicas no DNA e em suas

proteínas associadas, e são passíveis de alterações, ao contrário das mutações genéticas e cromossômicas, que são alterações permanentes. Essas mudanças são mitoticamente e, em alguns casos, meioticamente herdáveis (TOST, 2010).

Os fenômenos epigenéticos são mediados por uma variedade de mecanismos moleculares que são divididos em quatro classes principais: metilação do DNA, modificações pós-traducionais de proteínas histonas, mudança na conformação da cromatina e silenciamento de mRNAs alvo por RNAs não-codificantes (nc-RNAs) (FINGERMAN et al, 2012).

4.6.1. Metilação no DNA

A metilação do DNA é uma modificação epigenética essencial para uma variedade de processos biológicos. Em genomas de vertebrados, a metilação do DNA ocorre pela adição de grupos metil na posição 5 das citosinas nos dinucleotídeos CG (designados como CpG), formando as 5-metilcitosinas. A metilação apropriada do DNA é um pré-requisito normal do desenvolvimento e está envolvida em vários processos como o controle da expressão gênica, *imprinting*, inativação do cromossomo X e supressão de elementos genômicos repetitivos (BOGDANOVIC; VEENSTRA, 2009).

A metilação é feita pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMT), expressas em células em proliferação e em tecidos somáticos. Dentre essas enzimas, a do tipo 1 (DNMT1) age principalmente na preservação dos padrões de metilação durante todo o desenvolvimento e período de vida. O modo de manutenção no padrão de metilação pela DNMT1 envolve o reconhecimento da molécula de DNA recém sintetizada, contendo o filamento velho metilado e o filamento novo não-metilado (DNA hemi-metilado), e a metilação das citosinas nos dinucleotídeos CpGs no filamento novo sob a orientação do padrão de metilação no filamento velho (GOLL; BESTOR, 2005).

A desmetilação, no entanto, pode ocorrer de duas formas: de maneira passiva dependente de replicação ou ativa envolvendo enzimas

especializadas. Na desmetilação passiva, dependente de replicação, o DNA genômico é progressivamente desmetilado com as divisões celulares, devido à depleção da DNMT1. Isso ocorre, por exemplo, com o genoma materno após a fecundação do zigoto até o estágio de oito células. Na desmetilação ativa, a enzima Tet 1 (*ten-eleven translocation 1*) é responsável por esse processo oxidando a 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, que é excisada pela maquinaria de reparo do DNA. Exemplo de desmetilação ativa ocorre no genoma paterno após a fecundação e na plasticidade do tecido neural em mamíferos (GUO et al, 2011; ZHOU, 2012).

Os dinucleotídeos CpGs não são uniformemente distribuídos por todo o genoma, ao invés disso, são encontrados em grupos, chamados de ilhas CpG. Essas ilhas, normalmente não-metiladas, são predominantemente encontradas associadas com promotores de genes de expressão constitutiva (genes *housekeeping*) (DEATON; BIRD, 2011). Por outro lado, a hipermetilação nas ilhas CpGs, encontradas nos promotores dos genes, tipicamente resulta no silenciamento gênico (COCOZZA et al, 2011).

Além das ilhas acima mencionadas existem as ilhas CpG *shores* ou ilhas CpG marginais/flanqueadoras, que são ilhas com uma densidade menor de dinucleotídeos CG que uma ilha típica. Elas são freqüentemente localizadas próximas a uma ilha CpG tradicional, à uma distância média de 2 kb (SHIMODA et al, 2013).

A metilação e desmetilação nessas ilhas CpG *shores* está intimamente associada com a inativação transcricional e a expressão gênica, respectivamente. A maioria das metilações tecido específicos parecem ocorrer não em ilhas CpG, mas em ilhas CpG *shores*. Além do mais, a metilação diferencial do DNA (DMR) – diferença de metilação nos diferentes tecidos ou estágios de desenvolvimento – em ilhas CpG *shores* parece correlacionar com o controle na expressão gênica, tal como acontece com as ilhas CpG tradicionais (PORTELA; ESTELLER, 2009).

Irizarry et al. (2009), realizaram um estudo relacionando a diferença de metilação nas ilhas CpG *shores* em diferentes tecidos humanos

(fígado, cérebro e baço) e mostraram uma forte variação de metilação nessas ilhas (76%) comparadas com as ilhas CpG normais (6%). Muitas das metilações encontradas foram localizadas à ~2 kb de distância da região promotora e essas regiões apresentavam diferenças de metilação entre os diferentes tecidos. Eles também correlacionaram essas diferenças de metilação com o perfil de expressão gênica, por microarranjo, entre fígado e cérebro. Um total de 2.041 pares de genes diferencialmente metilados apresentaram uma forte relação inversa entre a metilação nessas ilhas com a expressão gênica. Portanto, existem evidências suficientes de ilhas CpG proximais, menos enriquecidas com dinucleotídeos CG e fora da região promotora, que controlam a expressão gênica de acordo com o seu estado epigenético (IRIZARRY et al, 2009).

No processo de diferenciação celular, a metilação do DNA exerce um papel importante através da metilação e inativação de genes relacionados à pluripotência. Por outro lado são mantidas desmetiladas ilhas CpG em regiões promotoras de genes alvo, esses necessários à função especializada de cada órgão (HUAN; FAN, 2010).

Na célula, a metilação do DNA controla a expressão gênica de duas maneiras. Primeiro, a metilação do DNA na região promotora impede a ligação de fatores transcricionais no gene, interferindo diretamente com a ativação gênica. Segundo, a metilação do DNA atrai proteínas de ligação a CpG metilados, levando a mudança na conformação da cromatina para um estado repressivo heterocromático (KLOSE; BIRD, 2006; MAUNAKEA et al, 2010).

Os estudos epigenéticos na pecuária são quase que em sua totalidade focados na técnica de transferência nuclear de células somáticas (SCNT). Assim, são limitados os estudos dos eventos epigenéticos controlando a expressão de genes envolvidos na qualidade da carne e da carcaça, como os genes *CAST* e *CAPN1*.

Raynaud et al (2005) isolaram as regiões situadas a montante dos éxons 1xa, 1xb, 1u e 14t do gene *CAST* bovino e identificaram uma ilha CpG

em cada um dos quatro sítios de ligação ao fator de transcrição sp1 na região promotora do éxon 1u (RAYNAUND et al, 2005). Esse fator tem como característica o reconhecimento de sítios GC-box, que é comumente encontrado em promotores contendo ilhas CpG livres de metilação, típicos de genes de expressão constitutiva (*housekeeping*) (PHILIPSEN; SUSKE, 1999).

Juszczuk-Kubiak et al (2009) encontraram dois polimorfismos reconhecidos por RFLP em uma ilha CpG no promotor do éxon 1u e sugeriram que esses polimorfismos podem influenciar o perfil de metilação do gene *CAST* e conseqüentemente afetar sua regulação epigenética (JUSZCZUK-KUBIAK et al, 2009). No entanto, em ambos os trabalhos com o gene *CAST*, não foi feito estudo algum relacionando a expressão desse gene com o padrão de metilação no promotor do éxon 1u.

4.6.1.1. Desmetilação passiva do DNA pela 5-aza-2'-desoxicitidina

O 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) ou decitabina (DAC) é um análogo de nucleotídeo, que inibe a atividade da DNMT1 e gera hipometilação global passiva, quando as células se dividem (SI et al, 2010). Após o transporte para dentro das células, o AZA é fosforilado por diferentes cinases e convertido em sua forma trifosfatada ativa. A forma trifosfatada incorporada no DNA perturba a interação entre o DNA e a DNMT1, aprisionando-a para a degradação proteossomal. A depleção da DNMT1 resulta na perda passiva de metilação da citosina nas células filhas após a replicação (YANG et al, 2010). Assim, esse agente só tem efeito desmetilante em células em proliferação.

Montesano et al (2013) mostraram que o Aza à concentração de 5 µM sozinho induziu a diferenciação de mioblastos C2C12 de camundongos e aumentou a expressão de genes relacionados à diferenciação, como MyoG e p21 em comparação a mioblastos não tratados com Aza, mas induzidos à diferenciação. Esse estudo mostrou importante papel do Aza na diferenciação dos mioblastos através da desmetilação de genes envolvidos no processo (MONTESANO et al, 2013).

4.6.2. Modificações de histonas

As modificações de histonas envolvem o remodelamento do complexo DNA- octâmero de histonas, que é constituído de 2 histonas de cada tipo: H2A, H2B, H3 e H4. Essas modificações incluem metilação, acetilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, fosforilação e sumoilação em resíduos específicos de aminoácidos em suas caudas N-terminais (LI et al, 2007). As acetilações de lisinas apresentam funções cruciais na regulação da expressão gênica (promovem ativação gênica) e são as mais estudadas (BYCROFT, 2011).

As enzimas histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC) são conhecidas por terem importante função na regulação da transcrição gênica através do remodelamento da cromatina. As HATs promovem o relaxamento da cromatina a um estado ativo transcricionalmente através da adição de grupos acetil (COCH_3) na cauda N-terminal nos resíduos de lisina das histonas. No estado desacetilado ocorre uma interação entre a carga positiva da lisina na cauda da histona com o DNA de carga negativa, mantendo a estrutura em um estado condensado e repressivo transcricionalmente. No entanto, as HATs neutralizam essa interação adicionando grupos acetil, provenientes da acetil coenzima A (acetil CoA). Esse grupo acetil neutraliza a carga positiva das histonas e faz com que a cauda da histona se distenda para fora do nucleossomo diminuindo a interação com o DNA e com o nucleossomo adjacente. Com isso a cromatina adquire uma conformação relaxada “aberta” e ativa transcricionalmente (STERNER; BERGER, 2000).

As HDACs, por outro lado, catalisam a remoção desses grupos acetil e restauram o estado condensado da cromatina, inativa transcricionalmente (GILLESPIE et al, 2011). A remoção dos grupos acetil em sítios alvo do DNA pelas HDACs, e a consequente hipoacetilação resultam na diminuição do espaço entre o nucleossomo e o DNA que fica ao seu redor. Esse DNA mais compactado localmente diminui a acessibilidade de fatores de

transcrição e proteínas regulatórias, levando à repressão transcricional (RUIJTER et al, 2003).

4.6.2.1. Inibição das HDACs pela Tricostatina A

Uma variedade de inibidores de baixo peso molecular de HDACs tem sido descrita e inclui produtos naturais, como a Tricostatina A (TSA) (AHERNE et al, 2002), produto da fermentação promovida por *Streptomyces* (SHARMA et al, 2009). A TSA inibe reversivelmente as HDACs de mamíferos e, posteriormente, muda o equilíbrio entre a acetilação e desacetilação de histonas resultando em hiperacetilação da cromatina. A acetilação de histona é um importante fator na regulação positiva da expressão gênica, por essa razão o tratamento com TSA pode resultar no aumento da expressão gênica (NAIR et al, 2001).

Em pesquisas com transferência nuclear de células somáticas (SCNT) em bovinos, OH et al. (2012) mostraram que a tricostatina A à concentração de 100 nM aumentou a expressão de genes relacionados à pluripotência como *NANOG* e *OCT4* em embriões. Esses resultados foram semelhantes aos observados em embriões controle produzidos por fertilização *in vitro* e mostraram a participação da acetilação de histonas na pluripotência de zigotos bovinos e o aumento nas taxas de desenvolvimento de embriões bovinos SCNT por indução de hiperacetilação de histonas com a tricostatina A (OH et al, 2012).

5. Materiais e métodos

5.1. Coleta de tecido muscular bovino e estabelecimento de cultura de células satélites

Imediatamente após o abate, amostras de tecido muscular bovino foram coletadas do músculo *Longissimus dorsi* no quinto espaço intercostal,

colocadas em tubos de 50 mL contendo 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) com 1 % de antibiótico antimicótico (Gibco) e mantidas em gelo. O tampão fosfato salina é uma solução contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio, que mantém constante o pH e apresenta uma concentração salina isotônica que se iguala à dos animais. Já o antibiótico e o antimicótico são usados para impedir a contaminação no estabelecimento das culturas primárias, e apresentam em sua formulação 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. Essa concentração é de 100x, dado que a concentração de trabalho de 1% apresenta 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B.

No fluxo laminar, as amostras de tecido muscular foram lavadas uma vez com álcool 70% e três vezes com PBS. Pedacos de tecido conjuntivo e gordura foram removidos do músculo com o auxílio de lâmina de bisturi, pinça e tesoura, e posteriormente, o músculo foi cortado em pequenos fragmentos de aproximadamente 3 mm. Os fragmentos foram colocados em placas de Petri de 100 mm (TPP) contendo 9,815 mg/mL de gelatina (Sigma Aldrich) solubilizada em PBS, e aplicados 15 mL de meio de proliferação DMEM/Ham-F12 (1:1) (Sigma Aldrich) com 15% de soro fetal bovino (SFB; Cripion) e 1% de antibiótico antimicótico (Gibco). A gelatina é amplamente usada para ajudar na aderência das células à superfície das placas ou garrafas de poliestireno. Os meios de cultivo DMEM e Ham-F12 são meios ricos em aminoácidos e vitaminas importantes para a proliferação celular. O SFB atua como um suplemento fornecendo às células fatores de crescimento, aminoácidos e ácidos graxos, todos importantes para a proliferação também.

