

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

**Controle epigenético da expressão do gene *CAST*,  
relacionado à maciez de carne em bovinos de corte**

**MARINA IBELLI PEREIRA ROCHA**

**SÃO CARLOS – SP**

**2013**

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

**Marina Ibelli Pereira Rocha**

**Controle epigenético da expressão do gene *CAST*,  
relacionado à maciez de carne em bovinos de corte**

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 a 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**

R672ce

Rocha, Marina Ibelli Pereira.

Controle epigenético da expressão do gene *CAST*,  
relacionado à maciez de carne em bovinos de corte / Marina  
Ibelli Pereira Rocha. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
81 f.

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

1. Genética. 2. Epigenética. 3. Carne bovina - maciez. 4.  
Calpastatina. 5. Expressão gênica. 6. Metilação. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

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

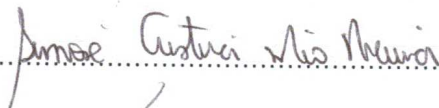
“Controle epigenético da expressão do gene *CAST*, relacionado à maciez de carne em bovinos de corte”

Dissertação de Mestrado de

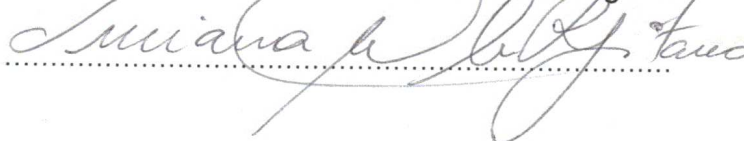
**MARINA IBELLI PEREIRA ROCHA**

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura

  
.....

Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

  
.....

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho

  
.....

**Dedico esse trabalho ao meu querido pai Celso, meu exemplo,  
minha mãe Eliana, minha vó Alzirina, tia Gracia e tio André, minhas fontes de força,  
e à minha irmã Ligia, minha maior entusiasta e meu maior orgulho**

***Meu mais sincero agradecimento as seguintes pessoas:***

A minha orientadora Dra Simone Cristina Méo Niciura por todo ensinamento, dedicação e confiança.

A Dra Luciana Correia de Almeida, ao Dr. Maurício Mudado ao Dr. Wilson Malagó, pela disponibilidade, pelo apoio e ajuda.

Aos meus amigos do laboratório de Biotecnologia Animal (Embrapa Pecuária Sudeste) e laboratório de Sanidade Animal, Adriana S., Alexandre, Ana Luisa, Andressa, Juliana, Marcela, Márcio, Mirelly, Polyana, Priscila, Rodrigo, Suelen, Talita B, Talita, Tatiane, Vanessa, Vitor e Viviane, pelo companheirismo, pela ajuda, pela paciência, pelo companheirismo e pelo cafezinho.

Um agradecimento especial para Flavia e Gilbertinho pelo apoio, ajuda, amizade e convivência, essenciais em todas as fases do projeto.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Mestrado e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários da EMBRAPA pela convivência

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

À minha família, minha mãe Eliana, minha irmã Ligia, minha avó Alzirina, meus tios Gracia e André meu cunhado Heraldo e minha prima Adriana por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando muita força nas minhas decisões.

Aos meus amigos, Carol, Isabella, Janaína, João Paulo (Zen), Lara, Mário, Natália, Priscilla, obrigada pela força e pelos momentos importantes e inesquecíveis. Alguns estão perto, outros em outras cidade e até mesmo em outro continente, mas sempre estão comigo.

E a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram nesse trabalho e fizeram da minha vida mais leve e feliz.

## Resumo

A maciez da carne, uma característica de grande interesse econômico, é influenciada pela intensidade da degradação de proteínas miofibrilares no período pós-morte. A  $\mu$ -calpaína é a principal enzima responsável pelo amaciamento do músculo esquelético, e de maneira oposta, a calpastatina que é codificada pelo gene *CAST*, atua como inibidor endógeno das calpaínas e, portanto, diminui a taxa e extensão da proteólise no músculo esquelético. Polimorfismos no gene *CAST* já foram associados à atividade da enzima e à força de cisalhamento, indicando a grande importância no estudo da regulação desse gene. Sabe-se que a transcrição da maior parte dos genes é reprimida estavelmente na maioria dos tecidos e só permanece ativa nos seus tecidos de expressão e em determinados estádios do desenvolvimento, e que isso pode ser controlado por eventos epigenéticos como a metilação de citosinas do DNA, passível de identificação por sequenciamento de DNA tratado com bissulfito. Os objetivos deste estudo foram avaliar se ocorre expressão preferencial de tecido, de genótipo e de estágio do desenvolvimento para o gene *CAST* em fígado, músculo e pele de fetos e músculo e fígado de animais adultos em bovinos homocigotos e heterocigotos para o polimorfismo A>G no éxon 30/3'UTR por meio de PCR em tempo real com o fluoróforo SYBR®. Além disso, foi verificado se a expressão diferencial do gene é regulada pelo status de metilação no seu promotor. Todas as expressões foram normalizadas para o gene referência *RPS-9*. Em fetos o gene *CAST* foi duas vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em fígado do que em pele e quase duas vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em fígado do que em músculo. Também foi encontrado aumento na expressão do gene de 1,83 x ( $p < 0,05$ ) em músculo adulto quando comparado a músculo fetal, evidenciando expressão diferencial de estágio de desenvolvimento. Quando analisadas as diferenças de expressão entre genótipos, comparando o genótipo homocigoto com o genótipo heterocigoto (usado como calibrador) foi encontrado, em amostras de fetos, um aumento de expressão ( $p < 0,05$ ) do gene *CAST* em músculo e pele de indivíduos GG (2x e 1,74x, respectivamente, em relação a heterocigotos) e músculo de indivíduos AA (1,4x em reação a AG). Em amostras de animais adultos, o gene foi mais expresso em fígado e músculo de indivíduos GG (2x e 1,63x mais que AG, respectivamente) e foi menos expresso ( $p < 0,05$ ) em fígado de indivíduos homocigotos AA (0,32x menos que AG). Foi identificada a presença de uma ilha CpG na região promotora do gene *CAST* e foi realizado tratamento do DNA com bissulfito, a clonagem do fragmento e o sequenciamento de clones. A ilha CpG mostrou-se hipometilada nos diferentes tecidos: 0,63% de dinucleotídeos CpG metilados em músculo fetal, 0,43% em fígado fetal e 0,61% em músculo adulto; e nos diferentes genótipos: 0,61%, 0,49% e 0,60% em AA, 0,81%, 0,35%, 0,34% em AG, 0,4%, 0,45% e 0,9% em GG em músculo fetal, fígado fetal e músculo adulto respectivamente. Assim a hipometilação da ilha CpG pode permitir a transcrição do gene, mas não explica as diferenças de expressão entre tecidos, estágio de desenvolvimento e genótipo para o genes *CAST*.

**Palavras-Chave:** Maciez de carne. Bovino. Calpastatina (*CAST*). Expressão gênica. Epigenética. Metilação.

## Abstract

The Meat tenderness, a trait of economic importance in animal production, is influenced by the intensity of the degradation of myofibrillar proteins in post-mortem. The  $\mu$ -calpain is the main enzyme responsible for meat tenderness of skeletal muscle, and, conversely, the calpastatin, which is encoded by the *CAST* gene, acts as endogenous inhibitor of calpain and thus decreases the extent of proteolysis in skeletal muscle. Polymorphisms in *CAST* were associated with enzyme activity and shear force, indicating the great importance of the study of *CAST* gene regulation. It is known that the transcription of most genes is stably suppressed in most tissues and only remains active in their tissue of expression and in certain developmental stages, and that can be controlled by epigenetic events such as methylation of DNA cytosine that is identified by sequencing of bisulfite-treated DNA. The aim of this study was to evaluate if there was preferential expression, of tissue, genotype and stage of development for the *CAST* gene in liver, muscle and skin of fetuses and muscle and liver of homozygous and heterozygous adult cattle for the A> G exon 30/3'UTR polymorphism, evaluated by real-time PCR with SYBR<sup>®</sup> fluorophore, and to verify if the differential expression is regulated by the methylation status of promoter region. Differential gene expression analyses were normalized to the reference gene RPS-9. When we analyzed the tissue-specific expression in fetuses, the *CAST* gene was 2 times more expressed in liver than in skin ( $p < 0.05$ ) and almost two times more expressed in liver than in muscle ( $p < 0.05$ ). It was also found that this gene was 1.83 x up regulated in adult muscle when compared to fetal muscle ( $p < 0.05$ ), showing differential expression in the developmental stage. Differences in expression between genotypes were also found, when comparing the homozygous genotype to the heterozygous genotype (used as calibrator). Fetal samples of muscle and skin of individuals with GG genotype presented higher expression ( $p < 0.05$ ) of *CAST* gene (2x and 1,74 x, respectively, compared to heterozygous) and muscle of animals with AA genotypes also presented higher expression (1.4x compared to AG). In adult animals, the gene was up regulated in liver and muscle of individuals with GG genotype (2x and 1.63x more than AG, respectively) and was less expressed in the liver of homozygote AA (0,32x less than AG) ( $p < 0.05$ ). The presence of a CpG island in the promoter region of the gene *CAST* was identified and the methylation status was studied after bisulfite treatment, cloning of the fragment and sequencing of clones. The CpG island was hypomethylated in different tissues: 0.63% of methylated CpG dinucleotides in fetal muscle, 0.43% in fetal liver and 0.61% in adult muscle. According to the different genotypes the island was methylated in 0.61%, 0.49%, 0.60% in animal with AA genotype, 0.81%, 0.35%, 0.34% in AG, 0.4%, 0.45%, 0.9% in GG in fetal muscle, fetal liver and adult muscle respectively. In our results we show that the CpG island is hypomethylated and can allow transcription of the gene but the methylation does not explain the differences in expression within tissues, developmental stage and genotypes of the *CAST* gene.

**Keywords:** Meat tenderness. Bovine. Calpastatin (*CAST*). Gene expression. Epigenetic. Methylation.



## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática do gene da calpastatina (*CAST*) bovino. As caixas indicam os éxons. Fonte: Modificada pela autora de SENSKY et al. (2006).....17
- Figura 2.** DNA tratado com bissulfito para identificação da 5-metil-citosina ( $C^m$ ). Fonte: HAYATSU (2008b).....23
- Figura 3.** Gráfico de discriminação alélica com designação dos alelos para determinação do genótipo dos animais para o SNP no gene *CAST* em PCR em tempo real, com sondas de hidrólise, no termociclador ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems).....39
- Figura 4.** Imagem de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S, evidenciando a integridade do RNA.....41
- Figura 5.** Valores de estabilidade identificados na ferramenta RefFinder para os genes referência *RPS-9*, *RPL-19*, tubulina, *GAPDH*,  $\beta$ -actina e histona H2A em tecidos bovinos fetais.....43
- Figura 6.** Valores de estabilidade identificados na ferramenta RefFinder para os genes referência *RPS-9*,  $\beta$ -actina, *RPL-19* e *GAPDH* em tecidos de bovinos adultos.....44
- Figura 7.** Razão de expressão do gene *CAST* em fetos bovinos: músculo em relação a fígado, pele em relação a músculo e pele em relação a fígado, normalizados para o gene referência *RPS-9*.....46
- Figura 8.** Razão de expressão do gene *CAST* bovino: músculo de feto em relação a músculo de adulto, fígado de feto em relação a fígado de adulto, normalizados para o gene referência *RPS-9*. As barras mostram a variação das relações entre os estádios de desenvolvimento.....47
- Figura 9.** Razão de expressão do gene *CAST* em fetos bovinos: músculo de animais homocigotos em relação músculo de animais heterocigotos, fígado de animais homocigotos em relação a fígado de animais heterocigotos e pele de animais homocigotos em relação à pele de animais heterocigotos, normalizados para o gene referência *RPS-9*.  
.....48
- Figura 10.** Razão de expressão do gene *CAST* em bovinos adultos: músculo de animais homocigotos em relação músculo de animais heterocigotos e fígado de animais homocigotos em relação a fígado de animais heterocigotos, normalizados para o gene referência *RPS-9*.  
.....49
- Figura 11.** Ilha CpG localizada no gene *CAST* bovino identificado pelo programa Emboss (-4000 pb até 16.000 pb).....52
- Figura 12.** Ilha CpG localizada no gene *CAST* bovino identificado pelo programa CpG Island Searcher (-4.000 pb até 16.000 pb).....53

<b>Figura 13.</b> Ilha CpG localizada no gene <i>CAST</i> bovino identificado pelo programa Methyl Primer Express (-4.000 pb até 16.000 pb).....	<b>54</b>
<b>Figura 14.</b> Ilha CpG identificada pelos programas Emboss (sublinhado), CpG Island Searcher e Methyl Primer Express (destacado na cor cinza claro) no gene <i>CAST</i> bovino, com destaque para o fragmento escolhido para amplificação (-252 pb até 163 pb, delimitado por primers destacados na cor rosa) e para os dinucleotídeos CpG (destacados na cor cinza escuro).....	<b>55</b>
<b>Figura 15.</b> Imagem dos fragmentos de 415pb amplificados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). .....	<b>56</b>
<b>Figura 16.</b> Eletroferograma gerado após sequenciamento direto de produto de PCR de DNA tratado com bissulfito.....	<b>57</b>
<b>Fígura 17.</b> Análise da metilação do gene <i>CAST</i> em 56 sequências (clones) de músculo fetal.....	<b>59</b>
<b>Fígura 17.</b> Continuação: 16 dinucleotídeos CpG.....	<b>60</b>
<b>Fígura 17.</b> Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.....	<b>61</b>
<b>Fígura 18.</b> Análise da metilação do gene <i>CAST</i> em 63 sequências (clones) de fígado fetal.....	<b>62</b>
<b>Fígura 18.</b> Continuação: 16 dinucleotídeos CpG.....	<b>63</b>
<b>Fígura 18.</b> Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.....	<b>64</b>
<b>Fígura 19.</b> Análise da metilação do gene <i>CAST</i> em 49 sequências (clones) de músculo adulto.....	<b>65</b>
<b>Fígura 19.</b> Continuação: 16 dinucleotídeos CpG.....	<b>66</b>
<b>Fígura 25.</b> Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.....	<b>67</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos <i>primers</i> , tamanho dos produtos de amplificação e número de acesso no GenBank.....	<b>28</b>
<b>Tabela 2.</b> Sequências (5'-3') dos <i>primers</i> e das sondas utilizadas para a genotipagem do polimorfismo no gene <i>CAST</i> bovino e tamanho do produto de amplificação do DNA e do RNA.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3.</b> Amostras de animais adultos, suas respectivas raças e total de animais.....	<b>37</b>
<b>Tabela 4.</b> Amostras de fetos bovinos selecionadas e respectivos genótipos para o SNP no gene <i>CAST</i> , sexo e idade fetal.....	<b>39</b>
<b>Tabela 5.</b> Amostras de bovinos adultos selecionados e respectivos genótipos para o SNP no gene <i>CAST</i> , sexo, idade e raças.....	<b>40</b>
<b>Tabela 6.</b> Estatística descritiva dos valores de $C_q$ para os genes referência <i>GAPDH</i> , <i>RPS-9</i> , <i>RPL-19</i> , tubulina, $\beta$ -actina e histona H2A em tecidos bovinos fetais.....	<b>42</b>
<b>Tabela 7.</b> Estatística descritiva dos valores de $C_q$ para os genes referência <i>RPS-9</i> , <i>RPL-19</i> , $\beta$ -actina e <i>GAPDH</i> em tecidos bovinos adultos.....	<b>42</b>
<b>Tabela 8.</b> Classificação dos melhores genes referência para tecidos bovinos fetais nos métodos Delta Ct, BestKeeper, Normfinder e Genorm.....	<b>43</b>
<b>Tabela 9.</b> Classificação dos melhores genes referência para tecidos de bovinos adultos nos métodos Delta Ct, BestKeeper, Normfinder e Genorm.....	<b>43</b>
<b>Tabela 10.</b> Amplitude e média da eficiência de amplificação e amplitude de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtidos no programa <i>LinRegPCR</i> para os genes <i>CAST</i> e <i>RPS-9</i> .....	<b>44</b>

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>14</b>
<i>2.1. A pecuária no Brasil e o estudo de marcadores moleculares.....</i>	<i>14</i>
<i>2.2. O sistema da calpaína.....</i>	<i>15</i>
<i>2.3. Expressão gênica específica de tecido, alelo ou estágio de desenvolvimento.....</i>	<i>18</i>
<i>2.4. Epigenética.....</i>	<i>19</i>
<i>2.5. O estudo da epigenética.....</i>	<i>22</i>
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>24</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Hipótese.....</b>	<b>25</b>
<b>6. Materiais e Métodos.....</b>	<b>26</b>
<i>6.1. Obtenção das amostras.....</i>	<i>26</i>
<i>6.2. DNA.....</i>	<i>26</i>
<i>6.2.1. Extração de DNA.....</i>	<i>26</i>
<i>6.2.2. Avaliação da quantidade e qualidade do DNA.....</i>	<i>27</i>
<i>6.3. Desenho de primers e sondas.....</i>	<i>27</i>
<i>6.4. Genotipagem em PCR em tempo real.....</i>	<i>28</i>
<i>6.5. RNA.....</i>	<i>29</i>
<i>6.5.1. Extração de RNA.....</i>	<i>29</i>
<i>6.5.2. Avaliação da quantidade e qualidade do RNAI.....</i>	<i>30</i>
<i>6.6. Transcrição reversa (RT-PCR).....</i>	<i>30</i>
<i>6.7. Expressão gênica.....</i>	<i>30</i>
<i>6.7.1. Expressão gênica em PCR em tempo-real.....</i>	<i>30</i>
<i>6.7.2. Escolha do gene referência.....</i>	<i>32</i>
<i>6.7.3. Eficiência de Amplificação.....</i>	<i>33</i>
<i>6.8. Identificação de Ilhas CpG na região promotora por meio de bioinformática.....</i>	<i>33</i>
<i>6.9. Estudo da Metilação.....</i>	<i>34</i>
<i>6.9.1. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....</i>	<i>34</i>
<i>6.9.2. Amplificação de DNA tratado com bissulfito de sódio.....</i>	<i>34</i>
<i>6.9.3. Sequenciamento direto do DNA tratado com bissulfito.....</i>	<i>35</i>
<i>6.9.4. Clonagem e sequenciamento de DNA tratado com bissulfito.....</i>	<i>36</i>
<i>6.9.5. Análise das sequências de DNA tratado com bissulfito.....</i>	<i>36</i>

<b>7. Resultados e Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>7.1. Genotipagem.....</b>	<b>37</b>
<b>7.2. Expressão gênica.....</b>	<b>40</b>
7.2.1. Escolha do gene referência.....	41
7.2.2. Eficiência de amplificação.....	44
7.2.3. Expressão gênica relativa.....	45
<b>7.3. Identificação de Ilhas CpG na região promotora por meio de bioinformática.....</b>	<b>51</b>
<b>7.4. Estudo da Ilha CpG.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>70</b>
<b>9. Referência Bibliográfica.....</b>	<b>71</b>

## 1. Introdução

O Brasil é o maior exportador mundial de carne e possui um rebanho de bovinos de mais de 200 milhões de cabeças (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011; BRASIL, 2013). Devido a grande importância econômica da criação de bovinos de corte, muitos estudos são realizados para encontrar marcadores genéticos, como os SNPs, associados à locos de caracteres quantitativos (QTL), que possibilitem a seleção precoce de animais superiores.

Dentre várias características de qualidade da carne estudadas, a maciez é a mais importante para a satisfação do consumidor. O sistema da calpaína que possui três principais proteínas,  $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina, é um dos principais sistemas envolvidos na proteólise de proteínas miofibrilares no período pós-mortem, evento que resulta no amaciamento da carne. Alguns SNPs nos genes que codificam essas proteínas, principalmente no gene da  $\mu$ -calpaína (*CAPNI*) (PAGE et al., 2002; WHITE et al., 2005) e da calpastatina (*CAST*) (CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006) já foram encontrados e associados com a maciez da carne. Barendse (2002) identificou um SNP caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina na região 3' UTR do gene *CAST* (AF\_159246.1G2959A>G) associado à maciez da carne por meio da avaliação da força de cisalhamento (CASAS et al., 2006; MORRIS et al., 2006; CURI et al., 2009).

A calpastatina é o inibidor endógeno das calpaínas e, portanto, pode reduzir a taxa e a extensão da degradação das proteínas miofibrilares podendo causar a diminuição da maciez da carne (KOOHMARAIE 1994; KEMP et al., 2010) e vários estudos já demonstraram a importância dessa proteína tanto no amaciamento da carne (GEESINK et al.2006) como em funções celulares essenciais como a expressão gênica e a apoptose (GOLL et al., 2003). Em bovinos, o gene *CAST* está situado no cromossomo 7 (BTA7), possui 4 diferentes promotores e regulação complexa, envolvendo regulação na transcrição, na tradução e após a tradução.

O estudo da regulação desse gene é importante para o entendimento das diferenças de expressão do gene e da variação da maciez, ou seja, das mudanças no fenótipo. A epigenética, estudo de modificações químicas nos genes, que afetam a expressão gênica, mas não alteram a sequência do DNA como, por exemplo, a metilação do DNA e as modificações de histonas (LIEB et al., 2006), faz parte do entendimento da interação entre os genes e o ambiente que geram o fenótipo.

A metilação das citosinas do DNA é a modificação epigenética mais bem estudada em relação à expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento ou entre tecidos e

também em diversas doenças com atenção especial em câncer. O dogma da epigenética está baseado na idéia de que promotores metilados são silenciados e aqueles não metilados podem ser ativados (LEVENSON, 2010). Geralmente a metilação ocorre em dinucleotídeos CpG, e sequências com grande concentração desses dinucleotídeos são chamadas de ilhas CpG e são dispostas em promotores e primeiros éxons dos genes (TOST, 2010). Além da metilação podem ocorrer várias modificações epigenéticas e ligação de diversos fatores nas regiões regulatórias dos genes que modificam sua expressão.

Portanto, o objetivo desse estudo foi a avaliação da expressão do gene *CAST* em músculo, fígado e pele de fetos e músculo e fígado de animais adultos, homozigotos e heterozigotos para o polimorfismo A>G no éxon 30/3'UTR, para a verificação de expressão diferencial de tecido, estágio de desenvolvimento e genótipo. Além disso, verificamos se a expressão diferencial é regulada pelo status da metilação da ilha CpG presente na região promotora do gene.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. A pecuária no Brasil e o estudo de marcadores moleculares

A pecuária brasileira apresenta extrema importância para a economia nacional. O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo mundial de bovinos, com cerca de 212 milhões de cabeças (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2012; BRASIL, 2013). Os bovinos distribuem-se aproximadamente 20,5 % na região Norte do país, 14% na Nordeste, 18,5 % na Sudeste, 13 % na Sul e 34 % na Centro-Oeste, sendo que Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul possuem os maiores rebanhos efetivos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Além disso, o Brasil é também o maior exportador mundial de carne, seguido por Austrália, Estados Unidos, Índia, Nova Zelândia e Canadá (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2011). Entre os maiores importadores de carne bovina brasileira encontram-se Rússia, Hong Kong, Egito, União Européia e Estados Unidos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2012).

Devido a essa grande importância comercial dos bovinos de corte, vários estudos têm buscado a identificação e seleção precoce de animais superiores para características de interesse econômico por meio de marcadores, processo denominado de seleção assistida por marcadores (MAS) genéticos. Os marcadores podem ser determinados pela identificação de locos de caracteres quantitativos (QTL) associados à característica ou pelo estudo de polimorfismos e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes candidatos posicionais (escolhidos pela localização em regiões em que já foram identificados QTL) ou funcionais (cujas ações biológicas estão envolvidas no desenvolvimento ou na fisiologia da característica de interesse) (WU et al., 2005).

A maciez da carne é uma das características mais importantes para a satisfação do consumidor possuindo grande importância na produção de gado de corte (MORRIS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006). Alguns SNPs em genes candidatos associados a essa característica já foram estudados no gene da *CAPN* (BOEHM et al., 1998) em éxons (A316G e V530I) e íntron (CAPN4571) com avaliação da força de cisalhamento de Warner-Bratzler, em diferentes populações de bovinos (PAGE et al., 2002; WHITE et al., 2005). Também foram estudados polimorfismos no gene *CAST* que foram associados à atividade da enzima



(CHUNG et al., 2001) e à força de cisalhamento (CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006).

As proteínas calpaína e calpastatina são componentes do sistema da calpaína, importante no amaciamento da carne no período pós-mortem. O gene da calpaína é um candidato posicional para maciez, pois foi mapeado dentro do QTL encontrado por Casas et al. (2000) e também é considerado um candidato funcional, pois participa de um sistema que realiza proteólise de proteínas miofibrilares. O gene *CAST* é candidato funcional, pois produz a calpastatina o inibidor endógeno da calpaína e também é um candidato posicional para maciez, pois foi mapeado no QTL encontrado por Davis et al. (2008).

Barendse (2002) identificou um SNP caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina na região 3' UTR do gene *CAST* (AF\_159246.1G2959A>G). Estudos posteriores encontraram associação desse SNP com a maciez da carne (CASAS et al., 2006; MORRIS et al., 2006; CURI et al., 2009). Os resultados de Casas et al. (2006) demonstraram que animais que herdaram o genótipo AA possuem carne mais macia que animais com genótipo GG avaliada pela força de cisalhamento de Warner-Bratzler. Curi et al. (2009) também encontraram resultados que demonstraram a superioridade do genótipo AA em relação a heterozigotos AG. Essas análises do SNP demonstram a importância dele na seleção de animais superiores para a maciez da carne.

