



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO MÚSCULO
LONGISSIMUS DORSI DE VACAS E SEUS EFEITOS NA MACIEZ
DA CARNE**

GIANCARLO DE MOURA SOUZA

Trabalho de Dissertação apresentado
como parte das exigências para a
realização da Defesa Final para obtenção
do Título de Mestre em Zootecnia.

Dourados-MS
Junho-2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO MÚSCULO
LONGISSIMUS DORSI DE VACAS E SEUS EFEITOS NA MACIEZ
DA CARNE**

GIANCARLO DE MOURA SOUZA
Médico Veterinário

Orientador: Dr. Alexandre Rodrigo
Mendes Fernandes

Co-orientadores: Dr. André Luiz Julien
Ferraz e Dr. Gelson Luís Dias Feijó

Trabalho de Dissertação apresentado
como parte das exigências para a
realização da Defesa Final para obtenção
do Título de Mestre em Zootecnia.

Dourados-MS
Junho-2012

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –

641.36
S729e

Souza, Giancarlo de Moura

Estudo da expressão gênica do músculo *longissimus dorsi* de vacas e seus efeitos na maciez da carne / Giancarlo de Moura Souza. – Dourados, MS : UFGD, 2012.
xii, 55 f.: il.; 28 cm.

Orientador: Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Agrárias, 2012.

1. Bovino de corte. 2. Qualidade da carne. 3. Marcador molecular.
4. *Longissimus dorsi*. I. Título.

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UFGD, Dourados.
e-mail: giancarlo@cnpqc.embrapa.br

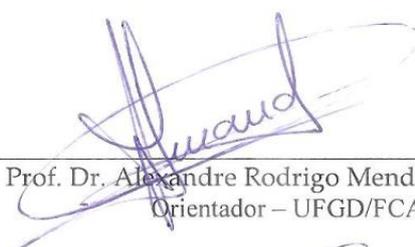
“Estudo da expressão gênica do músculo Longissimus dorsi de vacas e seus efeitos na maciez da carne”

por

Giancarlo de Moura Souza

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA

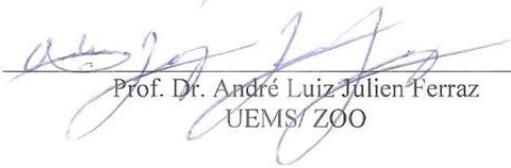
Aprovado em: 12/06/2012



Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes
Orientador – UFGD/FCA



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno
UFGD/FCA



Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz
UEMS/ ZOO

BIOGRAFIA DO AUTOR

GIANCARLO DE MOURA SOUZA, solteiro, filho de Neal Costa Souza e Ana Hercília de Moura Souza, nascido no dia 15 de fevereiro do ano de 1988 na cidade de Teófilo Otoni – MG. Ingressou no curso de Medicina Veterinária como bolsista do Programa Universidade para Todos – PROUNI na Universidade Católica Dom Bosco no ano de 2006, cumprindo todas as exigências do curso, obteve o título de Médico Veterinário em Dezembro de 2009. Em 2010 foi aprovado no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados, e sob orientação do professor Dr. Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes, e co-orientação do Dr. André Luiz Julien Ferraz e Dr. Gelson Luis Dias Feijó desenvolveu seu experimento de Mestrado no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal da Embrapa Gado de Corte – Campo Grande (MS) e laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de São Paulo – Jaboticabal (SP). O trabalho intitulado “Estudo da Expressão Gênica do Músculo *Longissimus dorsi* de vacas e seus efeitos na maciez da carne, foi defendido em junho de 2012. Possui experiência em técnicas moleculares como PCR em tempo Real, Avaliação quantitativa e qualitativa de carcaça e carne, e Ultrassonografia de carcaça.

Dedico...

A Deus pela sabedoria e por toda a força que ele proporciona.

Aos meus pais e irmã, pelo amor, carinho, atenção, apoio e incentivo.

Aos demais pessoas que durante esses anos contribuíram mesmo de forma indireta para que eu alcançasse esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em especial ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realizar esse curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes pela orientação, conhecimentos transmitidos e compreensão diante a situação do projeto.

Ao co-orientador Prof. Dr. André Ferraz pela amizade, paciência, por todos os ensinamentos, pelos conselhos diante as dificuldades e pela ajuda na idealização do projeto.

Ao co-orientador e pesquisador Dr. Gelson Luís Dias Feijó pela abertura em realizar esse projeto na Embrapa Gado de corte, e por todos os conhecimentos e confiança em mim colocada.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan, pela abertura das portas e orientação durante as análises finais do meu trabalho no centro de Biotecnologia da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FUNDECT e FAPESP pela concessão do auxílio para execução do experimento.

A todos os funcionários e pesquisadores da Embrapa Gado de Corte pela colaboração na implantação do experimento.

Ao mestrando Marcelo Almeida Rezende pelo companheirismo, motivação, conselhos e pela grande amizade que cultivamos durante a pós-graduação, minha sincera gratidão.

Ao técnico e amigo Igor Joba, pelo trabalho em equipe e apoio técnico durante o experimento.

Aos amigos e pós-graduandos, Waleska Ascurra Nunes Nascimento e Daiane Aparecida Fausto pelo trabalho em equipe e pela amizade que fica marcada durante esses anos.

A todos os amigos do Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal, Isabella, Gustavo, Talita Ceccon, Cristina e Thiago pelo apoio durante o trabalho de extração de RNA.

Aos doutorandos, Raquel Lunedo, Rafael Kuradomi (Jack), Gustavo Squassoni (Vurto) e Miguel Frederico (Dunga) pela ajuda durante minhas análises no laboratório de Biotecnologia da UNESP.

Aos estagiários que passaram pelo laboratório, Camila Magalhães, Camila Fleury, Jéssica Monteschio, Héber Pereira, Flávio Mousinho e Thiago Teixeira de Menezes.

Aos companheiros da República Pau da Goiaba, por me acolherem durante o período em que estive em Jaboticabal.

Aos amigos de pós-graduação da UFGD, pela alegria, apoio e por todos os momentos incríveis que passamos durante o início do mestrado.

A família Moreira, pelo apoio e carinho, em especial a minha namorada Cejane Paula Rosa Moreira pelo amor e companheirismo durante esses anos.

A família Arnas Ricardo, e família Bezerra Cavalcante, vocês foram fundamentais para mim durante todos os anos e sempre serão parte da minha família.

A todos os meus amigos campo-grandenses que conquistei ao longo do tempo, pela ajuda, companheirismo e também por contribuírem no meu crescimento como pessoa.

Ao meu cunhado Wagner Ferreira Schultz pela amizade, sinceridade, conselhos e prontidão em todos os momentos.

Agradeço aos meus familiares que sempre me incentivaram a buscar meus sonhos, mesmo que fossem grandes demais para serem alcançados.

Enfim agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente nessa conquista, e digo que vocês fazem parte desse momento. Deixo marcado aqui meu respeito e gratidão a todos vocês.

MUITO OBRIGADO!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charlis Chaplin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVEATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
2 OBJETIVO	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 MACIEZ DA CARNE.....	4
3.1.1 Maturação	5
3.2 ÁCIDO RIBONUCLÉICO	7
3.3 qPCR.....	10
3.4 GENES EM ESTUDO	12
3.4.1 CAST	12
3.4.2 DNAJA1	13
3.4.3 CASP3	13
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 2	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4 CONCLUSÕES	40
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 3 (Metodologia detalhada)	45
1 MATERIAL E MÉTODOS	46
1.1 EXPERIMENTO A CAMPO.....	46
1.2 ANÁLISE DA FORÇA DE CISALHAMENTO E COLETA DE AMOSTRAS	46

1.3 EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE MÚSCULO	47
1.4 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DO RNA	48
1.5 ANÁLISE DE INTEGRIDADE DO RNA PELO BIOANALYSER	48
1.6 SÍNTESE DE CDNA PARA A TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	49
1.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS FRAGMENTOS ESPECÍFICOS PARA OS GENES ESTUDADOS	51
1.8 CLONAGEM EM VETOR PLASMÍDEO TOPOTA®	52
1.9 CULTIVO DE CLONES BACTERIANOS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	52
1.10 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES E COMPROVAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS	53
1.11 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS PADRÃO	54
1.12 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA	55
1.13 REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL	56
1.14 ANÁLISE DE <i>THRESHOLD</i> E EFICIÊNCIA DAS CURVAS-PADRÃO	56
2 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS	57
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Representação esquemática das proteínas miofibrilares e os principais componentes do sarcômero 6

FIGURA 2 – Esquema de formação de proteínas e RNA..... 7

FIGURA 3 – Curva de ampliação do qPCR em Tempo Real C_T – *Cycle Threshold* 10

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Resultado do programa Normfinder[®] com análise de estabilidade de genes constitutivos para expressão relativa em qPCR. 31

FIGURA 2 – Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os tratamentos 33

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Lista de genes, número de acesso e seqüências dos iniciadores direto e reverso utilizados no estudo de expressão gênica 27

TABELA 2 – Médias e erro padrão para cada uma das variáveis estudadas 32

TABELA 3 – Resultados das correlações entre as variáveis estudadas..... 36

CAPÍTULO 3

TABELA 4 – Lista de genes, número de acesso e seqüências dos iniciadores direto e reverso utilizados no estudo de expressão gênica 51

LISTA DE ABREVIATURAS

CASP3 – Caspase 3

CAST – Calpastatina

cDNA – DNA complementar

CT – Ciclo de “threshold”

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAJA1 – Proteína de choque térmico 40kDa

FC – Força de cisalhamento

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

qPCR – Reação em cadeia Polimerase quantitativo em tempo real

rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal

tRNA – Ácido ribonucléico transportador

pRNA – Ácido ribonucléico precursor

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos genes CAST, CASP3 e DNAJA1 no músculo *Longissimus dorsi* de vacas adultas da raça Nelore. Após o abate as carcaças foram refrigeradas por 24 horas em câmara frigorífica. Mediante ao resfriamento das carcaças, foram retirados bifes do músculo *Longissimus dorsi* para a determinação da força de cisalhamento, sendo que, de um mesmo animal foram retirados bifes para serem mantidos em resfriamento durante 7 e 21 dias, e sofrerem o processo de maturação. De acordo com os resultados de força de cisalhamento após 24 horas, as amostras foram classificadas em dois grupos (G1 - Dura e G2 - Macia). Foi extraído o RNA total de cada uma das amostras, sendo este avaliado de forma qualitativa. Para a síntese de cDNA utilizou-se uma alíquota de 2µg de cada amostra de RNA total, posteriormente sendo utilizado na amplificação de cada um dos genes em estudo por PCR comum. Cada gene foi clonado em um vetor plasmidial, e a partir do seqüenciamento e confirmação de cada clone, os plasmídeos foram linearizados e utilizados na construção de curvas padrão. Após a obtenção dos resultados das curvas padrão, foi medida a expressão absoluta de cada um dos genes entre os dois grupos experimentais. Os dados foram avaliados num modelo a partir dos extremos de maciez. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) para força de cisalhamento entre os tratamentos somente no dia 0. Para o efeito de maturação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os dois tempos avaliados (7 e 21 dias). Na quantificação absoluta, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) para o gene CASP3, indicando maior expressão deste gene nos animais que apresentaram também maiores valores na força de cisalhamento ao 0 dia. Enquanto que, para os genes CAST e DNAJA1 não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Conclui-se que carnes com maior força de cisalhamento expressam mais o gene CASP3, por outro lado, essas carnes sofreram maior processo de maturação, confirmando a hipótese que propõe a ação da caspase 3 no processo proteolítico *postmortem*.

Palavras Chave: caspase, cDNA, cisalhamento, expressão, , maturação, PCR

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the expression of genes CAST, CASP3 and DNAJA1 in longissimus dorsi muscle of adult Nelore cows. After slaughter, the carcasses were chilled for 24 hours in refrigerating chamber. Upon chilling of the carcasses were removed steaks from muscle Longissimus dorsi for the determination of shear force, being that, in the same animal were removed steaks to be maintained in chilling during 7 and 21 days, and undergo the maturation process. According to the shear force results after 24 hours, the samples were classified into two groups (G1 - Hard and G2 - Soft). Was extracted o total RNA from each sample, being this evaluated of form qualitative and quantitative. For the synthesis of cDNA was used a aliquot of 2µg of each total RNA sample, being after used in the amplification of each of the genes studied by PCR common. Each gene was cloned into a plasmid vector, from of sequencing and confirmation of each clone, plasmids were linearized and used in the construction of standard curves. Data were evaluated in a model containing of extreme values of softness. There was statistical difference ($p < 0.05$) in shear force between treatments only on day 0. For the effect of maturation, was significant difference ($p < 0.05$) for two times evaluated (7 and 21 days). In absolute quantification, we observed statistical difference ($p < 0.05$) for gene CASP3, indicating a higher expression of this gene in animals that also had higher shear force values to the 0 day. While for genes DNAJA1 and CAST there was no statistical difference ($p > 0.05$) between groups. It is concluded that meats with higher shear force express more the gene CASP3, on the other hand, this meat suffered a greater maturation process, confirming the hypothesis that proposes the action of caspase 3 in postmortem proteolysis process.

Keywords: aging, caspase, cDNA, expression, PCR, shear

CAPÍTULO 1

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A pecuária brasileira é considerada a 2ª maior do mundo, com um rebanho de aproximadamente 205 milhões de bovinos, além de possuir o maior rebanho comercial, produzindo aproximadamente 9,8 milhões de toneladas de carne (ABIEC, 2011). No início do século XIX essa atividade tornou-se uma das atividades econômicas mais importantes para o Brasil, houve a necessidade de incorporação de tecnologias na produção de bovinos visando à melhoria das características qualitativas da carne, e buscando atender mercados consumidores mais exigentes, principalmente quanto à maciez.

Dentre as potenciais tecnologias utilizadas atualmente, os estudos de expressão gênica por meio do Ácido Ribonucléico (RNA) tem possibilitado a identificação e associação de genes a características fenotípicas da carne. O RNA é uma molécula de extrema importância biológica, e este se divide em vários tipos, sendo que um deles é denominado de RNA mensageiro (mRNA), originado pela célula no momento da transcrição dos genes, e pode ser assim considerado uma forma indireta de se medir a expressão dos genes, permitindo elucidar mecanismos envolvidos na maciez inicial e no processo de amaciamento da carne.

Porém a maciez é dependente de uma sequência de processos bioquímicos que ocorrem durante o processo proteolítico *postmortem* no músculo. De acordo com Delgado & Santos (2007), são três fatores responsáveis por determinar a maciez da carne, sendo esses: 1) Patamar de maciez intrínseca, resultado de limitações estruturais do tecido conjuntivo que envolve a musculatura; 2) Endurecimento da estrutura muscular pelo estabelecimento do *rigor mortis*; 3) Taxa e extensão do processo de desestruturação limitada do arcabouço miofibrilar por enzimas proteolíticas, denominado amaciamento ou maturação.