As amostras foram mantidas por 10 dias em estufa de cultivo celular (Incusafe CO₂ incubator, Sanyo) à temperatura de 37 °C com 5% de CO₂ em ar.

Após os 10 dias, as amostras foram visualizadas no microscópio óptico invertido (Olympus CK2) para identificar células precursoras de mioblastos migrando para fora dos fragmentos de músculo. Depois, os

fragmentos foram retirados das placas e as células lavadas uma vez com PBS. As células foram desprendidas das placas aplicando 10 mL de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich) (20 mL de tripsina estoque 2,5% em 180 mL de solução de Puck) por 5 minutos. A tripsina é uma proteína digestiva produzida pelo pâncreas e que promove quebras nas ligações entre os aminoácidos das proteínas da superfície celular, responsáveis na aderência das células à superfície do frasco de cultura e na aderência umas com as outras.

Para a neutralização da tripsina, foram adicionados 10 mL de meio de proliferação, no qual a α 1 anti-tripsina, presente no soro fetal bovino, inibe a ação da tripsina. As células foram então homogeneizadas e centrifugadas a 1200 x g por 10 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em meio de proliferação. Uma parte dessas células ressuscitadas foi destinada a imunofluorescência indireta anti-desmina e as demais, congeladas para experimentos posteriores.

5.2. Imunofluorescência indireta anti-desmina

Para a imunofluorescência indireta, três culturas de células oriundas de três animais foram plaqueadas à concentração de 1×10^3 células/mL em placas de 96 poços (Becton & Bickinson, BD). As células foram mantidas na incubadora de CO₂ por 3 dias para permitir a aderência total das células. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com formaldeído 4% (Sigma Aldrich) por 30 minutos à temperatura ambiente, para fixar e manter estáveis as estruturas moleculares das células. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 3% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a marcação, foi utilizado anticorpo de coelho anti-desmina (Sigma Aldrich) na proporção 1:20 (1 μ L do anticorpo mais 19 μ L de PBS), aplicado nos poços e deixado agir por 1 hora a 37 °C. Após 1 hora, as células foram lavadas três vezes com PBS, com cuidado para evitar que as células se desprendessem da placa. Depois de

lavadas, as células foram incubadas com anticorpo secundário de cabra conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldrich), na proporção 1:80 (1 μ L do anticorpo secundário mais 79 μ L de PBS) por 45 minutos a 37 °C. Depois do período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e analisadas no microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss). As imagens das células foram obtidas com câmera digital (Easyshare V530, 5.0 megapixels- Kodak) e processadas como o software livre Image J (versão 1.47, National Institute of Health (NIH)).

5.3. Criopreservação das culturas primárias de células satélites

Para a criopreservação, as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio de preservação, que contém 50% de SFB, 40% de DMEM e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO; Sigma Aldrich), e depois transferidas para criotubos de 2 mL. A alta concentração de soro fetal é importante, pois garante recuperação de grande quantidade de células quando essas são descongeladas, e o DMSO criopreserva as células evitando danos celulares que ocorrem devido à desidratação decorrente do congelamento lento.

As células foram homogeneizadas em meio de criopreservação e submetidas à lenta diminuição da temperatura: 1 hora a 4 °C, 1 hora a - 20 °C, 1 hora a - 35 °C e *overnight* a - 80 °C. No dia seguinte, os criotubos foram mantidos por 12 horas no vapor de nitrogênio, cerca de 2 cm acima do nível do nitrogênio líquido (~ - 120 °C) e finalmente mergulhados no nitrogênio (~ - 196 °C), no qual é possível serem estocadas por período indeterminado.

5.4. Descongelamento das culturas primárias

Quando necessárias, as culturas primárias foram descongeladas para realização das análises morfológicas e de expressão gênica. Para isso, o meio de cultura foi pré-aquecido a 37 °C, enquanto que os criotubos de congelamento contendo as células foram retiradas do nitrogênio líquido e

aquecidos a 37 °C. Em um tubo de 15 mL foram aplicados 5 mL do meio de cultura previamente aquecido, e depois de descongelados os criotubos, as células foram transferidas para o tubo com o meio. As células homogeneizadas foram centrifugadas a 1.200 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 15 mL de meio de proliferação DMEM/Ham-F12 (1:1) com 15% de SFB e 1% de antibiótico antimicótico e proliferadas em garrafas de 75 cm² até alcançar confluência ou estabelecimento de monocamada de células.

5.5. Contagem celular e teste de viabilidade por exclusão de azul de trypan

Para determinar a viabilidade celular antes dos plaqueamentos e depois dos tratamentos, 10 µL de células em suspensão foram homogeneizados com o mesmo volume de azul de trypan 4% (Gibco), proporção 1:1, e contados em câmara de Neubauer.

A fórmula utilizada para determinar a concentração celular foi:

$$\frac{Q1+Q2+Q3+Q4}{4} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição} = \text{N}^\circ \text{ de células/mL} \quad (5.1)$$

Para determinar a viabilidade celular, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100 = \% \text{ de células viáveis} \quad (5.2)$$

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células inviáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100 = \% \text{ de células inviáveis} \quad (5.3)$$

As células viáveis são aquelas que apresentam membrana plasmática íntegra e coloração normal na observação em câmara de Neubauer, por outro lado, as inviáveis são aquelas que apresentam perda de integridade da membrana, e por isso, o azul de trypan é internalizado e as células coram-se em azul.

A análise estatística foi feita pelo método não paramétrico *one-way* ANOVA. A comparação dos valores médios entre os grupos foi feita usando o teste comparativo múltiplo de Tukey. O valor p foi de 0,05 com intervalo de confiança (CI) de 95% (GraphPad Prism versão 5.0).

5.6. Coloração por May-Grünwald-Giemsa

A técnica de coloração por May-Grünwald-Giemsa, que cora simultaneamente o núcleo e o citoplasma, foi utilizada para analisar a morfologia dos mioblastos. Para isso as culturas de células satélites plaqueadas foram lavadas 1 vez com PBS e fixadas por 15 minutos com metanol 100% (Sigma Aldrich). Depois da fixação, foi aplicado o primeiro corante, o May-Grünwald (Sigma Aldrich), e deixado agir por 5 minutos. Sem descartar o corante, foi aplicada água tamponada (8,3 mM de KH_2PO_4 e 8,3 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em água ultrapura, pH 7,0), misturado bem e deixado agir por 1 minuto. O corante foi removido e as células foram marcadas com o segundo corante feito na hora, Giemsa (1:20) (Sigma Aldrich), por 15 minutos. O Giemsa foi removido e as células foram lavadas com cuidado com água ultrapura para remover o excesso de corante.

As placas foram deixadas secar e posteriormente visualizadas sob microscópio óptico (Primo Star, Zeiss). As imagens foram adquiridas com câmera de vídeo (Axio Cam ER c5s, Zeiss) e processadas no software Axio Vision Rel. 4.8 e no Image J.

Para quantificar a formação dos miotubos o número total de núcleos e o número total de núcleos incorporados nos miotubos foram contados em 10 campos microscópicos escolhidos ao acaso. O índice de fusão

foi calculado como porcentagem de núcleos incorporados nos miotubos relativo ao número total de núcleos. Somente estruturas contendo no mínimo três núcleos foram consideradas como miotubos representativos. A fórmula geral utilizada para calcular o índice de fusão foi:

$$\text{Índice de fusão (IF)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de núcleos incorporados nos miotubos}}{\text{n}^\circ \text{ de núcleos totais}} \times 100 \quad (5.4)$$

5.7. Determinação do tempo de diferenciação dos mioblastos em miotubos

Para a determinação do tempo de diferenciação dos mioblastos em miotubos, uma amostra de cultura de células satélites foi plaqueada em meio de proliferação DMEM/Ham-F12 (1:1) com 15% de SFB e 1% de antibiótico antimicótico à concentração de 1×10^4 células/mL em 4 placas de petri de 35 cm². Essas placas foram avaliadas após 0, 2, 4 e 6 dias (0d, 2d, 4d e 6d, respectivamente) da indução da diferenciação. A 0d é a placa controle sem a indução da diferenciação, que foi corada por May-Grünwald-Giemsa após 3 dias na incubadora de CO₂, tempo necessário para a aderência total das células às placas. Exceto o controle (0d), as demais placas foram induzidas à diferenciação, por meio da substituição do meio de proliferação pelo meio de diferenciação (meio DMEM/Ham F-12 com 2% de SFB e 1% de antibiótico antimicótico). O meio de diferenciação foi trocado a cada 2 dias. Após 2, 4 ou 6 dias de diferenciação, as placas 2d, 4d e 6d, respectivamente, foram coradas com May-Grünwald-Giemsa.

A análise estatística das quantificações de núcleos incorporados nos miotubos foi feita pelo método não paramétrico *one-way* ANOVA. A comparação dos valores médios entre os tratamentos foi feita usando o teste comparativo múltiplo de Tukey. O valor p foi de 0,05 com CI de 95% (GraphPad Prism versão 5.0).

5.8. Tratamento das células satélites com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A

Depois de determinado o tempo ideal de diferenciação dos mioblastos em miotubos, o passo seguinte foi realizar os tratamentos das células com 5-Aza-2'-desoxicitidina (Aza; Sigma Aldrich) e Tricostatina A (TSA; Sigma Aldrich), em triplicata biológica.

Para a formação dos grupos de tratamentos, as células satélites foram contadas, avaliadas quanto à viabilidade e plaqueadas à concentração de $3,5 \times 10^4$ células/mL. Foram feitos quatro grupos: 1) controle negativo - células mantidas em meio de proliferação sem tratamento ou indução da diferenciação; 2) controle positivo - células precursoras de mioblastos induzidas à diferenciação, sem outro tratamento; 3) grupo Aza - células tratadas diariamente com 10 μ M de Aza por 2 dias e induzidas à diferenciação; 4) grupo TSA - células tratadas com 50 nM de TSA por 24h e induzidas à diferenciação.

Estudo prévio mostrou que o 5-Aza-2'-desoxicitidina, nessas mesmas condições, mostrou-se capaz de aumentar a expressão de genes específicos musculares como *hSGT* e *FST*, dois inibidores da via de sinalização da miostatina (FAN et al., 2012). Essa via está envolvida no controle da diferenciação dos mioblastos, com a miostatina limitando a fusão dos mioblastos, e conseqüentemente o desenvolvimento muscular (FAN et al, 2012).

A tricostatina A, nas condições aqui utilizadas, tem sido aplicada na SCNT, melhorando o desenvolvimento pré-implantação de embriões suínos clonados tanto pelo aumento na produção de blastocitos quanto na qualidade desses (CONG et al, 2013).

Para cada replicata, foram feitas oito placas de 60 mm, quatro destinadas às análises morfológicas por May-Grümwald-Giemsa e quatro destinadas à extração de RNA e análise de expressão dos genes *CAPN1* e *CAST* por qPCR.

5.9. Extração de RNA

A água DEPC utilizada nos procedimentos de extração de RNA foi feita aplicando 1 mL de DEPC (Diethylpircarbonato, Sigma-Aldrich) em 1 L de água ultrapura (Purelab option-Q, Elga). A água foi brevemente agitada para solubilizar o DEPC e mantida *overnight*, para que o DEPC degradasse RNases contaminantes. Após esse período, a água foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos para esterilizar a água e inativar o DEPC, que pode reagir com adeninas de RNA. Além da água DEPC, utilizada para evitar a degradação do RNA por RNases, foi utilizado peróxido de hidrogênio 3% (Farmex) para limpar a bancada de trabalho e todos os objetos utilizados nas extrações (micropipetador, caixa de ponteiras etc).

Depois dos tratamentos, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.200 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas. Uma alíquota dessas células precipitadas foram submetidas ao teste com azul de trypan, para determinar se os tratamentos afetaram a viabilidade celular.

Depois da determinação da concentração celular, as demais células foram submetidas à extração de RNA. Todas as células recuperadas de cada placa destinada à análise de expressão foram ressuspensas em 250 µL de PBS, transferidas para microtubos de 1,5 mL, homogeneizadas e lisadas com 750 µL de Trizol[®] (Life Technologies). As células homogeneizadas foram mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio (J. T. Baker). Os tubos foram agitados por inversão por 15 segundos, incubados por mais 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados por 12.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Depois da centrifugação, a fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para um novo tubo, com o máximo de cuidado para evitar que a fase intermediária, que contém DNA e proteínas, fosse aspirada junto com a fase aquosa. Na fase aquosa foi acrescentado 1 µL de glicogênio (20 µg) (Roche), para auxiliar na precipitação de RNA e assim aumentar o rendimento da extração, e adicionado

0,5 mL de álcool isopropílico (J. T. Baker). Foi realizada inversão dos tubos por 10 vezes e manutenção por 10 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% em água DEPC. Depois de centrifugado por 7500 xg por 5 minutos, o RNA precipitado foi deixado secar, mas não completamente por aproximadamente 20 minutos. O RNA foi ressuscitado com 20 µL de água DEPC e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop[®] ND 1000, Thermo Scientific). A quantificação e a determinação da razão de absorvâncias para ácidos nucleicos de 260/280 nm, foi feita com a aplicação de 1 µL da amostra de RNA solubilizada em água DEPC. Foi tomada atenção na concentração em ng/µL, informação necessária para a síntese de cDNA, e na razão 260/280 nm para a identificação de contaminação por proteínas, pela qual uma amostra pura deve apresentar razão igual ou superior a 1,8. O RNA extraído foi estocado a -80 °C.

