

POLIMORFISMOS DOS GENES CALPAÍNA E CALPASTATINA EM BOVINOS

Pereira N.I.^{1,2,3}, Soares W.V.B.¹, Lara M.A.C.^{1*}

¹Instituto de Zootecnia. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA. Nova Odessa, SP, Brasil.

*malara@iz.sp.gov.br.

²Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Rio Claro, SP.

³Aluna de Graduação, Bolsista PIBIC- CNPq.

RESUMO

A calpaína e calpastatina são enzimas que participam da degradação das fibras musculares após o *rigor mortis*. A seleção assistida por marcadores moleculares relacionados à maciez da carne, como é o caso destas proteases, podem auxiliar na melhoria desta característica. Com o objetivo de conhecer o potencial genético de bovinos das raças Caracu e Nelore para produção de carne macia, foram investigados polimorfismos nos genes calpaína (CAPN316, CAPN530, CAPN4751) e calpastatina (SNP2959) pela técnica de PCR-RFLP. Para a identificação destes polimorfismos foram utilizados as seguintes enzimas de restrição: *BtgI*, *AvaII* e *BsaII* e *DdeI*. As frequências gênicas observadas para o marcador CAPN316 demonstraram que o alelo favorável "C" encontrava-se em frequências inferiores no Caracu e Nelore em relação à outra forma alélica "G". Com relação ao marcador CAPN530, as frequências gênicas revelaram a predominância do alelo "G" em ambas as raças. O marcador CAPN4751 foi o que apresentou a maior variabilidade genética em relação aos demais. O alelo favorável "C" foi mais frequente no Caracu (0,692) do que no Nelore (0,264). As frequências do alelo favorável "A" e do genótipo "AA" para o CAST2959 no gado Caracu foram 0,596 e 0,269 e, no gado Nelore, 0,536 e 0,220, respectivamente. Os resultados obtidos revelam que estas raças apresentam potencial para produção de carne com qualidade, uma vez que se observou a presença de alelos favoráveis para os genes calpaína e calpastatina. A seleção assistida pelo uso desses marcadores poderá contribuir para aumentar as frequências de genótipos superiores para maciez de carne.

Palavras-chave: Caracu; Maciez de carne; Marcador molecular; Nelore.

POLYMORPHISMS OF CALPAIN AND CALPASTATIN GENES IN CATTLE

ABSTRACT

The calpain and calpastatin are enzymes that participate in the muscular fiber's degradation after *rigor mortis*. The selection by molecular markers-assisted related to meat tenderness, which is the case of these enzymes, can assist in the improvement of this feature. In order to understand the genetic potential of Caracu and Nelore breeds for production of tenderness meat, markers of calpain (CAPN316, CAPN530, CAPN4751) and calpastatin genes (CAST2959) were investigated by PCR-RFLP technique. For the identification of these polymorphisms were used the following restriction enzymes: *BtgI*, *AvaII*, *BsaII* and *DdeI*. The allelic frequencies observed for the CAPN316 marker demonstrated that the favorable allele "C" was found in lower frequencies in Caracu and Nelore in relation to the other allele G". With respect to the CAPN530 marker, the allelic frequencies revealed the predominance of allele "G" in both breeds. The CAPN4751 marker was the one which presented higher genetic variability in relation to others. The favorable allele "C" was more frequent in Caracu (0.692) than Nelore cattle (0.264). The frequencies of favorable allele "A" and genotype "AA" to the CAST2959 in Caracu was 0.596 and 0.263 and, in Nelore, 0.536 and 0.220, respectively. These results reveal that these breeds present great potential for production of quality meat and the use of molecular markers may contribute to the identification of superior genotypes for tenderness meat.

Keywords: Caracu; Meat tenderness; Molecular marker; Nelore.

INTRODUÇÃO

O desafio atual da cadeia de produção de carne bovina é oferecer um produto de exímia qualidade, aumentando o consumo da mesma e padronizando a alta qualidade do produto final, pois o que mantém seu consumo é a qualidade do mesmo. Nesse contexto, melhorias do potencial genético dos animais e sua adequação ao ambiente e ao manejo continuam sendo pontos importantes para se alcançar maior eficiência dos sistemas de produção. A principal característica observada pelo consumidor no momento de avaliar a carne é sua maciez, que é influenciada, principalmente, pela raça, idade do abate, sexo, alimentação, uso de agentes hormonais (agentes β -adrenérgicos) e tratamentos *post-mortem* (OLIVEIRA, 2000). Koohmaraie & Geesink (2006) consideram que 85% da variabilidade observada na maciez da carne está relacionada com alterações no *post-mortem*, ou seja, no processo enzimático que leva ao amadurecimento da