Embora o SNP em questão esteja localizado em uma região 3' UTR e não em uma região codificadora, devido à associação entre o marcador e a característica estudada pode ser sugerido que existe ligação ou forte desequilíbrio de ligação entre esse polimorfismo e outros polimorfismos, em regiões codificantes ou regulatórias, que são responsáveis pelas alterações fenotípicas (CURI et al., 2009; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009). Além disso, regiões 3' UTR são importantes na regulação gênica e nos RNAs, pois podem ser alvo de miRNA, que modificam a expressão gênica (CURI et al., 2009; ZHAO et al., 2012).

## **2.2. O sistema da calpaína**

Vários fatores são responsáveis pela variação da maciez da carne, como a variação genética e biológica, diferenças fisiológicas, mudanças biofísicas durante o abate do animal e algumas diferenças que ocorrem durante a maturação da carne no período pós-mortem. Três fatores são essenciais no período pós-mortem e variam dependendo do músculo estudado: proteólise, tecido conjuntivo e tamanho do sarcômero. Dentre esses fatores a proteólise é o

mais importante para explicar a variação na maciez (KOOHMARAIE, 1994, 1996; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006).

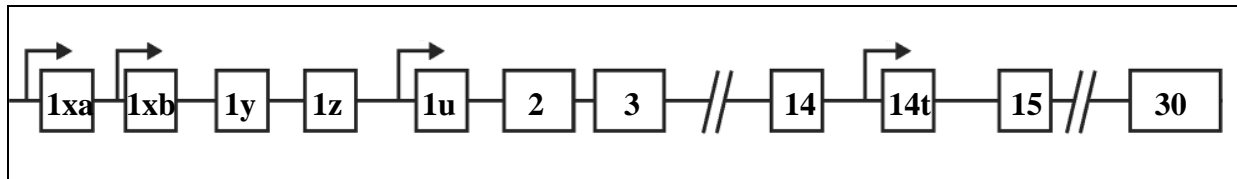
A proteólise é causada pela degradação de proteínas miofibrilares no período pós-morte (KOOHMARAIE, 1994; KOOHMARAIE 1996; BOEHM et al., 1998) realizada pelas calpaínas. O sistema da calpaína possui três proteínas importantes e bem caracterizadas, a  $\mu$ -calpaína e a m-calpaína, e seu inibidor endógeno específico, a calpastatina, além de várias outras calpaínas com características pouco conhecidas (GOLL et al., 2003; GEESINK et al., 2006). A  $\mu$ -calpaína (calpaína-1) e a m-calpaína (calpaína-2) são cisteínas proteases dependente de cálcio que requerem concentrações de cálcio micromolar e milimolar, respectivamente, para sua ativação (MORRIS et al., 2006; KEMP et al., 2010). A  $\mu$ -calpaína é a principal enzima responsável pela proteólise das miofibrilas e das proteínas chaves que mantêm sua estrutura e integridade como, por exemplo, as titinas, desminas e nebulinas. O enfraquecimento dessas miofibrilas causa o amaciamento do músculo esquelético no período pós-morte (KOOHMARAIE 1996; BOEHM et al., 1998; GOLL et al., 2003; KEMP et al., 2010).

A calpastatina atua como inibidor das calpaínas e, portanto, reduz a taxa e diminui a extensão da proteólise no músculo esquelético, diminuindo assim a maciez da carne (BOEHM et al., 1998; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; KEMP et al., 2010). Vários estudos já demonstraram a associação com diferenças de maciez da carne e o aumento da atividade da calpastatina. Koohmaraie et al. (1991) mostraram que diferenças na proteólise e no amaciamento da carne de bovinos, suínos e ovinos poderiam ser explicadas pela variação da calpastatina. Shackelford et al. (1991) também chegaram à mesma conclusão comparando a proteólise de carne entre bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*. Kent et al. (2004), usando camundongos transgênicos que possuíam expressão aumentada de calpastatina, observaram grande diminuição da proteólise pós-morte. Esses e outros estudos comprovam a importância de se estudar o sistema da calpaína e em especial a calpastatina para a compreensão do processo de amaciamento da carne.

O gene da calpastatina, *CAST* (Figura 1), foi mapeado no cromossomo bovino sete (BTA7) (BISHOP et al., 1993), contém cerca de 130kb e possui 35 éxons, sendo 30 éxons pertencentes à parte traduzida e 5 éxons situados a montante do éxon 2 que não são traduzidos (1xa, 1xb, 1y, 1z e 1u). Possui pelo menos quatro promotores a montante dos éxons 1xa, 1xb, 1u e 14t que produzem quatro transcritos, I, II, III e IV, respectivamente, sendo o último específico de testículos (RAYNAUD et al., 2005a,b; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009)

(Figura 1). Os promotores possuem padrões de expressão diferenciais para os quatro tipos de transcritos e estudos com suínos e bovinos já demonstraram diferenças na ativação dos promotores, sendo o promotor 1u mais ativo em suínos e o 1xb mais ativo em bovinos (PARR et al., 2004; RAYNAUD et al., 2005b; KEMP et al., 2010).

**Figura 1** – Representação esquemática do gene da calpastatina (*CAST*) bovino.



Fonte: Modificaa pela autora, de SENSKY et al. (2006). As caixas indicam os éxons. As setas indicam os sítios de início de transcrição e a direção da transcrição. 1xa (início da transcrição do transcrito I), 1xb (início da transcrição do transcrito II), 1u (início da transcrição do transcrito III) e 14t (início da transcrição do transcrito IV).

A expressão do gene da calpastatina é complexa possuindo diferentes níveis de controle dos promotores, da transcrição, da tradução e pós-traducionais como o *splicing* alternativo. Diversas sequências de transcritos e isoformas de proteínas já foram relatadas em estudos com humanos, ratos, suínos e bovinos (TAKANO et al., 2000; RAYNAUD et al., 2005a,b) As regiões promotoras do gene não possuem TATA Box, são ricas em GC e possuem sítios de ligação do fator de transcrição Sp-1, características de genes largamente expressos em diferentes tipos de células, como os genes *housekeeping*. Essa grande gama de controle da expressão pode ser significativa para assegurar a expressão da calpastatina que é essencial para inibir a proteólise mediada pela calpaína, podendo modular o desenvolvimento da textura da carne (CONG et al., 1998; TAKANO et al., 2000; RAYNAUD et al., 2005a,b; MEYERS; BEEVER, 2008; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009).

Além de participar da proteólise de miofibrilas, o sistema da calpaína também está envolvido na regulação do crescimento do músculo, no *turnover* das miofibrilas, na regulação da migração e fusão de mioblastos, na diferenciação de mioblastos e adipócitos, na motilidade e proliferação de células, no crescimento do músculo, na reorganização da actina, na progressão do ciclo celular, na transdução de sinal, na regulação da expressão de genes e na apoptose (TAKANO et al., 2000; GOLL et al., 2003). Esse sistema também já foi estudado e tem implicação em doenças como diabetes mellitus tipo 2, Mal de Alzheimer, distrofias musculares e infarto do miocárdio (GOLL et al., 2003). Alguns estudos também demonstraram relação entre mudanças no ambiente e a variabilidade da atividade da

calpastatina como, por exemplo, aumento da expressão do gene após alimentação com dieta acrescidas de agentes agonísticos  $\beta$ -adrenérgicos em carneiros e bovinos (KILLEFER e KOOHMARAIE, 1994) e em suínos (PARR et al., 2000).

Devido à gama de funções e à importância no amaciamento da carne, muitos estudos buscam o entendimento das funções de cada proteína do sistema da calpaína. A calpastatina, sendo o único inibidor da calpaína, tem uma grande importância, e o estudo da sua regulação é essencial para o entendimento da variação da maciez (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009; KEMP et al., 2010).

### 2.3. Expressão gênica específica de tecido, alelo ou estágio de desenvolvimento

A existência de um SNP pode modificar os níveis de expressão gênica, pois um polimorfismo em região codificante pode estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo na região do promotor que afeta a eficiência de transcrição ou que cria um sítio de *splicing* alternativo (FOLCH et al., 1999; DEBELJAK et al., 2000; TAO et al., 2006). Isso já foi demonstrado, em bovinos, para a kappa caseína ( $\kappa$ -CN) (DEBELJAK et al., 2000) e para a  $\beta$ -lactoglobulina (FOLCH et al., 1999). Entretanto, além do genótipo, mecanismos epigenéticos podem influenciar os níveis de expressão gênica em casos de polimorfismos. Em ovinos Texel, foi demonstrado que a existência de uma transição G > A na região 3' UTR cria um sítio alvo para microRNAs que inibem a tradução do gene da miostatina e contribuem para a hipertrofia muscular (CLOP et al., 2006).

Sabe-se que a transcrição da maior parte dos genes é reprimida estavelmente na maioria dos tecidos e só permanece ativa nos seus tecidos de expressão e em determinados estádios do desenvolvimento, e que isso pode ser controlado por eventos epigenéticos (LANDE-DINER et al., 2007). Já foi demonstrado que a metilação do DNA, em regiões diferencialmente metiladas específicas de tecidos, controla a expressão tecido-específica da leptina, em bovinos (KREMENSKOY et al., 2006).

Denomina-se *imprinting* o evento no qual a expressão de um gene é dependente de sua origem parental (materna ou paterna), e seu mediador epigenético central é a metilação da citosina (WATSON et al., 1992; LI et al., 1993; ALBERTS et al., 1994; JAENISCH, 1997). Para os genes não-*imprinted* é aceito que qualquer um dos alelos pode ser expresso (expressão bialélica). Entretanto, já foi descrito que a expressão alélica diferencial (DAE) é um evento comum e que está associada à variação fenotípica (KHATIB, 2007). Em humanos, diversos

genes apresentam expressão diferencial entre alelos e essa variação é transmitida por herança mendeliana (YAN et al., 2002; LO et al., 2003).

A busca pela associação entre o estado epigenético e a expressão alelo-específica tem sido realizada para genes *imprinted*, genes relacionados à resposta imune em camundongos (ROTHENBURG et al., 2001; ROGERS et al., 2006) e humanos (RIETSCHOTEN et al., 2006) e para a compreensão de doenças humanas, como câncer e Alzheimer (LI et al., 2006). Entretanto, a informação sobre os mecanismos epigenético de controle da expressão alelo-específica de outros genes ainda é escassa, principalmente em bovinos.

Apesar dos estudos tradicionais enfocarem o efeito da combinação entre o genótipo e o ambiente sobre a variação fenotípica individual, evidências sugerem a participação do epigenótipo nesse processo (DOLINOY et al., 2007). Processos epigenéticos não causam modificações permanentes, mas herdáveis e que ocorrem no desenvolvimento e na diferenciação, com o envelhecimento ou por meio de estímulo ambiental (JAENISCH; BIRD, 2003; TOST, 2010) evidenciando a importância do estudo da epigenética para compreensão das interações entre genes e ambiente.

#### **2.4. Epigenética**

O termo epigenética refere-se às modificações químicas dos genes, que são herdadas de uma geração de células para outra, durante as divisões celulares, e afetam a expressão gênica, mas não alteram a sequência do DNA, ou seja, alteram o fenótipo sem modificar o genótipo (KENDREW, 1994; BRADBURY, 2003). Mais recentemente, a epigenética foi definida como o estudo de processos que produzem um fenótipo herdável, mas que não dependem estritamente da sequência de DNA (LIEB et al., 2006). As informações epigenéticas, ou seja, as camadas dinâmicas de regulação, podem ser transmitidas por meio de variantes de histonas, complexos de remodelamento de cromatina dependentes de ATP, complexos proteicos polycomb/trithorax, RNAs pequenos e não codificadores que incluem siRNA e miRNA, modificações pós-transcricionais nas histonas (proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA) e metilação do DNA (BRADBURY, 2003; FAZZARI; GREALLY, 2004; TOST, 2010; ATTAR, 2012).

Diferenças nos padrões de expressão gênica que resultam no desenvolvimento de órgãos e tecidos, geralmente, não ocorrem por modificações na sequência do DNA, mas sim pelo estabelecimento de marcas epigenéticas (REIK, 2007). Assim, as modificações epigenéticas participam de vários processos fisiológicos, como expressão de genes tecido-

específicos, inativação do cromossomo X, inativação do centrômero e regulação do *imprinting* genômico (YOUNG; FAIRBURN, 2000).

A cromatina é formada por unidades repetidas chamadas nucleossomos, que são compostos de um segmento de DNA de 146 pares de bases enrolado ao redor de um octâmero de histonas, que é formado de um par de cada histona H2A, H2B, H3 e H4 sendo que o tetrâmero das H3-H4 é flanqueado de cada lado por dímeros H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>B (SEGA et al., 2007; TOST, 2010). Existem diversos tipos de modificações que ocorrem na cauda N-terminal das histonas como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ribosilação e sumoilação (GREGORY et al., 2001; LIEB et al., 2006) Essas modificações covalentes pós-traducionais das caudas das histonas têm papel importante na transcrição de genes e na estrutura da cromatina, e o conjunto de modificações que resulta em uma função subsequente específica é conhecido como código das histonas (DION et al., 2005; LIEB et al., 2006).

Dentre as modificações de histonas as duas mais estudadas são a metilação e a acetilação seletiva de lisinas. A metilação pode promover repressão ou ativação gênica dependendo de qual resíduo de lisina é metilado. Por exemplo, a metilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4), encontrada em muitos promotores, da H3K36 e da H3K79 provoca ativação, enquanto a metilação em H3K9, H3K27 e H4K20 promove silenciamento gênico (TALASZ et al., 2005; SEGA et al., 2007; MAUNAKEA et al., 2010). A acetilação está associada ao aumento de expressão gênica e ativação da transcrição, e trabalhos já demonstraram que a acetilação de H3K9 e H3K27 são encontradas em regiões regulatórias de genes ativos (ERNST et al., 2011; SHIN et al., 2012)

A metilação da citosina no DNA é a modificação epigenética mais bem estudada. Diferenças na metilação da citosina podem ocorrer entre tecidos, entre espécies, estágios de desenvolvimento, no envelhecimento e em diversas doenças com destaque para o câncer (GAMA-SOSA et al., 1983; EGGER et al., 2004; LIEB et al., 2006; YANG et al., 2011). Em células tumorais muitos promotores de genes supressores de tumor podem estar hipermetilados e, portanto, silenciados podendo ocorrer perda de *imprinting*, enquanto ocorre uma hipometilação global do genoma, incluindo oncogenes (ROBERTSON; JONES; 2000; REIK; DEAN, 2001; JAENISCH; BIRD, 2003)

No genoma de mamíferos a grande parte da transferência do grupo metil, fornecido pelo doador universal S-adenosil-L-metionina (SAM), para a citosina é catalisada por enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMT). A deposição de grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina localizada em posição 5' a um resíduo de guanina, transforma-a em 5-metil-citosina (5mC). Essa situação na qual a citosina a ser

metilada é seguida de uma guanina é chamada de dinucleotídeo CpG (ENRIGHT et al., 2003; TOST, 2010). Cerca de 1% das bases em humanos é de 5mC, com alguma variação entre os diferentes tecidos, e a maioria, 75%, dos dinucleotídeos CpG nos genomas de mamíferos são metilados (TOST, 2010).

A metilação de citosinas na região promotora de genes está relacionada ao silenciamento gênico (ENRIGHT et al., 2003) e, nas regiões diferencialmente metiladas, à regulação da maioria dos genes *imprinted* (FEIL; BERGER, 2007). A maioria dos genes de expressão específica de tecidos é metilado, o que pode ser explicado pela modificação da acessibilidade da cromatina devido ao grupo metil (CEDAR, 1988). Regiões que são ricas em dinucleotídeos CpG e possuem conteúdo de C+G elevado são chamadas de ilhas CpG e são encontradas nas regiões dos promotores e nos primeiros éxons de muitos genes. Aproximadamente 70% dos genes humanos possuem ilhas CpG em seus promotores (SAXONOV et al., 2006). Geralmente as ilhas CpG são pouco metiladas, o que corresponde à manutenção da estrutura da cromatina aberta e potencial estado ativo de transcrição (ILLINGWORTH; BIRD, 2009; TOST, 2010). No genoma humano, a grande maioria dos dinucleotídeos CpG está metilada enquanto em genes constitutivamente expressos (genes *housekeeping*) não está metilada (LANDE-DINER et al., 2004).

As mudanças epigenéticas podem ocorrer juntas e fazem parte de diversas camadas de regulação da expressão gênica tanto para a manutenção de um estado ativo quanto de um estado reprimido (DEATON; BIRD, 2011). É possível que a metilação da citosina possa ser induzida por meio de eventos primários envolvendo as modificações covalentes nas caudas N-terminal das histonas (LIEB et al., 2006). Por outro lado, a metilação do DNA também pode influenciar as modificações das histonas, tanto a acetilação quanto a metilação (LANDE-DINER et al., 2004). Existem diferentes padrões da presença de histonas modificadas entre promotores com ilhas CpG e sem ilhas CpG (VAVOURI; LEHNER, 2012).

Lande-Diner et al. (2004) estudaram a relação da metilação do DNA e as modificações das histonas na repressão gênica e observaram que alguns genes possuíam promotores com ilhas não metiladas e modificações nas histonas, como a acetilação da H3K4, que possibilitavam maior acesso ao nucleossomo, sendo o controle realizado por fatores de transcrição específicos de tecido. Outros genes possuíam promotores com ilhas CpG metiladas, mas quando a metilação do DNA era perdida, havia o aumento da acetilação das histonas e a diminuição da metilação de histonas H3, possibilitando a transcrição. Em um último grupo de genes, a repressão da transcrição era formada por várias mudanças

epigenéticas e, mesmo sem a metilação da região promotora, a cromatina permanecia com a estrutura condensada, ou seja, sem permitir a transcrição.

### ***2.5. O estudo da epigenética***

O objetivo do estudo da epigenética é a identificação dos locais e da natureza das sequências de DNA que estão modificadas epigeneticamente (FAZZARI; GREALLY, 2004). O progresso no entendimento da epigenética é atribuído às tecnologias que permitem apontar a localização genética de proteínas histonas, que empacotam e regulam o acesso ao DNA (LIEB et al., 2006), assim como de regiões de DNA metilado.

A imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foi primeiramente descrita por Solomon, Larsen e Varshavsky (1988) como uma técnica utilizada para o estudo das interações DNA-proteína. É baseada na utilização de anticorpos para a identificação da presença de proteínas ou de modificações específicas das histonas nos nucleossomos de regiões do DNA (LIEB et al., 2006; HARING et al., 2007; PARK, 2009). O DNA, precipitado, obtido na técnica de ChIP, pode ser analisado por meio de PCR quantitativo, para determinação da abundância de uma região específica de interesse no precipitado, *Southern blotting*, hibridização em microarranjo de DNA (ChIP-chip ou ChIp-on-chip), sequenciamento *paired end tag* (ChIP-PET) ou de nova geração (ChIP-seq) que permitem a análise global do DNA modificado (LIEB et al., 2006; HARING et al., 2007; KIM; PARK, 2011).

Para o estudo do grau de metilação em sequências particulares de DNA utilizam-se dois métodos: não bissulfito e bissulfito. O primeiro baseia-se na digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação (MSRE), que pode ser combinada com diversas técnicas. O segundo é baseado nas modificações no DNA causadas pelo tratamento com bissulfito de sódio e que também pode ser combinado com um grande número de técnicas permitindo a determinação quantitativa do status da metilação (FRAGA; ESTELLER, 2002; GAGNON et al., 2010).

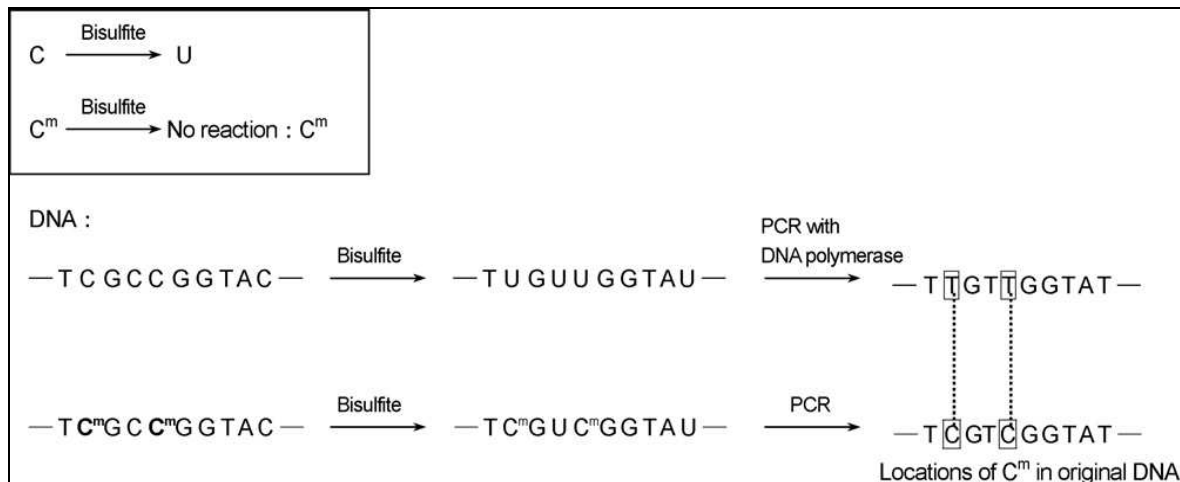
Os métodos baseados nas enzimas de restrição podem ser usados para DNA metilados ou não metilados. Geralmente as comparações podem ser feitas de três formas diferentes: entre amostras tratadas com uma enzima ou diversas enzimas e um controle sem tratamento; entre uma amostra tratada com uma enzima sensível à metilação comparada com uma amostra controle tratada com um isômero insensível à metilação; ou entre duas amostras testes, como por exemplo dois tecidos diferentes, ambos tratados com a mesma enzima (ZILBERMAN; HENIFOFF, 2007). Em geral, o DNA genômico cortado por enzimas de restrição sensíveis à



metilação pode ser analisado usando *Southern-hybridization* e/ou PCR (AZHIKINA; SVERDLOV, 2005).

O sequenciamento de DNA tratado com bissulfato de sódio é uma técnica que foi desenvolvida por Frommer et al.(1992) e por Clark et al.(1994) A grande maioria da pesquisa em epigenética emprega essa técnica que consiste na distinção entre a 5-metil-citosina (5mC) e a citosina. O tratamento do DNA com bissulfato de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) gera o íon bissulfato ( $\text{HSO}_3^-$ ) que converte a citosina em uracila por meio de desaminação, enquanto a 5mC não é convertida devido a sua baixa reatividade se comparado com os resíduos de citosina. Por ser um análogo da timina, a uracila é reconhecida pela DNA polimerase como timina e, sendo assim, na reação em cadeia da polimerase (PCR) os resíduos de uracila são convertidos em resíduos de timina nos produtos de amplificação. Já os resíduos de 5-metil-citosina, permanecem inalterados após o tratamento com bissulfato. Durante a amplificação são produzidos polinucleotídeos nos quais os resíduos de citosina representam os resíduos de 5mC no DNA original metilado (Figura 2) (AZHIKINA; SVERDLOV, 2005; ZILBERMAN; HENIKOFF, 2007; HAYATSU, 2008a,b; SCHAEFER et al., 2008; SMITH et al., 2009).

**Figura 2** – DNA tratado com bissulfato para identificação da 5-metil-citosina ( $\text{C}^m$ ).



Fonte: HAYATSU (2008b)

Todo o tratamento com bissulfato pode ser dividido em três passos: sulfonação no qual o bissulfato é adicionado à citosina; desaminação hidrolítica que ocorre com o derivado de citosina-bissulfato gerando derivado de uracila-bissulfato; e dessulfonação, que é a remoção de um grupo sulfonado devido ao tratamento alcalino, gerando então a uracila (PATTERSON et al., 2011). Para o sucesso da técnica é necessário que ocorra uma conversão total de todas as citosinas não metiladas em uracilas e para isso é necessário atenção nas temperaturas e no

tempo de incubação para que seja preservada a integridade do DNA (FRAGA; ESTELLER, 2002). Outro fator importante é o cuidado na utilização do bissulfito, que pode oxidar facilmente em contato com o ar, produzindo radicais livres que podem quebrar a fita de DNA (HAYATSU, 2008a).

Com o avanço de criação de programas para o estudo da presença de ilhas, das técnicas e das tecnologias para o sequenciamento, a produção de conhecimento sobre a metilação do DNA de determinados sítios e de genomas completos é cada vez maior e permite cada vez mais o entendimento da função dessa modificação epigenética. Trabalhos recentes utilizam o sequenciamento de bissulfito em alta resolução e imunoprecipitação de DNA metilado (MeDIP) (ILLINGWORTH; BIRD, 2009; LI; TOLLEFSBOL, 2011).

### **3. Justificativa**

Raros são os estudos sobre o efeito de polimorfismos e epigenética em genes não-*imprinted*, exceto em humanos e camundongos. Assim, estudar esse padrão em bovinos se justifica não apenas por sua importância na produção de alimentos, mas também como modelo para ruminantes. O gene proposto, *CAST*, foi escolhido, pois uma vez que caracteres quantitativos, como as características de produção animal, são bastante influenciados pelo ambiente, mecanismos epigenéticos de controle podem estar envolvidos na determinação do fenótipo dos animais.