5.10. Tratamento do RNA com DNase

Para evitar que algum DNA contaminante interferisse nas análises de expressão por qPCR, o RNA foi tratado com o kit *DNase 1 Amplification Grade* (Sigma Aldrich). Para tanto, 8 µL de RNA, variando para as amostras de 928 a 4565,76 ng, foram transferidos para tubos de 0,2 mL aos quais foram acrescentados 1 µL de tampão de reação 10x e 1 µL de *DNase Amplification Grade* (1 U/µL). Os reagentes foram misturados gentilmente e mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 1 µL de solução de bloqueio (*Stop Solution*), que se liga aos íons de cálcio e magnésio e inativa a DNase 1. Após a aplicação da solução de bloqueio, as amostras foram mantidas por 10 minutos a 70 °C para desnaturar tanto a DNase 1 quanto para quebrar as estruturas secundárias que são produzidas no RNA. As amostras foram refrigeradas em gelo e estocadas a -80 °C.

5.11. Síntese de cDNA

Depois das amostras serem tratadas com DNase 1, o RNA foi convertido em cDNA por transcrição reversa com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Life Technologies, Invitrogen). A concentração final de RNA para fazer a transcrição reversa foi de 700 ng. Para tanto, o RNA foi misturado com 1 µL do tampão de hibridação (*annealing bufer*), 1 µL de oligo(dT) (2,5 µM) e o quanto se precisa (q.s.p) de água DEPC para alcançar um volume total de 6 µL. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e deixadas em gelo por até um minuto. Em seguida, foram acrescentados 10 µL do *First Strand Reaction Mix* (5 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de cada dNTP) e 2 µL do *SuperScript III/RNase OUT Enzyme Mix*, atingindo volume final de 20 µL. As amostras foram gentilmente misturadas e brevemente centrifugadas. Os tubos foram incubados a 50 °C por 50 minutos, depois a 85 °C por 5 minutos e refrigerados em gelo. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20 °C para posterior utilização.

5.12. Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real ou quantitativo

5.12.1 Desenho de primers

Os *primers* utilizados neste trabalho foram avaliados em duas ferramentas *on line*: OlygoAnalyser v. 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) e Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) para determinar suas propriedades físicas, como temperatura de dissociação ou *melting temperature* (TM), conteúdo GC, temperatura de hibridação, estabilidade 3' e *rating*.

A Tabela 1 mostra as sequências dos *primers* utilizados e os fragmentos produzidos. Na Tabela 2, estão descritas as características físicas de cada um dos *primers*.

Tabela 1 - Sequência dos *primers*, tamanhos dos fragmentos, localização no gene e no cromossomo e acesso no Ensembl dos genes *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, em bovinos.

Gene	Primers 5' – 3'	Localização	Frag.	Cromossomo
¹ CAST	F_5'- TGCTAATCGTAGAGACCCTGGACA -3' R_5'- ACAAGGTGCGGAAGTCCTAA -3'	Éxon 35. 3'- UTR	96 pb	BTA 7
² CAPN1	F_5'- TGACTTTGTGCTGCGTTTCT -3' R_5'- CCAGTTGTCTGAAGAGGGACTTGA -3'	Éxon 11 Éxon 13	143 pb	BTA 29
³ ACTB (β -actina)	F_5'- GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA -3' R_5'- TCGTCCCAGTTGGTGACGAT -3'	Éxon 3 -	78 pb	BTA 11
⁴ RPL-19	F_5'- ACCTGGATGAGGAGGATGAG -3' R_5'- GTACAGGCTGTGATACATGTGG -3'	Éxon 2 Éxon 2/3	93 pb	BTA 19
⁵ RPS-9	F_5'- GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA -3' R_5'- GGGCATTACCTTCGAACAG -3'	Éxon 3 Éxon 3/4	108 pb	BTA 18
⁶ RPL-27	F_5'- TTCTGCTGTAGTCCCAAGTG -3' R_5'- GCCGTCATCAATGTTCTTC -3'	Éxon 1 Éxon 2/3	128 pb	BTA 19

1. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG00000000874;r=7:98444979-98581253

2. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG00000010230;r=29:51505224-51505224;t=ENSBTAT00000011678

3. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG00000026199;r=25:39343633-39347044;t=ENSBTAT00000036888

4. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG0000002060;r=19:40332947-40334703;t=ENSBTAT0000002666

5. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG00000006487;r=18:63381416-63388728;t=ENSBTAT00000008502

6. http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?g=ENSBTAG00000017441;r=19:43669374-43671655;t=ENSBTAT00000023183

Tabela 2 - Características físicas (comprimento, temperatura de *melting*, conteúdo de GC, temperatura de hibridação, estabilidade 3' e *rating*) dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, em bovinos.

Genes	Comprimento	Tm °C	GC%	Temperatura de hibridação	Estabilidade 3'	Rating
CAST	24 pb_F	64.3	50.0	60,3 °C	7.9 Δ G	100
	20 pb_R	59.7	50.0	55,7 °C	7.5 Δ G	87
CAPN1	20 pb_F	59.6	45.0	55,6 °C	7.0 Δ G	100
	24 pb_R	64.1	50.0	60,1 °C	4.0 Δ G	91
ACTB (β -actina)	22 pb_F	63,4	54,5	59,4 °C	6,4 Δ G	88
	20 pb_R	63.9	55.0	59,4 °C	8.0 Δ G	76
RPL-19	19 pb_F	58.1	57.9	54,1 °C	6.6 Δ G	99
	22 pb_R	58.0	50.0	54,0 °C	8.2 Δ G	83
RPS-9	20 pb_F	60.1	55.0	51,0 °C	7.3 Δ G	91
	19 pb_R	58.2	52.6	54,2 °C	6.7 Δ G	79
RPL-27	20 pb_F	56.5	50.0	52,5 °C	6.7 Δ G	100
	19 pb_R	56.6	47.4	52,6 °C	6.7 Δ G	100

Fonte: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>

5.12.2. Eficiência de amplificação

Foram feitas as avaliações das eficiências de amplificação para os genes *CAPN1*, *RPL-27*, *ACTB* (β -actina) e *RPL-19* a partir dos resultados da diluição seriada de cDNA. As eficiências de amplificação para os demais genes foram determinadas a partir dos resultados da validação do gene referência (*RPS-9*) e da expressão gênica relativa (*CAST*).

Inicialmente, o cDNA foi diluído em cinco concentrações: 1:1, 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. Para a amplificação, foi feito um *mix* de reação de 20 μ L consistindo de 10 μ L de *Power SYBR Green PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) (concentração final de 1x), 0,4 μ L de cada *primer* (concentração final de 0,2 μ M), 0,3 μ L de cDNA (concentração final de 10 ng) e 9 μ L de água ultrapura estéril. O *mix* foi distribuído em *strips* com 8 microtubos de 0,2 mL (Applied Biosystems) aos quais foi aplicado o cDNA nas diferentes concentrações. As amostras foram analisadas em duplicatas.

No equipamento de PCR em tempo real 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), foi utilizada a opção *Quantitation- standart curve* no 7500 *Software v.2.0.5*, com o SYBR Green como fluoróforo. Na opção *Plate setup* foram atribuídas as diluições em cada tubo e o gene sob avaliação. Na opção *Run Method* foram configuradas as condições de ciclagem: um ciclo a 50 °C por 2 min, um ciclo de 95 °C por 10 min e 45 ciclos a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Ao término foi acrescentada a curva de dissociação (início em 60 °C e +0,1 °C de aumento até 95 °C). Na opção *Define and Set up Standarts* as configurações foram: 5 pontos de diluição, 2 replicatas, quantidade inicial de 1 e fator serial de 1:5. As amostras foram amplificadas e depois analisadas quanto à curva de dissociação e de amplificação. Só foram validadas as amostras que apresentavam diferenças C_q s entre as duplicatas de até 0,5 e que não apresentavam amplificação na amostra controle negativo (ou branco).

Depois das amplificações, os dados foram exportados para uma planilha de Excel 2003 utilizando a opção *export*. Nessa opção foram

selecionadas as opções *Results* e *Raw Data*. Na aba *Customize Export* foi escolhida a opção *Customize* e *Raw Data*. Na opção *Organize Data* foi selecionado *Across Columns*, e no *Format Selection*, a opção *Cycles*. A opção filtro 1 foi selecionada, e os dados das corridas foram exportados.

No arquivo do Excel, em uma nova aba foram colados todos os ciclos e todos os dados do primeiro filtro, sem deixar nenhum espaço. Os dados organizados dessa forma são importantes para que o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) possa fazer as análises de eficiência. No programa LinRegPCR foi utilizada a opção *Cq Threshold* e selecionado *Determine Baselines*. Depois de alguns segundos o programa mostrou as eficiências dos genes em uma planilha do Excel *output* com informações sobre a eficiência média do *primer* e o coeficiente de correlação (R^2).

5.12.3. Validação de genes de referência

Para a validação de um gene de referência foi avaliado a estabilidade de expressão dos genes β -actina, componente estrutural que constitui o citoesqueleto (MULLINS; HANSEN, 2013); *RPS-9*, *RPL-19* e *RPL-27*, todas codificantes de proteínas que constituem o ribossomo (YOSHIHAMA et al, 2002) (Tabela 1).

As opções de amplificação e de ciclagem utilizadas foram as mesmas do teste de eficiência, exceto que foi selecionada a opção *Quantitation- Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)*.

Para a validação do gene de maior estabilidade foi utilizado o *software on line* RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>). Esse programa integra os principais programas de validação de genes constitutivos – geNorm, Normfinder, BestKeeper e o método comparativo $\Delta\Delta Cq$, para comparar e classificar os genes de referência testados. Baseado na classificação de cada programa, ele atribui um peso a um gene individual e calcula a média

geométrica de seus pesos para a média final de classificação. O gene mais estável foi, então, adotado para o estudo da expressão gênica relativa.

5.12.4. Expressão gênica relativa

As configurações do equipamento de PCR em tempo real e as condições de amplificação foram as mesmas utilizadas nos testes de validação do gene de referência. Um total de 24 amostras foi analisado para cada gene: cDNAs de culturas celulares estabelecidas de três animais (M61, M88 e M107), nos quais foram feitos quatro tratamentos (controle negativo, controle positivo, Aza e TSA), em duplicata. Após as qPCRs, os Cqs das amostras foram transferidos para uma planilha do Excel para que o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) pudesse ser aplicado. Para tanto foi calculado a média e o desvio padrão dos Cqs.

A partir desses dados foi feita a normalização com o gene de referência, ΔCq , pela subtração das médias Cqs do gene alvo com as médias do gene constitutivo ($\Delta Cq = \text{média } Cq_{\text{alvo}} - \text{média } Cq_{\text{referência}}$). Depois de calculado o ΔCq , foi calculado o $\Delta\Delta Cq$, que consistiu da diferença entre os ΔCqs das amostras tratadas com os ΔCqs do calibrador, que neste caso são as amostras controle negativo ($\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{tratamentos}} - \Delta Cq_{\text{controle}}$).

E para o cálculo das diferenças de expressão foi utilizada a equação $2^{-\Delta\Delta Cq}$, assumindo eficiências de amplificação de 100% tanto para o gene alvo quanto para o gene de referência (base 2 da equação).

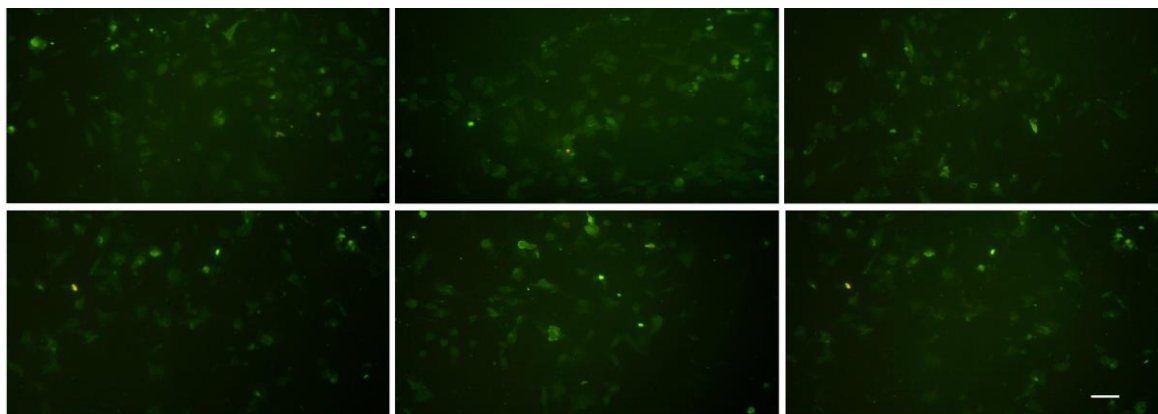
Para avaliar as diferenças significativas a um intervalo de confiança de 95% foi utilizado o *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*, no Relative Expression Software Tool (REST; PFAFFL et al, 2002). Além disso, também foi feita uma análise estatística pelo método não paramétrico *one-way ANOVA*. A comparação dos valores médios entre os tratamentos foi feita usando o teste comparativo múltiplo de Tukey. O valor p foi de 0,05 com CI de 95% (GraphPad Prism versão 5.0).