carne. São três os sistemas enzimáticos responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas: o sistema das catepsinas, complexo multicatalítico de proteases e o sistema enzimático das “calpaínas” (ALVES & MANCIO, 2005). Goll *et al.* (1992) ressaltaram que as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais da tenderização *post-mortem* da carne. Elas são proteases neutras ativadas por íons cálcio (GESSINK & KOOHMARAIE, 1999), são classificadas como proteases de cisteína. Essas calpaínas participam da proteólise *post-mortem* que conduz a um aumento na maciez da carne e são inibidas pela calpastatina (KOOHMARAIE, 1994). Os polimorfismos genéticos relacionados à calpaína e calpastatina têm sido alvo de muita pesquisa a fim de melhorar a qualidade da carne bovina. Vários polimorfismos nos genes calpaínas e calpastatina têm sido descritos e, por serem relacionados à maciez de carne, sendo alguns de uso comercial. Page *et al.* (2002) demonstraram que a substituição de C por G, no exon 9 (CAPN316), levou à modificação do aminoácido alanina por glicina, na posição 316 (A316G); e que a substituição de G por A, no exon 14 (CAPN530), levou à substituição de valina por isoleucina, na posição 530 (V530I). Ambas as substituições foram relacionadas à diminuição da maciez da carne, avaliada pelo aumento da força de cisalhamento de Warner-Bratzler (FCWB) no músculo *Longissimus dorsi*. White *et al.* (2005) estudando o marcador CAPN4751, caracterizado pela transição de C por T, na posição 6545 do intron 17, verificaram associação significativa com FCWB. A presença do alelo C em forma homozigótica ou heterozigótica para este marcador tem sido relacionada à diminuição dos valores de FCWB (Casas *et al.*, 2006). Com relação ao gene calpastatina, Barendse (2002) identificou uma substituição de G para A, na região não traduzida 3'UTR do RNAm de CAST, associando o alelo A com carne mais macia. A associação de polimorfismos com as características de produção animal é de grande importância para os programas de melhoramento genético uma vez que podem permitir ganhos genéticos em um ritmo mais acelerado (Lara *et al.*, 2012). Desse modo, o conhecimento da variabilidade destes SNPs nos genes calpaína e calpastatina e sua relação com características de interesse comercial em raças bovinas criadas no Brasil são fundamentais para o estabelecimento de programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares. O presente estudo teve como objetivo investigar os polimorfismos CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAST2959 a fim de conhecer o potencial genético de bovinos da raça Caracu e Nelore para produção de carne macia.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 81 bovinos, não aparentados, provenientes de rebanhos localizados no Estado de São Paulo foi investigado, sendo 26 da raça Caracu e 55 da raça Nelore.

O DNA genômico foi obtido a partir de 10-20 mg de músculo *Longissimus dorsi*. As amostras de carne foram misturadas em 300µl de tampão de lise pH 8,0 (Tris 0,5M, EDTA 0,1M, SDS 2%) e 5µL proteinase k (10mg/mL), incubadas a 55°C com agitação de 250rpm, durante pelo menos 12 horas. As amostras foram purificadas adicionando-se 350µl de acetato de amônio 7M, seguidas de centrifugação por 15min, 14.000 rpm a 4°C. O DNA foi precipitado adicionando-se 700 µl de isopropanol e lavado em 200 µL de etanol 70%, empregando-se a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram ressuspendidas em 50 µL de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), quantificadas e diluídas para uma concentração de 50ng/µl. Para as análises do CAPN316, cujas sequências estão depositadas no *GenBank* (AF252504), um fragmento com 839 pb (localizado entre o intron7 e exon 10) foi amplificado e clivado com a enzima *BtgI*, segundo Lara *et al.* (2013). Para a PCR foi utilizado aproximadamente 125 ng de DNA para um volume final de 25 µL, contendo tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,15 µM de cada *primer* (F: 5'-TAGAGCTGCTCTCTCAGCAGTTT-3' e R: 5'-ACGCATGAAGTCTCGGAAGGACAT-3') e 1 unidade de *Taq DNA-polimerase*. Para as análises do marcador CAPN530 (AF248054) um fragmento com 318 pb foi amplificado e hidrolisado com a enzima de restrição *AvaII*, segundo Lara *et al.* (2012). Para a PCR foi utilizado aproximadamente 100 ng de DNA para um volume de 20 µL, contendo tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,15 µM de cada *primer* (F: 5'-GAGAGGTGACTTTGTGCTGCGTTT-3' e R: 5'-AAAGTGCTTGGCAAGTGAGGGATG-3') e 1 unidade de *Taq DNA-polimerase*. Para as análises do marcador CAPN4751 (AF248054) um fragmento com 359 pb foi amplificado e hidrolisado com a enzima de restrição *BsaI*. Para a PCR foi utilizado aproximadamente 100 ng de DNA para um volume de 25 µL, contendo tampão 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,20 µM de cada *primer* (F: 5'-ATAGGAAGGGCTTGGGTTGGGAT-3' e R: 5'-AAACTCCACAGCGTAAACCAGACG-3') e 0,5 U de *Taq DNA-polimerase*. Após desnaturação inicial a 95°C por 3 min, a amplificação foi realizada em 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 65,0°C por 45 seg e 72°C por 45 seg, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 µL do produto amplificado foi digerido com 0,7 U da enzima *BsaI* a 37°C durante 3 horas. Os RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e, os produtos de restrição, visualizados segundo Sanguinetti *et al.*, 1994. Para as análises do SNP2959 (GenBank AF150246), um fragmento com 257pb foi amplificado e clivado com a enzima *DdeI*, segundo Lara *et al.* (2010). A reação de PCR foi realizada empregando-se aproximadamente 50 ng de DNA em volume de 25 µL, contendo Tampão (20 mM Tris-HCL, pH 8,4; 50mM

