



Associação de polimorfismos no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em animais da raça Nelore

Minos Esperândio Carvalho¹, Joanir Pereira Eler², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro²,
Luciana Correia de Almeida Regitano³, Flávio Vieira Meirelles², José Bento Sterman Ferraz²

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação da FZEA/USP. Pirassununga, SP. Bolsista FAPESP. e-mail: minovisk@hotmail.com

²Professor do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP. Pirassununga, SP.

³Pesquisadora do CPPSE/EMBRAPA. São Carlos, SP.

Resumo: Os bovinos de origem *Bos indicus* são preferidos nos trópicos devido a sua maior resistência a adversidades ambientais. No entanto, estes animais não produzem carne tão macia quanto os taurinos. A seleção assistida por marcadores relacionados à maciez da carne, como é o caso da protease calpaína, pode auxiliar na melhoria da característica. Nesse trabalho, foram utilizados 229 animais da raça Nelore. Após a extração do DNA de amostras de sangue, por desproteínização em presença de NaCl a identificação e determinação dos polimorfismos para três marcadores (CAPN316, CAPN530 e CAPN4751) foi realizada pelo sistema de detecção TaqManTM utilizando-se PCR em Tempo Real. A análise de maciez da carne, aos 7, 14 e 21 dias de maturação, foi realizada com amostras de carne do *Longissimus dorsi*, retiradas entre a 12^a e 13^a costela e cisalhadas utilizando-se um *Warner Braztler Shear Force*. Os polimorfismos dos marcadores CAPN316 e CAPN530 não apresentaram efeitos significativos ($P > 0,05$) para a maciez da carne aos 7, 14 e 21 dias de maturação. Foram verificados efeitos significativos para os polimorfismos do CAPN4751 em relação à maciez da carne aos 7 ($P = 0,001$), 14 ($P = 0,005$) e 21 ($P = 0,006$) dias de maturação.

Palavras Chaves: raça Nelore, calpaína, maciez, marcadores

Association of a polymorphism in the gene of μ -calpain with the meat tenderness in Nelore beef cattle

Abstract: The *Bos indicus* are favorite in the tropics due greater resistance for environmental adversities. However, these animals produce worse meat quality than taurine. The marker assisted selection in systems for the meat tenderness, as in the case of the calpain protease, it may be helpful to improvement this trait. In this work, 229 Nelore beef cattle were used. After the extraction of DNA by precipitation in NaCl of blood samples, the identification and determination of the polymorphism for three markers (CAPN316, 530 and 4751) were accomplished by the detection system *TaqMan*TM through PCR in Real Time. The tenderness analysis for the 7, 14 and 21 days of maturation were accomplished with meat samples of the *Longissimus dorsi* muscle, extract among the 12 and 13rd rib and evaluated by *Warner Braztler Shear Force*. The CAPN316 and CAPN530 markers polymorphism were not significant ($P > 0,05$) to meat tenderness on 7, 14 and 21 days of maturation. The markers association effects of meat tenderness were significant just for CAPN4751 in the three times of maturation on 7 ($P = 0,001$), 14 ($P = 0,005$) and 21 ($P = 0,006$) days of maturation.

Keywords: Nelore beef cattle, calpain, tenderness, markers

Introdução

Os animais *Bos indicus* têm sido preferidos nas regiões tropicais, devido sua resistência às doenças e grande tolerância ao calor. Entretanto, em relação à característica maciez da carne, restrições têm sido atribuídas a este tipo de animal. Particularmente neste aspecto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável à redução da variação da maciez da carne. Trabalhos têm evidenciado que as proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas, são parcialmente responsáveis pela proteólise *post mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez da carne. A Seleção Assistida por Marcadores (MAS) possui grande potencial para melhorar características historicamente relatadas como de difíceis mensurações. São escassas as informações a respeito do potencial da utilização de marcadores moleculares em relação aos genes ligados à maciez da carne em animais da raça Nelore. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar as frequências de polimorfismos em genes candidatos e relacionar as frequências gênicas dos diferentes marcadores utilizados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

Animais avaliados. Foi extraído o DNA de 229 animais da raça Nelore, empregando-se o método de extração e precipitação das proteínas em NaCl a partir de amostras de sangue.