6. Resultados e discussão

6.1. *Imunofluorescência anti-desmina*

A Figura 1 mostra a imunofluorescência anti-desmina após o estabelecimento das culturas de células satélites musculares bovinas.

Figura 1 - Micrografia de fluorescência mostrando a presença da proteína desmina em todas as células. Em cada coluna estão as duplicatas de cada animal a partir do qual foram feitas as culturas primárias. Barra: 50 μ m. Magnitude de 10x.



Fonte: Elaborada pelo autor

A desmina é uma subunidade do filamento intermediário e exerce um papel fundamental na manutenção da arquitetura muscular (STEWART; RITTWEGGER, 2006). Ela é encontrada principalmente nas linhas em Z conectando os filamentos intermediários ao sarcolema e às organelas, como as mitocôndrias e o núcleo (PAULIN; LI, 2004).

A desmina tem sido usada como marcador em eventos fisiológicos, como a miogênese (CAPETANAKI et al, 2007) e em patologias como a miopatia esquelética (RAHIMOV; KUNKEL, 2013). No presente trabalho, a identificação da desmina foi utilizada para confirmar a presença de células satélites musculares nas culturas, que se mostraram positivas em todas as células confirmando a pureza das culturas obtidas. A desmina é uma das primeiras proteínas específicas do tecido muscular a aparecer durante a

miogênese. Sua concentração é baixa em mioblastos e células satélites em replicação e altas em miotubos diferenciados (PAULIN; LI, 2004). Esse fato pode explicar a fluorescência fraca vista nas células.

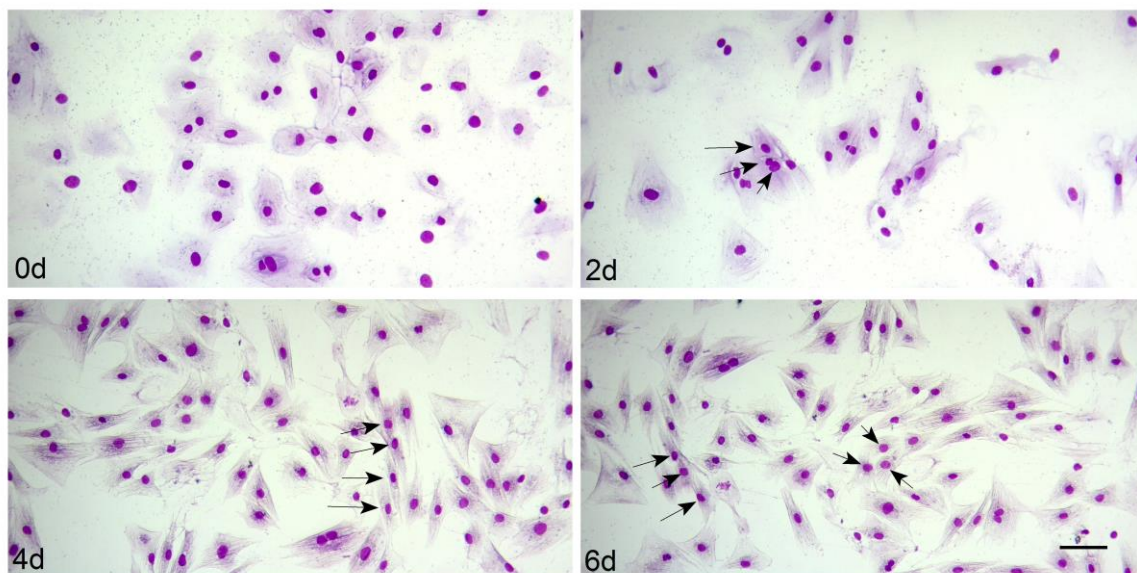
6.2. Determinação do tempo de diferenciação dos mioblastos em miotubos

Depois de confirmada a presença de células satélites, o próximo passo foi determinar quanto tempo foi necessário para que os mioblastos se diferenciassem em miotubos após a indução da diferenciação. A diferenciação foi desencadeada pela troca do meio de proliferação (15% de SFB) por meio de diferenciação (2% de SFB). A diferença entre esses dois meios dá-se na proporção de SFB utilizada e, conseqüentemente, à concentração diferencial de fatores de crescimento e hormônios presentes no soro.

A alta concentração de soro no meio de proliferação favorece a divisão celular dos mioblastos e o bloqueio de sua diferenciação. Essa situação ocorre pela presença de mitógenos como o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) e TGF β (*transforming growth factor β*) encontrados no soro. No entanto, sob condições de restrição de soro, como no caso do meio de diferenciação, os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) têm a propriedade de estimular a expressão de genes codificantes de fatores de transcrição específicos do músculo. Esses fatores de transcrição incluem o MyoD, Myf-5, Myog e MRF-4, conhecidos como MRFs (*myogenic regulatory factors*), que ativam genes envolvidos na diferenciação dos mioblastos em miotubos (YOSHIKO et al., 2002). Portanto, condições com baixa concentração de mitógenos, em decorrência de um meio pobre em soro, causam a saída dos mioblastos do ciclo celular, a expressão de IGF-I e II e a subsequente diferenciação (JIAO et al, 2013).

Nos resultados morfológicos, obtidos por coloração por May-Grünwald-Giemsa, foi possível observar a formação dos miotubos, com no mínimo três núcleos incorporados (Figura 2), nos tratamentos que foram submetidos à diferenciação.

Figura 2 - Análise da formação de miotubos em células bovinas *in vitro*. As células satélites musculares foram plaqueadas em placas de 35 mm a 1×10^4 células/mL e coradas por May-Grünwald-Giemsa. 0d, controle; 2d, 4d e 6d - dias após a indução de diferenciação. As setas indicam três ou mais núcleos incorporados nos miotubos. Barra: 50 μ m. Magnitude: 10x.

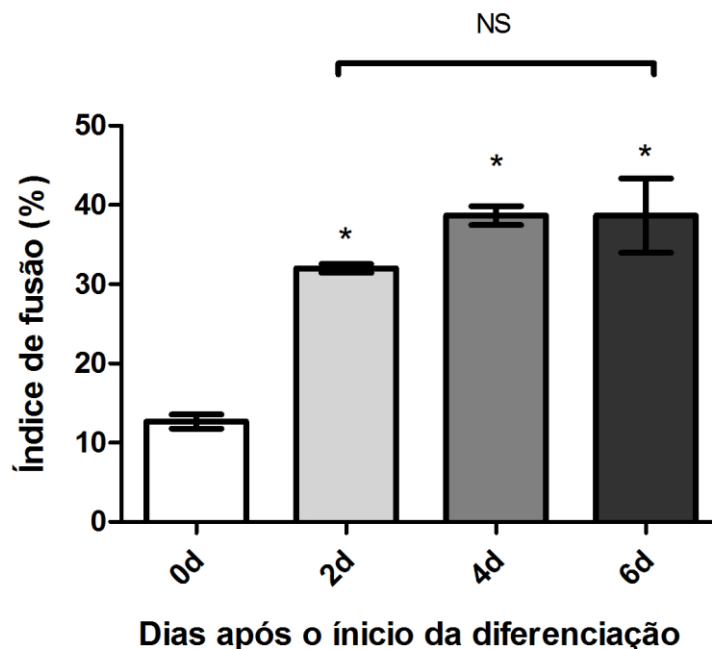


Fonte: Elaborada pelo autor

O índice de fusão foi quantificado pela contagem desses núcleos incorporados aos miotubos e pela contagem do número total de núcleos, e os valores obtidos foram aplicados na fórmula 5.4.

Depois das quantificações foi feita uma análise estatística não paramétrica por ANOVA *one way*, para determinar se havia alguma diferença entre as placas. Somente foi visto diferença estatisticamente significativa comparando os grupos 2d, 4d e 6d com o grupo controle 0d, dado que nenhuma diferença significativa foi vista entre os grupos induzidos a se diferenciarem. Assim, os grupos submetidos à diferenciação apresentaram índice de fusão superior ($p < 0,05$) ao grupo controle (0d). Apesar do índice de fusão ter sido crescente no decorrer dos dias, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos submetidos à diferenciação por 2, 4 ou 6 dias (Figura 3).

Figura 3 - Índice de fusão (média \pm erro padrão) de mioblastos bovinos após 0, 2, 4 e 6 dias da indução da diferenciação. NS: não significativo. * $p < 0,05$ em comparação a 0d.



Fonte: Elaborada pelo autor

A coloração por May-Grünwald-Giemsa é uma técnica que permite quantificar o processo de fusão dos mioblastos *in vitro*, mas é um método que só pode fornecer uma estimativa, devido à falta de precisão causada pela sobreposição das células e pela contagem manual (AUTHIER et al, 1999). No entanto, constitui uma boa ferramenta para quantificar a diferenciação morfológica.

Muitos estudos de culturas primárias de mioblastos em mamíferos, ou até mesmo de linhagens celulares, reportam o tempo necessário para que os mioblastos se fusionem e formem os miotubos. Burattini et al. (2004), analisando a imunofluorescência das proteínas actina e miosina em mioblastos C2C12 de camundongos, mostraram a formação de miotubos em 5 dias após a indução da diferenciação, comparado aos tempos de 3, 7 e 10 dias (BURATTINI et al, 2004). Veliça e Bunce (2011), em um ensaio utilizando o corante Janner-Giemsa de ação semelhante ao May-Grünwald-Giemsa,

mostraram brusco aumento na formação de miotubos entre os dias 1-3, enquanto que o índice de fusão declinou 5 a 7 dias após a indução da diferenciação (VELIÇA; BUNCE, 2011).

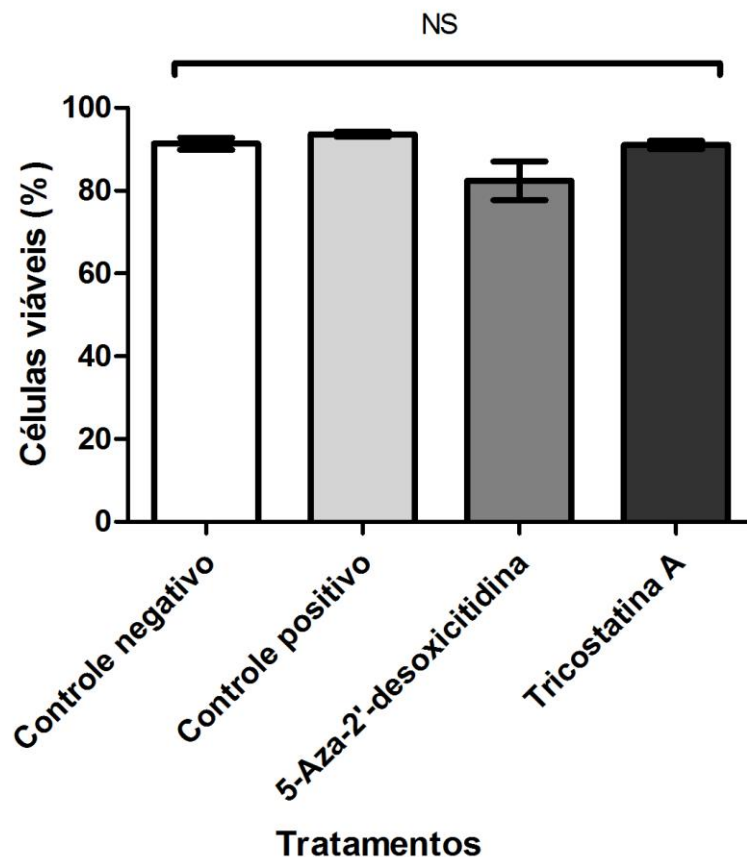
No presente estudo, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos induzidos à diferenciação, foi possível observar que os mioblastos diferenciados por 4 dias apresentaram um índice de fusão numericamente maior que por 2 dias. Além disso, apesar de valores próximos de índice de fusão, a diferenciação por 4 dias resultou em erro padrão menor que 6 dias ($39\pm 0,012$ vs $39\pm 0,047$, respectivamente). Portanto, foi adotado o tempo de diferenciação de 4 dias para os experimentos posteriores.

