

## VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

### Efeito médio de substituição alélica para os polimorfismos CAPN4753 e UOGCAST no gene da calpaína e calpastatina

Minos Esperândio Carvalho<sup>1</sup>, Joanir Pereira Eler<sup>2</sup>, Diego Córdova Cucco<sup>2</sup>, Fernanda Marcondes de Rezende<sup>2</sup>, José Bento Sterman Ferraz<sup>2</sup>, Flávio Vieira Meirelles<sup>2</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>3</sup>, Júlio César Carvalho Balieiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduando em Zootecnia da FZEA/USP, bolsista: FAPESP, e-mail: minovisk@hotmail.com

<sup>2</sup>Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da FZEA/USP

<sup>3</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, e-mail: luciana@cnpse.embrapa.br

**Resumo** – Os objetivos deste trabalho foram avaliar possíveis interações alélicas para os polimorfismos nos genes da  $\mu$ -calpaína (CAPN4753) e da calpastatina (UOGCAST1), ligados a característica de maciez da carne. Nesse trabalho, foram utilizados 590 animais da raça Nelore. Após a extração do DNA de amostras de sangue por precipitação em NaCl. A identificação e determinação dos polimorfismos para os marcadores foram realizadas pelo sistema de detecção TaqMan<sup>TM</sup> 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<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela e cisalhadas utilizando-se um Warner Bratzler Shear Force. Foram observados resultados significativos para o efeito médio de substituição aos 14 dias de maturação da carne, apenas para o polimorfismo no gene da calpastatina, e aos 21 dias para ambos os polimorfismos (CAPN4753 e UOGCAST1).

**Palavras-chave:** calpastatina, maciez,  $\mu$ -calpaína, Nelore.

### Average effect of substitution for CAPN4753 and UOGCAST polymorphisms in the calpain and calpastatin gene

**Abstract** – The aim of this work was evaluated possible allelic interactions for genes polymorphisms in the  $\mu$ -calpaína (CAPN4753) and calpastatin (UOGCAST1), linkage at tenderness trait. A total of 590 Nelore breed animals were used in this study. After DNA blood samples extraction, by precipitation in NaCl. The polymorphisms markers (CAPN4753 and UOGCAST1) identification and determination was realized by TaqMan<sup>TM</sup> detection system using real time PCR. The meat tenderness analysis, at the 7, 14 and 21 days of maturation, was realized with *Longissimus dorsi* meat samples, taken at the 12<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> rib interface and Warner Bratzler Peak Shear force measurements were used. Significant results were observed for the average effect of substitution to the 14 days of maturation of the meat, just for the polymorphisms in the calpastatin gene, and to the 21 days for both polymorphisms (CAPN4753 and UOGCAST1).

**Keywords:** calpastatina,  $\mu$ -calpain, tenderness and Nelore

## Introdução

A calpastatina, enzima inibidora das calpaínas, é a principal reguladora da atividade proteolítica no *postmortem*. As seqüências helicoidais da calpastatina impedem as calpaínas de se ligarem às membranas (MELLGREN et al., 1989). No músculo vivo, a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas (MORGAN et al., 1993). Ainda com relação à atividade da calpastatina, Pringle et al. (1997) observaram o aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína, com o aumento da proporção *Bos indicus* (Brahman) usadas nos cruzamentos. Schenkel et al. (2006) associaram genótipos do marcador do gene da calpastatina (UOCAST1) com a maior maciez da carne, quando o alelo favorável C substitui o alelo G. E por ser um inibidor específico das calpaínas, o aumento da atividade da calpastatina é correlacionado com a redução da maciez da carne (PRINGLE et al., 1997).