Identificação dos polimorfismos. A caracterização e determinação dos genótipos para três marcadores foi realizada por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento ABI Prism® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan™, sendo sintetizadas sondas de forma a parear seletivamente no DNA molde onde se encontra o polimorfismo de interesse. Os polimorfismos em questão, já descritos em outras populações, possuem a seqüência depositada no *GenBank*, junto de seus respectivos *primers*. As proporções de indivíduos heterozigotos e homozigotos para cada loco foram estimadas por meio das leituras de fluorescências das sondas. Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 50 ng de DNA para uma reação de 25 µl, contendo 0,2 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em 32 ciclos de 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 58°C e 1 minuto à 72°C. Os marcadores utilizados e suas respectivas seqüências dos primers e sondas, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos marcadores investigados e suas seqüências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*), bem como as respectivas referências

Marcador	Primers	Sonda	Referências
CAPN 316	F: GAGTGGCCCTCATAAGATAA R: CCCATCCTCCATCTTGACC	CCTCGGAGTGGAAACG	CASAS et al (2005)
CAPN 530	F: GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT R: CCTTGCTGGCTAGAGACCAA	GGGGAGATTGGCCTGGA	CASAS et al (2005)
CAPN 4751	F: AAGGGACAGATGTGGACAGG R: GAGGGTGTCTCTGAGTGC	ACACAGCCCTGCGCCTC	WHITE et al (2005)

Análise de maciez. Foram coletados das meias carcaças, três bifes de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12ª e 13ª costela em direção caudal. Os bifes foram identificados individualmente, embalados a vácuo (embaladura Selovac M160) em filme flexível de alta barreira, Polyfilm®, após as 24 horas de resfriamento das carcaças. As amostras sofreram processo de maturação a 2°C por 7, 14 e 21 dias *pos mortem*, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à maciez, conforme os procedimentos recomendados por Koohmaraie et al. (1994), onde seis cilindros de cada amostra, com aproximadamente 13 milímetros de diâmetro, foram cisalhados utilizando-se um *Warner Braztler Shear Force*.

Efeito dos marcadores SNP sobre a maciez da carne. Para avaliar as implicações dos resultados moleculares sobre as características relacionadas a maciez da carne, foram utilizadas as informações obtidas dos testes de maciez (*Shear Force*) como variável dependente. Os efeitos dos genótipos encontrados para os três marcadores, considerando os diferentes dias de maturação, foram avaliados a partir dos modelos utilizados por Casas et al. (2005), White et al. (2005) e Casas et al. (2006). O modelo pode ser representado da seguinte forma: $Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + \beta_1(I_{ijkl} - \bar{I}) + e_{ijkl}$, em que: Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para a característica maciez; μ = é uma constante inerente a todas as observações; C_i = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos; S_j = é o efeito aleatório de reprodutor, com média 0 e variância σ_s^2 ; M_k = é o efeito fixo do genótipo para marcador (CAPN316, CAPN530, CAPN4751); β_1 = é coeficientes de regressão linear da característica Y_{ijkl} em relação à idade do animal ao abate, incluído no modelo como covariável; I_{ijkl} = é a idade do animal ao abate; \bar{I} = é a média de idade ao abate dos animais avaliados; e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ_e^2 .

Resultados e Discussão

As freqüências gênicas associadas aos três polimorfismos avaliados, estão apresentadas na Tabela 2.