6.3. Viabilidade dos mioblastos após os tratamentos

Com o objetivo de analisar a viabilidade dos mioblastos e verificar qualquer evidência de citotoxicidade após os tratamentos de diferenciação e com modificadores epigenéticos Aza e TSA, foi feito o teste de exclusão com o azul de trypan.

O tratamento de diferenciação (controle positivo), assim como os tratamentos com Aza e TSA não causaram citotoxicidade e, portanto, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) na viabilidade dos mioblastos submetidos a eles (Figura 4).

Figura 4 - Viabilidade (média \pm erro padrão) de mioblastos bovinos submetidos ou não à diferenciação e aos tratamentos com Aza e TSA. NS: não significativo.



Fonte: Elaborada pelo autor

A análise da viabilidade após o tratamento com fármacos que promovem modificações no controle epigenético da expressão gênica é um passo importante antes de ser feito qualquer experimento. O 5-Aza-2'-desoxicitidina tem sido considerado como um potente agente desmetilante do DNA. No entanto, a sua função é mais evidente a baixas concentrações, caso contrário, a droga exibe grande citotoxicidade interferindo na síntese de DNA (YANG et al, 2010). Esse agente é extremamente potente em inibir a metilação do DNA a concentrações micromolares, no entanto, sua vida média curta em soluções aquosas prejudica sua capacidade de ação (YOO; JONES, 2006).

Jüttermann et al. (1994), com objetivo de medir o efeito citotóxico da droga, trataram células tronco embrionárias de murinos com diferentes concentrações de 5-aza-2'-desoxicitidina (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 2,0, 3,0, 10,0 e 20,0 μM) por 24h de cultivo. Dentre os resultados, eles demonstraram que o número de células tronco sobreviventes declinou rapidamente com o aumento da concentração de Aza, com 50% de sobrevivência à concentração de 0,05 μM (JÜTTERMANN et al, 1994).

No atual estudo, apesar de não ter sido feita dosagem seriada do Aza, foi possível observar que, à concentração de 10 μM e por 48h de cultivo, o Aza não afetou a viabilidade dos mioblastos (média de 82%; Figura 4).

A Tricostatina A tem sido efetiva em causar mudanças epigenéticas através da inibição das histonas desacetilases. Contudo, a principal dúvida a respeito da modulação transcricional causada por inibidores de histona desacetilases é a citotoxicidade esperada desses componentes. Quando usado à concentração nanomolar, o TSA exerce o seu efeito esperado, isso é, promove acúmulo de histonas acetiladas além de inibir o ciclo celular nas fases G1 e G2 nas células de mamíferos. Em grandes concentrações, pode levar à apoptose (NERVI et al, 2001). Schnichels et al. (2012) estudaram o efeito em células do glânglio retinal humano com diferentes concentrações de TSA: 40, 150, 500 e 2000 nM por 24 e 48h. Após esses períodos de tempo, a viabilidade foi medida pela conversão do componente tetrazolium (MTS) em sais de formazam, em células ativas metabolicamente. Em seus resultados, houve redução na viabilidade celular dependente de tempo e de concentração, com a concentração de 40 nM causando uma redução de 82% e 72% nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente (SCHNICHEL et al, 2012).

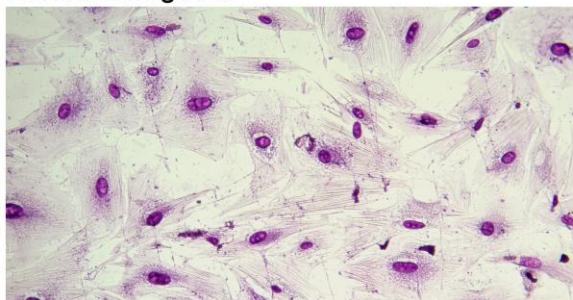
Semelhantemente ao Aza, no presente experimento, foi possível observar que a TSA à concentração de 50 nM por 24 h não afetou a viabilidade dos mioblastos (média de 91%, Figura 4).

6.4. Morfologia dos mioblastos após os tratamentos

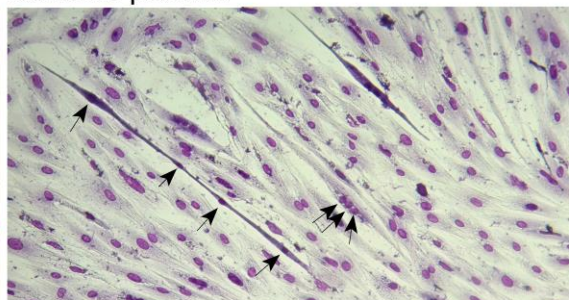
O índice de fusão dos mioblastos em miotubos foi avaliado em culturas não submetidas à diferenciação (controle negativo), submetidas à diferenciação (controle positivo) e tratadas previamente com Aza ou TSA (Figura 5)

Figura 5 - Formação de miotubos em mioblastos bovinos não submetidos à diferenciação (controle negativo), submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) após tratamento com 10 μM de 5-aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h. Os mioblastos foram plaqueados em placas de 60 mm à densidade de $3,5 \times 10^4$ células/mL e corados por May-Grünwald-Giemsa. As setas indicam três ou mais núcleos incorporados nos miotubos. Barra: 50 μm . Magnitude: 10x.

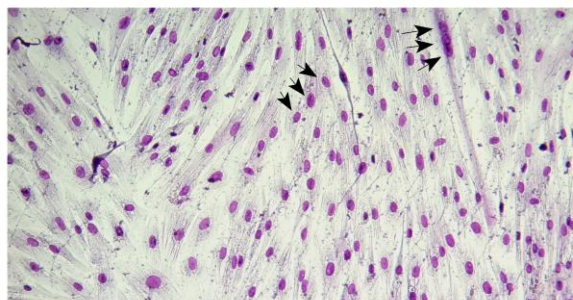
Controle negativo



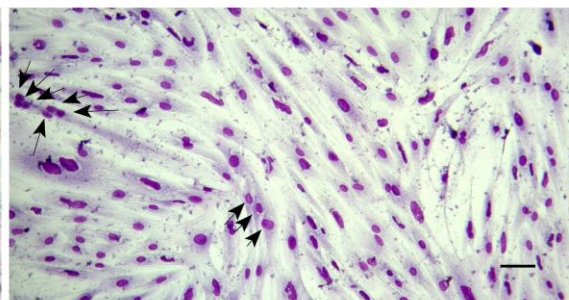
Controle positivo



5-aza-2'-desoxicitidina



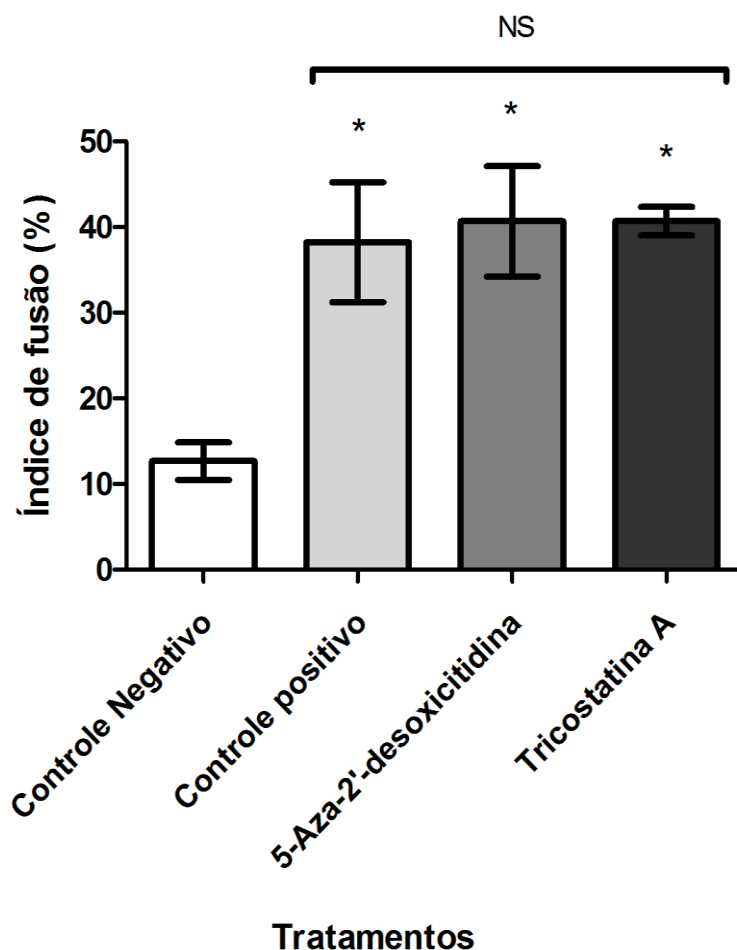
Tricostatina A



Fonte: Elaborada pelo autor

O aspecto morfológico (Figura 5) e os índices de fusão (Figura 6) foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os tratamentos submetidos à diferenciação (controle positivo, Aza e TSA), mas diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle não submetido à diferenciação (controle negativo).

Figura 6 - Índice de fusão (média \pm erro padrão) dos mioblastos bovinos não submetidos à diferenciação (controle negativo), submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h. NS: não significativo. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.



Fonte: Elaborada pelo autor

As diferenças observadas entre o controle negativo e o positivo devem-se, provavelmente, aos mesmos fatores citados anteriormente: a baixa concentração de soro no meio favorece a expressão de IGF e a consequente diferenciação, considerado que em um meio rico em soro, com altas concentrações de mitógenos, favorece a proliferação e impede a diferenciação (YOSHIKO et al, 2002; JIAO et al, 2013).

Quanto aos tratamentos Aza e TSA, a diferença com o controle negativo também pode ser devida à relação observada entre o grupo não diferenciado e diferenciado.

Entretanto, a ausência de efeito desses modificadores epigenéticos em relação ao tratamento controle positivo é mais controversa, pois já que ambos os agentes promovem ativação gênica (por remoção de marcas repressivas de metilação de DNA e manutenção de marcas ativas de acetilação de histonas), esperava-se algum efeito positivo, pelo aumento da expressão de genes que promovem diferenciação, ou negativo, pelo aumento da expressão de genes que conferem pluripotência. Entretanto, os efeitos epigenéticos promovidos por Aza e TSA podem ter sido muito brandos ou desnecessários nessa etapa do desenvolvimento e, dessa maneira, não resultaram em modificações fenotípicas nos mioblastos em diferenciação. Outra hipótese é de que os tratamentos tenham promovido tanto aumento nos genes de diferenciação quanto dos genes de pluripotência, que acabaram equilibrando-se e não resultaram em variação fenotípica celular.

Já foi reportado que a metilação de DNA afeta o processo de diferenciação de mioblastos. Em células satélites quiescentes e em proliferação, os fatores de transcrição envolvidos na miogênese não são expressos, pois as ilhas CpGs em regiões reguladoras distais nos genes MyoD e Myog encontram-se metiladas (LUCARELLI et al, 2001; PALACIOS; PURI, 2006). Com a indução da diferenciação, essas ilhas CpGs vão sendo desmetiladas, e o resultado é a saída da célula do ciclo celular e a expressão de genes envolvidos na miogênese, causados pela ação desses fatores de transcrição (PERDIGUERO et al, 2009).

Portanto, o processo de diferenciação por si só já promove a ativação gênica e parece que a utilização de um agente que promove desmetilação adicional não é necessária para aumentar a diferenciação de mioblastos.

A acetilação e a desacetilação de histonas em regiões promotoras de genes podem favorecer a ativação ou a repressão gênica, respectivamente

(LEGUBE; TROUCHE, 2003). Entretanto, de maneira semelhante à observada quanto à metilação do DNA, o aumento da acetilação de histonas não afetou o processo de diferenciação de mioblastos bovinos nas condições experimentais aqui reportadas.

6.5. Expressão gênica

6.5.1. Extração de RNA

A Tabela 3 mostra o resultado das quantificações e das razões de absorvância 260/280 nm do RNA extraído das amostras de mioblastos bovinos. Observa-se que o RNA foi obtido em concentração e qualidade adequados para a realização dos procedimentos de expressão gênica.

Tabela 3 - Resultado das quantificações e das razões de absorvância 260/280 nm do RNA extraído de mioblastos bovinos.