Entretanto, parte da melhora na maciez da carne pode ser atribuída ao complexo enzimático calpaína/calpastatina, pois estas agem na degradação de proteínas miofibrilares durante o processo de maturação da carne (KOOHMARAIE, 1996 e THERKILDSEN, 2005). Porém, existem vários outros mecanismos que estão supostamente envolvidos no processo de amaciamento da carne, e que ainda não foram elucidados.

Dessa maneira o estudo de expressão torna-se extremamente importante, permitindo um melhor entendimento da ação proteolítica. E por meio da avaliação diferencial de genes envolvidos nesse processo, poderão ser identificados possíveis marcadores moleculares para maciez da carne.

2 OBJETIVO

Avaliar a expressão dos genes CASP3, DNAJA1 e CAST por meio do RNA obtido a partir de amostras do músculo *Longissimus dorsi* de vacas de descarte da raça Nelore.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MACIEZ DA CARNE

O termo qualidade em carne bovina é muito amplo e depende de vários fatores agindo de forma concomitante. Limitando a definição de qualidade da carne bovina em termos sensoriais, a maciez, a suculência e o sabor acabam sendo os principais quesitos na preferência do consumidor (HADLICH et al., 2006). Suculência e sabor, embora importantes para o consumidor, são características determinadas, principalmente, pelas escolhas do próprio consumidor ao preparar a carne, ou seja, a forma de preparo e o ponto de cocção são mais importantes na determinação de sabor e suculência do que qualquer atributo genético ou ambiental inerente ao animal do qual a carne é oriunda.

Dessa maneira a maciez, passa ser o quesito mais importante na avaliação de consumidores de carne bovina, uma vez que é uma característica influenciada por todos os elos da cadeia de produção. Segundo Riley et al. (2005), tratamentos apropriados para carcaças durante o período *postmortem* podem controlar efetivamente eventuais variações organolépticas, especialmente, a maciez. Ignorando que fatores *postmortem*, como estimulação elétrica e maturação, possam impactar positivamente na maciez da carne bovina, fatores pré-abate, ou seja, inerentes ao próprio animal, são os de maior importância na determinação dessa característica.

Em outras palavras, aspectos genéticos e fatores ambientais presentes durante o processo de criação do bovino, predispõem à produção de carne mais ou menos macia (FELÍCIO, 1993). Na verdade, genética e ambiente atuam de forma conjunta na determinação das qualidades da carne, pois o potencial genético de um animal para produzir carne macia, por exemplo, só será expresso em sua totalidade se o ambiente permitir que esse animal o expresse.

Em termos de ambiente, práticas de manejo, como a castração, e de alimentação, como a suplementação a pasto e o confinamento, podem alterar o nível de maciez da carne. A redução na idade de abate apresenta-se como a prática de maior impacto na melhora da qualidade da carne, especificamente, maciez. Segundo Field et al. (1997), a idade de abate é fator determinante na maciez da carne, de tal forma que há diminuição na maciez à medida que a idade avança.

Considerando que não existe registro na literatura evidenciando que o processo enzimático calpaína/calpastatina torna-se menos ativo à medida que a idade do animal avança, um dos possíveis candidatos para tal efeito é o tecido conjuntivo (colágeno) presente no músculo.

A conexão entre o colágeno intramuscular e a maciez da carne foi inicialmente identificada em trabalhos datados no início do século XX e re-estudada com certa ênfase entre as décadas de 40 a 70, quando foram reveladas algumas das complexas maneiras com que o colágeno impacta a maciez da carne. Variáveis como a quantidade total de colágeno, a organização molecular das fibras de colágeno e os componentes da estrutura do colágeno foram hipotetizadas como variáveis explanatórias para a dureza na carne. Finalmente, chegou-se a conclusão que a qualidade do colágeno e o nível de encurtamento das fibras seriam os fatores mais importantes para a dureza observada em carnes de animais velhos (BAILEY & LIGHT, 1989).

3.1.1 Maturação

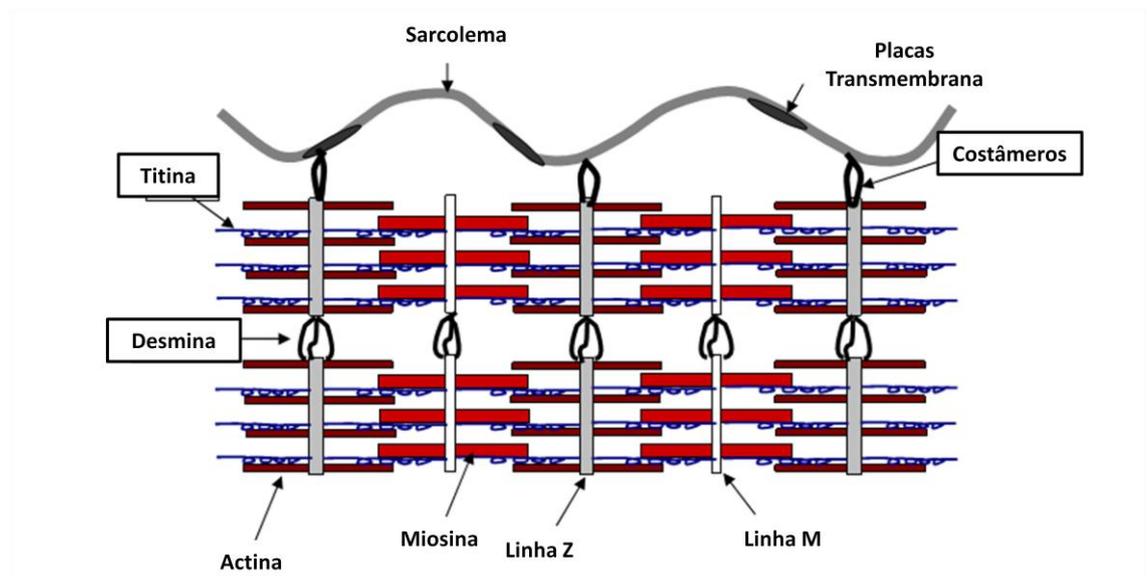
Koohmaraie & Gessink (2006) afirmam que os consumidores têm pagado um maior valor em produtos cárneos que possuem características de acordo com suas preferências. Visto que a dureza da carne é uma das causas mais comuns de inaceitabilidade, a maturação mostra-se como alternativa para diminuir a força de cisalhamento. A dureza da carne está atribuída a uma série de fatores, incluindo o tecido conjuntivo intramuscular, gordura intramuscular e o comprimento do sarcômero.

A maturação vem sendo utilizada em vários mercados, assim como no mercado americano, onde o tempo varia de 10 a 14 dias. Já no Brasil, a maturação é feita de 14 a 21 dias. A explicação para essa diferença no tempo de maturação está baseada na genética populacional dos bovinos. Em outros países a utilização de raças taurinas, permite a utilização de menor tempo de estocagem devido à maior eficácia do processo nestas raças.

Em trabalhos científicos já realizados, percebe-se que para animais indianos, é necessário maior tempo para que o efeito da maturação ocorra de forma eficiente, atendendo as expectativas do mercado. Mesmo sendo um processo conhecido e utilizado há muitos anos, somente agora estão sendo cientificamente comprovadas as

transformações que ocorrem durante a maturação. No entanto é aparente que a ação de vários complexos enzimáticos na proteólise de proteínas estruturais é determinante na maciez final (KEMP et al., 2010).

De acordo com os mesmos autores, a maciez final da carne depende do grau de alteração das proteínas estruturais associadas ao músculo. Especificamente as miofibrilas citoesqueléticas e proteínas costâmeras, tais como titina, desmina e vinculina, actina e miosina (Figura 1).



Fonte: Adaptado de Kemp et al. (2010).

FIGURA 1. Representação esquemática das proteínas miofibrilares e os principais componentes do sarcômero.

Existem várias enzimas que estão envolvidas no processo proteolítico, entre elas, as catepsinas, proteossomas, calpaínas, calpastatinas e caspases.

As catepsinas são enzimas compostas a partir de exo e endopeptidases, formando três grupos: cisteínas (catepsinas B, H, L, X), Aspárticas (catepsinas D, E), Serinas (catepsina G) (SENTANDREU et al., 2002). De acordo com Whipple et al. (1990), estas estão pouco associadas à variação na sensibilidade da carne. No entanto, o efeito proteolítico dessas enzimas é demonstrado em vários trabalhos com carne bovina (ZAMORA et al., 2005; O'HALLORAN et al., 1997; HOPKINS & TAYLOR, 2002).

Outras enzimas descritas na literatura como as proteossomas, têm seu envolvimento no processo de maturação da carne por meio da degradação de proteínas do citosol e do núcleo (COUX et al., 1996). Tais enzimas são abundantes no músculo esquelético de acordo com Robert et al. (1999). Os autores mostraram que essas enzimas foram capazes de causar proteólise de proteínas miofibrilares incluindo a nebulina, miosina, actina e tropomiosina, sendo que este efeito também foi observado por Taylor et al. (1995).

Vários estudos estão sendo realizados demonstrando que o sistema proteolítico calpaína desempenha um papel central na proteólise post-mortem e no amaciamento da carne. No músculo esquelético, o sistema calpaína é composto em pelo menos três proteases, a μ -calpaína, m-calpaína e calpaína 3, e um inibidor, calpastatina. Entretanto há controvérsias sobre o envolvimento da calpaína 3, no processo proteolítico (KOOHMARAIE & GESSINK, 2006).

Recentemente têm sugerindo que a família das caspases poderia estar atuando durante a proteólise muscular (OUALI et al., 2006; SENTANDREU et al., 2002). Essas enzimas pertencem à família de cisteína proteases de aspartato, identificadas por atuar durante o processo de apoptose ou inflamação, podem ser divididas em caspases iniciadoras, tais como a 8, 9, 10 e 12 e caspases efetoras 3,6 e 7 (KEMP et al., 2010).

Com tantos fatores envolvidos na determinação do amaciamento da carne, torna-se difícil a compreensão geral acerca dos mecanismos responsáveis por este processo. A partir disso, deve-se continuar a busca de ferramentas experimentais buscando elucidar o envolvimento de todo esse complexo enzimático.

3.2 ÁCIDO RIBONUCLÉICO

Normalmente em eucariotos, a molécula de RNA é uma fita simples, podendo ser encontrada tanto no núcleo, local em que é sintetizada, quanto no citoplasma, onde tem lugar a síntese protéica (LEHNINGER, 2004).

O mesmo autor afirma que diferentes tipos de RNA estão presentes nas células, e os principais tipos são o mensageiro (mRNA), o ribossômico (rRNA), o transportador (tRNA) e os micro RNAs. O mRNA transfere a informação genética contida na cadeia de DNA aos ribossomos. O tRNA identifica e transporta as moléculas

de aminoácidos até os ribossomos, organelas compostas por RNA ribossomal (rRNA) e que dão suporte molecular para a síntese de polipeptídios. Esse tipo de RNA apresenta-se em maior proporção em relação às outras formas.

De acordo com Alberts et al. (2004), no DNA, os éxons são sequências de bases transcritas e traduzíveis, enquanto que os íntrons são seqüências transcritas e não traduzíveis (Figura 2). Desse modo, nos eucariotos, as partes traduzidas do gene é que correspondem à informação genética que realmente codifica a seqüência de aminoácidos da proteína.

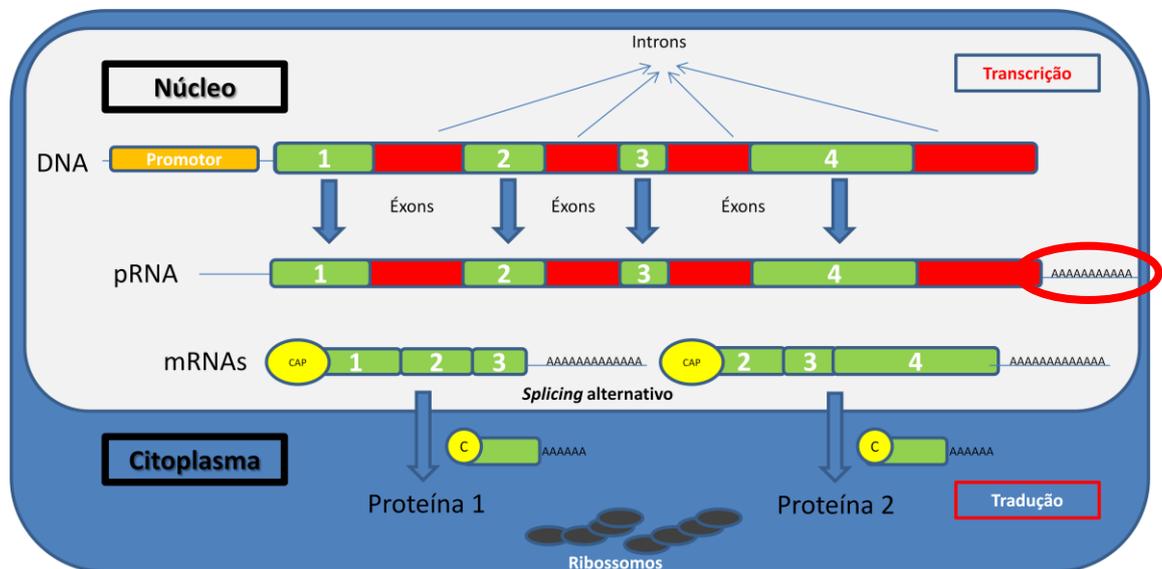


FIGURA 2. Esquema de formação de proteínas e RNA

O RNA resultante da transcrição do gene é denominado RNA precursor (pRNA). Após a transcrição, o pRNA perde os íntrons, e em um processo denominado de “*splicing*”, os éxons se unem em uma molécula única, formando os mRNAs (LEHNINGER, 2004).

Segundo Alberts et al. (2004), a maioria dos mRNA possui uma seqüência de aproximadamente 200 resíduos de adenina na sua extremidade 3’, que é chamada de cauda poliA (Figura 2). Esta cauda não está codificada no DNA e não existe nos rRNAs e tRNAs. Sendo assim, os nucleotídeos contendo a adenina não são codificados pelo DNA, e posteriormente são adicionados ao mRNA através da enzima poliA-polimerase. Outra estrutura importante está presente na extremidade 5’, denominada *cap* 5’ ou

“capacete”. Ele confere ao mRNA uma maior estabilidade, pois o protege da ação de fosfatases e nucleases, além de aumentar a chance do mRNA ser capturado pelo sistema de tradução.