#### 4. Objetivos

Os objetivos deste projeto são:

- Avaliar a expressão específica de tecido, genótipo e estágio do desenvolvimento para o gene *CAST* em amostras de músculo, fígado e pele de fetos, músculo e fígado de animais adultos em bovinos homozigotos e heterozigotos para o polimorfismo A>G, no éxon 30/3' UTR do gene;
- identificar o status de metilação da região promotora do gene *CAST* por meio da identificação da presença de ilhas CpG na região promotora, tratamento do DNA com bissulfito, amplificação por PCR, clonagem do fragmento e sequenciamento de clones.
- Verificar se a expressão diferencial do gene *CAST* é regulada por metilação diferencial em seu promotor.

#### 5. Hipótese

A hipótese deste trabalho é de que existe expressão preferencial de tecido, de genótipo e de estágio do desenvolvimento para o gene *CAST* relacionado à maciez da carne em bovinos e que essa expressão preferencial é regulada por mecanismos epigenéticos de metilação da cromatina.

## 6. Materiais e Métodos

### 6.1. Obtenção das amostras

Inicialmente foram coletadas amostras de pele, músculo e fígado de 35 fetos no Frigorífico Barra Mansa em Sertãozinho- SP em três dias diferentes no mês de fevereiro de 2010. Esses tecidos foram estocados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. Os tecidos de 98 animais adultos foram coletados no Frigorífico Fribordogue em Bariri-SP em quatro dias diferentes, nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2012. Os tecidos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

Para o estudo de expressão gênica foram selecionados pele, músculo e fígado de 15 fetos de diferentes genótipos para o polimorfismo  $A > G$  no gene *CAST*, sendo cinco de cada genótipo (AA, AG e GG) e 27 amostras de fígado e músculo de animais adultos, sendo nove de cada genótipo. Para o estudo de metilação do DNA foram selecionadas nove amostras de músculo fetal, nove amostras de fígado fetal e nove amostras de músculo adulto sendo três de cada genótipo para cada tecido.

### 6.2. DNA

#### 6.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA de músculo, fígado e pele de fetos e músculo e fígado de animais adultos para genotipagem e para utilização no estudo da metilação da ilha CpG foi realizada segundo o protocolo adaptado de SATO et al. (2003), descrito a seguir.

Primeiramente o tecido (100 – 200 mg) foi macerado com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido com posterior transferência para um microtubo de 2,0 mL. Em cada microtubo foi adicionado 1,5 mL de tampão de digestão (100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de EDTA pH 8,0, 0,2% de SDS, 200 mM de NaCl e 0,1 mg/mL de Proteinase K) com posterior homogeneização, incubação a  $56^{\circ}\text{C}$  *overnight*, em thermomixer e separação da amostra em dois microtubos de 2,0 mL. A cada tubo foi adicionado 1 mL de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1) seguido por vórtex de 15 segundos e centrifugação, à temperatura ambiente, a  $16.000 \times g$  por 5 minutos para a separação de duas fases. A fase aquosa superior dos dois tubos foi transferida para um novo tubo no qual foi

acrescentado 1 mL de isopropanol 100% à temperatura ambiente seguido de inversão dos tubos, gentilmente, por 50 vezes. Para a obtenção do *pellet*, o DNA foi centrifugado a 16.000 xg por 15 minutos com posterior descarte do sobrenadante. Para a lavagem do *pellet*, foi adicionado 1 mL de etanol 70%, à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 16.000 xg por 5 minutos e descarte do sobrenadante. O *pellet* foi mantido à temperatura ambiente para secagem deixando o tubo invertido sobre papel filtro por 2-3 horas. Para ressuspensão do DNA foram adicionados 200 µL de TE-RNase (2 µg de RNase), o DNA foi incubado a 37°C por 1 hora em thermomixer e armazenado em freezer a -20°C.

### 6.2.2. Avaliação da quantidade e qualidade do DNA

A avaliação da concentração e da pureza (razão absorvância  $A_{260}/A_{280}$ ) do DNA extraído foi realizada por meio de espectrofotômetro NanoDrop®. As amostras que possuíam razão 260/280 superior a 1,80 foram consideradas puras. A integridade do DNA foi analisada por meio da realização de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observado em transiluminador UV. Nos géis foi avaliada a intensidade luminosa de uma única banda íntegra. Após as avaliações, o DNA foi armazenado em freezer a -20°C.

### 6.3. Desenho de primers e sondas

Foi realizado o desenho de *primers* para a genotipagem dos animais, análise da expressão gênica e para a amplificação do DNA tratado com bissulfito (Tabela 1).

As sequências de DNA utilizadas para o desenho dos primers e sondas foram retiradas de duas bases de dados: Ensembl (FLICEK et al., 2012; EMSEMBL, 2013) (ENSBTAG 00000000874) e GenBank (BENSON et al., 2005, GENBANK, 2013) acesso número AH014526.1.

Para a genotipagem do polimorfismo do tipo SNP em região codificadora do gene *CAST* por discriminação alélica em PCR em tempo real foram utilizados *primers* e sondas (sistema *TaqMan*®) sintetizados por meio da contratação do serviço *Assay-by-design* (Applied Biosystems).

Para o desenho dos *primers* para análise de expressão gênica foi utilizado o software *Primer 3 Plus* (UNTERGASSER et al., 2007, PRIMER3PLUS, 2013). Após a construção, foi realizada a avaliação das sequências dos *primers*, a análise das temperaturas de anelamento e

da presença de estruturas secundárias como *hairpins* e dímeros pelos softwares NetPrimer (NETPRIMER, 2013) e OligoAnalyzer (OLIGOANALYZER, 2013). Para a verificação da especificidade de cada *primer* foram utilizados dois softwares, BLAST (MOUNT, 2007; BLAST, 2013) e Primer BLAST (YE et al., 2012; PRIMERBLAST, 2013).

O desenho de *primers* para a amplificação do DNA tratado com bissulfito foi feito manualmente e sua avaliação e verificação de qualidade foi realizada por meio dos programas mencionados anteriormente.

**Tabela 1** – Sequências dos *primers*, tamanho dos produtos de amplificação e número de acesso no GenBank.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento	GenBank
CAST B 415 F CAST B R	TTAGGGTGTGAGTTGTAAATAGGTAG AAAAAACTAACCTCCTCTAAAAATAAACC	415 bp	AH014526.1
CAST3UF_Seq CAST3UR_Seq	TTGCCTTCAGTTGGGAGAGA ACAAGGTGCGGAAGTCCTAA	422 bp	AF159246.1
CASTF_Exp	TGCTAATCGTAGAGACCCTGGACA	96 bp	L14450
<i>GAPDH</i> F <i>GAPDH</i> R	GCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT	118pb	NM_001034034
Tubulina_F Tubulina_R	CAGAGCAAGAACAGCAGCTACTT GTGAACTCCATCTCGTCCATGC	227 bp	NM_001077127
H2A_F H2A_R	GTCGTGGCAAGCAAGGAG GATCTCGGCTGTCAGGTACTC	182 bp	BC151734
Actina_F Actina_R	GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	78 bp	AY141970
<i>RPS-9</i> F <i>RPS-9</i> R	GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA GGGCATTACCTTCGAACAG	108 pb	NM_001101152
<i>RPL-19</i> F <i>RPL-19</i> R	ACCTGGATGAGGAGGATGAG GTACAGGCTGTGATACATGTGG	93 pb	NM_001040516

#### 6.4. Genotipagem em PCR em tempo real

O polimorfismo estudado no gene *CAST* é uma troca de adenina por guanina no éxon 30/3' UTR (L14450) do cromossomo bovino sete (BTA 7). O sistema *TaqMan*®, baseado no uso de sondas de hidrólise, foi a ferramenta selecionada para a discriminação alélica em tempo real. Os *primers* e as sondas utilizados no ensaio estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Sequências (5'-3') dos *primers* e das sondas utilizadas para a genotipagem do polimorfismo no gene *CAST* bovino e tamanho do produto de amplificação do DNA e do RNA.

<i>Primers</i> (5'-3')	Sondas*(5'-3')	Produto DNA e RNA
TTTGACATTCTCCCCACAGT CGTGAGGCATCGTTTTCCAAATG	VIC – AATAAGTGCAAATTTGAAAAT (A) FAM – AGTGCAAATCGAAAAT (G)	94pb

\*Identificação dos fluoróforos (VIC ou FAM), do alelo específico (A ou G) para a sonda e do sítio de anelamento ao **SNP**.

As reações de PCR para discriminação alélica foram realizadas no termociclador ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems) e consistiram em 1X *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 1X ensaio *TaqMan* contendo os *primers* e as sondas e 15 ng de DNA em volume final de 5 µL. A reação consiste de 4 etapas: uma etapa de pré-leitura (*pre-read*), que consiste na leitura basal da fluorescência da placa a 60°C por 1 minuto; uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos; uma etapa de ciclagem que consistiu em 45 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e, para finalizar, uma etapa de pós-leitura (*post-read*) a 60°C por 1 minuto para discriminação dos alelos. Após a finalização das etapas o software 7500 v2.0.5 permitiu a visualização dos resultados da genotipagem.

## 6.5. RNA

### 6.5.1. Extração de RNA

A avaliação da expressão gênica foi realizada utilizando cDNA obtido a partir de RNA extraído de pele, músculo, fígado fetais e músculo e fígado de animais adultos. A extração de RNA foi feita com Trizol® (Invitrogen) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Primeiramente amostras de, aproximadamente, 100mg de tecido foram maceradas utilizando-se almofariz e pistilos, sempre mantendo as amostras embebidas em nitrogênio líquido. Após a maceração, o tecido foi transferido para um microtubo ao qual foi adicionado 1 mL de Trizol®. Após 5 minutos em temperatura ambiente foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio ao tubo que passou por agitação por 15 segundos, foi mantido por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi formado um gradiente de três fases (superior incolor, intermediária branca e inferior vermelha). A fase superior (incolor), cerca de 600 µL, foi destinada à extração de RNA.

Após a retirada da fase superior e a transferência para novo tubo, foi acrescentado 0,5 mL de álcool isopropílico para a precipitação do RNA, seguido por inversão por 10 vezes, manutenção por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% (preparado em água DEPC), misturado em vórtex e centrifugado a 7.500 xg por 5 minutos a 4°C. Após secagem do *pellet* ao ar, o RNA foi dissolvido com 50 µL de água livre de RNase (água DEPC) e incubado por 10 minutos a 55°C. O armazenamento foi feito a -80°C para preservar a integridade do RNA.

#### 6.5.2. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA

A avaliação da concentração e da pureza (razão absorvância  $A_{260}/A_{280}$ ) do RNA extraído foi realizada por meio de espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup>. As amostras de RNA que possuíam razão 260/280 superior a 1,80 foram consideradas puras. A integridade do RNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Nos géis de RNA foram avaliadas as intensidades luminosas das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Após as avaliações, o RNA foi armazenado em freezer a -80°C para posterior utilização.

#### 6.6. Transcrição reversa (RT-PCR)

A obtenção do cDNA foi feita por meio de transcrição reversa com o *kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Para tanto, uma mistura contendo 1 µg de RNA total, 2,5 µM de oligo(dT), 1 µL de tampão de anelamento, em volume final de 8 µL, foi incubada a 65°C por 5 minutos e colocada em gelo. Em seguida, foi acrescentado 1X de *First Strand Reaction Mix* (5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 mM de cada dNTP) e 2 µL *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix*, para que o volume final da reação atingisse 20 µL. Os tubos foram incubados a 50°C por 50 minutos e a 85°C por 5 minutos e refrigerados em gelo. O cDNA, obtido na concentração de 50 ng/µL, foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

#### 6.7. Expressão gênica

##### 6.7.1. Expressão gênica em PCR em tempo-real



A avaliação da expressão gênica relativa foi feita no termociclador ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems) com a seguinte reação de PCR: 1X de *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 0,2 mM de cada *primer forward* e *reverse* (Tabela 1) e 10 ng de cDNA, em volume final de 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas no ensaio *ddCt (Relative Quantification) Plate*. A termociclagem foi constituída de uma etapa a 50°C por 2 minutos, uma etapa a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minutos, finalizando com uma etapa da curva de dissociação. Foram avaliadas as curvas de amplificação e de dissociação e os  $C_q$  (*quantification cycles*) obtidos por meio do software 7500 v2.0.5.

Para verificar as diferenças no nível de expressão gênica entre os grupos estudados, optou-se pelo método de quantificação relativa (PFAFFL, 2001). Esse método é baseado na quantificação dos transcritos do gene de interesse em relação a um gene referência.

A razão de expressão relativa é baseada na eficiência de amplificação e na variação do  $C_q$  do grupo desafiado, em relação ao grupo controle. A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa:

$$Raz\tilde{a}o = \frac{\left(E_{gene\ alvo}\right)^{Cq\ gene\ alvo\ (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}{\left(E_{gene\ refer\tilde{e}ncia}\right)^{Cq\ gene\ refer\tilde{e}ncia\ (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}$$

em que:

$E_{gene\ alvo}$  = eficiência de amplificação do gene alvo

$E_{gene\ refer\tilde{e}ncia}$  = eficiência de amplificação do gene referência

$C_q$  = Ciclo de detecção do produto amplificado

O cálculo da razão para cada gene, foi realizado com o software desenvolvido por Pfaffl et al. (2002), denominado *Relative Expression Software Tool (REST®)*. Esse software avalia a significância das diferenças de quantificação do mRNA, ou seja, das diferenças de  $C_q$  dos genes estudados, entre os grupos experimentais, por meio de uma análise não-paramétrica. O teste utilizado é denominado *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test®*. Em todas as análises estatísticas, a significância considerada foi  $p < 0,05$ .

### 6.7.2. Escolha do gene referência

Para a avaliação da expressão gênica relativa, inicialmente é recomendado escolher o melhor gene referência para a normalização dos dados. Para identificar o melhor gene referência, foram utilizados seis genes candidatos retirados da literatura: *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase),  $\beta$ -actina, histona H2A, tubulina, *RPL-19* (proteína ribossomal 19) e *RPS-9* (proteína ribossomal S9).

Para os tecidos de fetos (pele, músculo e fígado), os primeiros a serem analisados, foram avaliados os seis genes referência, enquanto para os tecidos dos animais adultos foram avaliados quatro genes referência, *GAPDH*,  $\beta$ -actina, *RPS-9* e *RPL-19*. As sequências dos *primers* utilizados para a avaliação da expressão desses genes com o corante SYBR em PCR em tempo real, os sítios de anelamento na sequência do cDNA e o tamanho dos produtos de amplificação encontram-se descritos na Tabela 1.

Na seleção de um gene referência para os estudos de expressão gênica utilizamos os critérios de uniformidade e estabilidade dos níveis de expressão. A análise foi realizada por meio da comparação dos  $C_{qs}$  do gene referência em várias amostras e tratamentos.

Para a verificação da uniformidade e estabilidade dos níveis de expressão foi feita a comparação dos  $C_q$ s do gene referência em três amostras de cada tecido. Para os tecidos dos fetos, foram utilizadas as amostras 1, 5 e 8 de pele, 3, 9 e 19 de músculo e 1, 14 e 28 totalizando nove amostras. Para os tecidos de animais adultos foram utilizadas as amostras 3 (primeiro abate), 11 e 13 (segundo abate) de fígado e 19 (primeiro abate), 6 e 9 (segundo abate) de músculo. As amostras foram destinadas à amplificação de forma semelhante à descrita para eficiência de amplificação, mas com utilização de 10 ng de cDNA. As amplificações foram realizadas no ensaio *Quantitation- Comparative Ct* ( $\Delta\Delta Ct$ ) com a seguinte termociclagem: um ciclo a 50°C por 2 minutos, um ciclo a 95°C por 10 minutos, uma etapa de ciclagem com dois passos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, uma etapa de curva de dissociação (*melting*) com 4 passos, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. As curvas resultantes foram analisadas quanto à amplificação e a especificidade das curvas de dissociação, e os  $C_{qs}$  obtidos foram analisados.

Os valores de  $C_q$  foram utilizados de duas formas. Primeiramente foi feita a estatística descritiva dos valores de  $C_q$  para cada gene, utilizando o Excel, para escolher o gene com os menores erros e desvios. Finalmente, para a avaliação dos valores de  $C_q$  nos programas BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), Norm Finder (ANDERSEN et al., 2004), geNorm

(VANDESOMPELE et al., 2002) e pelo método de comparação do  $\Delta C_t$  (SILVER et al., 2006) foi utilizada a ferramenta RefFinder (REFFINDER, 2013), que permite a obtenção dos resultados de todos os programas em apenas uma etapa de análise.

### 6.7.3. Eficiência de Amplificação

O teste de eficiência de amplificação foi realizado com todos os genes estudados tanto para amostras de feto quanto para amostras de animais adultos. Para os tecidos fetais utilizamos as amostras pele 8, músculo 9 e fígado 14 e para os tecidos de animais adultos músculo 13 (abate 2) e fígado 14 (abate 1). Para o preparo da curva padrão de diluição, o cDNA de cada amostra escolhida foi submetido a 5 diluições (1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625). As diluições foram submetidas à amplificação em duplicata em PCR em tempo real no termociclador ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems), utilizando 1X de *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, e 0,2  $\mu$ L de cada diluição do cDNA em duplicata em volume final de 20  $\mu$ L. A amplificação foi feita no programa *Quantification- Standard Curve* com a seguinte ciclagem: um ciclo a 50°C por 2 minutos, um ciclo a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, com inclusão da curva de dissociação ao término da ciclagem. Após amplificação, foram avaliadas as curvas de amplificação e de dissociação. Para o cálculo dos valores de eficiência de amplificação dos *primers*, os dados de fluorescência a cada ciclo foram exportados do software 7500 v2.0.5 e foram utilizados nas análises de regressão linear para estimar a eficiência das reações de PCR quantitativos em tempo real no software LinRegPCR (RUIJTER et al., 2009).

### 6.8. Identificação de Ilhas CpG na região promotora por meio de bioinformática

As sequências do gene *CAST* utilizadas para a identificação de sequências alvo para estudo de modificações epigenéticas são as mesmas descritas anteriormente. Para a análise da presença de ilhas CpG foram utilizados os programas Emboss Cpplot (EMBOSS CPGPLOT, 2013) CpG Island Searcher (TAKAI; JONES, 2003; CPG ISLAND SEARCHER, 2013) e Methyl Primer Express (Applied Biosystems). No primeiro foram utilizados os seguintes parâmetros: tamanho  $\geq 200$ pb, porcentagem de GC  $\geq 50\%$  e conteúdo de GC observado/esperado  $\geq 0,6$ ; enquanto no CpG Island Searcher e no Methyl Primer Express os parâmetros utilizados foram o tamanho  $\geq 500$ pb, porcentagem de GC  $\geq 55\%$  e conteúdo de GC observado/esperado  $\geq 0,65$ .

A partir desses resultados foi selecionadas uma ilha CpG para estudo de modificações epigenéticas no gene *CAST*.

## **6.9. Estudo da Metilação**

### **6.9.1. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio**

Para o estudo da metilação da ilha CpG encontrada, o DNA foi tratado com bissulfito de sódio por meio da utilização do *kit* Imprint® DNA Modification Kit (Sigma) segundo o protocolo do fabricante. Para a conversão, foi utilizado até 1µg de DNA, quantidade máxima especificada para a utilização do *kit*. Para tanto, primeiramente foi adicionado 1,1 mL de *DNA Modification Solution* a um frasco de *DNA modification Powder* que passou por agitação. A esse frasco foram adicionados 40 µL de *Balance Solution*. Em um tubo de microcentrifuga foram acrescentados 10 µL de DNA, com concentração de aproximadamente 100 ng/µL, e ao tubo foram adicionados 110 µL da solução preparada inicialmente. O tubo passou por agitação breve e foi incubado a 99°C por 6 minutos seguido por incubação imediata a 65°C por 90 minutos.

Para a limpeza do DNA, após a modificação, foram utilizados tubos e colunas integrantes do *kit*. Na coluna foram colocados 300 µL de *Capture Solution* permanecendo por 1 minuto até a adição da solução de DNA modificado da etapa anterior. O tubo passou por centrifugação a 12.000 xg por 20 segundos e a solução presente no tubo foi descartada. À mesma coluna foram adicionados 200 µL de *ethanol- diluted cleaning solution* com posterior centrifugação a 12.000 xg por 20 segundos e adição de 50 µL de *balance/ethanol wash solution* deixando à temperatura ambiente por 8 minutos. Após centrifugação a 12.000 xg por 20 segundos o eluato foi descartado e à coluna foram adicionados 200 µL de etanol 90% com posterior centrifugação a 12.000 xg por 20 segundos, adição do mesmo volume de etanol 90% e centrifugação 12.000 xg por 40 segundos. Após esses passos a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionado 20 µL de *Elution Solution* à coluna com incubação de 1 minuto e centrifugação a 12.000 xg por 20 segundos. Após o descarte da coluna, o DNA eluído foi armazenado em freezer a -20°C.

### **6.9.2. Amplificação de DNA tratado com bissulfito de sódio**

Para a amplificação do DNA tratado com bissulfito foram desenhados *primers* (Tabela 1) para um fragmento de 415pb, que compreende parte da ilha CpG estudada. O desenho dos *primers* para DNA tratado com bissulfito é crítico para o sequenciamento subsequente das amostras. A temperatura de anelamento dos *primers* deve ser entre 55 e 65°C com diferença entre eles de +/- 3 °C. O tamanho deve ser em torno de 25 e 30 nucleotídeos, e o tamanho do fragmento deve ser em torno de 200 a 400pb, pois pode ocorrer degradação do DNA devido ao tratamento com bissulfito. Os *primers* não devem conter dinucleotídeos CpG pois todas as citosinas devem ser convertidas em timinas, porém, para aumentar a especificidade dos *primers*, é importante que possua citosinas (FERNANDEZ-FERNANDEZ; ESTELLER, 2007; TIERLING et al., 2007; LI; TOLLEFSBOL, 2011). Todos esses critérios foram obedecidas no estudo.

Para a amplificação do fragmento de 415pb foi realizada uma PCR com a utilização de 1X de tampão, 0,25 µM dos *primer* CAST B 415 F e CAST B R (Tabela 1), 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen), em volume final de 30 µL. A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, amplificação em 40 ciclos, com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento foi definida após a realização prévia de PCR com gradiente de temperaturas no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradiente*. A amplificação das amostras foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observado em transiluminador UV.

### 6.9.3. Sequenciamento direto do DNA tratado com bissulfito

Foi realizado o sequenciamento de duas amostras tratadas com bissulfito: fígado de feto 14 e músculo de feto 18. Primeiramente os produtos de amplificação foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (USB) segundo protocolo do fabricante. Foram misturados 5 µL de produto de PCR com 2 µL de ExoSAP-IT, com posterior incubação em termociclador a 37°C por 15 minutos e inativação a 80°C por 15 minutos. O DNA resultante dessa purificação foi submetido à reação de sequenciamento com a utilização de 1 µL do DNA purificado, 0,5X de tampão de sequenciamento, 0,5X de *BigDye Terminator v3.1*, 0,4 µL de *primer*, sendo uma reação para cada *primer, forward e reverse*, em volume final de 10 µL. A termociclagem dessa etapa consistiu de um ciclo de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 54°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. O produto

de sequenciamento foi precipitado uma vez com isopropanol 65% e duas vezes com etanol 60%. Após a secagem, as amostras foram submetidas à desnaturação com formamida, em termociclador a 95°C por 5 minutos e destinadas ao sequenciamento em capilar no *ABI 3100 Avant* (Applied Biosystems), com capilar de 50 cm e polímero *POP6*.

Para a análise dos eletroferogramas gerados, foram utilizados três programas: *base calling* Phred, Phrap e Consed. O Programa *base calling* Phred reconhece os dados de cromatogramas gerados pelo aparelho e identifica a sequência de DNA, atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. O programa de montagem Phrap (*Phragment Assembly Program*) agrupa e organiza as sequências em *contigs*. A visualização das sequências foi realizada pelo programa Consed.

#### 6.9.4. Clonagem e sequenciamento de DNA tratado com bissulfito

O fragmento amplificado por PCR após tratamento do DNA com bissulfito foi clonado com o kit pTZ57R/T (Thermo Scientific) e sequenciado pela empresa Genomic – Engenharia Molecular, São Paulo-SP. Para cada amostra em análise foram sequenciados 10 clones totalizando 270 sequências, 90 de músculo fetal e 90 de fígado fetal e 90 de músculo adulto.

#### 6.9.5. Análise das sequências de DNA tratado com bissulfito

As sequências obtidas após a clonagem e sequenciamento passaram por uma análise para verificação da qualidade da sequência com o *base calling* Phred, para retirada das sequências de *primers* dos vetores e retirada de nucleotídeos não identificados (X).

Para o estudo da metilação foi utilizado o software BiQ Analyzer (BOCK et al., 2005; BIQ ANALYZER, 2013) que seleciona as sequências em três etapas, após alinhamento. Na primeira etapa o programa identifica as sequências que não foram convertidas corretamente quando tratadas com bissulfito de sódio, ou seja, algumas citosinas não metiladas não foram convertidas para timina, permanecendo somente as sequências com níveis de conversão superiores a 90%. Na segunda etapa são retirados clones idênticos para não superestimar a metilação. Na terceira e última etapa são retiradas sequências com erros, que possuam menos de 80% de identidade com a sequência genômica estudada (BOCK et al., 2005).

## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Genotipagem

O polimorfismo estudado foi uma troca de adenina por guanina, do éxon 30 na região 3' UTR do gene *CAST*, situado no cromossomo bovino 7 (BTA 7). A genotipagem por discriminação alélica em PCR em tempo real (Figura 3) foi realizada com todas as amostras coletadas de fetos (n=35) e animais adultos (n=98). Dos 35 fetos, 18 eram machos e 17 eram fêmeas com idade fetal (dias) aproximada entre 77,5 a 130. Dentre as amostras, foram encontrados 5 fetos AA (14,3%), 9 fetos AG (25,7%) e 21 fetos GG (60%).

Já dos 98 animais adultos, 62 eram machos e 36 fêmeas com idade (meses) entre 10 e 24. Somente as amostras de animais adultos possuíam as raças discriminadas (Tabela 3). Dessa população estudada, os animais de composição 1/2 *Bos taurus* x 1/2 *Bos indicus* apresentaram os seguintes genótipos: 1 (20%) AA, 2 (40%) AG e 2 (40%) GG; 3/4 *Bos taurus* x 1/4 *Bos indicus*: 10 (12,1%) AA, 47 (56,6%) AG e 26 (31,3%) GG; 5/16 *Bos taurus* x 11/16 *Bos indicus*: 1 (20%) AA, 1 (20%) AG e 3 (60%) GG e 9/16 *Bos taurus* x 7/16 *Bos indicus*: 3 (60%) AG e 2 (40%) GG.

**Tabela 3** – Amostras de animais adultos, suas respectivas raças e total de animais.

	Raça	Número de animais
Hereford x Senepol-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	2
Hereford x Angus-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	24
Hereford x Simental-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	18
Hereford x Nelore	1/2 <i>B. taurus</i> x 1/2 <i>B. indicus</i>	1
Pardo Suiço x Senepol-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	3
Pardo Suiço x Angus-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	1
Pardo Suiço x Nelore	1/2 <i>B. taurus</i> x 1/2 <i>B. indicus</i>	4
Canchim x Nelore	5/16 <i>B. taurus</i> x 11/16 <i>B. indicus</i>	5
Canchim x Senepol-Nelore	9/16 <i>B. taurus</i> x 7/16 <i>B. indicus</i>	4
Canchim x Angus-Nelore	9/16 <i>B. taurus</i> x 7/16 <i>B. indicus</i>	1
Charolês x Angus-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	16
Charolês x Simental-Nelore	3/4 <i>B. taurus</i> x 1/4 <i>B. indicus</i>	19

Na avaliação do mesmo polimorfismo, Casas et al. (2006) estudaram uma população de *Bos taurus* de 539 animais e encontraram 64,7 % de animais com genótipo AA, 30,8% de animais AG e 4,5% de animais GG. No mesmo trabalho também foi estudado uma população de *Bos taurus* x *Bos indicus* de 580 animais sendo 68,8% de animais com genótipo AA, 29% de AG e 2,2% de GG. Morris et al. (2006), estudaram uma população de *Bos taurus* de 746

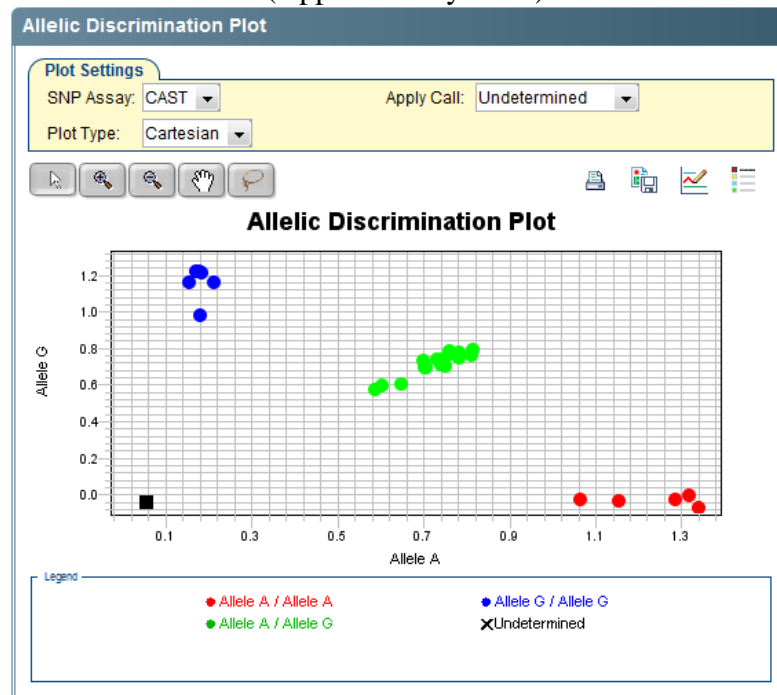
animais encontraram 89% de animais com genótipo AA, 10% de animais AG e 1% de animais GG. Curi et al. (2009) estudando uma população de *Bos indicus* (Nelore) de 114 animais, encontrou 34,2% de animais com genótipo AA, 43% de animais AG e 22,8% de animais GG. No mesmo trabalho, estudando populações de cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus* que totalizaram 186 animais, encontram 65,6% de animais com genótipo AA, 32,3% de animais AG e 2,1% de animais GG.

Esses resultados contrastam com os nossos, pois encontramos, tanto em fetos quanto em animais adultos, maior frequência de animais com genótipo GG quando comparados com animais com genótipo AA e nos três trabalhos citados anteriormente, a frequência de animais com genótipo GG foi mais baixa que a de animais AA.

Para o estudo de expressão gênica foram selecionadas amostras de pele, músculo e fígado de 15 fetos, cinco de cada genótipo AG, GG e AA. Para os animais adultos foram selecionadas 27 amostras de fígado e de músculo, nove de cada genótipo. Para o estudo de metilação do DNA foram selecionadas nove amostras de músculo fetal, nove amostras de fígado fetal e nove amostras de músculo adulto, três de cada genótipo. As amostras selecionadas de fetos seus respectivos genótipos, sexo e idade fetal estão apresentados na Tabela 4. As amostras selecionadas de adultos seus respectivos genótipos, sexo, idade e raças são apresentados na Tabela 5.



**Figura 3** – Gráfico de discriminação alélica com designação dos alelos para determinação do genótipo dos animais para o SNP no gene *CAST* em PCR em tempo real, sondas de hidrólise, no termociclador ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems)



Fonte: Arquivo pessoal

**Tabela 4** – Amostras de fetos bovinos selecionadas e respectivos genótipos para o SNP no gene *CAST*, sexo e idade fetal.

Amostra	Genótipo	Sexo	Fetos	
			Idade Fetal (dias)	Idade Fetal (meses)
1	GG	M	85	2,8
2	GG	M	77,5	2,6
3	GG	F	115	3,8
4	AA	F	92,5	3,1
5	AG	F	77,5	2,6
6	GG	F	80	2,7
8	AA	M	122,5	4,1
9	AA	M	110	3,7
13	GG	F	107,5	3,6
14	GG	F	95	3,2
16	AG	M	110	3,7
18	AA	M	125	4,2
19	AG	M	130	4,3
20	AG	M	117,5	3,9
23	AG	F	117,5	3,9
29	GG	M	77,5	2,6
34	AG	M	77,5	2,6
35	AA	F	120	4,0

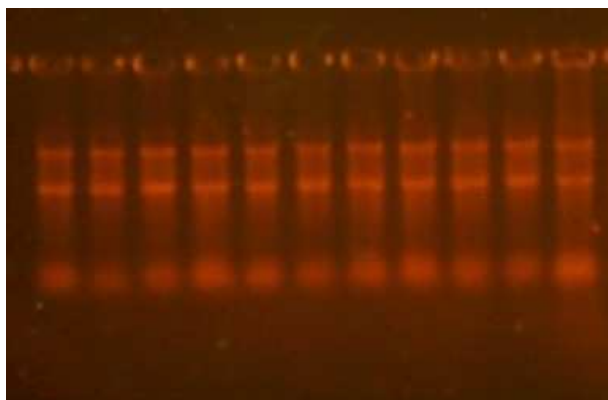
**Tabela 5** – Amostras de bovinos adultos selecionados e respectivos genótipos para o SNP no gene *CAST*, sexo, idade e raças.

Animais Adultos						
Abate	Amostra	Genótipo	Sexo	idade (meses)	Raça	
1	1	AA	M	22	Canchim x Nelore	5/16 B. taurus x 11/16 B. indicus
1	3	GG	M	20	Canchim x Senepol - Nelore	9/16 B. taurus x 7/16 B. indicus
1	8	AA	M	23	Pardo suíço x Nelore	1/2 B. taurus x 1/2 B. indicus
1	9	AG	M	22	Hereford x Nelore	1/2 B. taurus x 1/2 B. indicus
1	10	GG	M	23	Pardo suíço x Nelore	1/2 B. taurus x 1/2 B. indicus
1	14	GG	F	22	Canchim x Nelore	5/16 B. taurus x 11/16 B. indicus
1	15	GG	F	23	Hereford x Senepol - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
1	17	AG	F	23	Pardo suíço x Nelore	1/2 B. taurus x 1/2 B. indicus
1	19	AG	F	21	Canchim x Senepol - Nelore	9/16 B. taurus x 7/16 B. indicus
1	20	GG	F	22	Canchim x Nelore	5/16 B. taurus x 11/16 B. indicus
1	21	AA	F	23	Pardo suíço x Senepal - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
1	22	AG	F	21	Canchim x Senepol - Nelore	9/16 B. taurus x 7/16 B. indicus
2	1	AG	F	11	Hereford x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	2	AG	F	12	Hereford x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	6	AA	F	12	Hereford x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	7	GG	F	12	Charoles x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	9	GG	F	11	Hereford x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	11	AG	M	11	Hereford x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	12	AG	M	11	Hereford x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	13	AA	M	11	Charoles x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	15	AG	M	11	Charoles x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	16	AA	M	11	Charoles x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	26	AA	M	12	Hereford x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	29	GG	M	11	Charoles x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
2	30	GG	M	11	Charoles x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
3	15	AA	M	12	Hereford x Angus - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus
3	24	AA	M	10	Charoles x Simental - Nelore	3/4 B. taurus x 1/4 B. indicus

## 7.2. Expressão gênica

Após a seleção das amostras, extração de RNA, análise da quantidade e da qualidade (Figura 4) do RNA e RT-PCR, foi realizada a análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real.

**Figura 4** – Imagem de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S, evidenciando a integridade do RNA



Fonte: Arquivo pessoal

### 7.2.1. Escolha do gene referência

Um gene referência adequado é aquele que possui expressão constante, em nível constante, na célula ou no tecido analisado e que apresenta variação mínima da expressão entre as amostras e em diferentes condições experimentais (VANDESOMPELE et al., 2002; PFAFFL et al., 2004; ROBINSON et al., 2007; SILVER et al., 2006).

A escolha do gene referência correto para ser usado na normalização dos dados de expressão gênica relativa é um passo muito importante, pois muitos trabalhos mostraram que a expressão pode variar de acordo com as características de cada experimento como a célula, o tecido ou as condições experimentais utilizadas (VANDESOMPELE et al., 2002; SILVER et al., 2006).

Para as amostras analisadas, foi realizada a escolha do melhor gene referência para os tecidos provenientes de fetos e de adultos separadamente. Foram avaliados seis possíveis genes de referência, retirados da literatura e utilizados no laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste: *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase),  $\beta$ -actina, histona H2A, tubulina, *RPL-19* (proteína ribossomal 19) e *RPS-9* (proteína ribossomal S9).

Primeiramente foram avaliadas as curvas de amplificação e de dissociação que o software 7500 v2.0.5 disponibiliza para análise. Foram utilizadas para a avaliação três amostras, um de cada genótipo, de cada tecido. Para os tecidos de fetos, dos seis genes avaliados, foram observadas as melhores curvas para os genes *GAPDH*, *RPL-19* e *RPS-9*. Para os genes da  $\beta$ -actina e histona H2A houve muita variação de amplificação entre as

amostras e para o gene da tubulina, a curva de dissociação apresentou-se inespecífica. Para os tecidos de animais adultos foram utilizados quatro genes, e as melhores curvas foram observadas para os genes *RPS-9* e *RPL-19*. Para os genes da  $\beta$ -actina e *GAPDH* houve variação de amplificação entre as amostras.

A estatística descritiva dos valores de  $C_q$  de cada gene estão agrupadas nas Tabelas 5 e 6. Para as amostras de tecidos fetais, quando analisadas seis variáveis (média aritmética, amplitude, variância, erro padrão, desvio padrão e coeficiente de variação), a classificação dos genes para a escolha do melhor gene referência foi: *GAPDH*, *RPS-9*, *RPL-19*, tubulina,  $\beta$ -actina e histona H2A (Tabela 6). Já para as amostras de tecido adulto, quando analisadas as seis variáveis, a classificação dos genes foi: *RPS-9*, *RPL-19*,  $\beta$ -actina e *GAPDH* (Tabela 7).

**Tabela 6** – Estatística descritiva dos valores de  $C_q$  para os genes referência *GAPDH*, *RPS-9*, *RPL-19*, tubulina,  $\beta$ -actina e histona H2A em tecidos bovinos fetais.

Gene	Média Aritmética	Amplitude Total	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão	Coeficiente de variação
<i>GAPDH</i>	22,5676	1,184	0,1178	0,3433	0,1144	1,52%
<i>RPS-9</i>	17,0388	1,12	0,1406	0,3749	0,125	2,20%
<i>RPL-19</i>	16,9363	1,284	0,2247	0,474	0,158	2,80%
Tubulina	20,3378	2,535	0,6351	0,7969	0,2656	3,92%
$\beta$ -actina	20,8530	3,004	0,9262	0,9624	0,3208	4,62%
Histona H2A	25,2267	4,775	2,7828	1,6682	0,5561	6,61%

**Tabela 7** – Estatística descritiva dos valores de  $C_q$  para os genes referência *RPS-9*, *RPL-19*,  $\beta$ -actina e *GAPDH* em tecidos bovinos adultos.

Gene	Média Aritmética	Amplitude Total	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão	Coeficiente de variação
<i>RPS-9</i>	21,8289	2,4991	0,6354	0,7971	0,2301	3,65%
<i>RPL-19</i>	19,9888	2,4097	0,6287	0,7929	0,2391	3,97%
$\beta$ -actina	24,351	3,835	1,8932	1,3759	0,3972	5,65%
<i>GAPDH</i>	21,7439	3,8217	2,3335	1,5276	0,441	7,03%

Após a análise com a ferramenta RefFinder o gene *RPS-9* foi escolhido como gene referência mais estável e o mais indicado para a normalização dos dados de expressão das amostras de tecido fetal e adulto. A classificação dos melhores genes referência em cada programa pode ser observada nas Tabelas 8 e 9 e os valores de estabilidade podem ser observados nas Figuras 5 e 6.

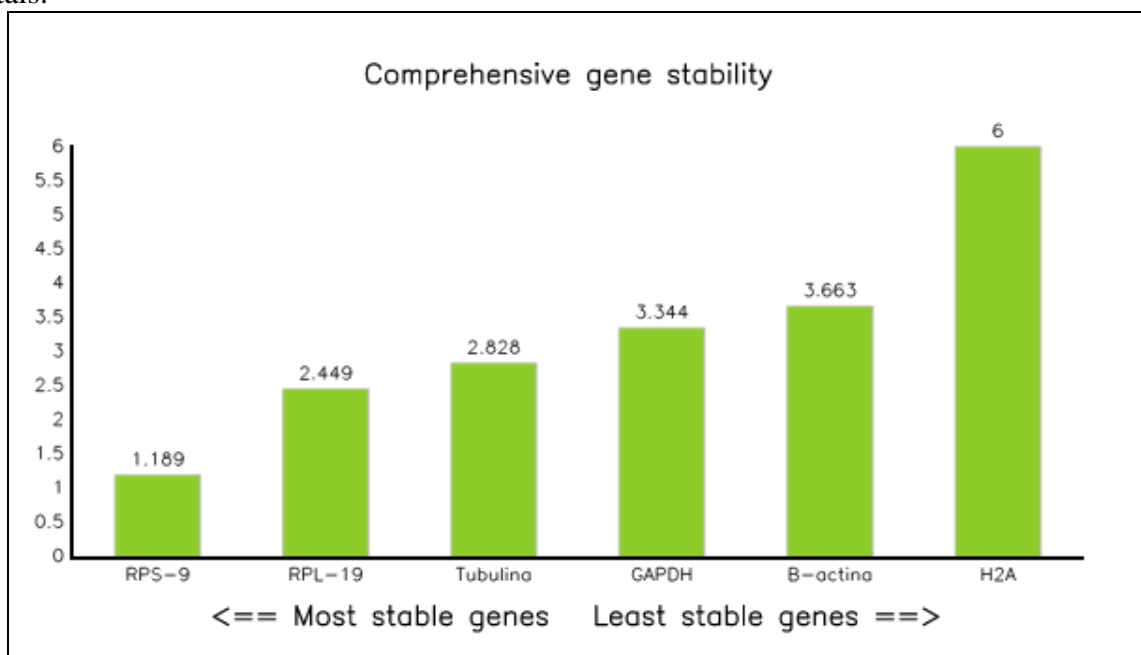
**Tabela 8** – Classificação dos melhores genes referência para tecidos bovinos fetais nos métodos Delta Ct, BestKeeper, Normfinder e Genorm.

Ranking Order (Better--Good--Average)						
Método	1	2	3	4	5	6
Delta CT	<i>RPS-9</i>	Tubulina	<i>RPL-19</i>	B-actina	<i>GAPDH</i>	H2A
BestKeeper	<i>GAPDH</i>	<i>RPS-9</i>	<i>RPL-19</i>	Tubulina	B-actina	H2A
Normfinder	<i>RPS-9</i>	Tubulina	B-actina	<i>RPL-19</i>	<i>GAPDH</i>	H2A
Genorm	<i>RPL-19</i>   <i>RPS-9</i>		B-actina	Tubulina	<i>GAPDH</i>	H2A
Recommended comprehensive ranking	<i>RPS-9</i>	<i>RPL-19</i>	Tubulina	<i>GAPDH</i>	B-actina	H2A

**Tabela 9** – Classificação dos melhores genes referência para tecidos de bovinos adultos nos métodos Delta Ct, BestKeeper, Normfinder e Genorm.

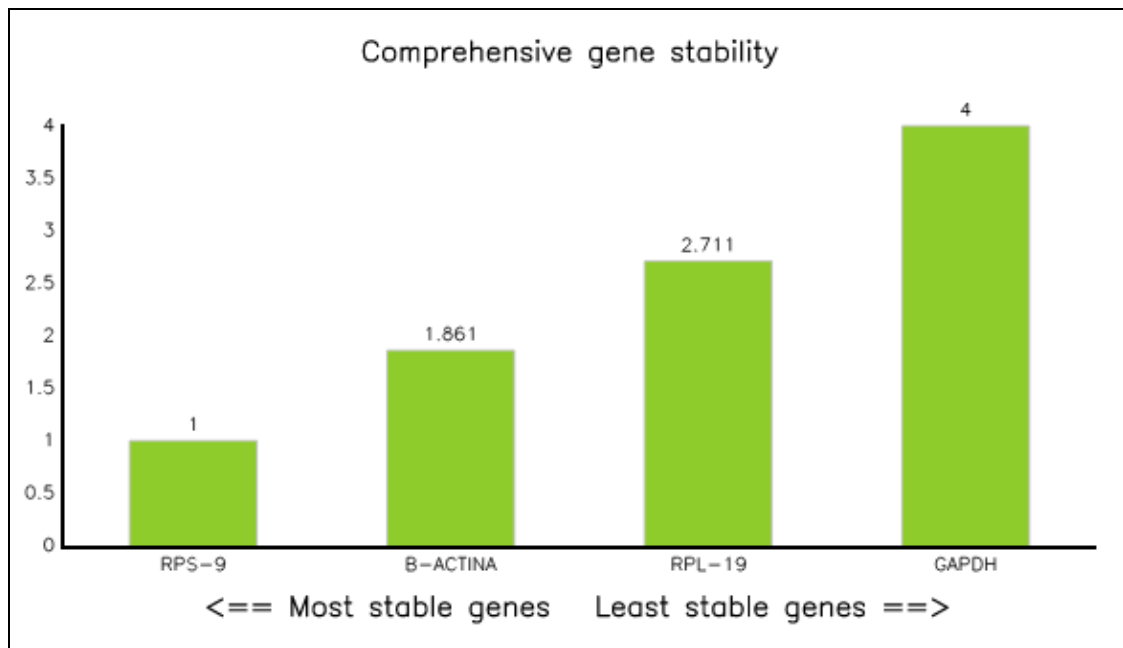
Ranking Order (Better--Good--Average)				
Método	1	2	3	4
Delta CT	<i>RPS-9</i>	ACTINA	<i>RPL-19</i>	<i>GAPDH</i>
BestKeeper	<i>RPS-9</i>	<i>RPL-19</i>	ACTINA	<i>GAPDH</i>
Normfinder	<i>RPS-9</i>	ACTINA	<i>RPL-19</i>	<i>GAPDH</i>
Genorm	<i>RPS-9</i>   ACTINA		<i>RPL-19</i>	<i>GAPDH</i>
Recommended comprehensive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

**Figura 5** – Valores de estabilidade identificados na ferramenta RefFinder para os genes referência *RPS-9*, *RPL-19*, tubulina, *GAPDH*,  $\beta$ -actina e histona H2A em tecidos bovinos fetais.



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 6** – Valores de estabilidade identificados na ferramenta RefFinder para os genes referência *RPS-9*,  $\beta$ -actina, *RPL-19* e *GAPDH* em tecidos de bovinos adultos.



Fonte: Arquivo pessoal

### 7.2.2. Eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação foi calculada para cada ensaio realizado, ou seja, para cada gene estudado. Uma eficiência de 100% ou 2 indica que cada fita molde de DNA está sendo duplicada ao final de cada ciclo, ou seja, o produto de PCR dobra a cada ciclo (PFAFFL et al., 2004). O cálculo da eficiência foi feito pelo programa *LinRegPCR* (RUIJTER et al., 2009) que utiliza uma regressão linear do logaritmo de fluorescência a cada ciclo.

Os dados de fluorescência de cada ciclo foram exportados por meio do software 7500 v2.0.5., e as eficiência de amplificação para os genes *CAST* e *RPS-9* tanto para fetos quanto para animais adultos podem ser observados na Tabela 10.

**Tabela 10** – Amplitude e média da eficiência de amplificação e amplitude de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtidos no programa *LinRegPCR* para os genes *CAST* e *RPS-9*

Tecidos	Gene	Eficiência	Eficiência media	$R^2$
Fetal	<i>CAST</i>	1,886-2,205	2,02	0,993-1,000
Fetal	<i>RPS-9</i>	1,925-2,194	2,098	-
Adulto	<i>CAST</i>	1,865-2,006	1,933	0,998-1,000
Adulto	<i>RPS-9</i>	1,902-1,959	1,929	0,999-1,000

Os dados de eficiência de amplificação foram utilizados posteriormente no programa *Relative Expression Software Tool* (REST; PFAFFL et al., 2002) para as análises de expressão gênica relativa.

### 7.2.3. Expressão gênica relativa

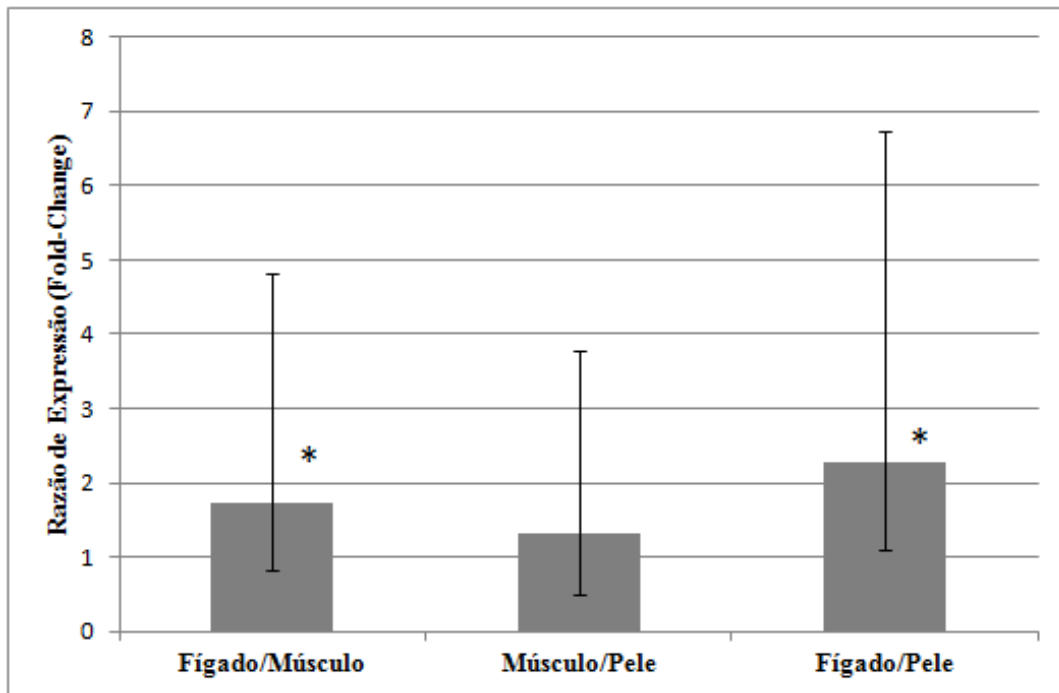
O estudo da expressão gênica relativa foi realizado em duas etapas. Inicialmente foi feita a análise da expressão de fígado, músculo e pele de fetos na qual foram utilizadas as amostras 1, 2, 3, 13 e 29 (GG); 4, 8, 9, 18 e 35 (AA) e 5, 16, 19, 20 e 23 (AG). Posteriormente foi realizada a análise da expressão de músculo e fígado de animais adultos, na qual foram utilizadas as amostras 3, 10, 14, 15 e 20 (primeiro abate), 7, 9, 29 e 30 (segundo abate), todas GG; 1, 8 e 21 (primeiro abate), 6, 13, 16 e 26 (segundo abate), 15 e 24 (terceiro abate) todas AA; 9, 17, 19 e 22 (primeiro abate), 1, 2, 11, 12 e 15 (segundo abate) todas AG (Tabela 5).