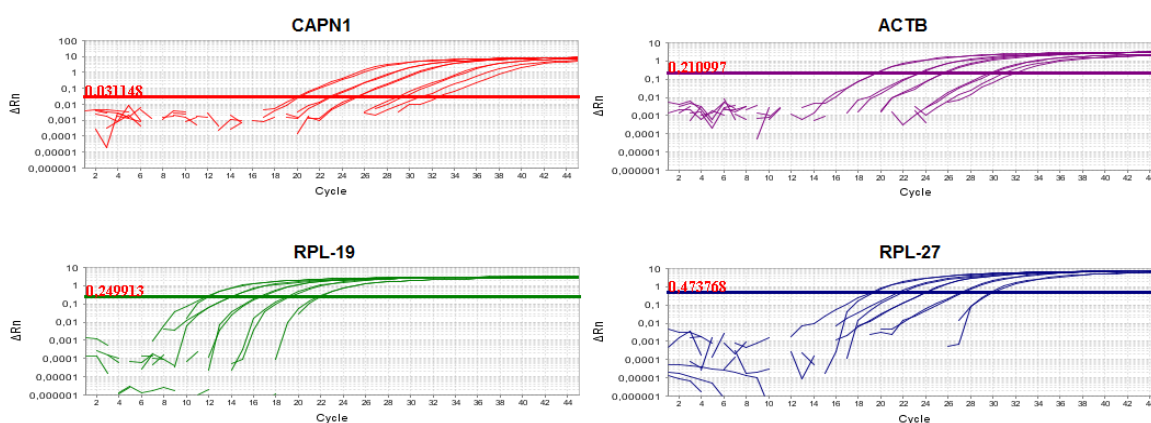
Amostras	ng/uL	260/280
M61_ Controle negativo	116	1,6
M61_ Controle positivo	438,4	1,82
M61_AZA	252,77	1,85
M61_TSA	331,97	1,83
M88_ Controle negativo	316,77	1,8
M88_ Controle positivo	289,75	1,81
M88_AZA	570,72	1,67
M88_TSA	400,06	1,93
M107_ Controle negativo	329,8	1,95
M107_ Controle positivo	259,11	1,91
M107_AZA	234,58	1,94
M107_TSA	238,88	1,98

Fonte: Elaborada pelo autor

6.5.2. Eficiência de amplificação

A Tabela 4 mostra os resultados das eficiências de amplificação de todos os genes avaliados neste trabalho, incluindo aqueles usados para a validação do gene de referência. A Figura 7 mostra a curva de amplificação da diluição seriada dos genes *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19* e *RPL-27*.

Figura 7. Amplificação dos genes *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19* e *RPL-27* em cinco diluições seriadas de cDNAs sintetizadas a partir de RNA extraído de mioblastos bovinos não induzidos à diferenciação e sem nenhum tratamento prévio.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 - Eficiência e regressão linear (R^2) dos *primers* utilizados para amplificação dos genes bovinos *CAST*, *CAPN1*, *ACTB*, *RPL-19*, *RPS-9* e *RPL-27*, nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	Eficiência ^a	Eficiência média ^a	R^{2a}	R^2 médio ^a	Eficiência ^b	R^{2b}
<i>CAST</i>	1,886-2,205	1,803	0,993-1,000	0,994	-	-
<i>CAPN1</i>	1,805-1,846	1,821	0,999-1,000	1,000	83,7%	0,963
<i>ACTB</i>	1,860-2,112	1,955	0,991-1,000	0,996	70,1%	0,981
<i>RPL-19</i>	1,826-2,103	1,857	0,996-1,000	0,997	90%	0,997
<i>RPS-9</i>	1,925-2,194	2,098	0,995-1,000	1,000	-	-
<i>RPL-27</i>	1,805-1,840	1,816	0,999-1,000	1,000	85,3%	0,987

^a Eficiência pelo programa LinRegPCR.

^b Eficiência da curva de diluição pelo programa 7500 Software v2.0.5 (Applied Biosystems).

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados das análises feitas pelo LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) mostraram que todos os genes apresentaram valores médios de eficiência de amplificação entre os esperados, de 1,8 a 2,0. Esse valor é importante, porque as eficiências dos *primers* devem ser o mais próximo possível de 2,0 (eficiência de 100%), que é o valor assumido pelo método comparativo $\Delta\Delta Cq$ (RAMAKERS et al, 2003). Os coeficientes de correlação R^2 apresentaram valores entre 0,994 e 1,0, enquanto valores de R^2 menores ou iguais a 0,985 também podem comprometer a eficiência de amplificação (BORGES et al., 2012).

6.5.3. Validação do gene de referência

Embora a qPCR seja usada amplamente, ainda existem inúmeros problemas associados ao seu uso. Isso inclui variabilidade nas diferentes etapas da técnica, como na extração do RNA, na síntese de cDNA e na eficiência do qPCR. Para corrigir essas variações é necessário um processo de normalização por meio do uso de genes que apresentem expressão constitutiva (BUSTIN; NOLAN, 2004). No entanto, já foi relatado que muitos genes constitutivos, como o *GAPDH* ou *18S*, apresentam variação de expressão (HUGGETT et al, 2005). Por esse motivo, é importante testar dois ou mais genes para identificar aquele que se apresente mais estável e, assim, usá-lo para a normalização dos dados de expressão (ROBINSON et al, 2006).

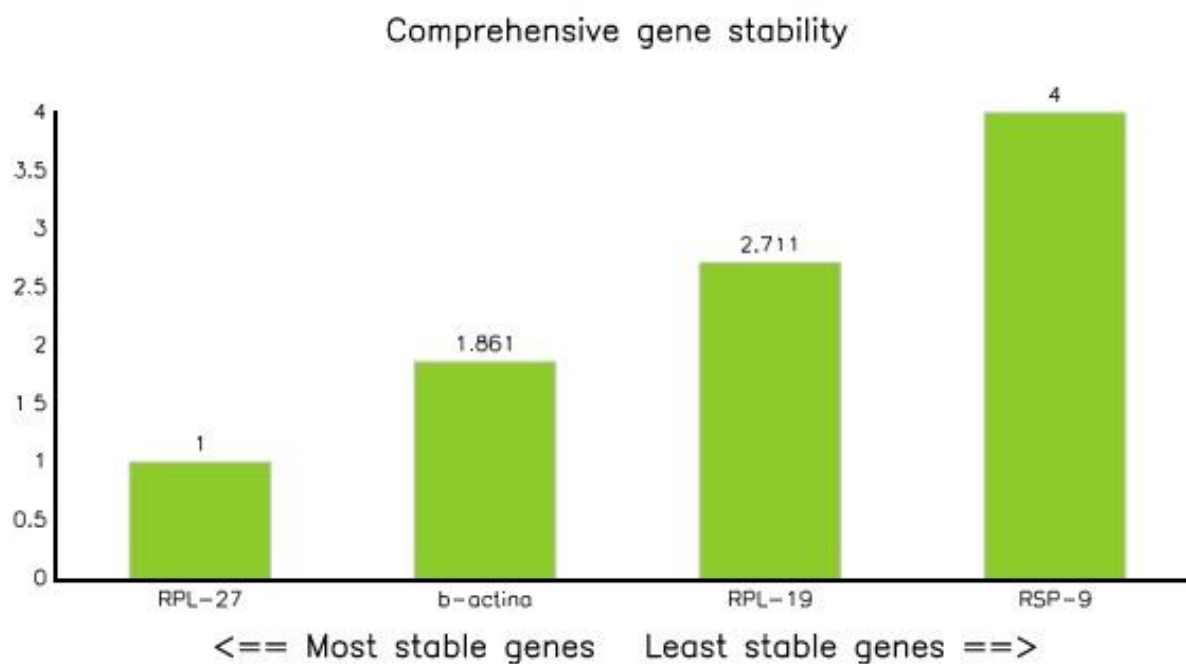
A Tabela 5 mostra a ordem de classificação dos genes de referência β -actina, *RPS-9*, *RPL-19* e *RPL-27* pelo programa RefFinder. A ordem, desde o gene mais estável para o menos estável é apresentado para cada programa: Bestkeeper, Normfinder, Genorm e DeltaCt. A Figura 8 mostra o gráfico da estabilidade gênica abrangendo os quatro métodos.

Tabela 5 - Classificação dos genes de referência nos métodos Delta Ct, Bestkeeper, Normfinder e Genorm.

Ranking Order (Better--Good--Average)				
Method	1	2	3	4
Delta CT	<i>RPL-27</i>	<i>β-actina</i>	<i>RPL-19</i>	<i>RPS-9</i>
BestKeeper	<i>RPL-27</i>	<i>RPL-19</i>	<i>β-actina</i>	<i>RPS-9</i>
Normfinder	<i>RPL-27</i>	<i>β-actina</i>	<i>RPL-19</i>	<i>RPS-9</i>
Genorm	<i>β-actina RPL-27</i>	-	<i>RPL-19</i>	<i>RPS-9</i>
Recommended comprehensive ranking	<i>RPL-27</i>	<i>β-actina</i>	<i>RPL-19</i>	<i>RPS-9</i>

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 8- Classificação dos genes de referência mais estáveis pelos métodos Delta Ct, Bestkeeper, Genorm e Normfinder.



Fonte: Elaborada pelo autor

Após a análise com a ferramenta RefFinder, o gene *RPL-27* foi escolhido como o gene de referência mais estável e o mais indicado para a normalização dos dados de expressão das amostras de mioblastos controle e tratadas.

6.5.4. Expressão gênica relativa

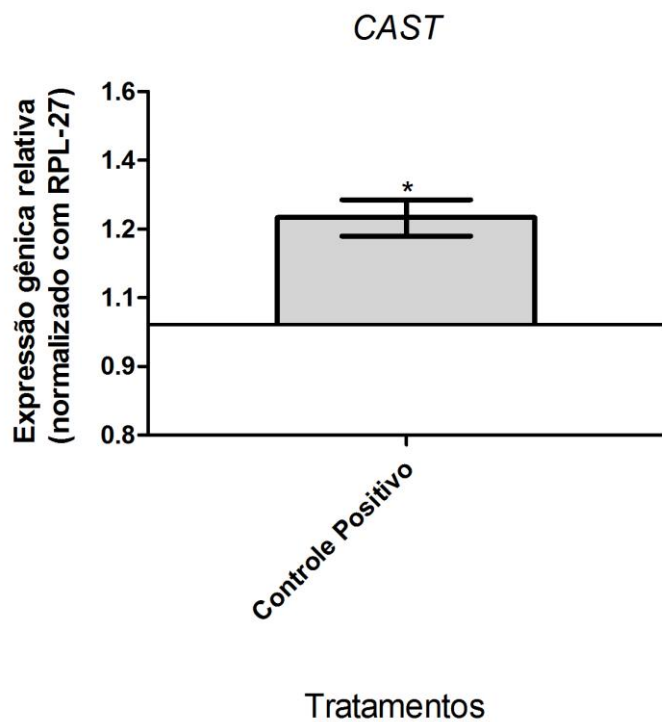
Na fase embrionária, o desenvolvimento muscular consiste no comprometimento das células tronco mesênquimais e sua diferenciação em mioblastos, que se fusionam formando os miotubos e determinando o número de fibras musculares no animal. Na fase adulta esse processo ainda ocorre, através da diferenciação das células satélites encontradas entre a lâmina basal e o sarcolema após algum tipo de lesão, no entanto, sem um incremento no número das fibras (DU et al, 2010). Nesse processo muitos genes estão envolvidos e muitos deles são de interesse comercial, pois influenciam a maciez da carne. Dentre eles estão os genes *CAST* e *CAPN1*, que participam não só do processo de desenvolvimento muscular, mas também na degradação dos componentes musculares no período posmorte.

Um modo de reproduzir o processo de desenvolvimento muscular e analisar o controle epigenético na expressão desses genes pode ser através de ensaios *in vitro*, nos quais as células satélites são induzidas a se diferenciarem formando os miotubos.

Portanto, neste trabalho os valores Cqs das amplificações por PCR em tempo real foram obtidos para o gene de referência *RPL-27* e para os genes alvo *CAST* e *CAPN1*. Foi calculada a expressão em *fold change* e realizada a avaliação das diferenças significativa a 5% por meio da utilização do programa REST (PFAFFL et al, 2002).

A Figura 9 apresenta os resultados da expressão do gene *CAST* nos grupos controle negativo e positivo.

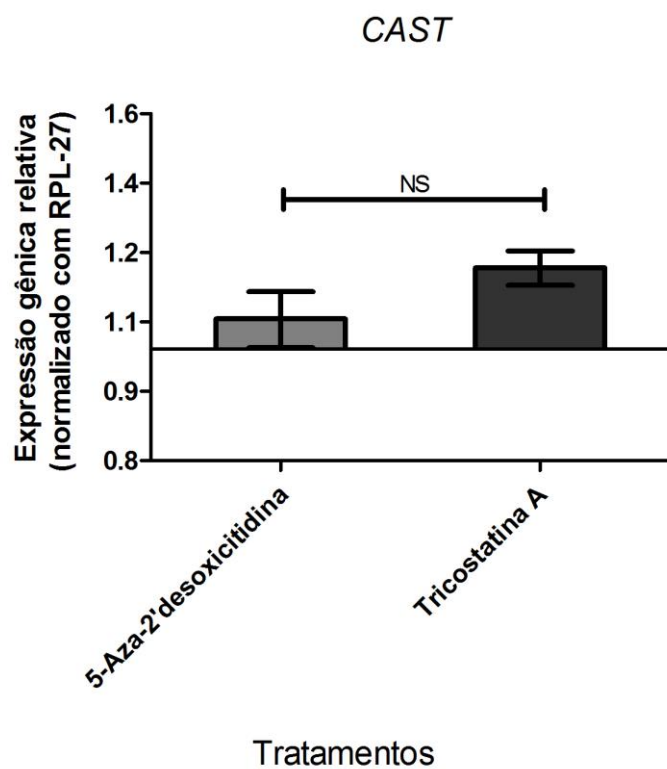
Figura 9 - Expressão do gene *CAST* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias sem nenhum tratamento prévio (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem a indução da diferenciação como calibrador. * Diferença significativa entre o controle negativo e positivo.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 10 mostra os resultados da expressão do gene *CAST* nos grupos controle positivo, 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.