## Material e Métodos

Foi extraído o DNA de 590 animais da raça Nelore, empregando-se o método de extração e precipitação das proteínas em NaCl a partir de amostras de sangue. A determinação dos genótipos para os marcadores foram realizadas por meio de PCR em Tempo Real, utilizando o equipamento ABI Prism<sup>®</sup> 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan<sup>™</sup>, 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 seqüências depositadas no *GenBank* (número de acesso: AF248054 e AY008267). As proporções de indivíduos heterozigotos e homozigotos para o loco foram estimadas por meio das leituras de fluorescências das sondas. Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 15 ng de DNA para uma reação de 10 µl, contendo 0,25 µl de Assay Mix<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), 5,0 µl de Taqman<sup>®</sup> Marter Mix Univerisal PCR (*Applied Biosystems*) em 10 minutos à 95° C e 45 ciclos de 15 segundos à 92° C e 1 minuto à 60° C. Os marcadores utilizados foram: CAPN4753 e UOCAST1 nos genes da calpaína e calpastatina, respectivamente. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados, foram: **CAPN4753** – primers - F: CCCAGGGAGAGGGAGGAC; R: GCGGAGGGTTCGAGGTA e sonda – AGGAGGGAGA(C/A)AGTTCC; **UOCAST1** – primers - F: GGAAGGAAGGAATTGCATTGTTTCA; R:CACTTGTGTTTTATGTAGTCAATTGTGAGAA e sonda – CTTTGGGTA(G/C)AAAATT. Na análise de maciez, após as 24 horas de resfriamento das carcaças foram coletados das meias carcaças, três bifes de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela em direção caudal e embalados a vácuo. As amostras sofreram processo de maturação a 2° C por 7, 14 e 21 dias *post mortem*, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à maciez, conforme os procedimentos recomendados por Koohmaraie et al. (1994), com o auxílio do equipamento *Warner Bratzler Shear Force*. Para avaliar as implicações dos resultados moleculares sobre as características relacionadas à maciez da carne, foram utilizadas as informações obtidas dos testes de maciez (*Shear Force*) como variável dependente. Os efeitos dos genótipos encontrados para o marcador, considerando os diferentes dias de maturação, foram avaliados a partir dos modelos utilizados por White et al. (2005). 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;  $\mu$  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  $\sigma_s^2$ ;  $M_k$  = é o efeito fixo do genótipo para os marcadores;  $\beta_1$  = 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  $\sigma_e^2$ .

### Resultados e Discussão

As frequências alélicas para o marcador CAPN4753 foram: f(A) =0,3414 e f(C) =0,6586; e para o marcador UOGCAST1: f(C) =0,6210 e f(G) =0,3790. A Tabela 1 apresenta as estimativas de efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeito médio de substituição para as características de maciez da carne aos 7 (MAC7D), 14 (MAC14D) e 21 (MAC21D) dias de maturação. Para o marcador CAPN4753 foi verificado apenas efeito de aditividade e efeito médio de substituição para 21 dias de maturação. Com relação ao marcador da calpastatina UOGCAST1, os efeitos de aditividade e substituição foram significativos para MAC14D e MAC21D.

Tabela 1- Efeitos de aditividade, desvios de aditividade e efeito médio de substituição.

Marcadores	Caract*	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito médio de substituição		
		Estimativa	EP	P >  t	Estimativa	EP	P >  t	Estimativa	EP	P >  t
CAPN4753	MAC7D	-0,32	0,17	0,0655	-0,24	0,14	0,0989	0,08	0,08	0,3209
	MAC14D	-0,31	0,15	0,0424	-0,14	0,13	0,2870	-0,11	0,07	0,1316
	MAC21D	-0,35	0,13	0,0093	-0,19	0,11	0,0772	-0,12	0,06	0,0455
UOGCAST1	MAC7D	0,18	0,19	0,3598	0,18	0,13	0,1569	-0,16	0,09	0,0823
	MAC14D	0,52	0,17	0,0026	0,02	0,11	0,8500	-0,26	0,08	0,0007
	MAC21D	0,40	0,15	0,0068	0,17	0,10	0,0954	-0,25	0,07	0,0003

\*Caract = Características de Maciez da carne para ao três tempos de maturação

A Figura 1 ilustra os valores do efeito médio de substituição em desvios nos gráficos. Para o marcador CAPN4753, com efeito significativo apenas aos 21 dias de maturação, observou-se uma estimativa com a presença de um alelo “C” de -0,12 kg no *Shear force*. Neste caso, os indivíduos heterozigotos apresentaram, em média, carnes mais macias em 0,12 kg e os homozigotos C/C, com 0,24 kg, quando comparados aos indivíduos de genótipo A/A. White et al. (2005) observaram associação significativa com *Shear force* (P=0,041) apenas em populações compostas para este marcador.

No estudo do marcador UOGCAST1, a figura também ilustra as estimativas do efeito de substituição significativo aos 14 e 21 dias de maturação. Na avaliação aos 14 dias de maturação, a presença do alelo favorável “C” apresentou uma estimativa de -0,26 kg no *Shear force*. Portanto, os indivíduos heterozigotos apresentaram em média, carne mais macia em 0,26 kg e os homozigotos C/C aproximadamente 0,52 kg, em relação aos indivíduos de genótipo G/G. Já para 21 dias de maturação, a estimativa do efeito médio de substituição para o alelo “C” foi de -0,25 kg no *Shear force*. Neste caso, os indivíduos heterozigotos apresentaram em média, carne mais macia em 0,25 kg e os heterozigotos C/C aproximadamente 0,50 kg, do que os indivíduos que possuíam o genótipo G/G. O resultados do presente estudo concordam com Schenkel et al. (2006), porém, são mais expressivos. Pois os mesmos autores observaram valores do efeito médio de substituição de 0,12 e 0,13 kg no *Shear force* para 14 e 21 dias, respectivamente, em animais cruzados de origem taurina.