Um aspecto comum a todos pRNAs é a presença da seqüência de AAUAAA, 11-30 nucleotídeos antes do sítio de poliadenilação (local onde deve ser inserida a cauda poliA). Esta seqüência, chamada de seqüência sinal para poliadenilação, é reconhecida por um fator específico, que sinaliza o local e permite que ocorra a clivagem através de uma endonuclease. A adição da cauda poliA é feita na extremidade 3' OH gerada pela clivagem. Depois que o mRNA poliadenilado chega ao citoplasma, a cauda poliA vai diminuindo, com o decorrer do tempo, provavelmente devido à ação de nucleases (LEHNINGER, 2004).

A seqüência de adeninas presentes na cauda poliA, é designada como uma parte de extrema importância na via de síntese protéica, pois facilita o transporte do mRNA para o citoplasma. Ao mesmo tempo em que lentamente se degrada, essa molécula também se torna mais estável no citoplasma (VOET & VOET, 1997). Existe também possibilidade da cauda poliA estar relacionada com o reconhecimento da molécula de mRNA pelo complexo que posteriormente realizará a tradução (ALBERTS et al., 2004).

Outro grupo de mRNAs que são transportados ao citoplasma e que não possuem cauda de poliA são denominados de RNAs mensageiros de histonas estando envolvidos na síntese de proteínas que participam do empacotamento do DNA (VOET & VOET, 1997).

Todos os RNAs são sintetizados por um processo conhecido como transcrição. Esse procedimento é feito com base na seqüência de nucleotídeos de apenas uma das fitas do DNA. A fita do DNA molde para a transcrição possui orientação 3' → 5' já que o sentido de crescimento dos ácidos nucléicos é 5' → 3'. As mesmas regras de pareamento da replicação do DNA são aplicadas na transcrição, com exceção do pareamento entre as bases nitrogenadas A e T, pois no RNA a base T é substituída pela U (uracila). Dessa forma, a seqüência da fita 3' → 5' será complementar à fita RNA sintetizada enquanto que a fita do DNA de orientação 5' → 3' é idêntica ao RNA, sendo as timinas substituídas pelas uracilas (PIERCE, 2011).

A informação armazenada no mRNA será lida nos ribossomos para a síntese de proteínas, mecanismo conhecido como tradução. O mRNA é lido a cada três nucleotídeos (códon) e, por meio do código genético, essa pequena seqüência está associada a um dos 20 aminoácidos para a síntese da cadeia polipeptídica (VOET & VOET, 1997).

3.3 qPCR

A reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido aceita em diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR convencional que apresenta somente resultados qualitativos (FERRAZ, 2009).

O processo de quantificação do DNA e RNA utilizando o qPCR permite avaliar os dados de quantificação destes ácidos nucleicos com maior precisão e reprodutibilidade determinando os valores durante a fase exponencial da reação em tempo real. Neste sistema, o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T) (Figura 3).

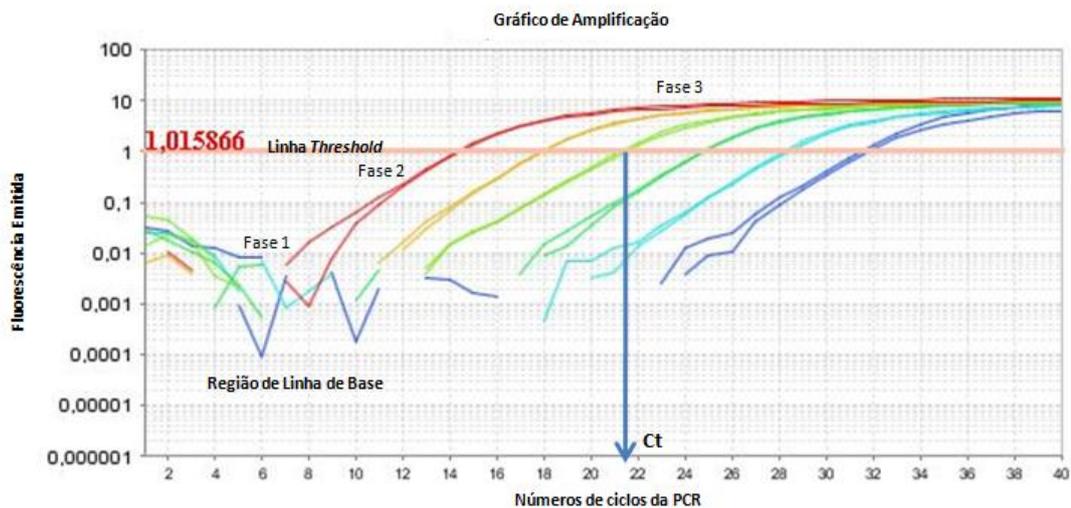


FIGURA 3. Curva de amplificação do qPCR em Tempo Real. C_T – *Cycle Threshold*. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: Não houve produtos da qPCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da qPCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos.

O C_T permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência, no qual a emissão desses compostos fluorescentes gera um sinal aumentando em proporção direta à quantidade de produto da PCR. Os valores de fluorescência são gravados em um dispositivo de armazenamento durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado, formando um gráfico de amplificação (NOVAIS & ALVES, 2004).

A qPCR requer uma plataforma de instrumentação que contenha um termociclador com sistema ótico para excitação e coleta da emissão de fluorescência, e um computador com um software para a aquisição dos dados e análise final da reação (NOVAIS & ALVES, 2004).

Existem dois diferentes métodos na análise de qPCR: quantificação absoluta e quantificação relativa. A primeira determina o número de cópias do transcrito de interesse baseado numa curva padrão, enquanto que o segundo método descreve a diferença de expressão entre dois grupos, no qual, geralmente se usa um grupo controle ou referência.

No caso de quantificação relativa, a escolha correta dos genes constitutivos para normalizar a expressão do gene alvo em qPCR em tempo real é essencial para refletir verdadeiramente o processo biológico (ROBINSON et al., 2006). Estes autores avaliaram 4 genes candidatos a genes normalizadores em bovinos (18S rRNA, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), RPLP0 e β -10 actina) e verificaram que os genes GAPDH e β -actina se comportaram melhor como genes constitutivos.

Em outro trabalho de validação de genes de referência especificamente em músculos, Perez et al. (2008) testaram 10 genes (18S, GAPDH, ACTB, B2M, RPII, UBC, CASC3, HMBS, SF3A1, EEF1A2) no qual verificaram que os três últimos se apresentaram mais consistentes para uso como genes normalizadores.

Essa ferramenta tem sido considerada uma das mais sensíveis e confiáveis, e vem sendo muito utilizada validando experimentos de microarranjos, proporcionando a quantificação de patógenos, medindo expressão de genes cancerígenos, determinando o número de cópias transgênicas e possibilitando o estudo de terapia com drogas (YUAN et al. 2006).

3.4 GENES EM ESTUDO

3.4.1 CAST

Segundo Rubensam et al. (1998), as proteases neutras ativadas pelo íon cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *postmortem*, que conduzem a um aumento progressivo da maciez da carne. Entretanto, apesar do papel das calpaínas na maturação, é evidente a maior importância do efeito inibidor de proteólise da calpastatina.

A calpastatina é o inibidor específico da m-calpaína e μ -calpaína, e sua isoforma predominante nos músculos esqueléticos é capaz de inibir calpaínas (LAGE et al., 2009).

A calpastatina é dependente de cálcio, e pode ser utilizada como substrato pelas calpaínas. (KOOHMARAIE, 1988). Mesmo havendo uma degradação, a perda de sua atividade não é total, podendo inibir ainda a ação enzimática proteolítica. Porém a μ -calpaína não está hábil a produzir a inativação da calpastatina, somente a m-calpaína produz um rápido e progressivo desaparecimento da atividade de calpastatina (LAGE et al., 2009).

A carne de *Bos indicus* tem sido reportada como menos macia quando comparada a de *Bos taurus* (CROUSE et al., 1993). Essa diferença ocorre em virtude da proteólise reduzida das proteínas miofibrilares, associada à alta atividade de calpastatina nos músculos (WHIPPLE et al., 1990). Segundo Shackelford et al. (1991), o nível de atividade da calpastatina duas horas *postmortem* pode ser usado como indicador da maciez final da carne.

No estudo feito por Rubensam et al. (1998), foi avaliada a atividade das enzimas em amostras de *Longissimus Dorsi* de bovinos aos dois anos de idade. A maior proporção de genes presentes nos animais puros de origem indiana afetou significativamente a atividade de calpastatina, no qual Ibrahim et al. (2008) encontraram menores forças de cisalhamento (FC) para animais Waguli, em relação à raça Brahman. Os autores também acreditam que o resultado é devido ao alto nível de calpastatina no músculo de Brahman, e pela menor atividade de calpastatina no músculo dos animais Waguli. O'Connor et al. (1997) e Pringle et al. (1997) também encontraram baixos níveis de maturação trabalhando com bovinos da raça Brahman.

O gene CAST está localizado no cromossomo 7 do genoma bovino, possuindo 136.556 pares de bases. Este gene tem papel fundamental no processo proteolítico *postmortem*, sendo responsável por regular a quantidade de calpaínas livres (NCBI).

3.4.2 DNAJA1

Em 2006 o gene DNAJA1 foi patenteado como um marcador molecular, mostrando-se inversamente relacionado com a maciez da carne (BERNARD et al., 2007). De acordo com Kemp et al. (2010) este gene codifica uma proteína de choque térmico (Hsp40). Esta proteína age conjuntamente com outra proteína de choque térmico Hsp70. O complexo Hsp40/Hsp70 mostra-se diretamente ligado com a inibição da apoptose celular, impedindo a translocação de proteínas pro-apoptóticas (Bax Proteínas) para a membrana mitocondrial, onde sofrem mudanças conformacionais desencadeando a liberação de citocromo C, componente essencial na ativação das caspases (GOTOH et al., 2004).

Sendo assim, Bernard et al. (2007) sugerem que se a atividade das proteínas de choque térmico for menor, o sistema proteolítico das caspases funcionará mais efetivamente, na indução da apoptose, conseqüentemente aumentando a maciez da carne.

Este gene está localizado no cromossomo 8 do genoma bovino, possuindo 9.757 pares de base. Age principalmente por estimular a atividade das ATPases de Hsp70, e realiza papéis cruciais na tradução de proteínas, tais como, dobrar, desdobrar, translocar e degradar (NCBI).

3.4.3 CASP3

As caspases pertencem à família de cisteínas proteases específicas de aspartato, estando divididas entre mediadores da inflamação e apoptose celular (EARNSHAW et al., 1999).

O sistema calpaína-calpastatina é importante no processo de amaciamento da carne, mas não é o único. Segundo Kemp et al. (2010), as caspases podem contribuir nesse processo *postmortem*, já que elas estão envolvidas na morte celular programada,

atuando como executoras deste processo. Além disso, há evidências que estas enzimas também contribuam para o amaciamento *postmortem*, por atuarem na clivagem de proteínas miofibrilares que também são alvo das calpaínas, tais como: desmina, troponina e espectrina (KEMP & PARR, 2008).

Além de clivarem os mesmos substratos das calpains, há também evidências que existam interações entre o sistema calpaína e o sistema de caspases, atuando de forma conjunta (CHUA et al., 2000; NAKAGAWA & YUAN, 2000). Outro ponto importante, é que a calpastatina é um substrato das caspases, principalmente as caspases 3 e 7 (WANG et al., 1998). Portanto, se as caspases estão ativas no músculo *postmortem*, estas podem influenciar na qualidade da carne em resposta à proteólise da calpastatina, resultando em maior quantidade de calpaínas ativas que podem atuar durante o processo proteolítico.

O gene CASP3 está presente no cromossomo 27 do genoma bovino, possuindo 25.184 pares de base, porém seu RNA mensageiro apresenta apenas 3.072 pares de base. Este gene desempenha um papel central na execução da fase de apoptose celular, ativando as caspases 6, 7 e 9 (NCBI).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira. São Paulo, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 edição. Porto Alegre. Artmed, p.1560, 2004.

BAILEY, A. J. & LIGHT, N. D. Connective tissue in meat and meat products. **London-Elsevier**, 356p, 1989.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DURBROEUCQ, H.; RENARD, G.; HOCQUETTE, J. F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5229–5237, 2007.

CHUA, B. T.; GUO, K.; LI, P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. **Journal Biology Chemistry**. v.275, p.5131–5135, 2000.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasome. **Annual Review of Biochemistry**, v.65, p.801–847, 1996.

CROUSE, J.D.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Beef Research, Progress Report** n.4, p.125-127, 1993.

DELGADO, E.F.; SANTOS, C.C. Maciez da carne em função das enzimas proteolíticas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4., 2007, Campinas. **Anais**, p. 33-40, 2007.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**, v.68, p.383–424, 1999.

FELÍCIO, P. E. Fatores *ante e post-mortem* que influenciam na qualidade da carne vermelha. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 30, 1993, Rio de Janeiro, Anais: SBZ, p.43-52, 1993.

FERRAZ, A. L. J. **Análise da Expressão Gênica no Músculo Esquelético de Bovinos das Raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o Desenvolvimento muscular e a maciez da carne**. Tese de Doutorado. Jaboticabal, UNESP, 2009.

FIELD, R.; McCORMICK, R.; BALASUBRAMANIAN, SANSON, D.: WISE, J.; HIXON, D.; RILEY, M.; RUSSEL, W. Tenderness variation among loin steaks from A to C maturity carcasses of heifers similar in chronological age. **Journal of Animal Science**, v.75, p.693-699, 1997.

GOTOH, T.; TERADA, K.; OYADOMARI, S.; MORI, M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. **Cell Death Differentiation**, v.11, p.390–402, 2004.

HADLICH, J. C.; MORALES, D. C.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N. de; CHARDULO, L. A. L. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **ACTA Scientiarum**, Maringá, v.28, n. 1, p.57-62, Jan/Mar, 2006.

HOPKINS, D. L. & TAYLOR, R. G. Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderisation. In M. te Pas, M. Everts, & H. Haagsman (Eds.), **Muscle development of livestock animals** (pp. 363–389). Cambridge, MA, USA: CAB International, 2002.

IBRAHIM, R.M.; GOLL, D.E.; MARCHELLO, J.A. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1426- 1433, 2008.

KEMP, C. M. & PARR, T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. **Journal Animal Science**. v.2 p.1254–1264, 2008.

KEMP, C. M.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus, semimembranosus, and infraspinatus muscles during *postmortem* storage. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2943-2951, 2010.

KEMP, C. M.; SENSKY, P. L.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, T. P. Tenderness – Na enzymatic view. **Meat Science** v.84, p.248 – 256, 2010.

KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S.C.; SCHOLLMAYER, J.E. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. **Journal of Food Science**, v.53, p.407-410, 1988.

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

KOOHMARAIE, M. & GESSINK, 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.

LAGE, J. F.; OLIVEIRA, I. M.; PAULINO, P. V. R.; RIBEIRO, F. Papel do sistema calpaína-calpastatina sobre a proteólise muscular e sua relação com a maciez da carne em bovinos de corte. **Revista eletrônica de Veterinária**. V.10 n.12, p.20, 2009.