Nos animais avaliados, freqüência gênica observada para o marcador CAPN316 demonstra que o alelo G, aparentemente, encontra-se fixado nesta população. Para o marcador CAPN530, a freqüência do alelo considerado favorável "A" foi baixa, em relação à forma alélica "G". White et al. (2005) relataram freqüência do alelo favorável "A" de 0,137 para animais do *ciclo 8* do Projeto de Avaliação de Germoplasma do *Meat Animal Research Center*, em Clay Center, Nebraska, EUA.

Tabela 2. Frequências gênicas associadas para os marcadores CAPN316, CAPN530 e CAPN4751 observados em bovinos da raça Nelore

CAPN316	CAPN530	CAPN4751
f(C)=0,000	f(A)=0,048	f(C)=0,211
f(G)=1,000	f(G)=0,952	f(T)=0,789

As frequências gênicas observadas para o marcador CAPN4751, demonstraram que o alelo favorável “C” encontra-se com frequência inferior a outra forma alélica “T”. Porém, White et al. (2005) reportaram frequências do alelo “C” de 0,096 para raça Brahman. Os efeitos dos marcadores *single nucleotide polymorphysm* (SNP) avaliados sobre a característica da maciez da carne foram avaliados apenas para CAPN530 e CAPN4751, os quais apresentaram variabilidade genotípica. Para os genótipos do marcador CAPN530, não foram observados resultados significativos ($P>0,05$) para a maciez avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Entretanto, para os genótipos associados ao marcador CAPN4751, foram observados efeitos altamente significativos para os três tempos de maturação, aos 7, 14 e 21 dias (Tabela 3). Estes resultados concordam com White et al. (2005), os quais relataram significativos aos 7 ($P<0,01$), 14 ($P=0,015$) e 21 ($P=0,001$) dias maturação em animais da população STARS Brahman do Projeto de Avaliação de Germoplasma, pertencentes ao *Meat Animal Research Center*, em Clay Center, Nebraska, EUA.

Tabela 3. Estimativas de médias de quadrados mínimos e os erros padrão associados aos efeitos dos genótipos do marcador CAPN4751 para característica de maciez de carne (*Shear Force*), avaliadas aos 7, 14, e 21 dias de maturação

Genótipos CAPN4751	MACIEZ 7 dias, kg	MACIEZ 14 dias, kg	MACIEZ 21dias, kg
C/C	5,93 ± 0,52	4,62 ± 0,45	4,03 ± 0,41
C/T	5,35 ± 0,24	4,53 ± 0,22	4,06 ± 0,20
T/T	6,20 ± 0,21	5,16 ± 0,19	4,61 ± 0,17
	P=0,001	P=0,005	P=0,006

Conclusões

Não foi detectado, para marcador CAPN316, a presença do alelo favorável “C”. Para marcador CAP530 não foram verificados efeitos significativos dos genótipos avaliados em relação à característica maciez de carne com 7, 14, e 21 dias maturação. Para o marcador CAPN4751, foram observados efeitos significativos dos genótipos em relação às características de maciez da carne nos diferentes dias de maturação. Portanto, os resultados obtidos no presente sugerem que o marcador molecular CAPN4751 pode auxiliar no melhoramento desta característica em animais da raça Nelore.

Literatura citada

- CASAS E., WHITE, S. N., RILEY, D. G., SMITH, P. L., BRENNEMAN, R. A., OLSON, T. A., JOHNSON, D. D., COLEMAN, S. W., BENNETT, G. L., CHASE C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal Animal Science**, v. 83.n. 1, p. 2661-2668, 2005.
- CASAS, E., WHITE, S. N., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D. G., CHASE, C. C., JR., JOHNSON, D. D., SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and {micro}-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal Animal Science**. v. 84, p. 520-525, 2006.
- KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and prediction. **USDA-ARS, U.S. Meet Animal Research Center: Nebraska**, 1994. 11 p.
- WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, S. D.; SHACKELFORD, M.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in CAPN extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal Animal Science**, v. 83, n. 9, p.2001-2008, 2005.