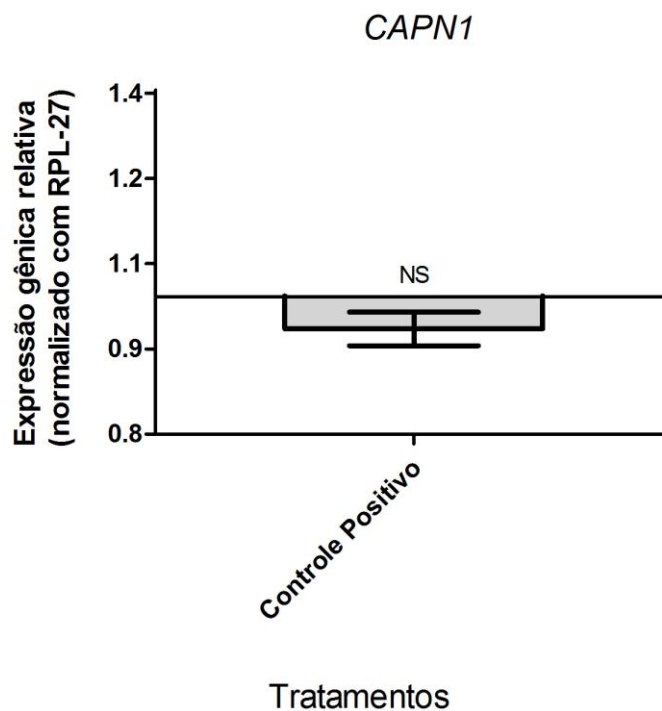
Figura 10 - Expressão do gene *CAST* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. NS: diferenças não-significativas entre os grupos controle positivo, 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 11 apresenta os resultados da expressão do gene *CAPN1* nos grupos controle negativo e positivo.

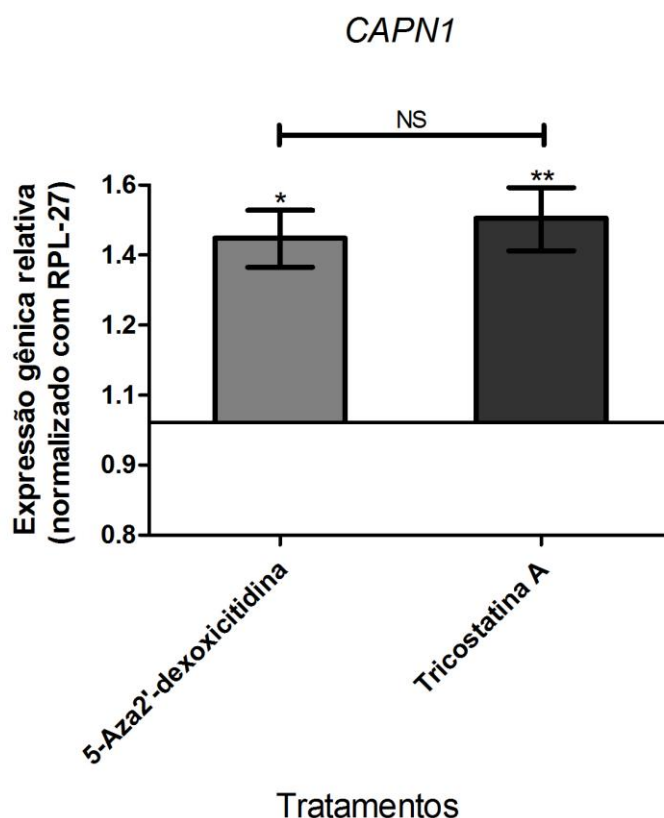
Figura 11 - Expressão do gene *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias sem nenhum tratamento prévio (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem a indução da diferenciação como calibrador. NS: diferença não significativa entre o controle negativo e positivo.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 12 mostra os resultados da expressão do gene *CAPN1* nos grupos controle positivo, 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.

Figura 12 - Expressão do gene *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizado com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. * Diferença significativa entre o grupo 5-Aza-2'-desoxicitidina e o controle positivo; ** diferença significativa entre o grupo Tricostatina A e o controle positivo; e NS: diferença não significativa entre 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A.



Fonte: Elaborada pelo autor

Com a indução da diferenciação dos mioblastos *in vitro* era esperado que ocorresse alguma alteração na expressão gênica. No caso do gene *CAST* foi observado que sua expressão aumentou ($p < 0,05$) no grupo controle positivo, induzido à diferenciação, em comparação ao controle negativo (Figura 9), evidenciando o papel da atividade proteolítica na fusão dos mioblastos em miotubos (DEDIEU et al, 2002). Entretanto, para o gene *CAPN1*

não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos controle negativo e positivo (Figura 11). Esses resultados corroboram as evidências de que os níveis de mRNA da μ -calpaína permanecem constantes em todo o processo de diferenciação dos mioblastos de ratos L8 (BARNOY et al, 2000).

Em relação aos outros grupos, não foi observada diferença de expressão ($p > 0,05$) para o gene *CAST* após os tratamentos com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A em relação ao grupo controle positivo (Figura 10). Uma explicação para essa falta de diferença na expressão pode ser pelo fato que esses modificadores epigenéticos, nessas concentrações e condições experimentais, poderiam ter induzidos alterações brandas que não afetaram a expressão desse gene.

Para a Tricostatina A, a sua ação a 50 nM por 24 horas pode não ter contribuído muito em aumentar a expressão do gene *CAST* além daquela vista no controle positivo.

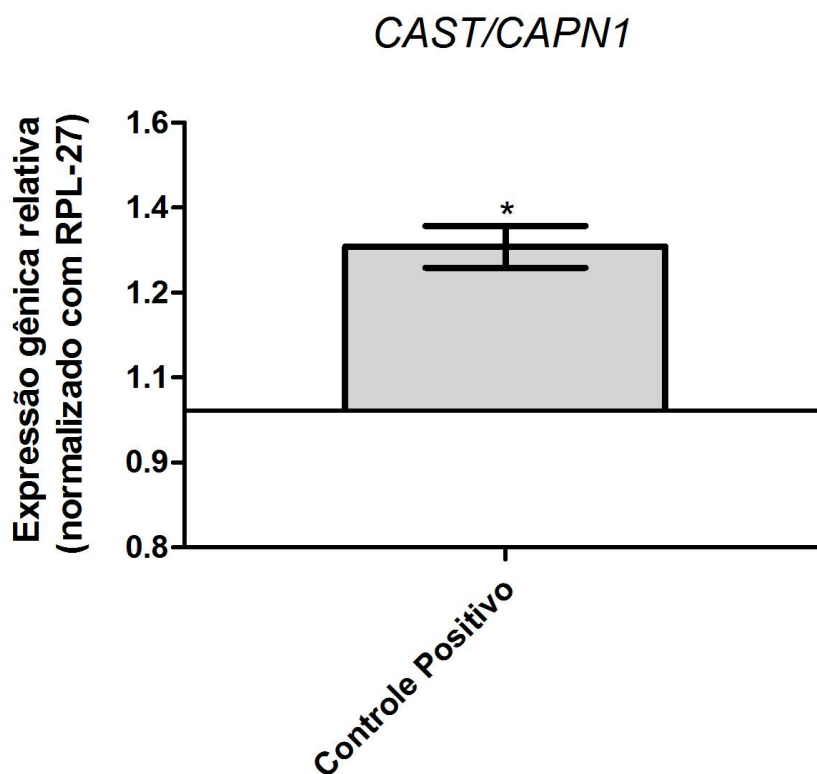
Quanto a 5-Aza-2'-desoxicitidina, uma explicação mais provável é o fato da expressão desse gene não ser controlado por metilação do DNA – a isoforma III, encontrada em todos os tecidos, apresenta uma ilha CpG na região promotora do éxon 1u, no qual se liga o fator de transcrição Sp1 (RAYNAUD et al, 2005). Essas ilhas são normalmente desmetiladas e normalmente encontradas em genes de expressão constitutiva (*housekeeping*) (PHILIPSEN; SUSKE, 1999). O gene *CAST* também apresenta ilha CpG em região próxima aos éxons 1xa e 1xb. Entretanto, essa região encontra-se hipometilada em músculo fetal e adulto e em fígado fetal, de maneira que a expressão diferencial do gene *CAST* entre tecidos e estádios do desenvolvimento em bovinos parece não ser regulada por metilação do DNA (ROCHA, 2013). Portanto, a regulação desse gene por metilação do DNA pode ser descartada, pela falta de correspondência entre o estado de metilação na região promotora com sua expressão.

No caso do gene *CAPN1*, os tratamentos com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A causaram aumento ($p < 0,05$) na expressão em comparação ao controle positivo (Figura 12). Assim, é provável que o gene

CAPN1 seja regulado tanto por metilação do DNA quanto por acetilação de histonas, já que a promoção de cada uma dessas modificações isoladamente resultou em níveis similares de expressão gênica.

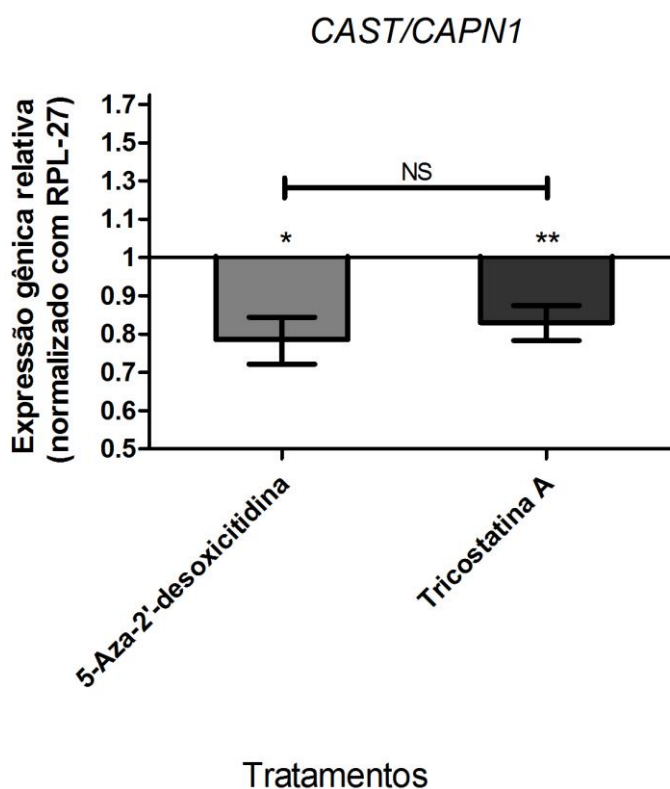
Depois de analisar a expressão dos componentes do sistema calpaína separados, o próximo objetivo foi verificar se houve alguma mudança na razão da expressão *CAST/CAPN1* nos diferentes tratamentos. A Figura 13 mostra essa razão comparando o grupo controle negativo ao positivo e, a Figura 14 mostra essa razão comparando os grupos controle positivo, Aza e TSA.

Figura 13- Razão de expressão entre os genes *CAST* e *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizados com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias (controle positivo) usando o grupo controle negativo sem indução de diferenciação como calibrador. * Diferença significativa na razão de expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* entre o grupo controle negativo e o positivo.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 14 - Razão de expressão entre os genes *CAST* e *CAPN1* (média \pm erro padrão), normalizados com o gene de referência *RPL-27*, em mioblastos bovinos submetidos à diferenciação por 4 dias após tratamento com 10 μ M de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 48 h ou 50 nM de Tricostatina A por 24 h, usando o grupo controle positivo (submetido à diferenciação por 4 dias sem tratamento prévio) como calibrador. * Diferença significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre o grupo 5-Aza-2'-desoxicitidina e o controle positivo; ** diferença significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre o grupo Tricostatina A e o controle positivo; e NS: diferença não significativa na razão de expressão *CAST/CAPN1* entre os grupos tratados com 5-Aza-2'-desoxicitidina e Tricostatina A não apresentou diferença significativa.



Fonte: Elaborada pelo autor

Foram observadas diferenças entre as razões de expressão dos genes *CAST* e *CAPN1*. Comparando o grupo controle negativo com o positivo houve aumento ($p < 0,05$) da razão *CAST/CAPN1* (Figura 13). Esse aumento da

proporção de *CAST* em relação à *CAPN1* resulta em maior degradação proteolítica que pode ser refletida no maior índice de fusão de mioblastos em miotubos observado após a diferenciação (Figura 6).