Após a seleção das amostras foi realizada a extração do RNA dos tecidos, a avaliação da qualidade por meio de gel de agarose, da concentração e da pureza em NanoDrop® e a obtenção de cDNA com utilização de transcriptase reversa (RT-PCR). O RNA apresentou, em geral, boa quantidade e qualidade, verificada pela razão A260/A280 superior a 1,80, e integridade, verificada pela presença das bandas 28S e 18S em gel de agarose corado com brometo de etídio (Figura 4).

Foram realizadas reações de amplificação por PCR em tempo real no termociclador ABI Prism® 7500 com a utilização do corante SYBR. Como dito anteriormente, o gene referência escolhido como normalizador nos experimentos foi o *RPS-9*. A expressão gênica foi realizada em duplicata para todas as amostras tanto para o gene *CAST* quanto para o gene referência *RPS-9*. Após a determinação da eficiência de amplificação para os dois genes, descrita anteriormente, foi calculada a razão de expressão e realizada a avaliação das diferenças significativas a 5% por meio da utilização do teste *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*, no REST (PFAFFL et al., 2002).

Para a análise de expressão tecido específica, foram comparadas as expressões de pele, músculo e fígado fetais e músculo e fígado adultos, normalizados para o gene referência *RPS-9* (Figura 7). Foi observado que o gene *CAST* foi duas vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em fígado do que em pele e quase duas vezes mais expresso em fígado do que em músculo, demonstrando expressão tecido específica em fetos. Já quando comparadas as amostras de músculo e fígado adultos, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dois tecidos.

**Figura 7** – Razão de expressão do gene *CAST* em fetos bovinos: músculo em relação a fígado, pele em relação a músculo e pele em relação a fígado, normalizados para o gene referência *RPS-9*.

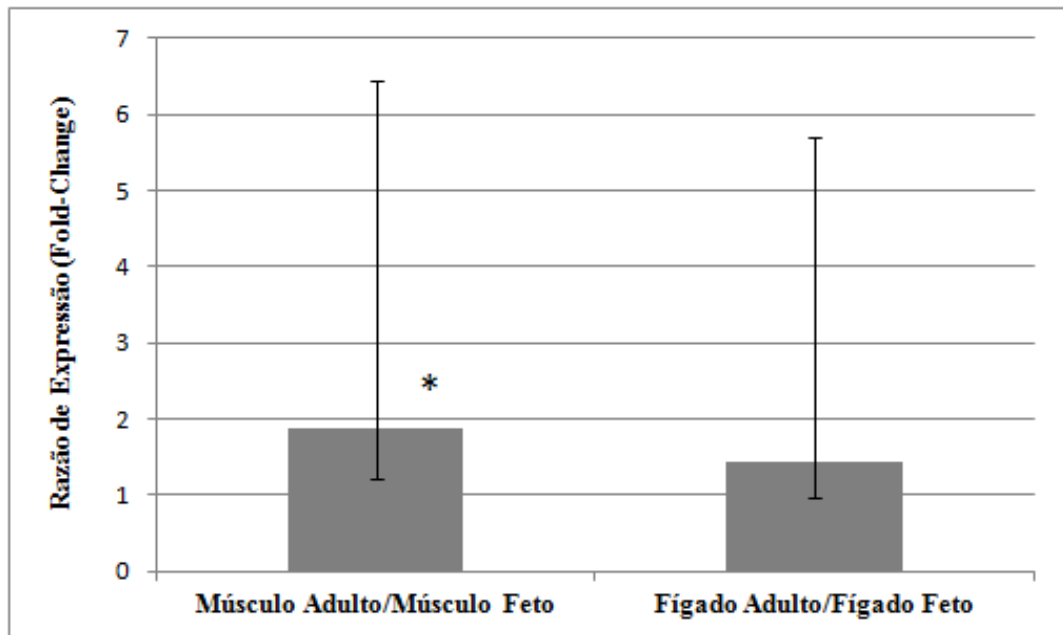


Fonte: Elaborada pela autora. As barras mostram a variação das relações entre os tecidos fetais. \* $p < 0,05$ .

Para a análise de expressão específica de estágio de desenvolvimento, foram comparadas as expressões de músculo fetal *versus* músculo adulto e fígado fetal *versus* fígado adulto para o gene *CAST*, sempre normalizadas para o gene referência *RPS-9* (Figura 8). Foi observado que o gene foi 1,83 vezes ( $p < 0,05$ ) mais expresso em músculo adulto do que em músculo fetal. Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre fígado fetal e fígado adulto.



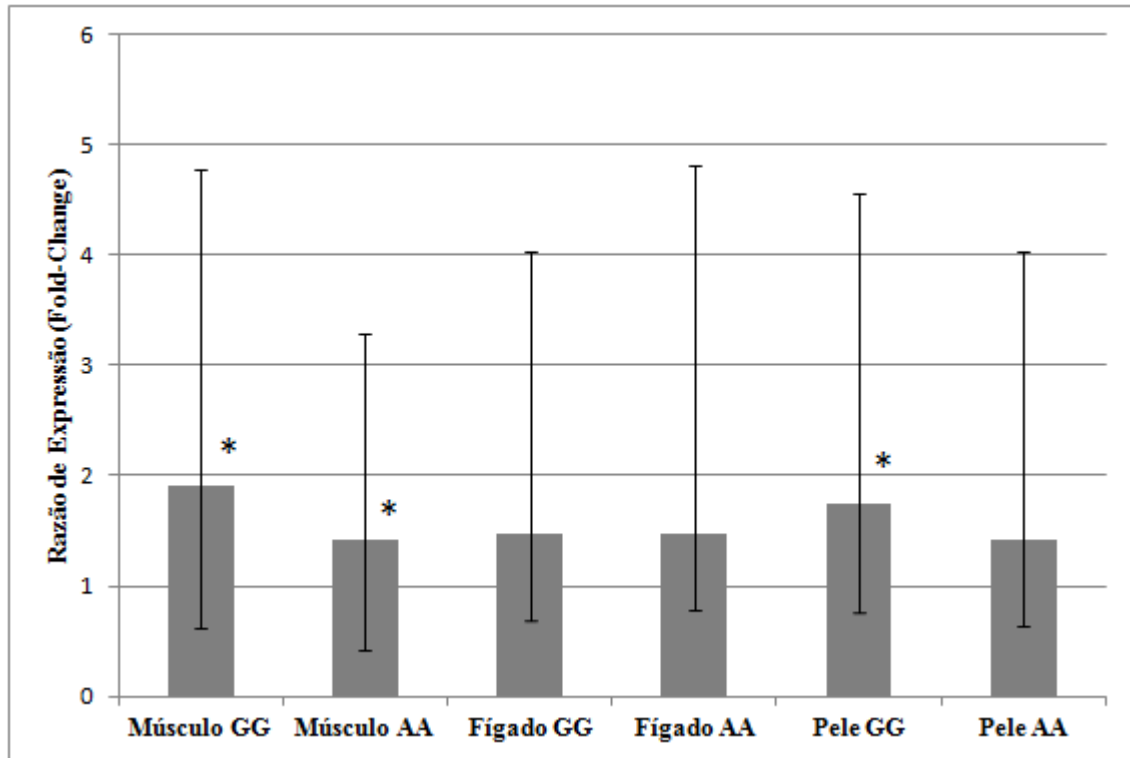
**Figura 8** – Razão de expressão do gene *CAST* bovino, músculo de feto em relação a músculo de adulto, fígado de feto em relação a fígado de adulto, normalizados para o gene referência *RPS-9*.



Fonte: Elaborada pela autora. As barras mostram a variação das relações entre os estádios de desenvolvimento. \* $p < 0,05$ .

Também foram realizadas comparações entre os genótipos das amostras (homozigotos *versus* heterozigotos). Os heterozigotos foram utilizados como calibradores e, portanto, são apresentados os resultados da relação homozigoto/heterozigoto (Figuras 9 e 10). Em amostras de fetos (Figura 9) o gene *CAST* foi aproximadamente duas vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em músculos de indivíduos homozigotos GG e 1,4 vezes mais expresso em indivíduos com genótipo AA em comparação a heterozigotos AG. Em pele de indivíduos homozigotos GG o gene *CAST* foi 1,74 vez mais expresso que em heterozigotos AG. Para os homozigotos AA em pele e fígado e GG em fígado não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação aos heterozigotos.

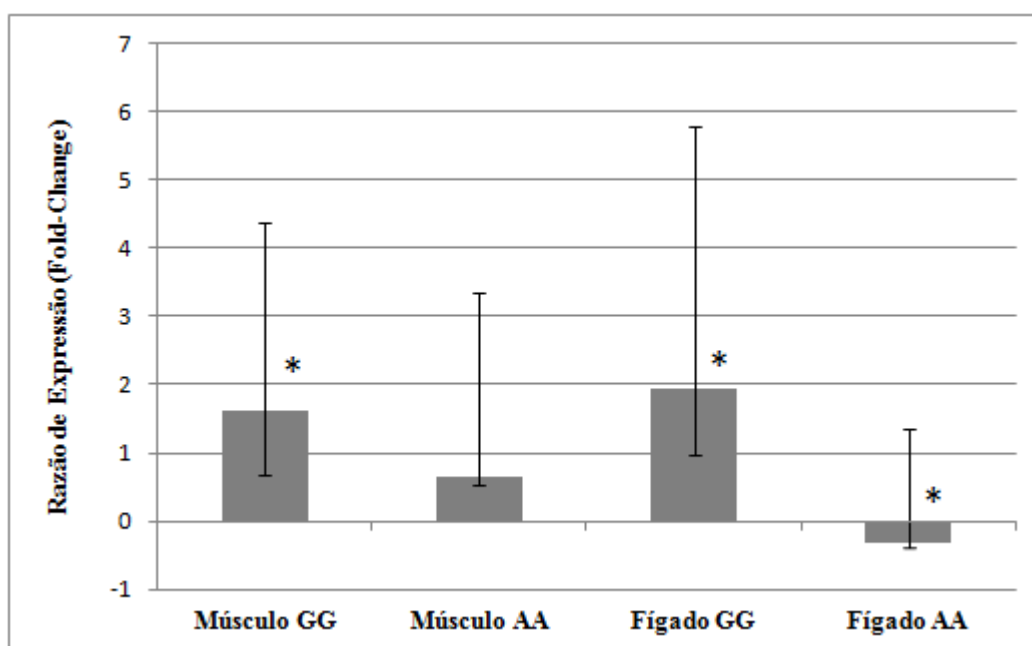
**Figura 9** – Razão de expressão do gene *CAST* em fetos bovinos: músculo de animais homozigotos em relação músculo de animais heterozigotos, fígado de animais homozigotos em relação a fígado de animais heterozigotos e pele de animais homozigotos em relação à pele de animais heterozigotos, normalizados para o gene referência *RPS-9*.



Fonte: Elaborada pela autora. As barras mostram a variação de acordo com o genótipo e o tecido (fetal), dos homozigotos (AA e GG) em relação aos heterozigotos (AG). \* $p < 0,05$ .

Em amostras de animais adultos (Figura 10) o gene *CAST* foi aproximadamente duas vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em fígado de indivíduos homozigotos GG em comparação a heterozigotos e aproximadamente 0,32 vezes menos expressos ( $p < 0,05$ ) em fígado de indivíduos homozigotos AA em comparação aos heterozigotos. Para músculo de indivíduos homozigotos GG, o gene *CAST* foi 1,63 vezes mais expresso ( $p < 0,05$ ) em comparação aos heterozigotos. Para os homozigotos AA em músculo não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação a AG.

**Figura 10** – Razão de expressão do gene *CAST* em bovinos adultos: músculo de animais homozigotos em relação músculo de animais heterozigotos e fígado de animais homozigotos em relação a fígado de animais heterozigotos, normalizados para o gene referência *RPS-9*.



Fonte: Elaborada pela autora. As barras mostram a variação de acordo com o genótipo e o tecido (adulto), dos homozigotos (AA e GG) em relação aos heterozigotos (AG). \* $p < 0,05$ .

Existem diversos trabalhos que comprovaram a associação de determinados polimorfismos com características de interesse. Tanto o gene *CAST* quanto o *CAPNI* são alvo de vários estudos de associação de SNPs e maciez no período pós-mortem (PAGE et al., 2002; WHITE et al. 2005; CASAS et al., 2005, 2006; SCHENKEL et al. 2006; CURI et al. 2009, 2010).

Para o gene *CAST*, existem trabalhos que reportam diferenças de expressão em diferentes tecidos (ILIAN et al., 1999; RAYNAUD et al., 2005b), entre diferentes músculos (ILIAN et al., 2001; MUROYA et al., 2012) e também das diferentes isoformas do gene (TAKANO et al., 2000; PARR et al., 2004; SENSKY et al. 2006).

Quando comparadas as expressões entre tecido adulto e fetal, observou-se aumento da expressão da calpastatina no músculo adulto. Zheng et al. (2011) estudando diferença de expressão da calpastatina e da miostatina entre tecido, raça e estágio de desenvolvimento em iaques (*Bos grunniens*) também encontram aumento da expressão do gene *CAST* em adultos quando comparados com bezerros.

Alguns trabalhos encontrados na literatura descrevem a participação do sistema da calpaína na regulação da diferenciação, migração e fusão de mioblastos, ou seja, no desenvolvimento muscular (GOLL et al., 2003; DARGELOS et al., 2008) e na regulação do

*turnover* de proteínas miofibrilares (GOLL et al., 2003; SENSKY et al., 2006). A calpaína é considerada uma candidata para o início da *turnover* de proteínas miofibrilares em músculo vivos e a calpastatina tem uma papel importante na inibição da calpaína e no controle dessa degradação (GOLL et al., 1992; KILLEFER; KOOHMARAIE, 1994; BARTOLI; RICHARD, 2005). Tidball e Spencer (2002), utilizando um rato transgênico que expressava mais calpastatina em músculos, demonstraram que ocorreu diminuição da calpaína, da degradação de proteínas totais e diminuição de atrofia muscular. Wheller e Koohmaraie (1992) relataram que, em tecidos musculares vivos, ocorreu diminuição da degradação de proteínas e aumento da atividade da calpastatina. Killefer e Koohmaraie. (1994) verificaram que músculos com hipertrofia devido ao aumento de agonista  $\beta$ -adrenérgico na alimentação, possuíam aumento na expressão de calpastatina. Os trabalhos mostram a importância do sistema calpaína/calpastatina e mais especificamente da regulação da calpastatina em tecidos vivos. Nesse sentido o aumento da expressão do mRNA que encontramos em tecidos adultos podem ser relacionados com a função da calpastatina em inibir a calpaína e diminuir o *turnover* das proteínas em músculos de animais vivos, podendo auxiliar tanto no desenvolvimento e na hipertrófia dos músculo (HUANG; FORSBERG, 1998), quanto na regulação da degradação de proteínas no período pós-mortem (SENSKY et al. 2006).

A diferença de expressão de mRNA entre os tecidos fetais, nos quais o fígado teve maior expressão quando comparado a músculo e pele pode ser analisada pela função que a calpastatina exerce nos hepatócitos. Limaye et al. (2006) demonstraram, em ratos, que em diversas situações de proliferação de hepatócitos e de estresse causados por algum tipo de injúria, a calpastatina apresentava expressão aumentada para prevenir a morte da célula e o aumento da injúria/dano causada pela calpaína. Nesse mesmo trabalho hepatócitos de recém nascidos exibiram grande divisão celular com aumento do fígado e da expressão da calpastatina. Em nossos resultados, a expressão não foi diferente quando comparado fígado fetais e adultos demonstrando a expressão constante do mRNA em duas etapas do desenvolvimento de bovinos podendo talvez ser explicado pela importante função da calpastatina nesse órgão durante toda a vida.

A calpastatina é o inibidor endógeno da calpaina, proteína que degrada as miofibrilas do músculo causando o amaciamento da carne pós-mortem. Alguns trabalhos de associação já demonstraram que o genótipo AA está associado a uma maior maciez da carne avaliada pela força de cisalhamento. Com o aumento da expressão da calpastatina, é provável que ocorra maior inibição da calpaína e conseqüentemente um endurecimento da carne. Barendse et al (2002) descreverem o SNP que estamos avaliando e encontram uma associação entre animais

homozigotos para o alelo A e uma diminuição da média de força de cisalhamento em comparação com animais homozigotos GG. Casas et al. (2006) encontraram uma associação entre os genótipos AG e GG com carne mais dura quando comparados com o genótipo AA. Morris et al. (2006) estudando as diferenças de força de cisalhamento também, encontraram associação entre o genótipo AA e a carne mais macia e AG com carne mais dura. Em nossas análises de expressão gênica entre os genótipos, tanto em tecido fetais (fígado e pele) quanto em tecidos adultos (músculo e fígado) o genótipo GG foi mais expresso quando comparado ao genótipo AG. O genótipo GG, portanto, pode promover um aumento da expressão do mRNA da calpastatina o que explicaria um aumento na dureza da carne, e diminuição da qualidade, que já foi associado a esse genótipo.

Lindholm-Perry et al. (2009) estudando a maciez da carne em suínos encontraram um polimorfismo no intron 19 do gene *CAST* associado com diferenças na força de cisalhamento e com a expressão do mRNA e conseqüentemente na proteína calpastatina. No mesmo trabalho os autores sugerem que a mutação causativa pode estar em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo encontrado e as diferenças de expressão podem ser explicadas por modificações da estabilidade ou na meia vida do mRNA ou pela regulação da expressão. Em outro estudo também com suínos, Galdolfi et al. (2011) estudaram a associação de um SNP no intron 6 do gene *CAST* suíno com a força de cisalhamento e mostraram que amostras de *Longissimus dorsi* com maior força de cisalhamento possuíam um expressão maior do mRNA da calpastatina, comprovando o papel do gene e sua proteína na maciez da carne.

### ***7.3. Identificação de Ilhas CpG na região promotora por meio de bioinformática***

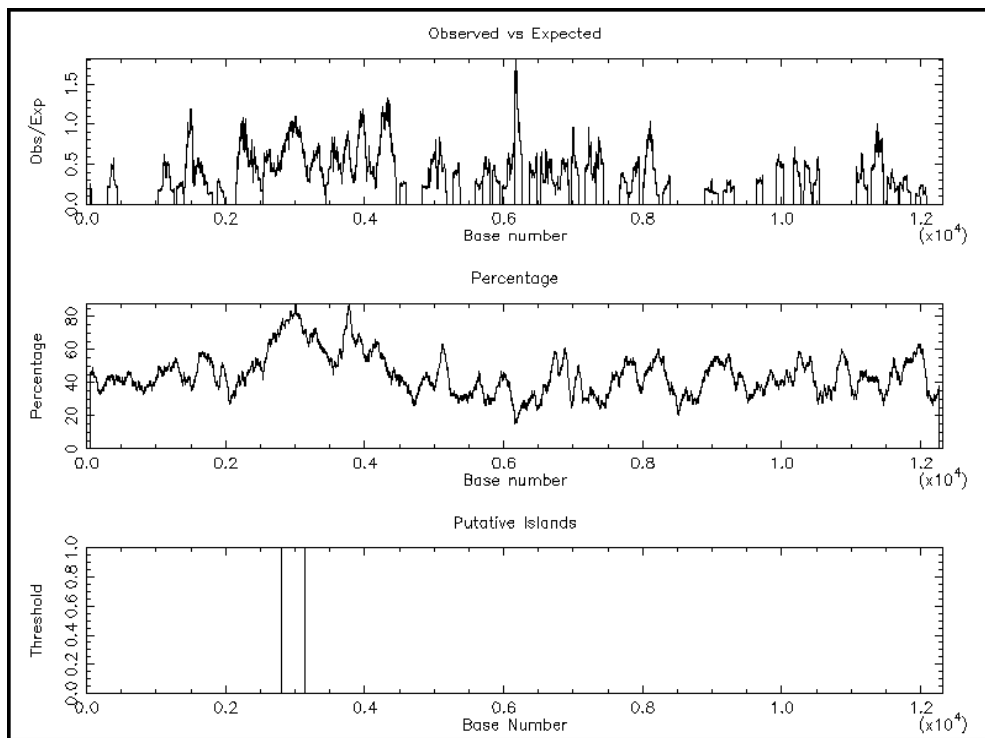
Para o estudo da região promotora do gene *CAST* foi incluída a região flanqueadora de 4000 pb (-4000 pb até o final do gene) na sequência do gene proveniente do Ensembl.

A presença de ilhas CpG foi analisada no programas Emboss Cpgplot utilizando os parâmetros mínimos para caracterizar uma ilha CpG descritos por Gardiner-Garden e Frommer (1987): tamanho  $\geq 200$ pb, porcentagem de GC  $\geq 50\%$  e conteúdo de GC observado/esperado  $\geq 0,6$ . Foi encontrada uma ilha CpG de 336 pb que se localiza da posição -202 pb até 134 pb (Figura 11).

Para os programas CpG Island Searcher e Methyl Primer Express foram utilizados os parâmetros descritos acima em uma primeira análise e os parâmetros descritos por Takai e Jones (2002): tamanho  $\geq 500$ pb, porcentagem de GC  $\geq 55\%$  e conteúdo de GC observado/esperado  $\geq 0,65$ . Os parâmetros mais restritivos são utilizados para exclusão de

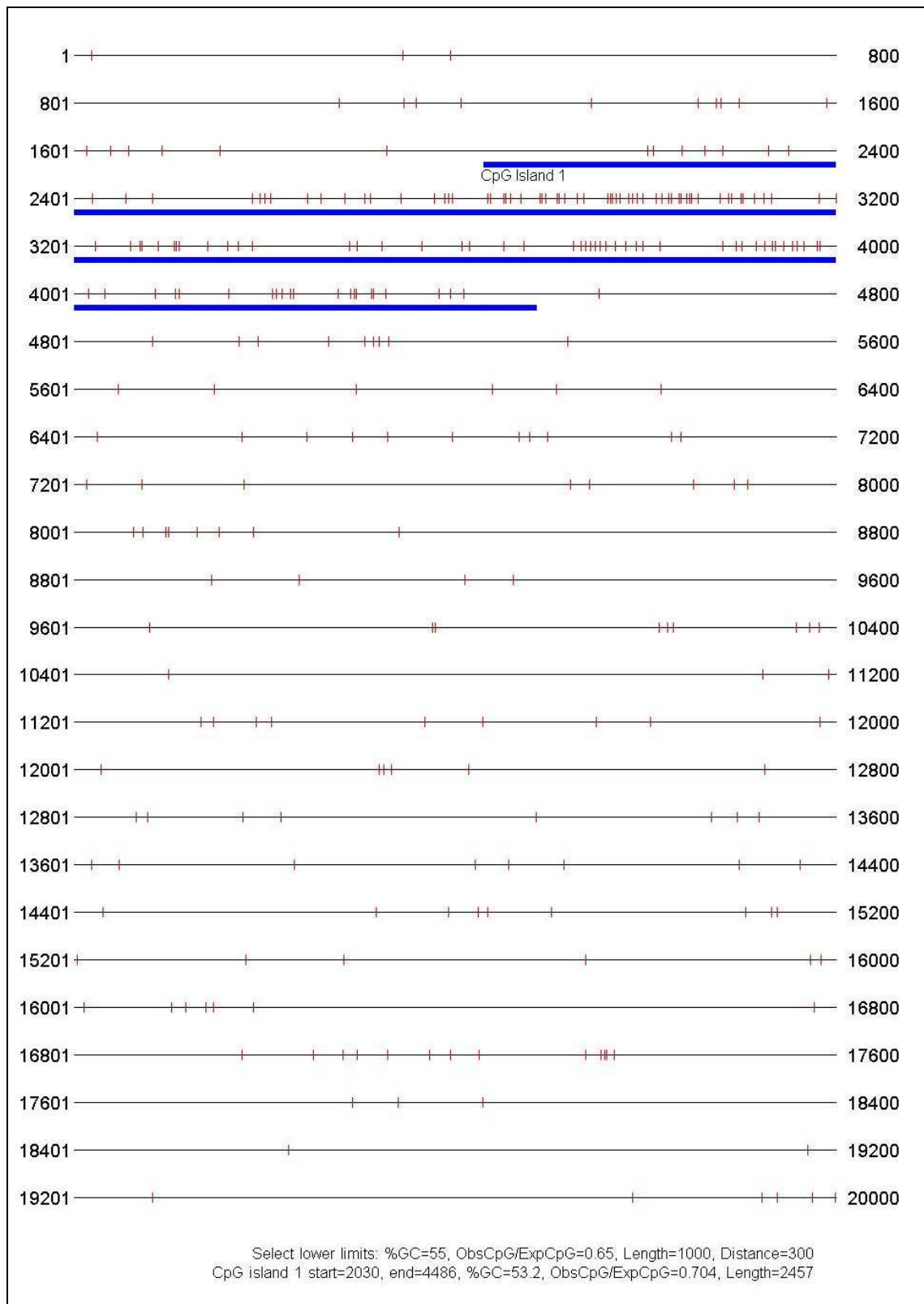
elementos repetitivos *Alu* que possuem tamanho aproximado de 280 pb, alta porcentagem de GC e alto conteúdo de GC observado/esperado (TAKAI; JONES, 2002). Para o programa CpG Island Searcher foi delimitado o tamanho máximo da ilha de 1.000 pb (TOST, 2010) e foi encontrado uma ilha de 2.457 pb que se localiza na região -971 pb até 1486 (Figura 12). Para o programa Methyl Primer Express o tamanho máximo foi de 4.000 pb (TOST, 2010) e foi encontrada uma ilha de 2.186 pb que se localiza da posição -682 pb até 1504 pb (Figura 13). A partir desses resultados foi selecionada parte da CpG de 415 pb (-252 até 163 pb) para o estudo da metilação.