LEHNINGER; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4ª edição. Nova Iorque: W. H. Freeman, p.1124, 2004.

NAKAGAWA, T.; & J. YUAN. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, **Journal Cell Biology**. 150:887–894, 2000.

NOVAIS, C.M. & ALVES, M.P. qPCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição n° 33. p. 10 – 13. Julho/Dezembro, 2004.

O'CONNOR, S. F., TATUM, J.D.; WULF, D.M. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1822-1830, 1997.

O'HALLORAN, G. R.; TROY, D. J.; BUCKLEY, D. J.; REVILLE, W. J. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, v.47, p.187–210, 1997.

OUALI, A., HERNAN HERRERA-MENDEZ, C., COULIS, G., BECILA, S., BOUDJELLAL, A., AUBRY, L. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v.74, p.44–58, 2006.

PEREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology** v.9:n.79, 2008.

PIERCE, B.A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3ª edição. Guanabara Koogan, 774 p. 2011.

PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2955-2961, 1997.

RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE Jr., C. C.; WEST, R. L.; COLEMAN, S. W.; OLSON, T.A.; HAMMOND, A. C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, v.70, p.347-356, 2005.

ROBERT, N.; BRIAND, M.; TAYLOR, R.; BRIAND, Y. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. **Meat Science**, v.51, p.149–153, 1999.

ROBINSON, T.L.; SUTHERLAND, I.A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR, **Veterinary Immunopathology** v.10.1016 p.9 - 12, 2006.

RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. C. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.v.18 (4) p.405-409, 1998.

SENTANDREU, M. A.; COULIS, G.; OUALI, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. **Food Science and Technology**, v.13, p.400–421, 2002.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F. 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

TAYLOR, R. G.; TASSY, C.; BRIAND, M.; ROBERT, N.; BRIAND, Y.; OUALI, A. Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. **Molecular Biology Reports**, v.21, p.71–73, 1995.

THERKILDSEN, M. Muscle protein degradation in Bull calves with compensatory growth. **Livestock Production Science**. v. 98, p. 205-218, 2005.

VOET & VOET, **Biochemistry** – John Wiley & Sons, New York, 2ª Edição, p.85, 1997.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR., N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics** v.7:n.85, 2006.

ZAMORA, F.; AUBRY, L.; SAYD, T.; LEPETIT, J.; LEBERT, A.; SENTANDREU, M. A. Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. **Meat Science**, v.71, p.730–742, 2005.

WANG, K. K.; R. POSMANTUR, K.; NADIMPALLI, R.; NATH, P.; MOHAN, R. A.; NIXON, R. V.; TALANIAN, M.; KEEGAN, L.; HERZOG, H. ALLEN. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. **Archive Biochemistry Biophysics**. v.356:p.187–196, 1998.

WHIPPLE, G., KOOHMARAIE, M., DIKEMAN, M.E. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science** 68, 2716–2728, 1990.

CAPÍTULO 2

(Redigido de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia)

1 **ESTUDO DOS GENES *CASP3*, *DNAJA1* E *CAST* EM TRANSCRIPTOMAS**
2 **OBTIDOS NO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE VACAS ADULTAS E**
3 **SEUS EFEITOS NA MACIEZ DA CARNE E NO PROCESSO DE**
4 **MATURAÇÃO**

5
6 **Resumo** - O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos genes *CAST*, *CASP3* e
7 *DNAJA1* no músculo *Longissimus dorsi* de vacas adultas da raça Nelore. Após o abate
8 as carcaças foram refrigeradas por 24 horas em câmara frigorífica. Mediante ao
9 resfriamento das carcaças, foram retirados bifes do músculo *Longissimus dorsi* para a
10 determinação da força de cisalhamento, sendo que, de um mesmo animal foram
11 retirados bifes para serem mantidos em resfriamento durante 7 e 21 dias, e sofrerem o
12 processo de maturação. De acordo com os resultados de força de cisalhamento após 24
13 horas, as amostras foram classificadas em dois grupos (G1 - Dura e G2 - Macia). Foi
14 extraído o RNA total de cada uma das amostras, sendo este avaliado de forma quali-
15 quantitativa. Para a síntese de cDNA utilizou-se uma alíquota de 2µg de cada amostra
16 de RNA total, posteriormente sendo utilizado na amplificação de cada um dos genes em
17 estudo por PCR comum. Cada gene foi clonado em um vetor plasmidial, e a partir do
18 seqüenciamento e confirmação de cada clone, os plasmídeos foram linearizados e
19 utilizados na construção de curvas padrão. Após a obtenção dos resultados das curvas
20 padrão, foi medida a expressão absoluta de cada um dos genes entre os dois grupos
21 experimentais. Os dados foram avaliados num modelo a partir dos extremos de maciez.
22 Houve diferença estatística ($p < 0,05$) para força de cisalhamento entre os tratamentos
23 somente no dia 0. Para o efeito de maturação, houve diferença significativa ($p < 0,05$)
24 para os dois tempos avaliados (7 e 21 dias). Na quantificação absoluta, observou-se
25 diferença estatística ($p < 0,05$) para o gene *CASP3*, indicando maior expressão deste gene
26 nos animais que apresentaram também maiores valores na força de cisalhamento ao 0
27 dia. Enquanto que, para os genes *CAST* e *DNAJA1* não foi observada diferença
28 estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Conclui-se que carnes com maior força de
29 cisalhamento expressam mais o gene *CASP3*, por outro lado, essas carnes sofreram
30 maior processo de maturação, confirmando a hipótese que propõe a ação da caspase 3
31 no processo proteolítico *postmortem*.

32
33 **Palavras Chave:** caspase, cDNA, cisalhamento, expressão, maturação, PCR

34 **STUDY OF GENES *CASP3*, *DNAJA1* AND *CAST* IN TRANSCRIPTOMES**
35 **OBTAINED OF THE *LONGISSIMUS DORSI* FROM COWS ADULTS AND**
36 **THEIR EFFECTS IN MEAT TENDERNESS AND IN MATURATION**
37 **PROCESS.**

38
39 **ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate the expression of genes *CAST*,
40 *CASP3* and *DNAJA1* in longissimus dorsi muscle of adult Nelore cows. After
41 slaughter, the carcasses were chilled for 24 hours in refrigerating chamber. Upon
42 chilling of the carcasses were removed steaks from muscle Longissimus dorsi for the
43 determination of shear force, being that, in the same animal were removed steaks to be
44 maintained in chilling during 7 and 21 days, and undergo the maturation process.
45 According to the shear force results after 24 hours, the samples were classified into two
46 groups (G1 - Hard and G2 - Soft). Was extracted o Total RNA from each sample, being
47 this evaluated of form qualitative and quantitative. For the synthesis of cDNA was used
48 a aliquot of 2µg of each total RNA sample, being after used in the amplification of each
49 of the genes studied by PCR common. Each gene was cloned into a plasmid vector,
50 from of sequencing and confirmation of each clone, plasmids were linearized and used
51 in the construction of standard curves. Data were evaluated in a model containing of
52 extreme values of softness. There was statistical difference ($p < 0.05$) in shear force
53 between treatments only on day 0. For the effect of maturation, was significant
54 difference ($p < 0.05$) for two times evaluated (7 and 21 days). In absolute quantification,
55 we observed statistical difference ($p < 0.05$) for gene *CASP3*, indicating a higher
56 expression of this gene in animals that also had higher shear force values to the 0 day.
57 While for genes *DNAJA1* and *CAST* there was no statistical difference ($p > 0.05$)
58 between groups. It is concluded that meats with higher shear force express more the
59 gene *CASP3*, on the other hand, this meat suffered a greater maturation process,
60 confirming the hypothesis that proposes the action of caspase 3 in postmortem
61 proteolysis process.

62
63 **Keywords:** aging, cDNA, caspase, expression, PCR, shear

64

65 1 INTRODUÇÃO

66

67 Nas últimas décadas foram inseridas novas tecnologias para o estudo da
68 qualidade da carne, principalmente para as pesquisas relacionadas ao melhoramento
69 genético molecular. Essas pesquisas proporcionaram um considerável avanço no
70 conhecimento sobre genes que estão correlacionados a características sensoriais da
71 carne.

72 Segundo Bernard et al. (2007), vários genes já foram associados à maciez da
73 carne de bovinos, entre eles os mais estudados são aqueles relacionados ao complexo
74 calpaína/calpastatina, que é considerado o principal sistema responsável pelo processo
75 de amaciamento *postmortem* devido ao processo de proteólise dos componentes
76 estruturais da musculatura esquelética.

77 Além destes, outros mecanismos de proteólise também vêm sendo
78 estudados, tais como o envolvimento das caspases na maciez da carne, processo que
79 ainda não foi totalmente elucidado. A caspase 3 é uma das enzimas que tem causado
80 maior divergência na literatura, devido a resultados sugestivos quanto à sua participação
81 no processo de proteólise e também pelos o resultados negativos, indicando nenhuma
82 associação desta enzima no amaciamento.

83 O gene responsável por codificar um das proteínas de choque térmico, a
84 HSP40, também tem sido alvo de estudos correlacionando a sua expressão com a
85 maciez da carne. Este gene, denominado de DNAJA1, mostra-se mais expresso em
86 animais que sofrem maior estresse durante o pré-abate e também parece estar envolvido
87 na inibição da apoptose celular *postmortem*.

88 Devido a divergências encontradas na literatura quanto ao processo de
89 proteólise, a utilização da técnica de qPCR pode ser uma ferramenta importante para
90 elucidar a relação desses mecanismos com a maciez carne e os resultados de expressão
91 poderão servir de base para novos estudos buscando desvendar esse processo multi-
92 enzimático.

93 O objetivo deste trabalho foi estudar a expressão dos genes CASP3,
94 DNAJA1 e CAST em animais contrastantes para o fenótipo maciez da carne,
95 verificando o envolvimento destes genes na determinação da qualidade da carne de
96 animais vacas de descarte.

97

98 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

99

100 A fase de campo foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de
101 Corte da Embrapa, Campo Grande, MS. Foram utilizadas 12 vacas de descarte da raça
102 Nelore, com idade entre 4 e 12 anos, divididas em dois grupos (G1 – Dura e G2 –
103 Macia) em função da força necessária ao cisalhamento das fibras musculares (FC). A
104 FC foi medida conforme metodologia descrita por Müller (1978) no músculo
105 *Longissimus dorsi* (contra-filé) em amostras coletadas entre a 12^a e 10^a vértebras
106 torácicas 24 horas após o abate. As amostras de contra-filé foram subdivididas em três
107 partes, uma foi congelada imediatamente e as outras duas foram maturadas por 7 ou 21
108 dias com a finalidade de se avaliar o efeito da maturação sobre a qualidade da carne.

109 Por ocasião do abate, também foram coletadas amostras de tecido muscular
110 na altura da 13^a vértebra torácica com a finalidade de se extrair o RNA total para análise
111 de expressão gênica. As amostras de músculo foram armazenadas em microtubos

112 criogênicos (2,0 mL) e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e depois
113 estocadas em ultra-freezer a -80°C até o momento da extração. O tempo decorrido entre
114 o sacrifício dos animais e o congelamento das amostras foi em média de 20 minutos.

115 As técnicas de biologia molecular foram executadas com protocolos padrão
116 e detalhamento conforme Sambrook et al. (2001). Para o processo de extração de RNA
117 total foram utilizados kits a base de trizol (Ribopure® – Âmbion e Purelink® –
118 Invitrogen), seguindo os protocolos indicados pelos fabricantes. A extração foi realizada
119 a partir de 300 mg de tecido muscular congelado e macerado em nitrogênio e transferido
120 para 4 mL de trizol. Para garantir que não houvesse contaminação com DNA, em cada
121 amostra foi realizado tratamento com 20U da enzima DNase RQ1 RNase Free
122 (Promega) com seu respectivo tampão de reação

123 Após a extração as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro
124 (ND-1000 NanoDrop Technologies), sendo medidas as absorbâncias nos comprimentos
125 de onda 260 e 280 nm. A avaliação da integridade do RNA foi realizada por duas
126 técnicas, a primeira foi uma pré-análise feita por meio de eletroforese em gel de agarose
127 (1,5%), em que se avaliou a relação entre as bandas 28S e 18S de uma alíquota de 2 µg
128 de RNA total, sendo considerada íntegra a amostra que apresentava uma relação em
129 torno de 1,5.

130 As amostras foram, posteriormente, submetidas à eletroforese capilar com o
131 equipamento Agilent 2100 Bioanalyser. Com o mesmo foi possível obter a análise de
132 RIN (número de integridade do RNA) que permite avaliar de forma objetiva a
133 integridade das amostras de RNA total obtidas (SCHROEDER et al., 2006).

134 Para a síntese de cDNA, utilizou-se 2 µg de RNA total e kit comercial
135 *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System Supermix* (Invitrogen) seguindo o

136 protocolo indicado pelo fabricante. Para a utilização em ensaios de qPCR, as amostras
 137 de cDNA foram quantificadas por meio do Qubit[®] 1.0 Fluorometer (Life Technologies)
 138 com o kit de leitura Single-Stranded DNA Assay, sendo posteriormente diluídas em
 139 H₂O RNase Free a uma concentração aproximada de 5ng/μl. Em seguida essas soluções
 140 de trabalho foram armazenadas a -20° C.

141 Para se estimar a expressão dos genes de interesse e sua associação com a
 142 característica fenotípica de maciez da carne, foram utilizados 3 genes alvo (CAST,
 143 DNAJA1 e CASP3) e três genes constitutivos (ACTB, B2M e HMBS) para serem
 144 utilizados como normalizadores. A diferença de expressão foi avaliada pela comparação
 145 entre os animais do grupo G1 e G2. Os oligonucleotídeos para a realização da análise de
 146 qPCR em tempo real foram desenhados por meio do programa Primer Express 3.0. Os
 147 genes contendo os pares de oligonucleotídeos e os números de acesso do GenBank das
 148 seqüências utilizadas para o desenho dos mesmos são apresentados na Tabela 1.

149
 150 **TABELA 1.** Lista de genes, número de acesso e seqüências dos iniciadores direto e
 151 reverso a serem utilizados no estudo de expressão gênica.
 152

Gene	Nome completo	Tamanho amplicon (pb) ¹	Número de acesso no GenBank	TM (°C) ²	Direto e Reverso
CASP3	Caspase 3	97	NM_001077840.1	81	(D) 5'-AAGGCCAGAGATGGGACACA-3' (R) 5'-TCACGGGAACCCAGTGGGTTA-3'
DNAJA1	Proteína de choque térmico (40 kDa)	82	AF308815.2	77	(D) 5'-GGAAGCCCTGGAACCACTCT-3' (R) 5'-CCCCTACTTCTTTGGTATTGTCAGAA-3'
CAST	Calpastatina	80	AF159246	80	(D) 5'-TTCAAATGCTCTGTCTTCATCTCAT-3' (R) 5'-CTGGCTTATCTTTCCAGATTTAGA-3'
B2M	β- 2- microglobulina	109	NM_173893.2	78	(D) 5'-AGTAAGCCGCAGTGGAGGT-3' (R) 5'-CGCAAACACCCTGAAGACT-3'
ACTB	β - actina	66	AY141970.1	77	(D) 5'-CCTCACGGAACGTGGTTACA-3' (R) 5'-TCCTTGATGTCACGCACAATTT-3'
HMBS	Hidroximetilbilane sintase	80	BC108110.1	78	(D) 5'-CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG -3' (R) 5'-AATGGTGAAGCCAGGAGGAA-3'

153 ¹. Número de pares de base.