Entre os grupos tratados também houve diferença ($p < 0,05$), com o 5-Aza-2'-desoxicitidina e a Tricostatina A causando redução na razão *CAST/CAPN1* comparados com o controle positivo (Figura 14). Entretanto, essa menor proporção *CAST/CAPN1* não refletiu em alteração nos índices de fusão em miotubos entre os grupos (Figura 6). Isso sugere que deve haver uma amplitude de valores em que a razão *CAST/CAPN1* promove efeito proteolítico, e consequente diferenciação, ou não. Isso vai depender para qual direção a mudança na proporção irá seguir, a partir daquele ponto de equilíbrio encontrado em mioblastos não diferenciados.

Outros trabalhos também mostraram a razão na expressão dos genes *CAST* e *CAPN1* em diferentes contextos. Muroya e colaboradores (2012) procuraram investigar a expressão da μ -calpaína, m-calpaína, calpaína-3 (específica ao músculo), a subunidade menor da calpaína e das isoformas I, II e III da calpastatina em diferentes tecidos musculares de vacas da raça Holstein. Em seus resultados, eles mostraram que a razão nos níveis de mRNA da μ -calpaína/calpastatina I no músculo lingual mostrou valores menores que no músculo psoas maior e longissimus toracis. Esses resultados sugerem que o tipo de músculo rico na isoforma de MHC do tipo lento possivelmente correlaciona com a baixa atividade do sistema calpaína devido à baixa razão calpaína/calpastatina (MUROYA et al, 2012). As pesquisas de Barnoy e colegas (2005) mostraram que com a alta expressão da calpastatina, depois dos mioblastos L8 serem transfectados com o gene *CAST* humano, ocorreu uma inibição da fusão dos mioblastos em miotubos comparado com as culturas controle, nas quais a fusão ocorreu normalmente após a indução da diferenciação. Eles declararam que essa inibição da fusão, nesses mioblastos transfectados foi devido à mudança na razão calpastatina e calpaína (BARNOY et al, 2005).

7. Conclusão

Os resultados deste trabalho mostram que o processo de diferenciação aumenta os índices de fusão de mioblastos bovinos em miotubos; que a indução da diferenciação e o tratamento com agentes que induzem modificações epigenéticas não afetam a viabilidade celular; que os agentes que induzem modificações epigenéticas não aumentam os índices de fusão promovidos pela diferenciação; e que a indução da diferenciação e os tratamentos com os agentes que induzem modificações epigenéticas afetam a expressão dos genes *CAST* e *CAPN1*.

8. Referências bibliográficas

AHERNE, W. G. et al. Assays for the identification and evaluation of histone acetyltransferase inhibitors. **Methods.**, v. 26, p. 245-253, 2002.

AUTHIER, F. J. et al. Differential expression of the IL-1 system components during in vitro myogenesis: implication of IL-1 beta in induction of myogenic cell apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 1012-1021, 1999.

BALCERZAK, D. et al. Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 75, p. 247-253, 1998.

BARNOY, S. et al. Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. **Biochem. J.**, v. 351, p. 413-420, 2000.

BARNOY, S. et al. Overexpression of calpastatina inhibits L8 myoblast fusion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 332, p. 697-701, 2005.

BOEHM, M. L. et al. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 2415-2434, 1998.

BOGDANOVIC, O. VEENSTRA, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromos.**, v. 11, p. 549-565, 2009.

BORGES, A. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stress. **Plant Cell Rep.**, v. 31, p. 827-838, 2012.

BURATTINI, S. et al. C2C12 murine myoblast as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. **Eur. J. Histochem.**, v. 48, p. 223-233, 2004.

BUSTIN, S. A. NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **J. Biomol. Tech.**, v. 15, p. 155-166, 2004.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**, v. 55, p. 611-622, 2009.

BYCROFT, M. Recognition of non-methyl histone marks. **Curr. Opin. Struct. Bio.**, v. 21, p. 1-6, 2011.

CAPETANAKI, Y. et al. Muscles intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. **Exp. Cell. Res.**, v. 13, p. 2063-2076, 2007.

COCOZZA, S. et al. CpG islands under methylation in human genomic regions under selective pressure. **Plosone.**, v. 6, p. 1-9, 2011.

CONG, P. et al. Effects of trichostatin A on histone acetylation and methylation characteristics in early embryos after somatic cell nuclear transfer. **Anim. Sci. J.**, v. 84, p. 639-649, 2013.

DEATON, A. M. BIRD, A. CpG island and the regulation of transcription. **Genes and Develop.**, v. 25, p. 1010-1022, 2011.

DEDIEU, S. et al. Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. **Biol. Cell.**, v. 94, p. 54-76, 2002.

DU, M. et al. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animal. **J. Anim. Sci.**, v. 88, p. 51-60, 2010.

FAN, H. et al. Sulforaphane causes a major epigenetic repression of myostatin in porcine satellite cells. **Epigenetics.**, v. 12, p. 1379-1390, 2012.

FINGERMAN, I. M. et al. Epigenomics: What's new for 2013. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 221-225, 2012.

GEESINK, G. H. KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by m μ -calpain under postmortem conditions. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 2685-2692, 1999.

GILLESPIE, J. et al. Histone deacetylase are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel HDAC3-selective inhibitor reduces IL-6 production by PBMC of RA patients. **Arthr. Rheum.**, v. 64, p. 1-15, 2011.

GOLL, D. E. et al. The calpain system. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 731-801, 2003.

GOLL, M. G. BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 481-514, 2005.

GUO, J. U. et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. **Cell.**, v. 145, p. 423-434, 2011.

HOCQUETTE, J. F. The GENOTEND chip: a new tool to analyses gene expression. In muscles of beef cattle for quality prediction. **Vet. Res.**, v. 8, p. 1-10, 2012.

HUAN, K. FAN. G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. **Regen. Med.**, v. 5, p. 531-544, 2010.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes Immun.**, v. 6, p. 279-284, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. p.1-34.

IRIZARRY, R. A. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 178-186, 2009.

JIAO, S. et al. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 373, p. 107-113, 2013.

JUSZCZUK-KUBIAK, E. et al. A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. **Mol. Biol. Rep.**, v. 35, p. 29-35. 2008.

JUSZCZUK-KUBIAK, E. et al. Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. **Meat Sci.**, v. 82, p. 278-283, 2009.

JÜTTERMANN, R. et al. Toxicity of 5-Aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 11797-11801, 1994.

KAISTO, T. **Special features of vesicle trafficking in skeletal muscles cells.**, 84 f. Dissertação (mestrado em anatomia e biologia celular) – Department of Anatomy and Cell Biology, University of Oulu. Oulu, Finland, 2003.

KEMP, C. M. et al. Tenderness – An enzymatic view. **Meat Sci.**, v. 84, p. 248-256, 2010.

KISS, R. et al. Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain. **Biochem.**, v. 47, p. 6936-6945, 2008.

KLOSE, R. J. BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem. Sci.**, v. 31, p. 89-97, 2006.

LEGUBE, G. TROUCHE, D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. **EMBO Rep.**, v. 4, p. 944-947, 2003.

LI, S. GOLDBERG, E. A novel N-terminal domain directs membrane localization of mouse testis-specific calpastatin. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1594-600, 2000.

LI, B. et al. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, p. 707-719, 2007.

LI, Y, X. et al. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in Yanbian cattle of China. **Mol. Biol. Rep.**, v. 40, p. 1875-1881, 2013.

LIVAK, K. J. SHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Method.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUCARELLI, M. et al. The dynamics of myogenin site-specific demethylation is strongly correlated with its expression and muscle differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 7500-7506, 2001.

MAUNAKEA, A. K. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. **Nat.**, v. 466, p. 253-259, 2010.

MONTESANO, A. et al. Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 9, p. 391-402, 2013.

MULLINS, R. D. HANSEN, S. D. *In vitro* studies of actin filament and network dynamics. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 25, p. 6-13, 2013.

MUROYA, S. et al. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. **Anim. Sci. J.**, v. 83, p. 252-259, 2012.

NAIR, R. A. et al. Paradoxical effects of trichostatin A: inhibition of NF-Y associated histone acetyltransferase activity, phosphorylation of hGCN5 and downregulation of cyclin A and B1 mRNA. **Cancer Lett.**, v. 166, p. 55-64, 2001.

NERVI, C. et al. Inhibition of histone deacetylase activity by Trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1247-1249, 2001.

NETO, W. A. S. **Crescimento da pecuária de corte no Brasil: fatores econômicos e políticas setoriais.**, 173 f. Tese (Doutorado em Economia aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 2011.

OH, H. J. et al. Trichostatin A improves preimplantation development of bovine cloned embryos and alters expression of epigenetic and pluripotency genes in cloned blastocysts. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 74, p. 1409-1415, 2012.

PALACIOS, D. PURI, P. L. The epigenetic network regulating muscle development and regeneration. **J. Cell Physiol.**, v. 207, p. 1-11, 2006.

PARR, T. et al. Expression of calpastatina isoforms in muscles and functionality of multiple calpastatina promoters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 427, p. 8-15, 2004.

PAULIN, D. LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Exp. Cell. Res.**, v. 301, p. 1-7, 2004.

PERDIGUERO, E. et al. Epigenetics regulation of myogenesis. **Epigenetics**, v. 8, p. 541-550, 2009.

PFAFFL, M. W. et al. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 1-10, 2002.

PHILIPSEN, S. SUSKE, G. A tale of three fingers: the Family of mammalian SP/XKLF transcription factors. **Nucleic. Acids Res.**, v. 27, p. 2991-3000, 1999.

POLAQUINI, L. E. M. SOUZA, J. G. GEBARA, J. J. Transformações técnico-produtivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.1 , p. 321-327, 2006.

PORTELA, A. ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat. Biotechnol.**, v. 28, p. 1057-1068, 2010.

RAHIMOV, F. KUNKEL, M. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. **J. Cell Biol.**, v. 201, p. 499-510, 2013.

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

RAYNAUD, P. et al. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 437, p. 69-77, 2005.

ROBINSON, T. L. et al. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, p. 160-165, 2006.

ROCHA, M. I. P. **Controle epigenético da expressão do gene CAST, relacionado à maciez da carne em bovinos de corte**, 84 f. Dissertação (mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos, 2013

RUIJTER, A. J. M. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochem. J.**, v. 370, p. 737-749, 2003.

SAWDY, J. C. et al. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Sci.**, v. 67, p. 421-426, 2004.

SCHNICHELS, S. et al. Trichostatin A induces cell death at the concentration recommended to differentiate the RGC-5 cell line. **Neurochem. Int.**, v. 60, p. 581-591, 2012.

SHARMA, A. et al. Trichostatin A inhibits corneal haze *in vitro* and *in vivo*. **Inves. Ophthal. Vis. Sci.**, v. 50, p 2695-2702, 2009.

SHIMODA, N. et al. Decrease in cytosine methylation at CpG island. Shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging. **Age**, v. 36, p. 103-115, 2013.

SI, J. et al. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation. **Cancer Res.**, v. 70, p. 6968-6977, 2010.

SORIMACHI, H. et al. Impact of genetics insights into calpain biology. **J. Biochem.**, v. 150, p. 23-37, 2011.

STERNER, D. E. BERGER, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factor. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 435-459, 2000.

STEWART, C. E. H. RITTWEGGER, J. Adaptative process in skeletal muscles: molecular regulators and genetic influences. **J. Musculoskelet. Neuronal Interact.**, v. 6, p. 73-86, 2006.

SUZUKI, K. et al. Structure, activation and biology of calpain. **Diabetes**, v. Suppl. 1, p. s12-18, 2004.

TAKANO, J. et al. Four types of calpastatina isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. **J. Biochem.**, v. 128, p. 83-92, 2000.

TORTORA, G. J. DERRICKSON, B. **Principles of anatomy and physiology**. 20th ed., Hoboken, New Jersey/US. John Wiley & sons, inc., 2009. p. 306.

TOST, J. DNA Methylation: An introduction to the biology and the disease associated changes of a promising biomarker. **Mol. Biotechnol.**, v. 44, p. 71-81, 2010.

USDA: produção mundial de carne bovina cresce 13% em 20 anos, brasileira cresce 65%. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/usda-producao-mundial-de-carne-bovina-cresce-13-em-20-anos-brasileira-cresce-65/>>. Acesso em: 14/12/2012.

VELIÇA, P. BUNCE, C. M. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. **Muscle Nerve**, v. 44, p. 366-370, 2011.

YANG, X. et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 31, p. 536-546, 2010.

YIN, H. et al. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiol. Rev.**, v. 93, p. 23-67, 2013.

YOO, B. C. JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat.**, v. 5, p. 37-50, 2006.

YOSHIHAMA, M. et al. The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. **Genome Res.**, v. 12, p. 379-390, 2002.

YOSHIKO, Y. et al. Differentiation in C₂C₁₂ myoblast depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 283, p. 1278-1286, 2002.

YUAN, Z. et al. Effects of DGAT1 gene on meat and carcass fatness quality in Chinese commercial cattle. **Mol. Biol. Rep.**, v. 40, p. 1947-1954, 2013.

ZHOU, F. C. DNA methylation program during development. **Front. Biol.**, v. 7, p. 485-494, 2012.