**Figura 11** – Ilha CpG localizada no gene *CAST* bovino identificada pelo programa Emboss (-4000 pb até 16.000 pb).



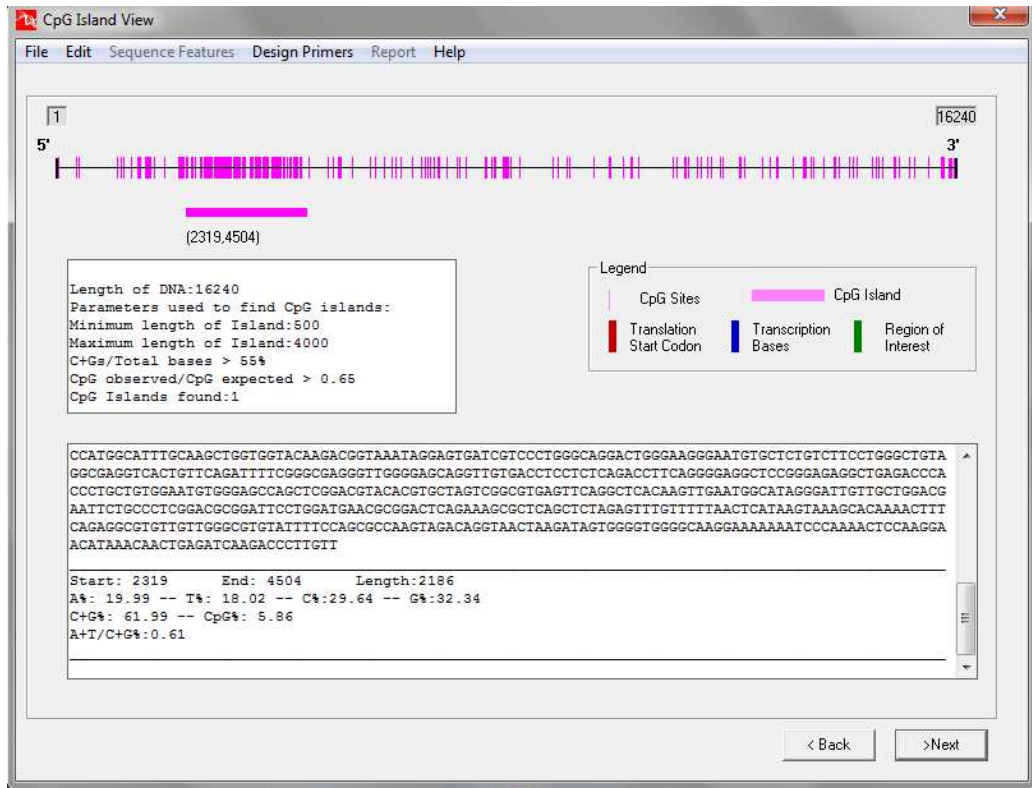
Fonte: Arquivo pessoal. Omissão das 139.270 pb finais do gene.

**Figura 12** – Ilha CpG localizada no gene *CAST* bovino identificada pelo programa CpG Island Searcher (-4.000 pb até 16.000 pb).



Fonte: Arquivo pessoal. Omissão das 139.270 pb finais do gene.

**Figura 13** – Ilha CpG localizada no gene *CAST* bovino identificada pelo programa Methyl Primer Express (-4.000 pb até 16.000 pb).



Fonte: Arquivo pessoal. Omissão das 139.270 pb finais do gene.



**Figura 14** – Ilha CpG identificada pelos programas Emboss (sublinhado), CpG Island Searcher e Methyl Primer Express (destacado na cor cinza claro) no gene *CAST* bovino, com destaque para o fragmento escolhido para amplificação (-252 pb até 163 pb, delimitado por primers destacados na cor rosa) e para os dinucleotídeos CpG (destacados na cor cinza escuro).

```

>7 dna:chromosome chromosome:UMD3.1:7:98439979:98581253:1
ACAATACACATCCTTGACGTA CTCTTTTCTATTTGGAACCAGTCTGTAGTTCCATGTCCAGTTCTGACTATTGCTTCCTGACCT
GCATACAGATTTCTCAGGAGGCAGATCAGGTGGTCTGGTATTTCCATCTCTTTTCCAGAAATTTCCACAGTTTGTGTTGATCCACATA
GTCAAAGGCTTTAGCATAGTCAATAAAACAGAAAGTAGATGTTTTCTGGGAGTTTCTTGCTTTTTCAATGATCCAAATGGATGTTGGC
AATTTAATCTCTGGTTCCCTCTGCCTTTTCTAAATCCAGCTTGAACATCAGGAAGTTCATGGTTCATGTACTGTTGAGCCTGGCTT
CGAGGATTTGAGCATCACTTTACTAGTGTGTGAGATGAGTGCAATTTGTGCGGTAGTTTGGCATTCTTTGGCATTGCTTTCTTT
GGGATTGGAATGAAAACAGCTTTTCCAGTCTGTGGCCACTTCTGAGTTTTCCAAATTTGCTGGCATTATGAGTGCAGCACTTT
AACAGCAATCATCTTTTAGGATTTGAAATAGCTCAGCTGGAATTTCCATCACCTCCACTAGCTTTGTTTCATAGTGATGCTTCCCTAAG
GCCACTTGACTTTCATTTCCAGGATGTCTAGCTCTAGATGAGTGATCACACCATCATGGTTACCTGGGTTCATGAAGATCTTTTTT
GTATAGTTTTTCTGTGATTTCTTGCCACCTCTAATGTCTTCTGCTTCTGTTAGGTCCATACCATTCTGTCTTTATTGTACCCA
TCTTTGCATGAAATGTTCCCTTGGTATCTCTAATTTTCTTGAAGAGATCTCTAGCTTTCCCATCTATTGTTTTCTCTATTTCT
TTGCATTGATCACTGAGGAAGGCTTTCTTATCTCTCCTTGCTATTCTTTGAACTCTGCATCCAAATGGGTATATCTTTCTTTTC
TCCTTTGGCTTTTGTCTCTCTTTCTTTCTAAGCAATTTTAAAGCCCTCCTCAGACACCATTTTGCTTGTGCATTTCTTTGTCTT
GGGATGGTCTGTGCTCTGTCTGTGACAAATTTGAGGCTCCCTCAGACACCATTTTGCTTGTGCATTTCTTTGTCTT
CCTTGAATCTATTTCTCACTTCCACTCCGGGAGTTTGTGACGGACAGGGAAGCCTGCATGCTGTAGTCCATAGGGTTGCAAAGAG
TCGGATATGACTGACTGAACTGAACTGAACTGATCCCACTTTCTTCTAACCACATCCACCAGCCAGTCAGCCAGCTCAAGCCTG
CTTTCCCTTCTATAGTCCCCAAACCCACAGAACCCAAATTTCCAAAGTGCCTTTGTATTTATTCACCCACTGTGTGCTTTTCA
ATGCCACCCAAATGATCATGGGTTACAAATGCTATATGACTTCAAGTGTGAAGTCCCTGGAGGGCAGGAAATACGTATTTT
AACCTTTATATCGCTCCGCTCAGACTCTTTTTCATCGTGTCTTACATGGAAGCCTTTCAAATATGACACTAGCCAGTTTAAAGCTCA
GTTTTATTTTTATTTTTGGTTGTGCTGGGTCTTCACTGCTGCGCACAGGCTTTCTCTAGTTGGACGAGGGGCACTACTCTGTTGTG
GTGCGTGGGCTTCTCATCTCTGCGGCTTCTCTTGTCTGTAAGCACAGGCTCTAGGTGCGTGGCTTCAGTAGCTGCAGCCTGTGGAC
TCAGTAGTCATGGCACAAGGGCTTACTTGCCCCGTGTAGCATGTGAAATCTTCTGGACCAGGGACCAAACCTGTGTCCCCTGCAT
TGACAGGCAGATCATTATCCACTGTACCACCAGGGAAGTCCCAAGTCCAATTTCAATACTCCATTAATAAATGACTCAGACTTTAA
TGGAACGTGTTCTTTTTCAGAGTCAGAATAATGTAAGTCTCGGGGATCTGAATCTAGGCCCTTTAGGATCCTGGGAGAGGTGGTTCCAAT
TCCTGGGCTGGAGGTAGGGCCATTATATCACTCCTTTTATGTTTGTCTTAAATTAAGTGTAGGTGTTTGGTCAACAATCATAA
AAGCATTTTTTCAGGTTTATGACATATTTTCTTTTCAATGTGAATGTAAGTCACTGATGCCATCAATCAGTTTTTCTTGAATGGGCAATCAT
AGCCCCATAATTCAGTTGATTCAAATTAATGTATAAGTTGT*CTGGCCTCCTCGAAACGAAATTCACAGCCCTCTGAAAGGGCAA
TGCGGTTTTAAATTTAGGATGTTCTTTCGGTTTTGATTTGAAACCCACGACTTGTCCACATGAAACATCATTGCACCTTTCAAACAA
GTAAAGCCGCACAAAACACACCAGGCCCGTGTGTGTACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
ATCACAACACACGGAGTCACACACAGACCAATTTGTTTCTGCAATCCGCTTCTCATCCAGAGGGTCCAGGCCCGGGCCATCTGA
GTTGGTAAATTTCTCCTCCTAGTTAACTCAGAGCAGATTGCAGAAATGCTGTCTAATTTCTTGAGATTTCTTAGGGAGTGGGGCTTGAG
ATGTAGACGGGGCCACGCCCCGGTTCGCTCTCCTTGCACAACCTGCAAGCCAAAGTCTAGGCAAGTCCGGGGGAAACCCCGCCATC
TCCAGCCCTCCTCTCTGCGACCCACTGGGGCCAAAGCCGACTCGGGTGGGTGGGGTGTCCCTGGGAGAAGATACGGGACCCA
GGGTGTGAGTTGCAAACAGGCAGCCC CGGGCTGCTGC CGCC CGGG CGCTGCCAAGTGCAGGCAGGAAGGGGAGGGCCCTGCC CGGC
CAAGGGGAGCTCTCGCGGGT CGGGCTGGGT CGGAAAAGCTGCCTCACAGG CGCG CC CGCCAGCCCTC CGCG CCCT CGCTCCCTC
CCAGCGCTCCC CGGCTCCAGCTCCCTTCCAGGCTC CGCGCG CGCCCG GAGGCAGCGCT CGCAC CGGCTC CGCATGTCCCAG
CGGGCCCGAAGCC CGCGCGCTCCC CGCGGCC CGGCGCGCTGCC CGCACCCAGGAGGTGAGTGG CGCTCCTAC CGC CGGGGT
TGAG CGCG GGGAGGATCT CGGGCCCCCGAAGCCT CGGGTCCACTTCAGAGGAGGGTTAGCCTTCC TGGCCTTCTGTCCCTGGG
CGCCACCCCTCCCAGGCCCGGAGAAACATCTGGAGAGAGACGGGTGTGGACTCAGAACCTGCCTCTGGGCAGGTGACCGGAGGGGG
CCGCGGATGGCCCTGGTCCGCGCAAGTTCACTGGGCGCGCGCACATTTGGAGTGGGCTTCCCTGGCGGCTCAGTCTGGTG
AAGAATCCGCCCTACAATGCGGGAGACTGGGCTCGTTGGTTGGGAAGATCCCTGGAGAAGGGAACCTGGCTCCCACTATCTGGC
CTGGAGAATTCCTGCCTGGATAGTCCATGGGTGGCAGAGTCAAGACGACTGAGCGACTTTTGTCTCACTTGTCACTCATGCGT
TGGGAAAAGTTGGTGGATGAGACAGGGGTGGGTGAGAAGCGGATAAGGGTAAAGGAGAATGAAATTCATTTGGGACCCCGGGGA
TTCCGGAGTCTGTAAGATCAGCAGAAAAGTCTGGTCTTCCGCCAGTCAAGGCTGCAGGGCGTGGCTGCCTGGAGCAATAACACTT
CTTCCCTAAGCAGCTTTGAGCCAAACCGGCAGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGGAGGGGGCGGGGAGAGGGCGGGG
TCAGCCGAGGGGGCGGGTCTGGGTAGGCCCGCCAGCTGTCTTGCACCCCTGACAGCCTAGGTGCTTACAGAGTTAGTCCC
AGTCAGTCTGCGGCAGGTGGAGTGCAGACCCGTGGCCCTTTGCTGCGTCCAGCCCGTGTCTCCGCGGCTTCCGGTCTCTCG
CTGCGTCTCTCGGAACACATCCATCGTCGCCATGGCATTGTCAAGCTGGTGGTACAAGACGGTAAATAGGAGTGTGCTCCCTGGG
CAGGACTGGGAAGGGAATGTGCTCTGTCTTCTTGGGCTGTAGGCGAGGTCACTGTTTCAATTTTCCGGCGAGGGTTGGGGAGCAGG
TTGTGACCTCTCTCAGACCTTCAAGGGAGGCTCCGGGAGAGGCTGAGACCCACCTGCTGTGGAATGTGGGAGCCAGCTCGGACG
TACACGTGCTAGTCCGGCTGAGTTCAAGGCTCAAGATTGAATGGCATAGGGATTGTTGTGAGCAATTTGCCCCGACCGCGGA
TTCTGGATGAACCGGACTCAGAAAGCGCTCAGCTCTAGAGTTTGTTTTTAACTCATAAGTAAAGCACAAAACCTTTCAGAGGCCGT
GTTGTTGGGCGTGTATTTTCCAGCGCAAGTAGACAGTAACTAAGATAGTGGGTGGGGCAAGGAAAAAATCCCAAACCTCAA
GGAACATAAAACAACCTGAGATCAAGACCCTTGTGAGAATGAGAGAGAGAGAGGAGACTCTATACTTTATTGCTTGGATCGGGGG
AAAGATGTTCCATTTATTTAATGCACTGAATGCTTGTCCAACATATGTAAGTGTGATATCCAGTCAAGCTGGTACTTGTAAATGTTTT
GAACCAGGAAGCATGCTTTAATATTAGGATGCTTTCCAAAATAATAA

```

Fonte: Elaborada pela autora. Omissão de 134.580 pb finais.\* omissão de sequência de 1.003 nucleotídeos não identificados (N).

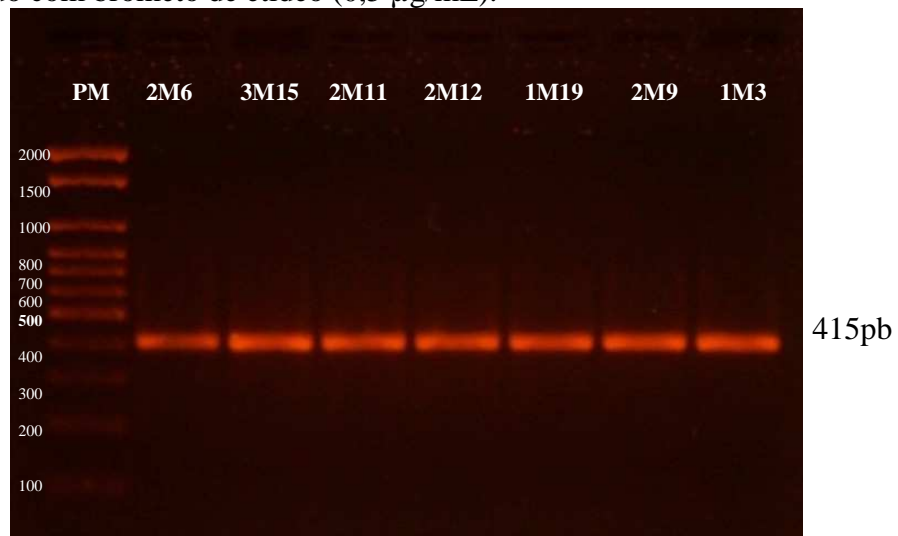
#### 7.4. Estudo da Ilha CpG

Para o estudo da ilha CpG foram desenhados *primers* para realização de amplificação de parte da ilha após tratamento com bissulfito de sódio. O fragmento analisado possui 415 pb (-252 pb até 163) e 45 dinucleotídeos CpG, ou seja, 45 possíveis sítios para metilação. Foram selecionados três tecidos para comparação da metilação nessa ilha CpG por possuírem diferença de expressão específica de tecido e de estágio de desenvolvimento: músculo de feto, fígado de feto e músculo de animais adultos. Para cada tecido foram escolhidas três amostras de cada genótipo totalizando 27 amostras.

Para músculo e fígado de fetos foram selecionadas as amostras 8, 9 e 18 (AA); 6, 13 e 14 (GG); e 20, 23 e 34 (AG). Para músculo de animais adultos foram escolhidas as amostras homozigotas AA 6 e 13 (abate 2) e 15 (abate 3); as amostras homozigotas GG 3 e 14 (abate 1) e 9 (abate 2); e as amostras heterozigotas AG 19 (abate 1) e 11 e 12 (abate 2).

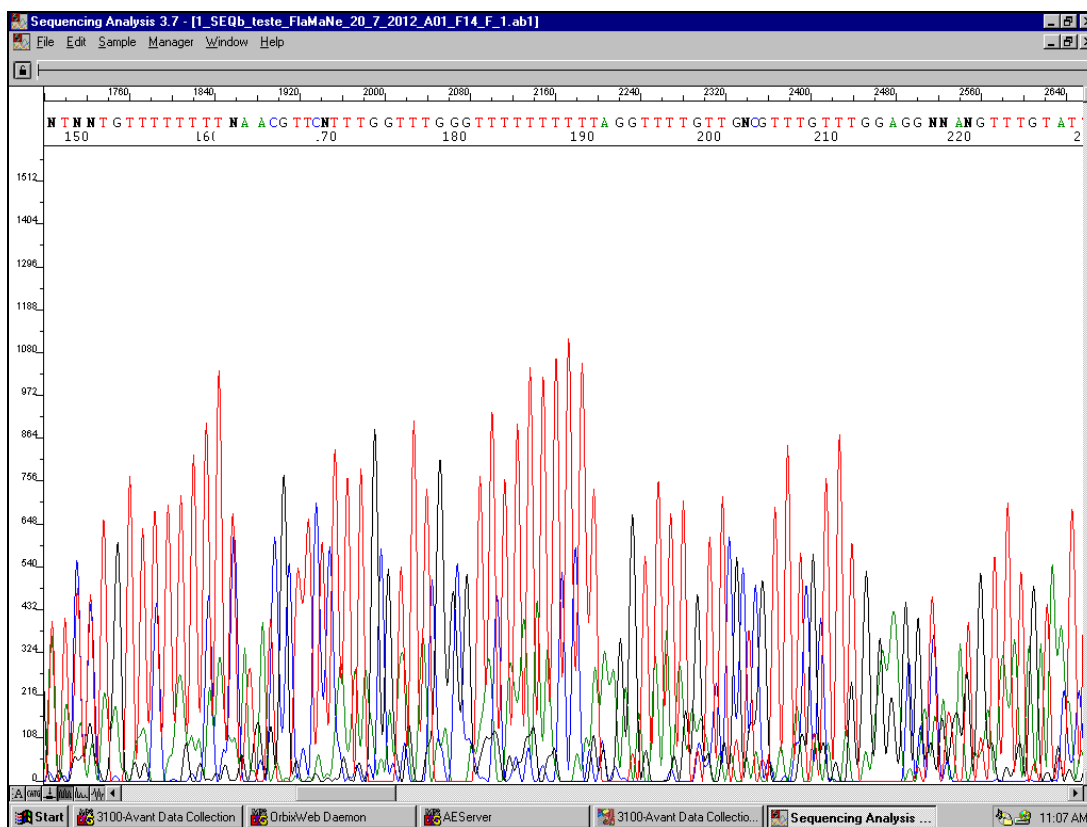
Após amplificação do fragmento e verificação em gel de agarose 1,5% (Figura 15), foi realizado o sequenciamento direto de duas amostras, porém os eletroferogramas obtidos não foram satisfatórios para a verificação das citosinas metiladas (Figura 16). As sequências foram geradas com picos pouco definidos e baixa resolução causando dificuldade para analisar a posição e a conversão das citosinas. Na literatura foram encontrados trabalhos indicando que o sequenciamento direto pode gerar resultados enganosos devido às diferenças nas sequencias que perdem sua completariedade após o tratamento do bissulfito (SVOBODA, 2007; LI; TOLLEFSBOL, 2011).

**Figura 15** – Imagem dos fragmentos de 415pb amplificados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).



Fonte: Arquivo pessoal. Marcador de peso molecular (PM) de 100 pb.

**Figura 16** – Eletroferograma gerado após sequenciamento direto de produto de PCR de DNA tratado com bissulfito



Fonte: Arquivo pessoal.

Para melhor análise da metilação da molécula de DNA, conforme Li e Tollefsbol (2011) realizamos a clonagem do fragmento de interesse para posterior sequenciamento. Uma vez que a clonagem não é realizada no laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste foram utilizados os serviços da empresa Genomic – Engenharia Molecular situada em São Paulo/SP. Foram utilizados 10 clones de cada amostra na análise, totalizando 270 sequências.

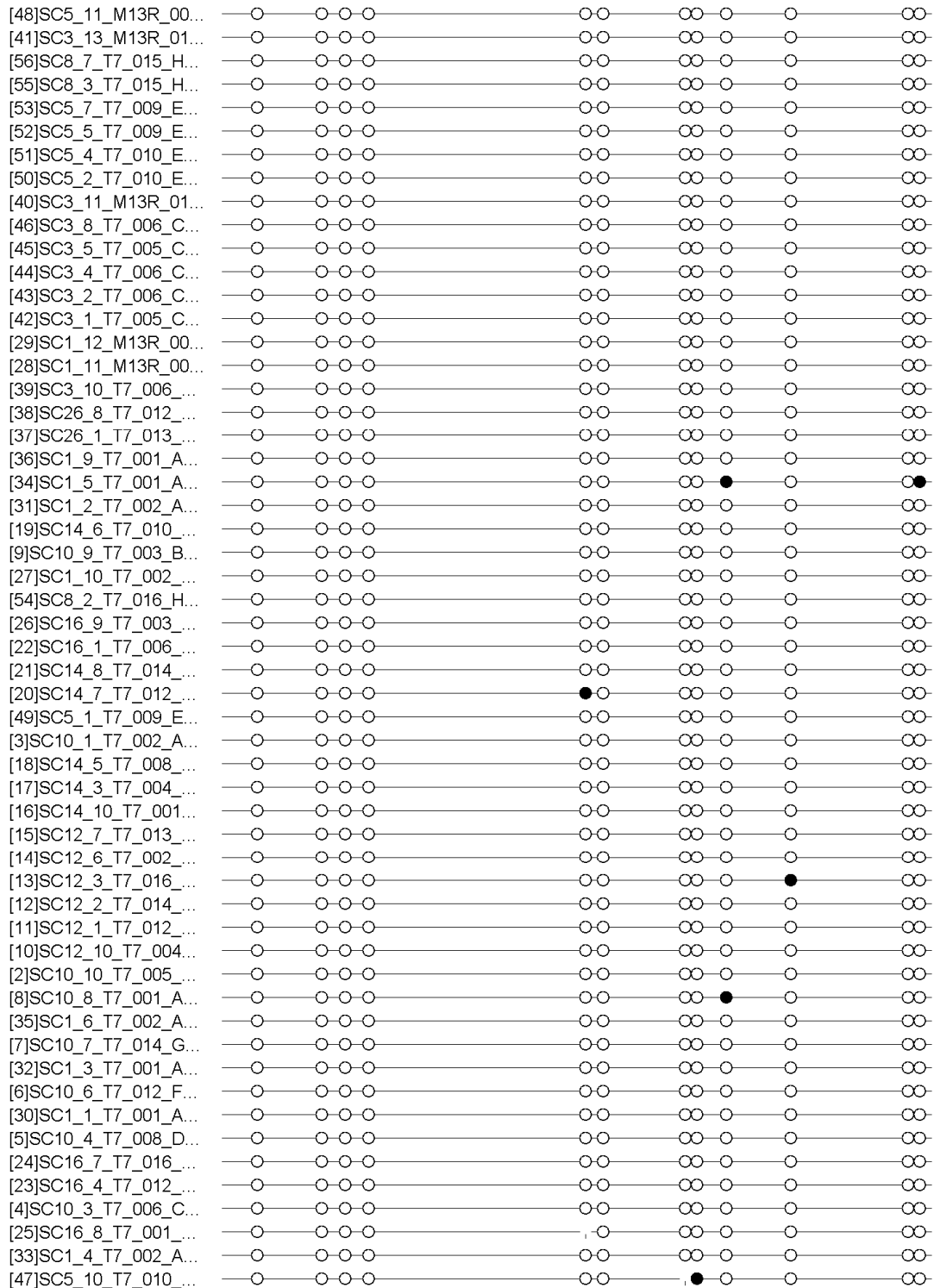
Após a análise da qualidade das sequências ocorreu diminuição do número de bases e, devido ao encurtamento, o número de dinucleotídeos CpG para análise passou a ser 37. Essas sequências foram inseridas no software Biq Analyzer e, após a seleção das sequências pela análise da qualidade de conversão, presença de clones e sequências com erros, foram utilizadas 56 sequências de amostras de músculo fetal, 63 de fígado fetal e 49 de músculo de animais adultos.