154 ². Temperatura de Melting

155

156 A especificidade dos oligonucleotídeos acima citados foi analisada *in silico*,
157 através da ferramenta Primer-BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
158 [blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). A confirmação da cobertura e fidelidade dos oligonucleotídeos utilizados foi
159 realizada através de amplificação, clonagem em vetor plasmidial (TOPOTA[®]
160 (Invitrogen) e seqüenciamento dos amplicons. Utilizando-se a ferramenta BLASTn
161 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento clonado foi comparado com as
162 seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>),
163 admitindo-se uma concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade
164 da mesma.

165 Após confirmação da seqüência clonada, os plasmídeos foram linearizados e
166 purificados para construção da curva-padrão de cada gene. Os DNAs plasmidiais
167 linearizados foram quantificados por fluorometria com o aparelho Qubit[®] 1.0 (Life
168 Technologies), sendo posteriormente realizada uma diluição seriada de 6 pontos, na
169 proporção de dez vezes, para obtenção dos demais pontos da curva-padrão. A partir do
170 tamanho do inserto somado ao tamanho do vetor plasmidial, foram calculados os
171 números de cópias dos genes em cada ponto da curva-padrão.

172 A comparação da expressão dos genes estudados foi realizada pelo método
173 da quantificação absoluta em qPCR com a utilização da curva-padrão, obtendo-se o
174 número de cópias de cDNA para cada um dos genes (CASP3, DNAJA1 e CAST). Para
175 tal, foi utilizada uma reação composta por 6.25 µL do reagente 2X Power SYBR Green
176 MasterMix (Applied Biosystems), 300 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e
177 reverso), 15ng de cDNA e água ultra-pura para completar o volume de 12,5 µL para
178 cada reação.

179 As reações foram conduzidas em aparelho Applied Biosystems 7500 Real-
180 Time PCR System (Applied Biosystems), e submetidas ao protocolo “*default*” do
181 equipamento. Para se verificar a existência de amplificação inespecífica foi realizada ao
182 final da PCR a curva de dissociação. Foi analisada a eficiência de cada reação e para as
183 curvas-padrão que não apresentaram eficiência de 100%, foram ajustados os resultados
184 para cada um dos genes. Para tal, foram utilizados os valores de Ct corrigidos com valor
185 “*slope*” de -3,32 (representando uma eficiência de 100%), e o mesmo valor de
186 intercepto específico para cada gene.

187 Com os resultados devidamente corrigidos para eficiência, foi realizada uma
188 análise de verificação do melhor gene normalizador para correção de erros de técnica.
189 Para esta finalidade foi definido o valor de estabilidade de cada gene (B2M, HMBS e
190 ACTB) utilizando-se os softwares geNorm[®] e NormFinder[®]. Em seguida todos os genes
191 em estudo foram normalizados com o melhor normalizador e a expressão gênica
192 diferencial entre os grupos G1 e G2 foi definida pelo método de delta-delta Ct (ddCt) e
193 pelo número de cópias.

194 A significância estatística dos dados foi verificada por meio de análises de
195 variância utilizando-se o procedimento GLM do programa estatístico SAS
196 (STATISTICS ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE – SAS, 2002), sendo as médias
197 comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Também foi verificada a correlação entre a
198 expressão gênica de cada gene e os fenótipos observados utilizando-se o procedimento
199 CORR do mesmo programa estatístico.

200

201

202

203 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

204

205 A quantidade de RNA total obtida e a respectiva qualidade em termos de
206 valor de RIN não foram diferentes entre os tratamentos ($P>0,05$). Os valores observados
207 para a quantidade de RNA e valor de RIN no tratamento carne dura foram $7,16\pm 1,78$ e
208 $7,85\pm 0,11$, respectivamente. Esses valores, na mesma ordem, para o tratamento carne
209 macia foram $7,59\pm 1,78$ e $7,92\pm 0,13$.

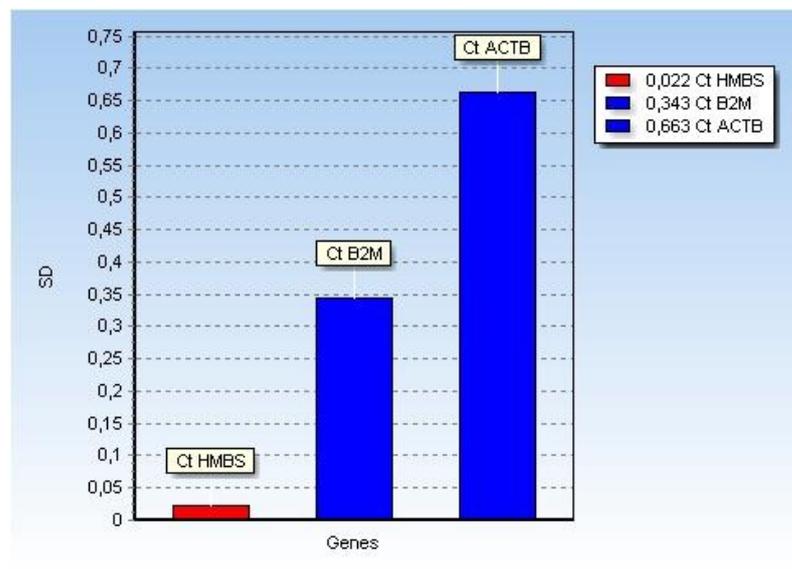
210 Os resultados de estabilidade obtidos com o programa geNorm[®] para os
211 genes HMBS e B2M foram similares e os menores (0,344) que a estabilidade observada
212 para o gene ACTB, que apresentou o valor de estabilidade de 0,58. Zhang et al. (2011),
213 avaliando genes constitutivos em experimentos com tecido muscular de suínos,
214 encontraram um valor de estabilidade de 0,66 para o gene ACTB, valor relativamente
215 próximo ao encontrado no presente estudo. Por outro lado, Perez et al. (2008), avaliando
216 a estabilidade de genes referência em tecido muscular de bovinos encontraram valores
217 de estabilidade iguais a 0,83 para o gene ACTB, 0,98 para B2M e 0,78 para HMBS.
218 Cabe ressaltar que, apesar dos valores numéricos encontrados serem diferentes do
219 presente trabalho, o gene HMBS foi o que apresentou melhor estabilidade e isso
220 coincide com os resultados encontrados.

221 Com os resultados obtidos com o uso do programa NormFinder[®] (Figura 1),
222 observa-se também que o gene HMBS mais uma vez apresentou o melhor valor de
223 estabilidade (0,022), enquanto que os genes B2M e ACTB apresentaram valores de
224 0,343 e 0,663, respectivamente. Perez et al. (2008) também verificaram a melhor
225 estabilidade para o gene HMBS (0,39) do que para os genes B2M e ACTB, que
226 apresentaram valores de 0,61 e 0,48, respectivamente. Esta discrepância entre os valores

227 encontrados e os de literatura pode ser devido a diferenças entre as condições
 228 experimentais e fatores intrínsecos e extrínsecos que não podem ser controlados.

229 Considerando os resultados encontrados, o gene HMBS foi escolhido para
 230 normalização dos resultados obtidos na expressão para os genes em estudo.

231



232

233 **FIGURA 1.** Resultado do programa Normfinder[®] com análise de estabilidade de genes
 234 constitutivos para expressão relativa em qPCR.

235

236 De acordo com os resultados da análise de variância para as características
 237 fenotípicas e o número de cópias para cada gene estudado (Tabela 2), observa-se que
 238 houve uma diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis de FC ao dia
 239 zero de maturação, porém esta diferença não foi observada nos tempos 7 e 21 dias
 240 ($P > 0,05$). Observa-se também que houve diferença significativa entre os grupos para as
 241 variáveis de maturação nos tempos 7 e 21 dias. Porém cabe ressaltar que o efeito de
 242 maturação foi maior até o sétimo dia, assim, o efeito significativo observado ao tempo
 243 de 21 dias pode ser considerado como um resultado acumulado, já que a diminuição na

244 força de cisalhamento do tempo 7 dias para o tempo 21 dias foi de apenas 0,68 e 0,77
245 kg para G1 e G2, respectivamente.

246 Uma provável explicação para os resultados encontrados seria que a
247 atividade de proteólise foi maior nas carnes mais duras, fazendo com que aos 7 dias de
248 maturação houvesse uma considerável redução na diferença entre as médias de FC para
249 os grupos estudados. Este efeito não foi observado entre os dias 7 e 21, onde parece
250 haver uma diminuição do processo de maturação ou da ação proteolítica das enzimas.

251 Resultados semelhantes foram encontrados por Arrigoni et al. (2004) que,
252 trabalhando com FC em carne de animais jovens maturadas até 14 dias, encontraram
253 somente diferenças significativas para efeito de maturação aos 7 dias, efeito que não se
254 prorrogou para um tempo maior. Koohmaraie (1990) explica esse efeito pelo
255 decréscimo da proteólise enzimática nos sete primeiros dias *postmortem*, resultando em
256 menor efeito de maturação a partir desse tempo.

257

258 **TABELA 2.** Médias e erro-padrão para a força de cisalhamento (FC) em amostras do
259 músculo *Longissimus dorsi* de vacas de descarte maturadas por 0, 7 ou 21
260 dias e expressão gênica no mesmo músculo.

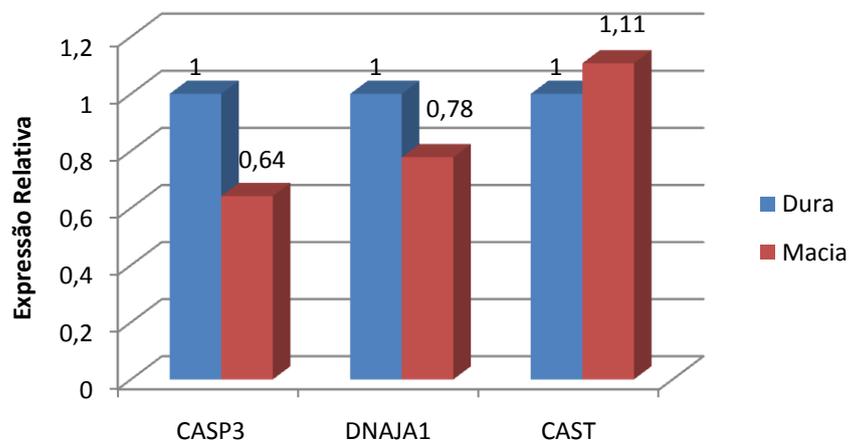
Variáveis	Tratamentos		Probabilidade (P<)
	Dura	Macia	
Força de cisalhamento (kg)			
0 Dias	13,04±0,57	7,04±0,64	0,0002
7 Dias	8,08±0,59	6,28±0,66	0,0826
21 Dias	7,40±0,58	5,86±0,65	0,1219
Redução na FC (kg)			
Efeito após 7 dias	4,96±0,50	1,42±0,71	0,0065
Efeito após 21 dias	5,64±0,48	2,19±0,69	0,0064
Quantificação absoluta¹			
CASP3	218,0±31,4	140,0±35,2	0,0365
DNAJA1	2417,3±393,7	1880,6±440,2	0,2742
CAST	3442,8±1052,0	3810,9±1076,1	0,6831

261 CASP3 – Caspase3; DNAJA1 – Proteína de Choque Térmico 40 kDa; CAST- Calpastatina.

262 ¹. Número de cópias do gene presente em cada ng de cDNA.

263 Quanto às variáveis pertinentes ao número de cópias para os genes
 264 estudados, somente o gene CASP3 apresentou diferença significativa entre os grupos
 265 G1 e G2. Os resultados de expressão gênica relativa entre os grupos estudados podem
 266 ser observados na Figura 2. Os animais que apresentaram carne com FC menor, também
 267 apresentaram menor número de cópias para o gene CASP3, sendo esta diferença na
 268 ordem de 36% menor quando comparada com animais com maior FC. Por outro lado,
 269 os animais de carne mais dura (G1) foram os que apresentaram maior efeito de
 270 maturação, evidenciando que essa enzima está associada somente ao processo
 271 proteolítico da maturação e não à dureza inicial da carne.

272



273

274 **FIGURA 2.** Diferença relativa na expressão dos genes em estudo entre os tratamentos

275

276 Após a morte do animal, o tecido muscular sofre um processo de proteólise
 277 que é determinante para o amaciamento da carne. Um dos complexos envolvidos nesse
 278 processo é o da calpaína/calpastatina (TAYLOR et al., 1995; KOOHMARAIE, 1996;
 279 BOEHM et al., 1998; DOUMIT & KOOHMARAIE, 1999; GEESINK &
 280 KOOHMARAIE, 1999 e RILEY et al., 2005), porém, conforme Koohmaraie (1996),

281 estas enzimas não podem explicar toda a variabilidade de maciez existente entre os
282 animais, levando a hipótese de existir outros sistemas de proteólise ativos *postmortem*.

283 Kemp et al. (2009) afirmam que as caspases do tipo 3, são proteases de
284 cisteínas e indutoras de apoptose celular, sendo ativadas pela pro-caspase 3
285 particularmente no músculo esquelético. O mesmo autor descreve que as caspases 8, 9 e
286 10 têm o papel de promover o início da cascata de ativação desse complexo, e que a
287 caspase 3, é uma enzima efetora e responsável por hidrolisar diversas proteínas
288 estruturais, que também são alvo das calpaínas.

289 O real envolvimento da enzima caspase 3 no processo proteolítico ainda é
290 bastante divergente na literatura. Alguns autores têm encontrado resultados positivos
291 quanto a ação desta enzima durante o processo de proteólise, como os resultados
292 sugeridos pelo presente trabalho. Kemp et al. (2006a, 2006b e 2008) em suínos e
293 Mendez et al. (2010) em bovinos, detectaram a ativação de caspases 3 em tecido
294 muscular esquelético *postmortem*, e identificaram a formação de um fragmento entre 30
295 e 32kDa, relacionados à clivagem da actina.