KCL) 1,5 mM MgCl, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* (F: 5'-ATTCTCCCCACAGTGCCTGTAA-3' e R: 5'-GCGCTTCCTGGTCTGTCCAG-3') e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751 e CAST2959 têm sido utilizados para seleção de bovinos de origem *Bos taurus taurus*, por estarem relacionados com valores de força de cisalhamento (Barendse, 2002; Page *et al.*, 2002; Casas *et al.*, 2006; White *et al.*, 2005). Esses marcadores, no entanto, não apresentam efeitos esperados em *Bos taurus indicus* e seus cruzados (Johnston e Graser, 2010) e, nas raças brasileiras adaptadas, poucos estudos têm sido realizados. A metodologia utilizada nas análises de CAPN4751 foi desenvolvida para o presente estudo, que em conjunto com as demais metodologias permitiram investigar os quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes calpaína e calpastatina nos rebanhos das raças Caracu e Nelore. Como pode ser visto na Tabela I, as frequências gênicas observadas para o marcador CAPN316 demonstraram que o alelo favorável “C” encontrava-se em frequências inferiores no Caracu (0,307) e Nelore (0,018) em relação à forma alélica “G”. No entanto, a frequência de heterozigotos CG foi maior na raça Caracu (0,462) o que demonstra o seu potencial genético para produção de carne macia. Com relação ao marcador CAPN530, foram detectados apenas os genótipos AG e GG em ambas as raças. As frequências do alelo “G”, considerado favorável, foi maior no gado Nelore em relação Caracu, o que não era esperado. Esse resultado sugere que marcador CAPN530 não é uma ferramenta adequada para a seleção de zebuínos, como é o caso do Nelore, além de não ter apresentado efeitos significativos na força de cisalhamento em carnes de origem *Bos taurus indicus* (Johnston e Graser, 2010). Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores por Lara *et al* (2012). Em oposição, o marcador CAPN 4751 foi o que apresentou a maior variabilidade genética em relação aos demais. Como pode ser visto na mesma Tabela, o alelo favorável “C” foi mais frequente no Caracu (0,692) do que no Nelore (0,264), como era esperado. Considerando que esse marcador está relacionado a maciez de carne e tendo sido detectado um grande número de animais heterozigotos (CT), sugere cruzamentos direcionados a fim de aumentar a frequência do genótipo favorável (CC) em ambos os rebanhos. Com relação ao marcador CAST2959, as frequências do alelo favorável “A” e do genótipo “AA” não apresentaram diferenças entre as populações, cujos valores estimados para o gado Caracu foram 0,596 e 0,269 e, para o gado Nelore, 0,536 e 0,22, respectivamente. Em estudos anteriores, Lara *et al.* (2010) detectaram efeitos significativos ($P < 0,05$) do marcador CAST2959 com valores de força de

cisalhamento, sendo o efeito médio de substituição para o alelo favorável “A” estimado em de -0,647 Kg em carnes proveniente de bovinos mestiços. Neste estudo, os autores sugerem que o efeito do SNP2959 na maciez de carne, pode ser resultante da menor atividade da calpastatina, codificada pelo alelo A. No presente estudo, esse marcador revelou ainda excesso de heterozigotos provavelmente devido ao número de indivíduos investigados e a seleção a favor do alelo “A”, já que os animais pertenciam a programas de melhoramento genético. A amostra investigada será ampliada e os resultados obtidos analisados em conjunto com dados de força de cisalhamento visando verificar a sua relação com maciez de carne. O emprego desses marcadores contribui para o conhecimento do potencial genético do gado Caracu e Nelore para maciez de carne, com a exceção do marcador CAPN530.