Após as análises das sequências o software identifica os dinucleotídeos CpG e aqueles que estão metilados gerando também os diagramas no formato *lollipop*. Nas sequências das

amostras de músculo fetal foram encontrados 13 dinucleotídeos CpG metilados (0,63%; 13/2.072) enquanto nas sequências de fígado fetal foram encontrados 10 (0,43%, 10/2.331) e nas sequências de músculo de animais adultos foram encontrados 11 (0,61%; 11/1.813). Também foram comparados os genótipos de cada tecido. Para músculo fetal foram encontradas 5 dinucleotídeos CpG metilados (0,61%; 5/814) em animais com genótipo AA, 6 (0,81%; 6/740) em animais AG e 2 (0,4%; 2/518) em animais GG. Para fígado fetal foram encontrados 4 dinucleotídeos CpG metilados (0,49%; 4/814) em animais com genótipo AA, 3 (0,35%, 3/851) para AG e 3 (0,45%; 3/666) para GG. Para músculo adulto foram encontrados 4 dinucleotídeos CpG metilados (0,60%; 4/666) em animais com genótipo AA, 2 (0,34%; 2/592) em AG e 5 (0,9%; 5/555) em GG. Os resultados das análises mostraram que a região estudada se mostrou hipometilada nos três tecidos analisados (Figuras 17, 18, 19) e, portanto, transcricionalmente ativa.

Quando comparamos a diferença de expressão e o status de metilação algumas associações puderam ser feitas, porém, o número baixo de dinucleotídeos CpG metilados não permite concluir as associações. Em alguns casos encontramos aumento da metilação e diminuição da expressão. Quando comparamos músculo e fígado fetal, a expressão foi maior em fígado (2,0x) e metilação foi 1,5x maior em músculo. Quando comparamos a expressão do gene entre genótipos em músculo fetal, em animais com genótipo GG e AA o gene foi mais expresso (2x e 1,4x respectivamente) que em animais heterozigotos AG e possuíam menos metilação (2,1x e 1,3x, respectivamente). Também encontramos casos onde a metilação não explicou a diferença de expressão. Quando comparados músculo fetal e músculo adulto, em músculo adulto o gene foi 1,83 vezes mais expresso que em músculo fetal, porém o status de metilação não foi diferente entre os tecidos. Quando comparamos a expressão entre genótipos em músculo adulto, em animais com genótipo GG o gene foi 2 vezes mais expressos que em animais heterozigotos AG e possuíam 2,65x mais metilação. Por fim, quando comparamos a expressão entre genótipos em fígado fetal, não encontramos diferenças na expressão do gene entre animais com genótipo GG e AA quando comparados com animais heterozigotos GG, mas encontramos aumento da metilação dos genótipos GG e AA (1,4x e 1,3x, respectivamente).

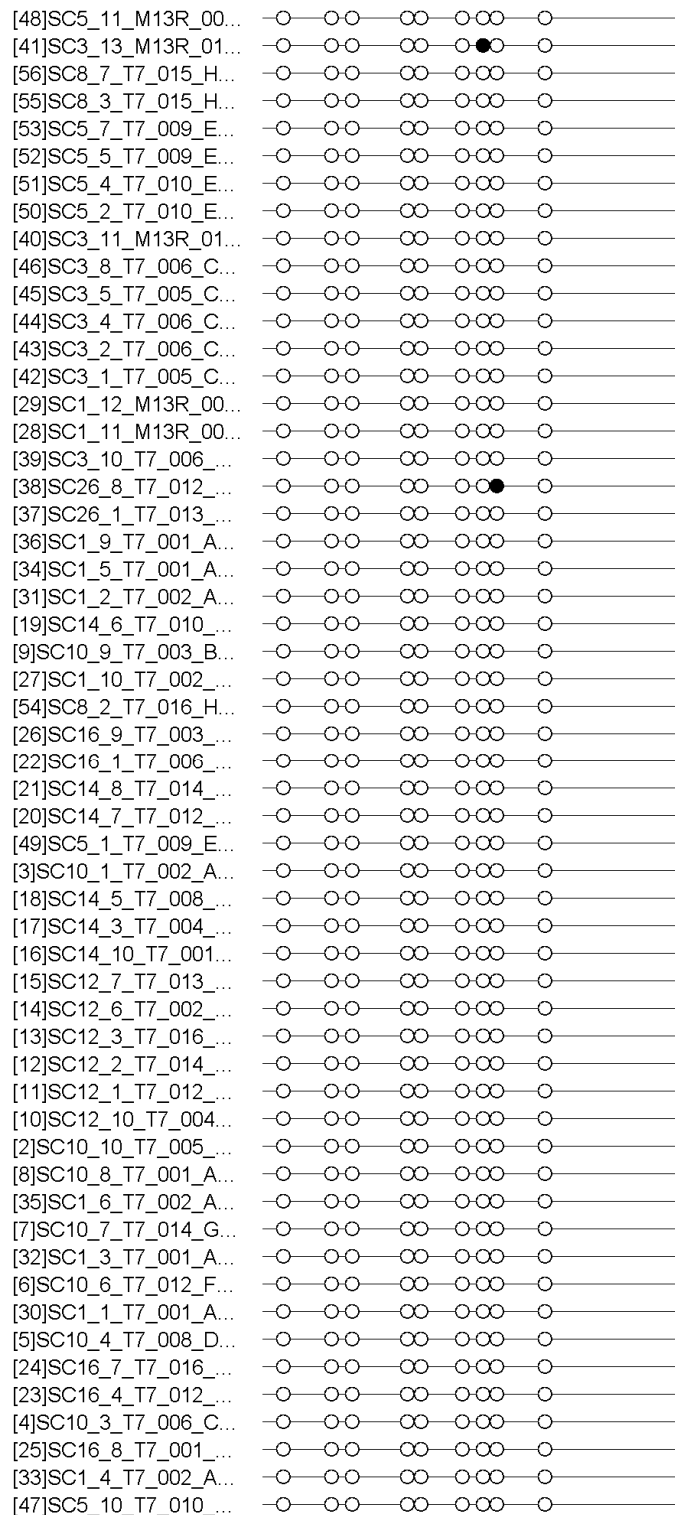
**Figura 17** – Análise da metilação do gene *CAST* em 56 seqüências (clones) de músculo fetal no software BiQ Analyzer.



Fonte: Arquivo pessoal. Cada círculo representa um dinucleotídeo CpG. Círculos brancos são representativos de CpG não metilado e círculos pretos são representativos de CpG metilado. Primeira parte: 12 dinucleotídeos CpG.

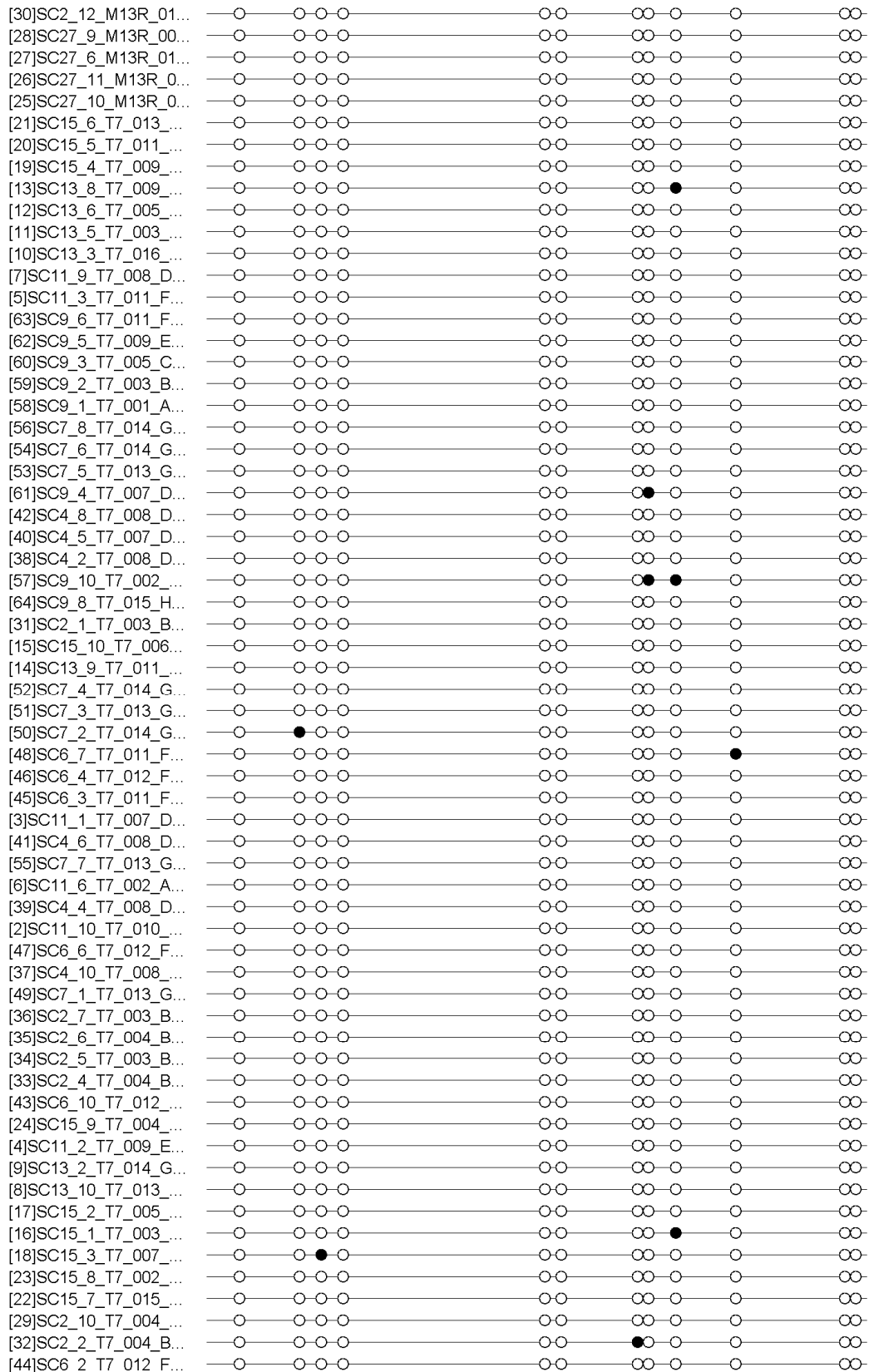


**Figura 17** – Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.



Fonte: Arquivo pessoal

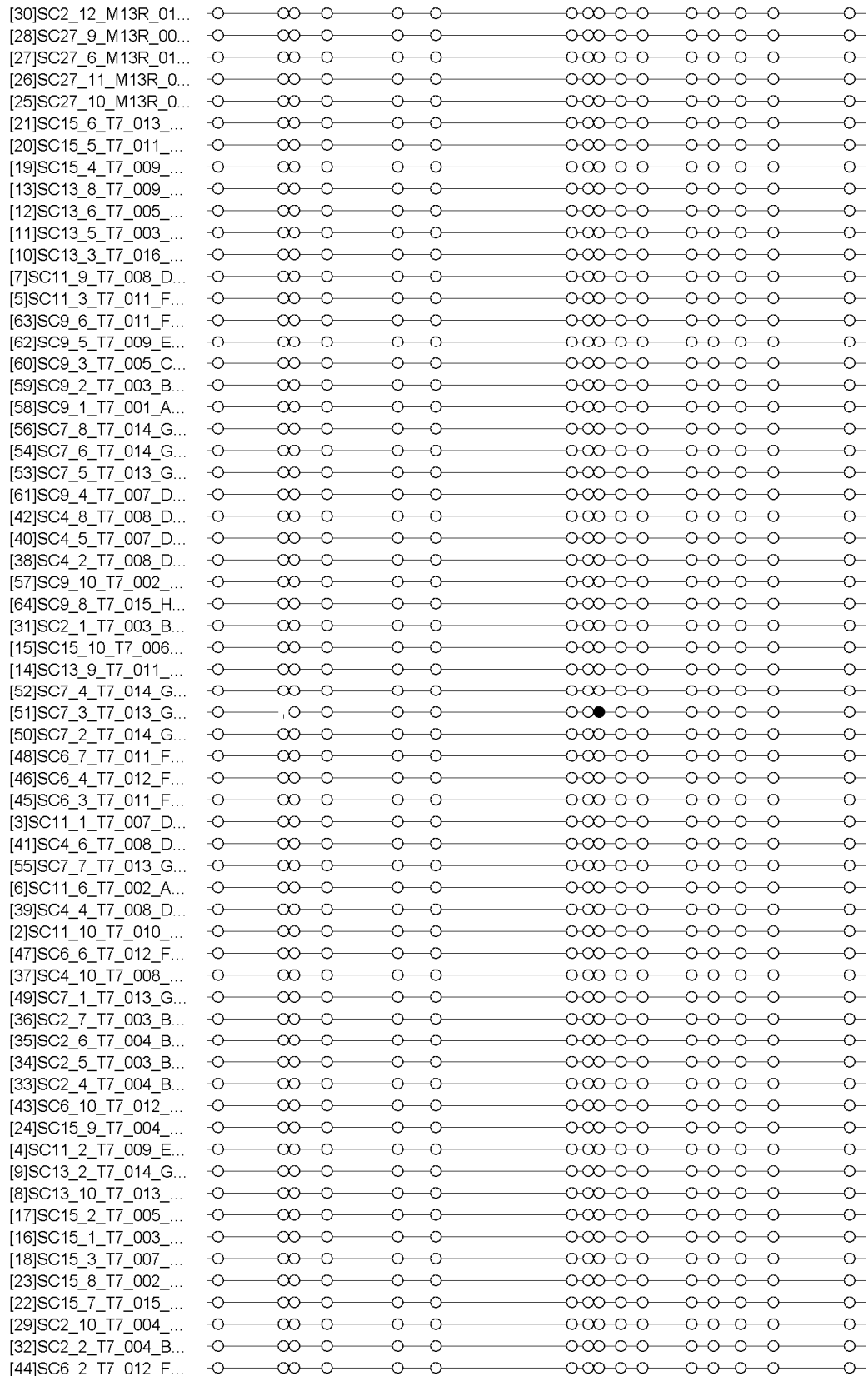
**Figura 18** – Análise da metilação do gene *CAST* em 63 sequências (clones) de fígado fetal no software BiQ Analyzer



Fonte: Arquivo pessoal. Cada círculo representa um dinucleotídeo CpG. Círculos brancos são representativos de CpG não metilado e círculos pretos são representativos de CpG metilado. Primeira parte: 12 dinucleotídeos CpG .



**Figura 18** – Continuação: 16 dinucleotídeos CpG.



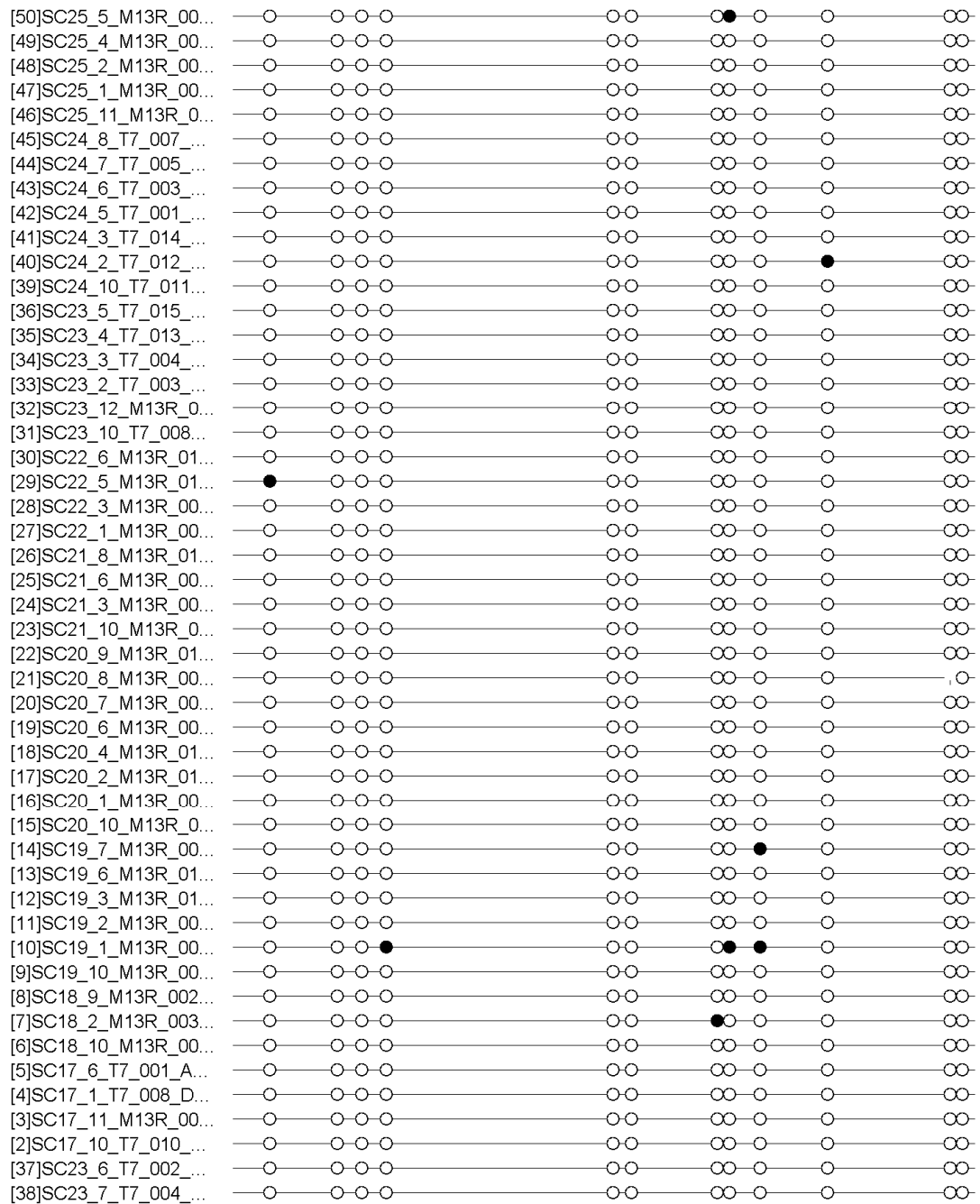
Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 18** – Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.

[30]SC2_12_M13R_01...	○	○	○	○	○
[28]SC27_9_M13R_00...	○	○	○	○	○
[27]SC27_6_M13R_01...	○	○	○	○	○
[26]SC27_11_M13R_0...	○	○	○	○	○
[25]SC27_10_M13R_0...	○	○	○	○	○
[21]SC15_6_T7_013_...	○	○	○	○	○
[20]SC15_5_T7_011_...	○	○	○	○	○
[19]SC15_4_T7_009_...	○	○	○	○	○
[13]SC13_8_T7_009_...	○	○	○	○	○
[12]SC13_6_T7_005_...	○	○	○	○	○
[11]SC13_5_T7_003_...	○	○	○	○	○
[10]SC13_3_T7_016_...	○	○	○	○	○
[7]SC11_9_T7_008_D...	○	○	○	○	○
[5]SC11_3_T7_011_F...	○	○	○	○	○
[63]SC9_6_T7_011_F...	○	○	○	○	○
[62]SC9_5_T7_009_E...	○	○	○	○	○
[60]SC9_3_T7_005_C...	○	○	○	○	○
[59]SC9_2_T7_003_B...	○	○	○	○	○
[58]SC9_1_T7_001_A...	○	○	○	○	○
[56]SC7_8_T7_014_G...	○	○	○	○	○
[54]SC7_6_T7_014_G...	○	○	○	○	○
[53]SC7_5_T7_013_G...	○	○	○	○	○
[61]SC9_4_T7_007_D...	○	○	○	○	○
[42]SC4_8_T7_008_D...	○	○	○	○	○
[40]SC4_5_T7_007_D...	○	○	○	○	○
[38]SC4_2_T7_008_D...	○	○	○	○	○
[57]SC9_10_T7_002_...	○	○	○	○	○
[64]SC9_8_T7_015_H...	○	○	○	○	○
[31]SC2_1_T7_003_B...	○	○	○	○	○
[15]SC15_10_T7_006_...	○	○	○	○	○
[14]SC13_9_T7_011_...	○	○	○	○	○
[52]SC7_4_T7_014_G...	○	○	○	○	○
[51]SC7_3_T7_013_G...	○	○	○	○	○
[50]SC7_2_T7_014_G...	○	○	○	○	○
[48]SC6_7_T7_011_F...	○	○	○	○	○
[46]SC6_4_T7_012_F...	○	○	○	○	○
[45]SC6_3_T7_011_F...	○	○	○	○	○
[3]SC11_1_T7_007_D...	○	○	○	○	○
[41]SC4_6_T7_008_D...	○	○	○	○	○
[55]SC7_7_T7_013_G...	○	○	○	○	○
[6]SC11_6_T7_002_A...	○	○	○	○	○
[39]SC4_4_T7_008_D...	○	○	○	○	○
[2]SC11_10_T7_010_...	○	○	○	○	○
[47]SC6_6_T7_012_F...	○	○	○	○	○
[37]SC4_10_T7_008_...	○	○	○	○	○
[49]SC7_1_T7_013_G...	○	○	○	○	○
[36]SC2_7_T7_003_B...	○	○	○	○	○
[35]SC2_6_T7_004_B...	○	○	○	○	○
[34]SC2_5_T7_003_B...	○	○	○	○	○
[33]SC2_4_T7_004_B...	○	○	○	○	○
[43]SC6_10_T7_012_...	○	○	○	○	○
[24]SC15_9_T7_004_...	○	○	○	○	○
[4]SC11_2_T7_009_E...	○	○	○	○	○
[9]SC13_2_T7_014_G...	○	○	○	○	○
[8]SC13_10_T7_013_...	○	○	○	○	○
[17]SC15_2_T7_005_...	○	○	○	○	○
[16]SC15_1_T7_003_...	○	○	○	○	○
[18]SC15_3_T7_007_...	○	○	○	○	○
[23]SC15_8_T7_002_...	○	○	○	○	○
[22]SC15_7_T7_015_...	○	○	○	○	○
[29]SC2_10_T7_004_...	○	○	○	○	○
[32]SC2_2_T7_004_B...	○	○	○	○	○
[44]SC6_2_T7_012_F...	○	○	○	○	○

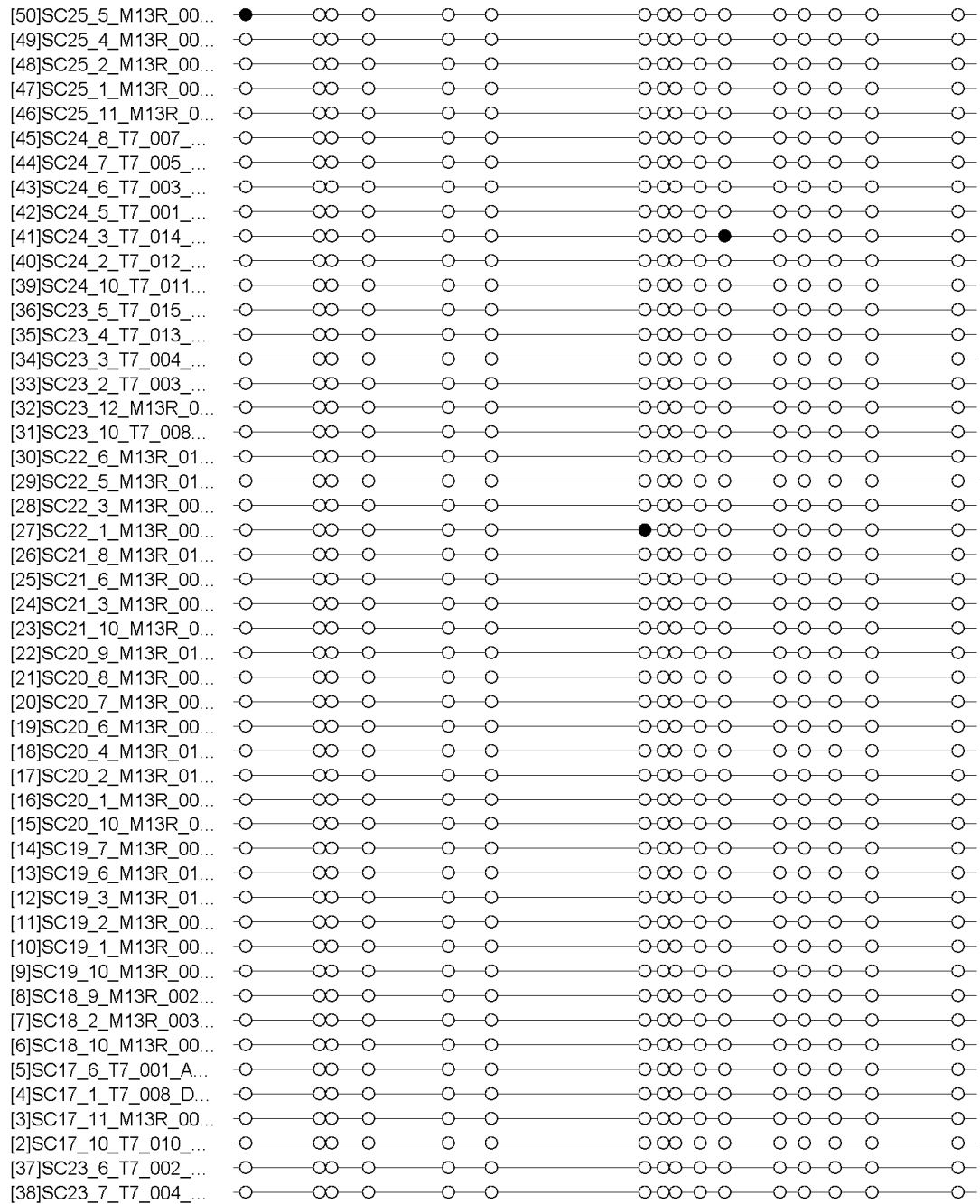
Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 19** – Análise da metilação do gene *CAST* em 49 sequências (clones) de músculo adulto no software BiQ Analyzer.