296 De acordo com Wang et al. (1998), existe uma correlação positiva entre os
297 produtos de degradação da espectrina e a ativação da caspase 3. No estudo realizado por
298 Chen et al. (2011) foi avaliada a degradação da espectrina em carne de frangos,
299 importante estrutura para a integridade do citoesqueleto muscular. Os autores
300 observaram que na adição de Ca^{2+} e outros dois produtos químicos de apoptose
301 (camptotecina e etoposido), somente o Ca^{2+} gerou um produto de degradação de
302 120kDa. Esse fragmento (SBDP 120) tem sido utilizado como um marcador para
303 caspase 3 após sua ação proteolítica, e a ação conjunta das caspases e calpaínas com um
304 marcador de 150kDa.

305 Embora a caspase 3 não seja uma protease de cisteína dependente de cálcio,
306 os resultados obtidos por Chen et al. (2011) mostraram de forma convincente que a
307 utilização de Ca²⁺ resultou em uma maior atividade da caspase 3, mas que ainda é
308 necessário entender o real relacionamento do sistema proteolítico calpaína/calpastatina
309 com as caspases.

310 Huang et al. (2009) observaram que a utilização de um inibidor específico
311 de caspase 3, acarretou na inibição da proteólise de estruturas que compõem o músculo
312 esquelético (titina, nebulina, desmina e troponina-T), que são naturalmente degradadas
313 *postmortem*. Sendo assim, os autores concluíram que a enzima caspase 3 pode estar
314 envolvida no processo de proteólise muscular, mas que é necessária a realização de
315 novas experiências buscando elucidar esse mecanismo. Por outro lado, Huang et al.
316 (2011) avaliaram a ação das caspases 3 e 6 em dois momentos (2 e 12 horas
317 *postmortem*) e verificaram uma ação pouco significativa da caspase 3 na degradação da
318 desmina em tecido muscular bovino, mas os resultados foram inconsistentes, levando os
319 autores a acreditar na hipótese de uma ação conjunta com a calpaína.

320 Outros autores também não encontraram efeito significativo para ação dessa
321 enzima com a degradação de miofibrilas musculares. Underwood et al. (2007),
322 trabalhando com vacas, não encontraram associação da FC com a atividade da caspase 3
323 e afirmaram que ela não está envolvida no processo de amaciamento *postmortem*. Os
324 próprios autores, porém, relatam que a metodologia utilizada no experimento (teste de
325 atividade enzimática por meio de *immunoblotting*) não é muito sensível, podendo não
326 detectar a presença de caspases 3 ativas quando em baixas concentrações.

327 Neste sentido, Mohrhauser et al. (2011) também não observaram atividade
328 da enzima em nenhum dos ensaios experimentais, não encontrando também nenhuma

329 correlação com a força de cisalhamento. Porém o número amostral utilizado pelo autor
 330 (n=2) não fornece aporte suficiente para assegurar a hipótese do não envolvimento da
 331 caspase 3 no processo de proteólise.

332 Na análise de correlação entre os genes e fenótipos estudados (Tabela 3),
 333 observa-se que a expressão do gene CASP3 é moderada e positivamente correlacionada
 334 com a força de cisalhamento no dia 0 e com o efeito de maturação, o que corrobora a
 335 idéia de que esta enzima esteja envolvida na formação do fenótipo.

336

337 **TABELA 3.** Resultados das correlações entre as variáveis estudadas¹

338

Variáveis	FC 0dias	FC 7dias	FC 21dias	M 7dias	M 21dias	CASP3	DNAJA1	CAST
FC 0 dias	1,00	0,71	0,65	0,87	0,94	0,66	0,47	-0,02
P<		0,015	0,030	0,001	<,0001	0,028	0,147	0,957
FC 7 dias		1,00	0,78	0,48	0,80	0,28	0,39	0,28
P<			0,005	0,160	0,006	0,409	0,232	0,403
FC 21 dias			1,00	0,78	0,70	0,27	0,38	-0,09
P<				0,008	0,024	0,427	0,254	0,789
M7 dias				1,00	0,83	0,63	0,37	-0,27
P<					0,003	0,049	0,289	0,444
M21 dias					1,00	0,61	0,41	0,07
P<						0,060	0,242	0,838
CASP3						1,00	0,82	0,34
P<							0,002	0,310
DNAJA1							1,00	0,57
P<								0,070

339 ¹. FC- Força de cisalhamento (kg); M7 – redução na FC do tempo 0 até 7 dias de maturação; M21 –
 340 redução na FC do tempo 0 até 21 dias de maturação.

341 CASP3 – Gene Caspase3; DNAJA1 – Gene Proteína de Choque Térmico 40 kDa; CAST- Gene Calpastatina.

342

343 Com os resultados de expressão para o gene CAST observa-se que as carnes
 344 mais macias apresentaram uma expressão de 11% a mais quando comparadas as carnes
 345 mais duras. Essa diferença sugere um efeito inibidor das calpastatinas, pois de acordo
 346 com a teoria de ação do complexo calpaína/calpastatina, quanto maior a quantidade de
 347 calpastatina, menor a ação das calpaínas, resultando em menor efeito no amaciamento

348 *postmortem*. De fato os animais que apresentaram maior expressão do gene CAST,
349 também apresentaram menor efeito de maturação (Tabela 1).

350 Esse efeito inibitório da enzima calpastatina sobre o processo de maturação
351 da carne já é bem comprovado na literatura (SHACKELFORD et al., 1994; GEESINK
352 & KOOHMARAIE, 1999; HOPKINS & TAYLOR, 2004; KOOHMARAIE &
353 GESSINK, 2006). Entretanto, a ausência de significância estatística entre os grupos
354 estudados para o número de cópias do gene CAST pode ser devido ao fato de se ter
355 utilizado no presente trabalho um único grupo genético (*Bos taurus indicus*),
356 previamente caracterizado por possuírem maiores teores de calpastatina no músculo em
357 relação aos animais taurinos (*Bos taurus taurus*) (SHACKELFORD, 1991;
358 RUBENSAM et al., 1998), ou talvez, devido ao baixo número de amostras utilizadas no
359 presente trabalho (n=6).

360 Cabe ressaltar que a expressão desse gene não se mostrou correlacionada
361 com nenhum dos fenótipos estudados (Tabela 3), um dos possíveis argumentos para a
362 ausência de associação desse gene com o efeito de maturação pode ser a variabilidade
363 encontrada na expressão desse gene (CV=29%).

364 Embora não tenha sido observada diferença significativa na expressão do
365 gene DNAJA1 entre os grupos estudados, com os resultados do presente trabalho há a
366 tendência de que carnes mais macias apresentam expressão 22% menor em relação às
367 carnes mais duras. O gene DNAJA1 corresponde a uma proteína de choque térmico
368 (Hsp40) que forma um complexo com uma Hsp70, e este complexo está associado a um
369 efeito anti-apoptótico (BERNARD et al., 2007). Uma hipótese recentemente proposta é
370 que o processo de apoptose celular esteja intimamente envolvido com o processo de
371 amaciamento da carne na fase de maturação (OUALI et al., 2006). De acordo com essa

372 linha de raciocínio, Bernard et al. (2007) encontraram um relacionamento negativo
373 desse gene com a maciez da carne de bovinos, no qual a expressão do DNAJA1 poderia
374 explicar até 63% da variabilidade encontrada na maciez da carne. Segundo estes autores
375 a maior expressão do DNAJA1 nas carnes mais duras, pode ser devido ao efeito inibidor
376 da atividade apoptótica. Sendo assim, a maior expressão do gene DNAJA1 contribuiria
377 para o impedimento da morte celular, retardando o processo de conversão de músculo
378 em carne e, conseqüentemente, reduzindo o amaciamento da mesma.

379 Esse efeito também foi verificado por Gotoh et al. (2004), mostrando que os
380 altos níveis dessa proteína retardaram a atividade proteolítica *postmortem*, sugerindo
381 uma propriedade anti-apoptótica dessas proteínas durante o processo de maturação. Em
382 outros estudos, Kemp et al. (2012) relatam que a baixa expressão do gene DNAJA1 leva
383 a uma baixa inibição da apoptose, permitindo uma maior eficiência na morte celular e
384 maior ação das atividades das caspases durante o período *postmortem*,
385 conseqüentemente aumentando o amaciamento da carne.

386 Um resultado divergente da literatura foi apresentado por Guillemin et al.
387 (2011), que com estudos proteômicos a partir de carnes maturadas de animais
388 Charoleses jovens e novilhos castrados encontraram uma correlação positiva do gene
389 DNAJA1 com a maciez da carne. Entretanto, estes autores trabalharam com a maciez da
390 carne após sofreram um processo de maturação. Não necessariamente as carnes mais
391 macias ao final desse período foram as que sofreram maior ação proteolítica (redução da
392 FC). Dessa forma esses autores podem somente associar a maior ou menor expressão
393 desse gene com a maciez encontrada na carne após o processo de maturação e não com
394 o efeito de maturação.

395 Os resultados encontrados no presente trabalho para a expressão do gene
396 DNAJA1 e para a FC ao T0, T7 e T21 estão de acordo com os relatados por Bernard et
397 al. (2007) no qual animais com maior expressão do gene apresentaram maior FC para os
398 três períodos. Entretanto, as carnes que apresentaram maior efeito de maturação foram
399 as que apresentaram maior expressão do gene DNAJA1, porém, os resultados de
400 correlação desse gene com os fenótipos avaliados mostram que ele não está associado
401 ao efeito de maturação.

402 Cabe ressaltar que as expressões dos genes CASP3 e DNAJA1 são alta e
403 positivamente correlacionadas, sugerindo que o aumento da expressão de um dos genes
404 acarretaria no aumento do outro. Assim, a hipótese criada seria que tecidos que por
405 alguma razão percam o seu estado de equilíbrio fisiológico (stress e ou aceleração do
406 metabolismo) tenderiam a elevar a expressão de proteases, dentre elas a caspase 3.
407 Todavia, uma das formas de atuação dessas proteases é a sinalização da apoptose
408 celular, e como mecanismo de defesa da célula, esta deve aumentar a transcrição de
409 proteínas anti-apoptóticas, tais como DNAJA1. Assim, todas estas alterações
410 acarretariam na formação de carne mais dura, porém apresentando uma maior proteólise
411 *postmortem*.

412

413

414 **4 CONCLUSÕES**

415

416 O processo bioquímico que determina o fenótipo de amaciamento da carne
417 ainda não se encontra bem elucidado, porém os resultados encontrados no presente
418 trabalho reforçam a hipótese que este é um processo multi-enzimático e não somente
419 determinado pelo complexo calpaína/calpastatina.

420 Os genes estudados mostram-se envolvidos no processo de conversão de
421 músculo em carne e no fenótipo de maciez. Porém novos trabalhos devem ser realizados
422 com a utilização de um número maior de amostras com a finalidade de confirmação do
423 real envolvimento desses genes tanto na determinação da dureza da carne, quanto no
424 processo proteolítico *postmortem* (amaciamento).

425

426

427 **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

428

429 ARRIGONI, M. B.; ALVES JÚNIOR, A.; DIAS, P. M. A.; MARTINS, C. L.;
430 CERVIERI, R. C.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N.; CHARDULO, L. A. L.
431 Desempenho, fibras musculares e carne de bovinos jovens de três grupos genéticos.
432 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.1033-1039, 2004.

433

434 BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DURBROEUCQ, H.;
435 RENARD, G.; HOCQUETTE, J. F. New indicators of beef sensory quality
436 revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food**
437 **Chemistry**, v.55, p.5229–5237, 2007.

438

439 BOEHM, M. L.; KENDALL, T. L.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Changes in the
440 Calpains and Calpastatin During *Post Mortem* Storage of Bovine Muscle. **Journal**
441 **of Animal Science**, v.76, p. 2415-2434, 1998.

442

443 CHEN, L.; FENG, X. C.; LU, F.; XU, X. L.; ZHOU, G. H.; LI, Q. Y.; GUO, X. Y.
444 Effects of camptothecin, etoposide and Ca²⁺ on caspase-3 activity and myofibrillar
445 disruption of chicken during *postmortem* ageing. **Meat Science**, v.87, p.165–174,
446 2011.

447

448 DOUMIT, M. E. & KOOHMARAIE, M. Immunoblot Anlysis of Calpastatin
449 Degradation: Evidence for Cleavage by Calpain in *Postmortem* Muscle. **Journal of**
450 **Animal Science**, v.77, p.1467-1473, 1999.

451

452 GEESINK, G. H. & KOOHMARAIE, M. Postmortem Proteolysis and
453 Calpain/Calpastatin Activity in Callipyge and Normal Lamb *Biceps Femoris*
454 During Extended *Postmortem* Storage. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 1490-
455 1501, 1999.

456

457 GOTOH, T.; TERADA, K.; OYADOMARI, S.; MORI, M. Hsp70-DNAJA chaperone
458 air prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation
459 of Bax to mitochondria. **Cell Death Differentiation**, v.11, p.390–402, 2004.

460

461 GUILLEMIN, N.; JURIE, C.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; RENAN,
462 G.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef
463 tenderness according to muscle and animal type. **Animal Journal**. v.5, p.885–94,
464 2010.

465

466 GUILLEMIN, N.; BONNET, M.; JURIE, C.; PICARD, B. Functional analysis of beef
467 tenderness. **Journal of Proteomics**. v.75, p.352-365, 2011.

468

469 HOPKINS, D.L. & TAYLOR, R.G. Post-mortem muscle proteolysis and meat
470 tenderness. In: Muscle Development of Livestock Animals – **Physiology, Genetics**
471 **and Meat Quality**. v.1, p.363-381, 2004.

472

- 473 HUANG, M.; HUANG, F.; XU, X. L.; ZHOU, G. H. Influence of caspase3 selective
474 inhibitor on proteolysis of chicken skeletal muscle proteins during *postmortem*
475 aging. **Food Chemistry**, v.115(1), p.181–186, 2009.
- 476
- 477 HUANG, F.; HUANG, M.; ZHOU, G.; XU, X.; XUE, M. In vitro proteolysis of
478 myofibrillar proteins from beef skeletal muscle by caspase-3 and caspase-6.
479 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, p.9658-9663, 2011.
- 480
- 481 KEMP, C. M.; BARDSLEY, R. G.; PARR, T. Changes in caspase activity during the
482 *postmortem* conditioning period and its relationship to shear force in porcine
483 longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2841–2846, 2006a.
- 484
- 485 KEMP, C. M.; PARR, T.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. Comparison of the
486 relative expression of caspase isoforms in different porcine skeletal muscles. **Meat**
487 **Science**, v.73, p.426–431, 2006b.
- 488
- 489 KEMP, C. M.; & PARR, T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar
490 proteins in porcine skeletal muscle. **Animal Journal**. v.2, p.1254-1264, 2008.
- 491
- 492 KEMP, C. M.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.;
493 KOOHMARAIE, M. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs
494 in *longissimus dorsi*, *semimembranosus* and *infraspinatus* muscles during
495 *postmortem* storage. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2943-2951,
496 doi:10.2527.jas.2009-1790, 2009.
- 497
- 498 KEMP, C. M. & PARR, T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat
499 tenderization. **Meat Science**. Article in press, 2012.
- 500
- 501 KOOHMARAIE, M. Inhibition of *postmortem* tenderization in ovine carcass through
502 infusion of zinc. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1476, 1990.
- 503
- 504 KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization
505 processes of meat. **Meat Science**, v. 43, p.193-201, 1996.
- 506
- 507 KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G.H. Contribution of *postmortem* muscle
508 biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the
509 calpain system. **Meat Science**, v. 74, p. 34-43, 2006.
- 510
- 511 MENDEZ, C. H. H.; OUALI, A.; BERTOMEU, M.; SENTANDREU, E.; COULIS, G.;
512 SENTANDREU, M. A. Muscle Actin degradation by the action of Caspase 3. Food
513 Inoova, **International Conference on Food Inoovation**, Valência, 2010.
- 514
- 515 MOHRHAUSER, D. A.; UNDERWOOD, K. R.; WEAVER, A. D. In vitro degradation
516 of bovine myofibrils is caused by μ -calpain, not caspase-3. **Journal of Animal**
517 **Science**, v.89, p.798–808, 2011.
- 518
- 519 MULLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de**
520 **novilhos**. 2ª edição. Santa Maria: UFSM, p.31, 1987.