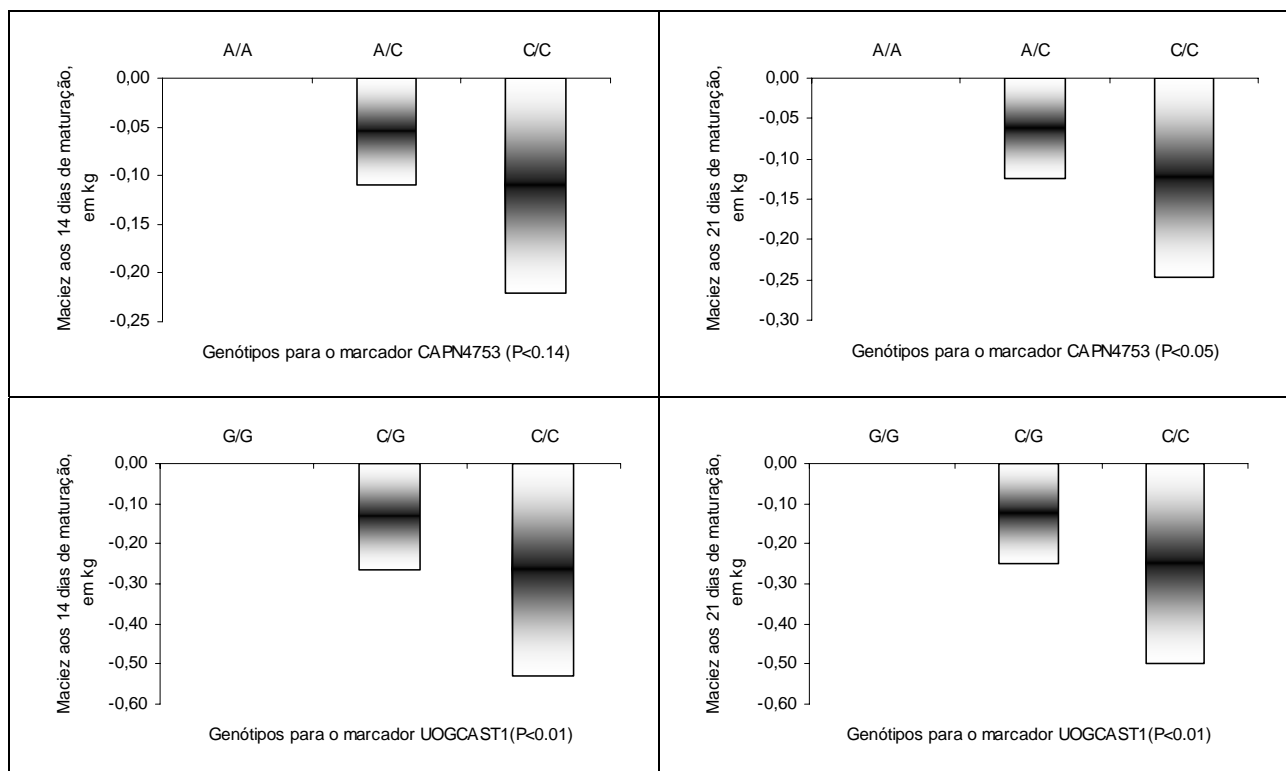


Figura 1- Efeitos médios de substituição alélica para os dois marcadores com 14 e 21 dias de maturação da carne.

### Conclusões

Os resultados observados sugerem que os marcadores CAPN4753 e UOGCAST1 podem auxiliar a identificação de animais com genótipos que apresentam maior maciez da carne em animais da raça Nelore.

### Literatura Citada

- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p.93-104, 1994.
- MELLGREN, R.L; LANE, R.D; MERICLE, M.T. The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.999, p.71-77, 1989.
- MORGAN, J.B. et al. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1471-1476, 1993.
- PRINGLE, T.D. et al. 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.
- SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.291-299, 2006.
- WHITE, S.N. et al. 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 of Animal Science**, v.83, n.9, p.2001-2008, 2005.