Tabela I. Frequências gênicas e genotípicas para os marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751 e CAST2959 estimadas para o gado Caracu e Nelore. (Gene and genotype frequencies for the CAPN316, CAPN530, CAPN4751 and CAST2959 markers estimated for Caracu and Nelore breeds).

Raças	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
	CAPN316				
	CC	CG	GG	C	G
Caracu	0,077	0,462	0,462	0,307	0,693
Nelore	0	0,020	0,980	0,018	0,982
	CAPN530				
	AA	AG	GG	A	G
Caracu	0	0,615	0,385	0,307	0,693
Nelore	0	0,040	0,960	0,091	0,909
	CAPN4751				
	CC	CT	TT	C	T
Caracu	0,423	0,538	0,038	0,692	0,308
Nelore	0,05	0,402	0,530	0,264	0,736
	CAST2959				
	AA	AG	GG	A	G
Caracu	0,269	0,654	0,077	0,596	0,404
Nelore	0,220	0,640	0,140	0,536	0,464

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos revelam que o Caracu e Nelore apresentam potencial para produção de carne com qualidade, uma vez que se observou a presença de alelos

favoráveis para os genes calpaína e calpastatina. A seleção assistida pelo uso desses marcadores poderá contribuir para aumentar as frequências de genótipos superiores para maciez de carne.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro e, ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pela orientação e colaboração.

BIBLIOGRAFIA

- Alencar, M.M. Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. In: Simpósio Sobre Melhoramento Animal, reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 41., 2004, campo grande. anais. campo grande: sbz, 2004. cd-rom
- Alves D.D., Goes R.H.T.B. and Mancio A.B. 2005. Maciez da carne bovina. *Ciência Animal Brasileira*, 135-49.
- Barendse W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PTC/AU02/00122 [International patent application WO 02/064820 A1], World International Property Organization.
- Casas, E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. L. Smith, R. A. Breneman, T. A. Olson, D. D. Johnson, S. W. Coleman, G. L. Bennett and C. C. Chase Jr. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphism in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos Taurus indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, 83:13.
- Geesink, G.H. and M. Koohmaraie. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by l-calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.*, 77: 2685-2692.
- Goll, D.E.; Taylor, R.G.; Christiansen, J.A. et al. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. In: ANNUAL MEAT CONFERENCE, 44, 1992, Chigago. Proceedings... Chicago: National Livestock and Meat Board, 1992. p25-36.
- Koohmaraie, M. and G.H. Geesink. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 74: 34-43.
- Koohmaraie, M. Nebraska:USA. 1994. Meat Animal Research Center, 11p.
- Johnston, D. J. and H. U. Graser. 2010. Estimated gen frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J. Anim. Sci.*, 88:1917.
- Lara, M.A.C., G. Gutmanis, P. Eder, M. H. Faria, A. Cavalcante-Neto e F. D. Resende. 2012. Detecção de polimorfismos no exon14 do gene CAPN1 em raças bovinas européias, zebuínas e seus mestiços. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 2:197-202.
- Lara, M. A. C., M. H. Faria, F. D. Resende, A. J. Pivetta, G. R. Siqueira, E. Pinatti, and A. Cavalcante Neto. 2010. Associação do SNP2959 do gene Calpastatina com maciez de carne em cruzados (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). In: Simpósio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zootenéticos, 2010, João Pessoa. Memoriais. Campina Grande: UFPb; Instituto Nacional do Semiárido, 11: 586-589.

- Lara, M. A. C. ; Pinatti E.; Nardon, R. F. ; Faria, M.H.; Cavalcante Neto, A. ; Gutmanis, G. ; Soares, W. V. B. ; Figueiredo, L. A. ; Machado, J. P. ; Demarchi, João J A A ; Resende, F. D. . Polimorfismo de base única nos genes calpaína, calpastatina e leptina relacionados á maciez de carne em bovinos. In: XXIII Reunião- Alpa, 2013, La Habana. 23, Asociación Latinoamericana de Produccion Animal, 2013. v. 13.
- Oliveira, A.L. 2000. Maciez da carne bovina. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia 33, 7-18.
- Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W., Smith T.P.L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness en cattle. Journal Animal Science 80, 3077-85.
- Page, B. T., E. Casas, R. L. Quaas, R. M. Thallman, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, S. N. White, G. L. Bennett, J. W. Keele, M. E. Dikeman and T. P. Smith. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. J. Anim. Sci. 82:3474-3481.
- Sanguinetti, C.J.; Neto, E.D.; Simpson, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques, v.17, p.914-921, 1994.
- White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase Jr CC, Johnson DD, Keele JW and Smith TPL (2005) A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bosindicus*, *Bostaurus*, and crossbred descent. J Anim Sci 83:2001-2008.