- 521
522 OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, H. C.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL,
523 A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into
524 meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v.74, p.44–58, 2006.
525
- 526 PEREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference
527 genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular**
528 **Biology** v.9: n.79, 2008.
529
- 530 RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE JUNIOR, C. C.; WEST, R. L.; COLEMAN,
531 S. W.; OLSON, T.A.; HAMMOND, A. C. Factors influencing tenderness in steaks
532 from Brahman cattle. **Meat Science**, v.70, p.347-356, 2005.
533
- 534 RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *bos*
535 *indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no
536 Sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.405-409, 1998.
537
- 538 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New
539 York: Cold Spring Harbor, 3ªEdição, 2001.
540
- 541 SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.;
542 GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T.
543 The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA
544 measurements. **BMC Molecular Biology**. v.7:3, doi: 10.1186/1471-2199-7-3,
545 2006.
546
- 547 SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J. D.;
548 REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus
549 by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal Animal Science**, v. 69, p.
550 171-177, 1991.
551
- 552 SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K. E.;
553 ROHRER, G. A.; SAVELL, J. W. Heritabilities and phenotypic and genetic
554 correlations for bovine *postrigor* calpastatin activity, intramuscular fat content,
555 Warner-Bratzler Shear force. Retail product yield, and growth rate. **Journal of**
556 **Animal Science**, v.72, n.4, p.857-863, 1994.
557
- 558 STATISTICS ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **User's guide**. Cary, 2002.
559
- 560 TAYLOR, R. G.; GEESINK, G. H.; THOMPSON, V. F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL,
561 D. E. Z-disk degradation responsible for *post-mortem* tenderization. **Journal of**
562 **Animal Science**, v.73, p.1351-1367, 1995.
563
- 564 UNDERWOOD, K. R.; MEANS, W. J.; DU, M. Caspase 3 is not likely involved in the
565 *postmortem* tenderization of beef muscle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.960–
566 966, 2008.
567

- 568 VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.;
569 DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative
570 RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome**
571 **Biology**, Jun v.18;3(7):RESEARCH0034, 2002.
572
- 573 WANG, K. K. W.; POSMANTUR, R.; NATH, R.; MCGINNIS, K.; WHITTON, M.;
574 TALANIAN, R. V.; GLANTZ, S. B.; MORROW, J. S. Simultaneous degradation
575 of α II- and β II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. **Journal of**
576 **Biological Chemistry**, v.273(35), p.22490–22497, 1998.
577
- 578 WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; JOHNSON, L.P.; MILLER, M.F.;
579 MILLER, R.K.; KOOHMARAIE, M. A comparison of Warner-Bratzler shear force
580 assessment within and among institutions. **Journal of Animal Science**, v. 75, p.
581 2423–2432, 1997.
582
- 583 ZHANG, J.; TANG, Z.; WANG, N.; LONG, L.; LI, K. Evaluating a Set of Reference
584 Genes for Expression Normalization in Multiple Tissues and Skeletal Muscle at
585 Different Development Stages in Pigs Using Quantitative Real-Time Polymerase
586 Chain Reaction. **DNA and Cell Biology**, v.00, n.00, p.1-8, DOI:
587 10.1089/DNA.2011.1249, 2011.
588
- 589

CAPÍTULO 3
(Metodologia detalhada)

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 EXPERIMENTO A CAMPO

A fase de campo foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte da Embrapa, Campo Grande, MS. Os animais utilizados para esse experimento constituem-se em uma subamostra de 12 indivíduos provenientes de um projeto que utilizou 38 vacas de descarte, da raça Nelore, com idade entre 4 a 12 anos.

1.2 ANÁLISE DA FORÇA DE CISALHAMENTO E COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram abatidos, no Laboratório de Carcaças da Embrapa de Corte, de forma seriada para avaliar a evolução da deposição tecidual nas carcaças.

As carcaças foram avaliadas de forma quali-quantitativa de acordo com a metodologia proposta por Muller (1978). A maciez da carne foi avaliada de forma indireta pela FC, para tanto, foram retirados quatro bifés de 2,5 cm do músculo *Longissimus dorsi*, sendo o primeiro congelado logo após o resfriamento e os demais após maturação de 7 e 21 dias. Para a avaliação da FC, os bifés foram descongelados a 8°C por 18 horas e assados em forno elétrico pré-aquecido a 300°C até atingirem a temperatura interna de 71 °C. Após o cozimento os bifés foram resfriados e posteriormente analisados. Utilizou-se um vazador, medindo 1,27 cm de diâmetro, acoplado a uma furadeira de bancada para a retirada de 6 amostras cilíndricas de cada bife. As amostras foram extraídas paralelamente ao eixo das fibras musculares. O cisalhamento das amostras foi realizado com um acessório Warner-Bratzler *Meat Shear Slot Blade*, lâmina cega em formato de “V”, acoplado em um texturômetro de marca TA XT Plus com velocidade de descida de 20 cm por minuto e célula com carga máxima de 30 kg (WHEELER et al., 1997).

A escolha dos animais selecionados para o experimento foi em função da maciez da carne, utilizou-se os extremos da distribuição dos valores de FC. Nessa amostragem, garantiu-se que os tratamentos originais estivessem balanceados nos dois extremos (G1 – Dura e G2 – Macia).

Os tratamentos testados nesse experimento foram constituídos de amostras do músculo *Longissimus dorsi* (contrafilé) coletadas logo após a esfolagem das vacas. Para tanto, utilizou-se um vazador com 2,54 cm de diâmetro para a retirada das amostras do músculo *Longissimus dorsi* na altura da 13ª vértebra torácica.

As amostras de músculo coletadas para a extração de RNA foram armazenadas em microtubos (1,5 mL). Durante o abate os microtubos foram mantidos em nitrogênio líquido e depois estocados em ultra-freezer a -80°C.

1.3 EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE MÚSCULO

Para o processo de extração de RNA total, utilizou-se kits a base de Trizol (Ribopure – Ámbion e Purelink – Invitrogen), seguindo os protocolos indicados pelo fabricante. A extração foi feita a partir de 300 mg de tecido muscular congelado e macerado em nitrogênio, usando-se cadinho e pistilo. O macerado foi transferido para um tubo de polipropileno (Falcon) de 15 mL, contendo 4 mL de trizol, sendo posteriormente homogeneizado em vórtex e retornado ao gelo. Após a homogeneização os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 8 minutos, permitindo a dissociação completa das nucleoproteínas.

Posteriormente os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4200 xg para separação das fases (tecido – trizol). Em seguida foram transferidos 1 mL do homogeneizado em 4 tubos de Eppendorf, adicionando a cada tubo 200 µL de clorofórmio e voltando a homogeneizar com movimentos lentos, evitando a contaminação com DNA, e incubando por 5 minutos.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 10 minutos. Transferiu-se 700 µL da fase superior a um novo tubo de Eppendorf, adicionou-se 350 µL de etanol absoluto e procedeu-se agitação imediata para evitar a formação de precipitados e para que o RNA pudesse se ligar à membrana de sílica da coluna. Em seguida foram transferidos 500 µL do homogeneizado para a coluna do kit, e logo após centrifugou-se por 30 segundos a 12.000 xg até que se passasse toda a fração dos 4 tubos correspondentes a cada amostra pela coluna. Após este procedimento foi adicionado à coluna 500 µL de solução de lavagem e centrifugado também por 30 segundos a 12.000 xg para lavagem da coluna.

Para garantir que não houvesse contaminação com DNA, foi feito tratamento com 20U da enzima DNase RQ1 RNase Free (Promega) por amostra, com seu respectivo tampão de reação. O tratamento foi feito diretamente na coluna, deixando incubado por 30 minutos a 37,5 °C. O próximo passo foi novamente a lavagem com solução de lavagem e centrifugação por 30 segundos a 12.000 xg, descartando a solução restante no fundo do tubo, sendo este passo feito mais uma vez, para que a coluna ficasse bem seca. Finalizando o processo, a coluna foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 50 µL de tampão de eluição a 46°C, deixando incubar por 2 minutos e centrifugando por 30 segundos a 12.000 xg para obtenção do RNA ligado a coluna.

As amostras de RNA total foram imediatamente quantificadas e armazenadas para verificação da qualidade e posterior síntese de cDNA.

1.4 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DO RNA

Para verificar a quantidade e a pureza do RNA total extraído em cada amostra, utilizou-se de duas técnicas de quantificação, por espectrofotometria e fluorimetria. As mensurações realizadas por espectrofotometria foram realizadas em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies), sendo medidas as absorvâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

A outra técnica de quantificação (fluorimetria) foi realizada no equipamento Qubit[®] 1.0 Fluorometer (Life Technologies), utilizando um kit de leitura RNA Assay, onde o reagente fluorescente liga-se somente ao RNA, devido a sua especificidade. Com a fluorescência ligada à molécula, ocorre uma emissão de luz sensível ao aparelho, que quantifica de forma precisa a quantidade de RNA presente naquela amostra, já que o fluoróforo não tem especificidade com outras biomoléculas.

1.5 ANÁLISE DE INTEGRIDADE DO RNA PELO BIOANALYSER

A avaliação da integridade do RNA foi conferida por meio de duas técnicas, sendo a primeira por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5%). Observou-se a relação das bandas 28S/18S de uma alíquota de 2 µg de RNA total, preparada com 6 µL de formamida e deixadas em banho-maria por 7 minutos a 70 °C para que os RNAs não

formassem estruturas secundárias. Após esse tempo adicionou-se 1 µL de GelRed e Stop de corrida, aplicando no gel todo o volume, e posteriormente ligando a corrente elétrica para iniciar a movimentação das moléculas.

A segunda técnica usada na avaliação do RNA foi realizada pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyser. O Bioanalyser determina o parâmetro RIN (número de integridade do RNA) que permite avaliar a integridade das amostras de RNA total obtidas. O seu valor varia entre 0 e 10, sendo tanto melhor a integridade das amostras quanto mais próximo de 10 estiver o valor (SCHROEDER et al., 2006).

No preparo da amostra, utilizou-se 1 µL de RNA de cada amostra e 1 µL de RNA padrão, sendo todos os tubos mantidos em gelo. Para leitura as amostras foram desnaturadas junto com o padrão de RNA a 70 °C por 2 minutos e, posteriormente, mantidas em gelo. Foi pipetado 1 µL do padrão e 1 µL de cada amostra em cada um dos 12 poços do nanochip (cubeta do equipamento). Por fim o chip foi colocado no vórtex e agitado por 1 minuto a 5000 rpm e em seguida foi realizada a leitura no equipamento.

1.6 SÍNTESE DE CDNA PARA A TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

A síntese de cDNA a partir do RNA foi realizada por meio do kit *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System Supermix* (Invitrogen[®]) conforme o protocolo do fabricante. Resumidamente, foi utilizado 2 µg de RNA total, ao qual foi adicionando 1 µL de oligo dT₁₈ primer (50 µM) e 1 µL de tampão de anelamento, completando com H₂O RNase Free para um volume final de 8 µL. As reações foram colocadas em um termociclador (GeneAmp Thermal Cycler 9700 – Applied Biosystems) seguindo o programa: 65°C por 5 minutos e 20°C por 5 minutos. Ao final desta etapa, foram adicionados a cada reação 10 µL de 2X First Strand Reaction Mix e 2 µL de SuperScriptTM III/RNaseOUTTM Enzyme Mix dando seguimento ao programa do termociclador: 50°C por 60 minutos e 80° por 5 minutos. A seguir foram adicionados a cada reação 0,5 µL de RNaseH (2U/ µL) mais 0,5 µL de H₂O RNase Free, posteriormente deixando terminar o programa com 37°C por 22 minutos.

Após o término, os tubos com as reações foram retirados do termociclador, adicionados de 1 µL de 0.5M EDTA (pH 8.0) diluído 1:3 (1 µL de EDTA + 3 µL de

H₂O RNase Free), agitados e centrifugados imediatamente. As reações foram transferidas a novos tubos de Eppendorf de 1,5 mL, adicionando a cada um deles 25 µL de H₂O RNase Free, 5µl de Acetato de Sódio (NaOAc) a 3M e 125µl de Etanol (EtOH) absoluto gelado. Logo após os tubos foram levados ao freezer -20°C e deixados durante a noite para precipitação do cDNA.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas à velocidade máxima por 20 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante cuidadosamente e removendo o excesso de ETOH com o pipetador. Em seqüência foi adicionado 1ml de ETOH 75% gelado, centrifugando novamente à velocidade máxima por 6 minutos a 4 °C. Por fim foi removido cuidadosamente o ETOH com o pipetador para não perder os peletes. Estes foram secados por 10 minutos em bomba a vácuo comum, e depois foram resuspendidos em 30 µL de H₂O RNase Free.

Para a utilização em ensaios de qPCR, as amostras foram quantificadas por meio do Qubit[®] 1.0 Fluorometer (Life Technologies), utilizando o Kit de leitura Single-Stranded DNA Assay, sendo posteriormente diluídas em H₂O RNase Free a uma concentração média de 5ng/µl. Em seguida essas soluções de trabalho foram armazenadas a -20° C.

Para se estimar a associação dos genes de interesse com a característica fenotípica de maciez da carne, foram utilizados 3 genes alvo (CAST, DNAJA1 e CASP3) e três genes constitutivos (ACTB, B2M e HMBS) para serem utilizados como normalizadores. A diferença de expressão foi avaliada pela comparação entre os animais do grupo G1 e G2.

Os oligonucleotídeos para a realização da análise de qPCR em tempo real foram desenhados por meio do programa Primer Express 3.0. Os genes contendo os pares de oligonucleotídeos e os números de acesso do GenBank das seqüências utilizadas para o desenho dos mesmos são apresentados na Tabela 4.