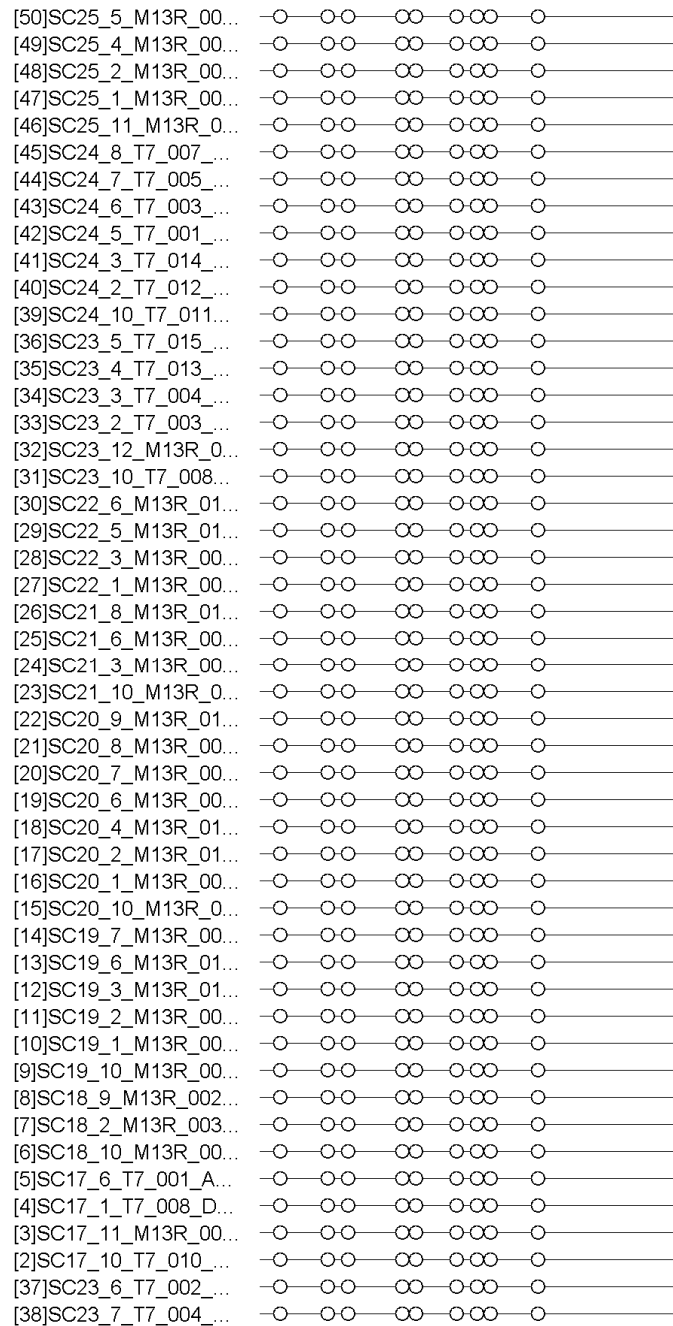
Fonte: Arquivo pessoal. Cada círculo representa um dinucleotídeo CpG. Círculos brancos são representativos de CpG não metilado e círculos pretos são representativos de CpG metilado. Primeira parte: 12 dinucleotídeos CpG.

**Figura 19** – Continuação: 16 dinucleotídeos CpG.



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 19** – Continuação: 9 dinucleotídeos CpG.



Fonte: Arquivo pessoal.

Existem muitos trabalhos na literatura que mostram a importância da metilação (hipermetilação ou hipometilação) do DNA principalmente em estudos com câncer e doenças humanas. Dentre esses trabalhos muitos mostram a relação da hipometilação de determinado promotor com um aumento na expressão de determinado gene. Em humanos, Sunahori et al. (2011) mostraram que nas células T de pessoas com lúpus eritematoso sistêmico, o promotor do gene PP2Ac $\alpha$  estava hipometilado quando comparados com células T normais e encontraram aumento da expressão da proteína PP2Ac $\alpha$  e nesse sentido há evidências de que a hipometilação permitiu a ligação de fatores de transcrição relacionados à expressão do gene. Em outro estudo, Wang et al. (2012) demonstraram que a hipometilação no promotor do gene COX-2 em mulheres com endometriose pode estar relacionado com o aumento de expressão do mRNA do gene.

Em bovinos, Liu et al., (2011) estudaram o gene *DAZL* em testículos de gado iaques e encontraram uma relação entre aumento da metilação do promotor e diminuição da expressão do gene. Em contraste com esses estudos, Natt et al. (2012) trabalhando com duas raças de galinhas para o estudo das diferenças genéticas e epigenéticas no genoma devido à domesticação, encontraram associação entre regiões diferencialmente metiladas com aumento, diminuição ou com nenhum efeito na expressão de alguns genes do cérebro, mostrando que a regulação gênica não depende somente da metilação sendo muito mais complexa e dependente de fatores como, as modificações das histonas, remodelamento da cromatina e a interação entre de um grande número de fatores *trans* que se ligam a sequências *cis* regulatórias específicas (CEDAR, 1988; JAENISCH; BIRD, 2003; NAKAYA et al., 2009). Futscher et al (2002) mostraram que em células sem expressão do gene *SERPINB5* o promotor encontra-se metilado e possui histonas hipacetiladas, enquanto em células com expressão do gene, a região promotora encontra-se sem metilação e com histonas acetiladas possuindo uma cromatina acessível a fatores de transcrição.

A metilação do DNA, nesse contexto, pode impossibilitar a acessibilidade dos fatores (a interação DNA-proteína) responsáveis por parte ativação da transcrição, regulando assim parte da expressão (CEDAR, 1988; LANDE-DINER; CEDAR, 2005; LANDE-DINER et al., 2007). Um exemplo do papel da metilação na alteração da estrutura do gene e, conseqüentemente da transcrição são os genes *housekeeping*, que são constitutivamente expressos em todas as células e possuem ilhas CpG sem metilação em células somáticas (BIRD, 1986; LANDE-DINER et al., 2004)

Em nossos resultados não encontramos uma associação clara entre a taxa de metilação da ilha CpG e a diferença de expressão entre tecidos, estágio de desenvolvimento e genótipo.

Uma possível explicação pode ser pelas características do promotor do gene *CAST* que se assemelham às características de genes constitutivamente expressos, que não possuem metilação em suas ilhas CpG, como ausência de TATA Box, região rica em GC e presença de sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 (RAYNAUD et al. 2005a). Essa região estudada pode, assim como em genes *housekeeping*, não ser metilada para talvez possibilitar a regulação por meio de fatores de transcrição tecido específicos, modificações das histonas, remodelamento da cromatina e ligação de proteínas que recrutam outras proteínas ou realizam as modificações como MBD (*methyl-CpG binding domains proteins*), HDACs (*histone deacetylases*) DNMTs (*DNA methyltransferase*) dentre outras (BIRD 1986; CEDAR, 1988; GRUNAU et al., 2000; JAENISCH; BIRD, 2003). Lande-Diner et al. (2004) demonstraram a existência de promotores com diferentes tipos de regulação e mostraram que existem promotores semelhantes aos dos genes *housekeeping*, sem metilação, com modificações de histonas que permitem a transcrição mas que possuíam uma expressão específica em determinadas células e tecidos. Grunau et al. (2000) mostraram em seus resultados que regiões com ilhas CpG pouco metiladas podem ser estudadas como regiões promotoras, sinalizadoras para atividade regulatória, independente do estado de atividade dessas regiões. Deaton e Bird (2011) sugerem que reguladores de transcrição específicos são responsáveis pelo início da ativação ou repressão de determinados genes, recrutando outras modificações epigenéticas, juntamente com as ilhas CpG.

Muitos são os processos que o sistema da calpaína está inserido como, por exemplo, funções essenciais para a célula, progressão do ciclo celular, transdução de sinais, apoptose quanto, o amaciamento da carne e até em diversas doenças, como Mal de Alzheimer. (TAKANO et al., 2000; GOLL et al., 2003). As proteínas que participam desse sistema  $\mu$ -calpaína, m-calpaína e calpastatina possuem uma grande importância e o entendimento de sua regulação é necessário, pois, são amplamente distribuídas em diversas células.

Assim, este trabalho procura contribuir um pouco mais à compreensão desse sistema ao evidenciar expressão específica de tecido, estágio de desenvolvimento e genótipo para o gene *CAST* bovino e que esses eventos não dependem do estado de metilação da região promotora.

## 8. Conclusão

Pode-se concluir que:

Existe expressão gênica específica de tecidos, entre músculo, fígado e pele de fetos; de estágio de desenvolvimento entre músculo fetal e de animais adultos; e de genótipo para músculos de fetos homozigotos GG em comparação a heterozigotos, músculo de animais adultos GG em comparação a heterozigotos e fígado de animais adultos GG e AA também em comparação a heterozigotos.

A Ilha CpG encontrada na região promotora do gene *CAST* encontra-se hipometilada em músculo e fígado fetais e músculo adulto.

Os níveis de expressão gênica e a expressão diferencial entre tecidos estágio de desenvolvimento e genótipos não são regulados por metilação do DNA no promotor do gene *CAST*.



## 9. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 451 p.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Exportação mundial de carne bovina 2011**. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/download/stat\\_mercadomundial.pdf](http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Perfil Carne Bovina Brasileira 2012**. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/img/Upl/Abiec-Profile\\_2012-800.jpg](http://www.abiec.com.br/img/Upl/Abiec-Profile_2012-800.jpg)>. Acesso em: 13 abr. 2013.

ATTAR, N. The allure of the epigenome. **Genome Biology**, v. 13, p. 419, 2012.

AZHIKINA, T. L.; SVERDLOV, E. D. Study of tissue-specific CpG methylation of DNA in extended genomic loci. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 5, p. 596-603, 2005.

BARENDSE W. J. **DNA Markers for Meat Tenderness**. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1, 2002.

BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2115-2133, 2005.

BENSON, D. A.; et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. D34-D38, 2005

BIQANALYZER. **Bisulfite sequencing simplified**. Disponível em: <<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>>. Acesso em: 22 abr. 2013.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v.321, n. 6067, p. 209-213, 1986

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

BLAST. **Assembled RefSeq Genomes**. Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

BOCK, C.; et al. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfate sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, n. 21, p. 4067-4068, 2005.

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

BRADBURY, J. Human epigenome project – up and running. **PLoS Biology**, v. 1, n. 3, p. 316-319, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 01 de abr. 2013.

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

CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.83, p. 13-19, 2005.

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

CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**, v. 53, p. 3-4, 1988.

CHUNG, H. Y.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine *calpastatin* gene. **Animal Genetics**, v. 32, p. 53, 2001.

CLARK, S. J. et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 15, p. 2990-2997, 1994.

CLOP, A. et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, v. 38, p. 813-818, 2006.

CONG M. et al. The bovine *calpastatin* gene promoter and a new n-terminal region of the protein are targets for a cAMP-dependent protein kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 660-666, 1998.

CpG Island Searcher. **CpG Island Searcher**. Disponível em: <<http://cpgislands.usc.edu/>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

CURI, R. A. et al. Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPN1* and *CAST* genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos Taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, p. 456-462, 2009.

CURI, R. A. et al. Assesment of *GHI*, *CAPN1*, *CAST* polimorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos Taurus-Bos indicus* cross beef cattle. **Meat Science**, v.86, p. 915-920, 2010

DARGELOS, E. et al. calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. **Biochimie**, v. 90, p. 359-368, 2008.

DAVIS, G. P. et al. QTL for meat tenderness in the M. longissimus lumborum of cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 1, p. 40-45, 2008.

- DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & development**, v. 25, p. 1010-1022, 2011
- DEBELJAK, M. et al. Allelic differences in bovine kappa-CN gene which may regulate gene expression. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 439, p. R4-R6, 2000.
- DION, M. F. et al. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. **PNAS**, v. 102, n. 15, p. 5501-5506, 2005.
- DOLINOY, D. C. et al. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 297-307, 2007.
- EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 457-463, 2004.
- EMBOSS **CpGPlot**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>>. Acesso em: 14 abr. 2013.
- ENRIGHT, B. P. et al. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1525-1530, 2003.
- ENSEMBL. **Ensembl Genome Browser**. Disponível em : < <http://www.ensembl.org>>. Acesso em: 21 abr. 2013.
- ERNST, J. et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. **Nature**, v.473, 43-51, 2011.
- FAZZARI, M.; GREALLY, J. M. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 446-455, 2004
- FEIL, R.; BERGER, F. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. **Trends in Genetics**, v. 23, p. 192-199, 2007.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; ESTELLER, M. **DNA methylation analysis by bisulfite sequencing**. 2007. Disponível em: <[http://www.epigenesys.eu/images/stories/protocols/pdf/20111026124212\\_p34.pdf](http://www.epigenesys.eu/images/stories/protocols/pdf/20111026124212_p34.pdf)>. Acesso em: 27 jun. 2013.
- FLICEK, P. et al. Ensembl 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D48-D55, 2012.
- FOLCH, J. M. et al. Differential expression of bovine beta-lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 537-544, 1999.
- FRAGA M. F.; ESTELLER M. DNA methylation: a profile of methods and applications. **Biotechniques**, v. 33, p. 632-649, 2002.
- FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **PNAS**, v. 89, p. 1827- 1831, 1992.

FUTSCHER, B. W. et al. Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression. **Nature Genetics**, v. 31, n. 2, p. 175-179, 2002

GAGNON, J. F. et al. Quantitative DNA methylation analysis of laser captures microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n. 1, p. 184-189, 2010.

GAMA-SOSA, M. A. et al. Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 740, p. 212-219, 1983

GANDOLFI, G. et al. Investigation on *CAST*, *CAPN1* and *CAPN3* porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. **Meat Science**, v. 88, p. 694-700, 2011.

GARDINER-GARDEN M.; FROMMER M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, p. 261-282, 1987.

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

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

GENBANK. **Genbank**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 22 abr. 2013.

GOLL, D. E. et al. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, v. 74, p. 225-237, 1992.

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

GREGORY, R. I. et al. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 5426-5436, 2001.

GRUNAU, C.; HINDERMANN, W.; ROSENTHAL, A. Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 18, p. 2651-2663, 2000.

HARING, M. et al. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. **Plant Methods**, v. 3, p.11, 2007.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfate-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis – a personal account. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 84, n. 8, p. 321-330, 2008a.

HAYATSU, H. The bisulfate genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutation Research**, v. 659, p. 77-82, 2008b.

HUANG, J.; FORSBERG, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. **PNAS**, v. 95, p. 12100-12105, 1998.

ILIAN, M. A.; GILMOUR, R. S.; BICKERSTAFFE, R. Quantification of ovine and bovine calpain I, calpain II, and calpastatin mRNA by ribonuclease protection assay. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 853-864, 1999.

ILIAN, M. A. et al. Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 122-132, 2001.

ILLINGWORTH, R. S.; BIRD A.P. CpG islands – ‘a rough guide’. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1713-1720, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores IBGE 2011. Produção Pecuária. Produção da Pecuária Municipal 2011**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf)>. Acesso em: 01 abr. 2013.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends in Genetics**, v. 13, p. 323-329, 1997.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 245-254, 2003.

JUSZCZUK-KUBIAK, E. et al. Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. **Meat Science**, v. 82, p. 278-293, 2009.

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

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

KENT, M. P.; SPENCER, M. J.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 794-801, 2004.

KHATIB, H. Is it genomic imprinting or preferential expression? **Bioessays**, v. 29, p. 1022-1028, 2007.

KILLEFER, J.; KOOHMARAIE, M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 606-614, 1994.

KIM, T.; PARK, P. J. Advances in analysis of transcriptional regulatory networks. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 21-35, 2011.

KOOHMARAIE, M. et al. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 617-624, 1991.

KOOHMARAIE, M. Muscle Proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, p. 93-104, 1994.

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

KOOHMARAIE, M; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v. 74, p. 34-43, 2006.

KREMENSKOY, M. et al. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 277-285, 2006.

LANDE-DINER, L. et al. Gene repression paradigms in animal cells. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 69, p. 131-138, 2004.

LANDE-DINER, L; CEDAR, H. Silence of the genes – mechanisms of long-term repression. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 648-654, 2005

LANDE-DINER, L. et al. Role of DNA methylation in stable gene repression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 12194-12200, 2007.

LI, E.; BEARD C.; JAENISCH R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v. 366, p. 362-365, 1993

LEVENSON, V. V. DNA methylation as a universal biomarker. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 481-488, 2010.

LI, Y. et al. *DAPK1* variants are associated with Alzheimer's disease and allele-specific expression. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 2560-2568, 2006.

LI Y.; TOLLEFSBOL O. DNA methylation detection: bisulfite sequencing analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 791, p. 11-21, 2011.

LIEB, J. D. et al. Applying whole genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 114, p. 1-15, 2006.

LIMAYE, P. B. et al. Upregulation of calpastatin in regenerating and developing rat liver: role in resistance against hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 44, n. 2, 379-388, 2006.

LINDHOLM-PERRY, A. K. et al. Relationships among calpastatin single nucleotide polymorphisms, *calpastatin* expression and tenderness on pork longissimus. **Animal Genetics**, v. 40, p. 713-721, 2009.

LIU, Z. et al. Comparative analysis on mRNA expression level and methylation status of *DAZL* gene between cattle-yaks and their parents. **Animal Reproduction Science**, v. 126, p. 258-264, 2011.

LO, H. S. et al. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. **Genome Research**, v. 13, p. 1855-1862, 2003.

- MAUNAKEA, A. K. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. **Nature**, 466, p. 253-260, 2010.
- MEYERS, S. N.; BEEVER, J. E. Investigating the genetic basis of pork tenderness: genomic analysis of porcine CAST. **Animal Genetics**, v. 39, p. 531-543, 2008.
- MORRIS, C. A. et al. Genotypic effects of *calpain 1* and *calpastatin* on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. **Animal Genetics**, v. 37, p. 411-414, 2006.
- MOUNT, D. W. Using basic local alignment search tool (BLAST). **Cold Spring Harbor Protocols**, 2007.
- MUROYA, S. et al. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 252-259, 2012.
- NAKAYA, Y. et al. The characterization of DNA methylation-mediated regulation of bovine placental lactogen and bovine prolactin-related protein-I genes. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 19, 2009.
- NÄTT, D. et al. Heritable genome-wide variation of gene expression and promoter methylation between wild and domesticated chickens. **BMC Genomics**, v. 13, p. 59, 2012.
- NETPRIMER. **Free Primer Analysis Software**. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- OLIGOANALYZER. **Oligoanalyzer**. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>. Acesso em: 17 abr. 2013.
- PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.
- PARK, P. J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p. 669-680, 2009.
- PARR, T. et al. Effects of epinephrine infusion on expression of calpastatin in porcine cardiac and skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 374, n. 2, p. 299-305, 2000.
- PARR, T. et al. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 427, p. 8-15, 2004.
- PATTERSON, K. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 56, e3170, 2011
- PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN G. W.; DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. e36, 2002.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, n.6, p. 509-515, 2004.

PRIMER3PLUS. **Primer3Plus**. Disponível em: <<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 22 de abr. 2013

**PRIMERBLAST: finding primers specific to you PCR template**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

RAYNAUD P. et al. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 437, p. 69-77, 2005a

RAYNAUD P. et al. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 440, p. 45-53, 2005b.

**REFFINDER. Reffinder**. Disponível em: <<http://www.leonxie.com/referencegene.php>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2838-2843, 2001

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, p. 425-432, 2007.

RIETSCHOTEN, J. G. I. van et al. Differentially methylated alleles in a distinct region of the human interleukin-1 $\alpha$  promoter are associated with allele-specific expression of IL-1 $\alpha$  in CD4<sup>+</sup> T cells. **Blood**, v. 108, p. 2143-2149, 2006.

ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 461-467, 2000.

ROBINSON, T.L.; SUTHERLAND I.A.; SUTHERLAND J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 160-165, 2007.

ROGERS, S. L. et al. A role for DNA hypomethylation and histone acetylation in maintaining allele-specific expression of mouse NKG2A in developing and mature NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 414-421, 2006.

ROTHENBURG, S. et al. DNA methylation contributes to tissue- and allele-specific expression of the T-cell differentiation marker RT6. **Immunogenetics**, v. 52, p. 231-241, 2001.

RUIJTER J.M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acid Research**, v. 37, n. 6, e45, 2009.



- SATO, T. et al. Multiple mechanisms are involved in apoptotic cell death in the mouse uterus and vagina after ovariectomy. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 289-297, 2003
- SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **PNAS**, v. 103, n. 5, p. 1412-1417, 2006
- SCHAEFER, M. et al. RNA cytosine methylation analysis by bisulfate sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 2, p. 1-10, 2008.
- SCHENKEL, F. S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 291-299, 2006.
- SEGA, M. F. et al. Pronuclear stage porcine embryos do not possess a strict asymmetric distribution of lysine 9 dimethylation of histone H3 based solely on parental origin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 2-7, 2007.
- SENSKY, P. L. et al. Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate-and calcium-related stimuli. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2973-2982, 2006
- SHACKELFORD, S. D. et al. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 171-177, 1991.
- SHIN, J. H. et al. Genome-wide ChIP-seq mapping and analysis reveal butyrate-induced acetylation of H3K9 and H3K27 correlated with transcription activity in bovine cells. **Functional & Integrative Genomics**, v. 12, p. 119-130, 2012.
- SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 33, 2006.
- SMITH, Z. D. et al. High-throughput bisulfate sequencing in mammalian genomes. **Methods**, v. 48, n. 3, p. 226-232, 2009.
- SOLOMON, M. J.; LARSEN, P. L.; VARSHAVSKY, A. Mapping protein – DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. **Cell**, v. 53, p. 937-947, 1988.
- SUNAHORI, K. et al. Promoter hypomethylation results in increased expression of protein phosphatase 2A in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4508-4517, 2011.
- SVOBODA, P. **Bisulfite sequencing of very small samples**, 2007. Disponível em: <<http://www.epigenesis.eu/index.php/en/protocols/dna-methylation/172-bisulfite-sequencing-of-very-small-samples>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

TAKAI D.; JONES P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **PNAS**, v. 99, n. 6, p. 3740-3745, 2002.

TAKAI, D.; JONES, P. A. The CpG island searcher: a new WWW resource. **In Silico Biology**, v. 3, n. 3, p. 235-240, 2003.

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

TALASZ, H. et al. Histone H4 – lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38814-38822, 2005.

TAO, H.; COX D. R.; FRAZER K. A. Allele-specific *KRT1* expression is a complex trait. **PLoS Genetics**, v. 2, p. 93, 2006.

TIDBALL, J. G.; SPENCER, M. J. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. **Journal of Physiology**, v. 545, n. 3, p. 819-828, 2002.

TIERLING, S.; REITHER, S.; WALT, J. **Bisulfite sequencing of small DNA/cell samples**, 2007. Disponível em: <<http://www.epigenesys.eu/index.php/en/protocols/dna-methylation/174-bisulfite-sequencing-of-small-dnacell-samples>>. Acesso em: 27 jun.2013.

TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 71-81, 2010.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W71-W74, 2007

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. research0034.1-0034.11, 2002.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 0034.1, 2002.

VAVOURI, T. ; LEHNER, B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. **Genome Biology**, v. 13, p. R110, 2012.

WANG, D. et al. DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. **European Journal of Medical Research**, v. 17, p. 12, 2012.

WATSON, J. D.; et al. **Recombinant DNA**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1992. p. 267-272.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Effects of beta-adrenergic agonist L644,969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meta tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3035-3043, 1992

WHITE, S. N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2001-2008, 2005.

WU, X. L. et al. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. **Genetica**, v. 125, p. 103-113, 2005.

YAN, H. et al. Allelic variation in human gene expression. **Science**, v. 297, p. 1143, 2002.

YANG, C. et al. Analysis of DNA methylation in various swine tissues. **PloS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16229, 2011

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reactions. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 53, p. 627-648, 2000.

ZHAO, C. et al. miRNA-dysregulation associated with tenderness variation induced by acute stress in Angus cattle. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3,p.12, 2012.

ZHENG, Y. C. et al. Expression profiles of myostatin and calpastatin genes and nalysis of shear force and intramuscular fat content of yak *longissimus* muscle. **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, n. 12, p. 544-550, 2011.

ZILBERMAN, D.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns.**Developments**, v.132, p. 3959-3965, 2007.