A especificidade dos oligonucleotídeos acima citados foi analisada *in silico*, através da ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Após a sintetização, amplificação e clonagem em vetor plasmídeo, a especificidade foi confirmada novamente pelo seqüenciamento de amplicons obtidos nas reações de PCR realizadas com amostras de cDNA do presente estudo.

TABELA 4. Lista de genes, número de acesso e seqüências dos iniciadores direto e reverso a serem utilizados no estudo de expressão gênica.

Gene	Tamanho amplicon (pb)	Número de acesso no GenBank	TM (°C)	Direto e Reverso
CASP3	97	NM_001077840.1	81	(D) 5'-AAGGCCAGAGATGGGACACA-3' (R) 5'-TCACGGGAACCACTGGGTTA-3'
DNAJA1	82	AF308815.2	77	(D) 5'-GGAAGCCCTGGAACCACTCT-3' (R) 5'-CCCCTACTTCTTTGGTATTGTCAGAA-3'
CAST	80	AF159246	80	(D) 5'-TTCAAATGCTCTGTCTTCATCTCAT-3' (R) 5'-CTGGCTTATCTTTCCAGATTTAGA-3'
B2M	109	NM_173893.2	78	(D) 5'-AGTAAGCCGAGTGGAGGT-3' (R) 5'-CGCAAAACACCCCTGAAGACT-3'
ACTB	66	AY141970.1	77	(D) 5'-CCTCACGGAACGTGGTTACA-3' (R) 5'-TCCTTGATGTCACGCACAATTT-3'
HMBS	80	BC108110.1	78	(D) 5'-CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG-3' (R) 5'-AATGGTGAAGCCAGGAGGAA-3'

¹. Número de pares de base.

². Temperatura de Melting

1.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS FRAGMENTOS ESPECÍFICOS PARA OS GENES ESTUDADOS

Para a confirmação da cobertura e fidelidade dos oligonucleotídeos utilizados, as amostras de cDNA foram amplificadas em PCR. Para cada reação, utilizaram-se 50ng de DNA genômico, tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 66ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5U de Taq DNA polimerase e água ultra-pura para um volume final de 50µL. A reação de PCR foi realizada utilizando a seguinte seqüência de termo-ciclos: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, Temperatura da anelamento específica para cada oligonucleotídeo (CASP3, DNAJA1 a 63° C; CAST a 61° C e B2M, ACTB, HMBS a 59° C) por 40 segundos, 72°C por 1:30 minutos e 72°C por 7 minutos.

Os amplicons gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 2%, diluído em tampão TBE 1X (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM; pH 8,0). Foram aplicados a cada poço do gel, 5µL de produto de PCR, 1µL de tampão de corrida (10mM Tris-HCl, 60mM EDTA, 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol, 60% glicerol) e 0,5µL de GelRedTM (Biotium) 20X. A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al (2001).

1.8 CLONAGEM EM VETOR PLASMÍDEO TOPOTA[®]

Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados utilizando o kit comercial TOPOTA[®] (Invitrogen), específico para clonagem de produtos de PCR, seguindo as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 3µL do produto de PCR foi adicionada a 1µL de *Salt Solution* e 1µL de água ultra-pura. Após homogeneização, 1µL do vetor TOPOTA foi adicionado à mistura, e a mesma incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para a inserção dos fragmentos nos vetores. Após a inserção, 3µL da reação de ligação foram adicionados a células quimicamente competentes de *E. coli* DH10β, a solução incubada no gelo por 30 minutos, e por meio de um choque térmico provocado quando colocados os tubos em banho-maria a 42°C por 45 segundos, permitiu a inserção do plasmídeo na célula competente. Para recuperação e multiplicação das células transformadas, foi adicionado 1mL de meio SOC, e os tubos incubados a 37°C, com agitação constante de 220 rpm durante 90 minutos.

Placas de Petri foram preparadas com meio de cultura 2xTY (1,2% de ágar), acrescido de 50µg/mL do antibiótico canamicina. Após solidificação do meio, 40µL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e 25µL de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, para que fosse possível identificar as colônias de bactérias que continham o inserto ligado ao vetor plasmídeo. Após secagem da solução IPTG – X-GAL, 200µL das células transformadas cultivadas em meio SOC foram aplicados nas placas de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski, e as placas incubadas a 37°C durante 12 – 16 horas.

1.9 CULTIVO DE CLONES BACTERIANOS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Uma colônia positiva e isolada de cada placa foi coletada com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem e transferida para um tubo contendo meio de cultura 2xTY, acrescido de 50µg/mL do antibiótico canamicina. O meio foi incubado sob agitação constante (250 rpm), a 37°C, durante 12 – 16 horas.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído seguindo protocolo estabelecido por Sambrook et al. (2001). Uma alíquota de 2 mL de colônia multiplicada em meio líquido foi transferida para um novo tubo, e centrifugada a 12000 g por 1 minuto, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano ressuspensionado em 100µL de tampão GET gelado (50mM glicose, 25mM Tris, 10mM EDTA; pH 8,0), vortexando em seguida. Foram adicionados 200µL da Solução II (0,2M NaOH, 1% SDS), misturando 5 vezes por imersão, seguido de incubação em gelo por 5 minutos. Logo após foi feita a adição de 150µL da Solução III (Acetato de potássio 3M; pH 5,5), e incubado novamente no gelo por 5 minutos. Este processo visou a separação do DNA plasmidial do DNA genômico da bactéria, de forma que, na centrifugação que se segue no protocolo, ocorreu a precipitação do DNA genômico complexado com proteínas, enquanto o DNA plasmidial permaneceu no sobrenadante, o qual foi transferido para um novo tubo. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 xg, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL, adicionando um volume igual de Isopropanol e incubando a -80° C por 30 minutos, para a precipitação do DNA plasmidial. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 13000 xg, a 4° C. Seguindo o protocolo, o sobrenadante foi descartado sendo adicionado 1 mL de ETOH 75%, misturando por imersão logo em seguida. Após a adição a homogeneização, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a temperatura ambiente na velocidade máxima. O sobrenadante foi descartado, e o pelete seco em bomba a vácuo para total evaporação do ETOH. Por fim, o pelete foi ressuspensionado em 30µL de solução de RNaseA na concentração de 10ng/µL. A concentração de DNA nas amostras foi mensurada espectrofotometricamente através do aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), e as amostras diluídas para uma solução de trabalho de concentração 100ng/µL, a qual foi encaminhada para seqüenciamento.

1.10 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES E COMPROVAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS

Os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram amplificados com a enzima AmpliTaq polimerase e “BigDye Terminator” (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores

M13, específicos para a região do vetor TOPOTA[®] que flanqueia o inserto. O seqüenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation). Primeiramente, as porções iniciais e finais das seqüências foram trimadas, mantendo apenas a porção de alta qualidade. Após limpeza das seqüências, foi realizado alinhamento das fitas direta e reversa de dois clones de cada conjunto de oligonucleotídeos, respeitando um mínimo de 85% de correspondência entre as seqüências e sobreposição mínima de 20%. A posição do alinhamento foi guardada e as seqüências visualizadas no programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia). A localização exata dos oligonucleotídeos foi encontrada, uma seqüência no formato fasta exportada e o inserto do produto de PCR selecionado. Utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento clonado foi comparado com as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da seqüência.

Após confirmação da seqüência clonada, os plasmídeos foram purificados e preparados para diluição das curvas-padrão.

6.1.11 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS PLASMÍDEOS PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO

Com o auxílio do mapa da região do gene LacZ operon do vetor utilizado, foram identificadas enzimas de restrição candidatas para o procedimento de linearização do plasmídeo. Com o auxílio do programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation), foi verificada a inexistência de sítios de restrição para as enzimas candidatas nas seqüências dos insertos clonados, garantindo que a digestão enzimática apenas linearizasse o plasmídeo, mantendo intacta a região do fragmento alvo.

Os plasmídeos linearizados foram quantificados por fluorometria através do aparelho Qubit[®] 1.0 (Life Technologies) e uma alíquota de 1µg de DNA plasmidial foi digerida com a enzima de restrição *Bam*HI, objetivando linearizá-lo para a construção da curva padrão. Para a reação de restrição, incluiu-se 5µL de 10X Fast Digest Buffer (Fermentas), 1µg de DNA plasmidial, 3µL da enzima *Bam*HI e água ultra-pura para um

volume final de 50µL de reação. Os tubos foram incubados a 37°C durante 3 horas e então a enzima inativada por incubação de 20 minutos a 80°C.

O produto da reação de restrição foi visualizado em gel de agarose padrão a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA; pH 8,0), sendo em cada poço aplicados 2µL de plasmídeo, 0,5µL de tampão de corrida (10mM Tris-HCl, 60mM EDTA, 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol, 60% glicerol) e 0,5µL de GelRed® (20X). A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al. (2001).

Após confirmação da digestão total, os plasmídeos linearizados foram purificados com o kit comercial MiniElute PCR Purification Kit (QIAGEN), seguindo recomendações do fabricante. Primeiramente, foram adicionados 5 volumes do “Buffer PB” para cada volume de reação, e este transferido a uma coluna e centrifugado. Adicionou-se 750µL do “Buffer PE”, os tubos centrifugados e a coluna transferida para o tubo coletor. Adicionou-se então 10µL de “*Elution Buffer*”, a coluna centrifugada e o eluído mensurado novamente por fluorometria para diluição nos pontos pré-determinados para a curva-padrão.

1.12 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

As curvas-padrão foram construídas a partir dos plasmídeos, contendo o inserto alvo, linearizados. A presença do inserto nos plasmídeos utilizados foi confirmada pelo sequenciamento e posterior BLAST dos mesmos. A partir do tamanho do inserto somado ao tamanho do vetor plasmidial, foi calculado o número de cópias do gene em cada ponto da curva-padrão a partir da equação:

$$Y_{moléculas/uL} = \frac{x \text{ g/uL de DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde: tamanho do plasmídeo corresponde a soma do vetor mais o inserto; 660 é o peso molecular em Daltons de um par de bases de DNA dupla fita; $6,022 \times 10^{23}$ é a constante de Avogrado.

Após os cálculos foram definidos os 5 pontos das curvas-padrão para a quantificação absoluta como:

- P1 = $2,2 \times 10^7$ cópias;
- P2 = $2,2 \times 10^6$ cópias;
- P3 = $2,2 \times 10^5$ cópias;
- P4 = $2,2 \times 10^4$ cópias;
- P5 = $2,2 \times 10^3$ cópias.
- P6 = $2,2 \times 10^2$ cópias.

Após definição dos pontos, os plasmídeos purificados foram quantificados pelo método fluorimétrico (Qubit®) e realizada a diluição para o primeiro ponto da curva-padrão. A partir do primeiro ponto, uma diluição seriada na taxa de dez vezes foi realizada para a construção dos demais pontos da curva-padrão.

1.13 REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

Para a quantificação absoluta do número de cópias de cDNA em expressão para cada um dos genes (CASP3, DNAJA1 e CAST), foram utilizadas reações compostas por 6,25 μ L do reagente 2X Power SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems), 1,25 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (Direto e Reverso) específico para cada gene estudado, a uma concentração de 3 μ M, 15ng de cDNA e água ultra-pura para completar o volume de reação de 12,5 μ L.

As reações foram conduzidas em aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e submetidas ao protocolo de ciclos descrito a seguir: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento 60° C por 1 minuto. Após os ciclos de amplificação, foi adicionada uma etapa em temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Para cada gene estudado, foi construída uma curva-padrão específica.

1.14 ANÁLISE DE *THRESHOLD* E EFICIÊNCIA DAS CURVAS-PADRÃO.

Os valores de Ct e os resultados dos números de cópias de cDNA para cada gene foram obtidos pelo software 7500 System SDS v2.0.6 (Applied Biosystems). No

entanto, as curva-padrão foram ajustadas pelo *threshold* buscando o melhor valor de r^2 e eficiência mais próxima de 100%, sendo que o último é dado pela equação abaixo e obtido pelo valor de “*slope*”. O valor ideal de “*slope*” é -3,32, mas considera-se eficiência de 100% quando este valor se encontra entre -3,6 e -3,1.

Eficiências maiores ou menores não são recomendadas, pois subestimam ou superestimam, respectivamente, o número de cópias de cDNA.

$$e = 10^{\left(\frac{-1}{slope}\right)} - 1$$

Com o auxílio do software GENEX[®], os valores de Ct foram ajustados para eficiência de 100%, para obter o número de cópias de cDNA para cada gene, utilizou-se a equação descrita abaixo, usando os valores de Ct corrigidos com valor “*slope*” de -3,32 (representando uma eficiência de 100%), e o mesmo valor de intercepto específico para cada gene.

$$Y = ax + b$$

$$N = 10^{\left(\frac{Ct - b}{a}\right)}$$

Onde: “a” é o valor de slope e “b” é o valor de “*intercept*” estimados para cada curva-padrão.

2 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

Para se obter os resultados relativos de expressão, os valores obtidos devem ser normalizados a partir de um gene constitutivo buscando corrigir os erros no procedimento experimental que podem interferir nos resultados finais. Atualmente existem vários programas e algoritmos desenvolvidos com a finalidade de se obter o melhor valor de estabilidade e assim designar o melhor gene normalizador ou de referência.

Dentre eles podemos citar os programas geNorm[®] e NormFinder[®]. O primeiro permite a eleição de genes de referência apropriados, tomando como fator de normalização a média geométrica entre pares de genes internos de referência que mostram um perfil de expressão similar, partindo do princípio de que, pares de genes

que apresentam padrões de expressão estáveis entre si são genes de controle adequados (VANDESOMPELE et al., 2002).

Por outro lado, o NormFinder[®] não só mede a variação de um gene endógeno, mas estabelece um ranqueamento entre os genes de referência, analisando como eles se diferem entre diferentes grupos de estudo, entendendo como se houvesse diferentes condições experimentais (VANDESOMPELE et al., 2002).

Com os resultados devidamente corrigidos para eficiência, foi realizada uma análise de verificação do melhor gene normalizador para correção de erros de técnica. Para esta finalidade foi definido o valor de estabilidade de cada gene (B2M, HMBS e ACTB) utilizando-se os softwares geNorm[®] e NormFinder[®].

Dessa forma, todos os genes em estudos foram normalizados com o melhor normalizador e a expressão gênica diferencial entre os grupos G1 e G2 foi definida pelo método de delta-delta Ct (ddCt) e pelo número de cópias.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística dos dados foi verificada através de análises de variância utilizando-se o procedimento GLM do programa estatístico SAS (STATISTICS ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE – SAS, 2002), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Também foi verificada a correlação entre a expressão gênica de cada gene e os fenótipos observados utilizando-se o procedimento CORR do mesmo programa estatístico.