

**DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS
ASSOCIADOS À MACIEZ DA CARNE EM
GENES DA CALPAÍNA E DA CALPASTATINA
EM BOVINOS DA RAÇA SIMENTAL NO RIO
GRANDE DO SUL**

**Cleiton Schneider Pereira¹
Bianca de Paula Telini²
Eduardo Borges de Assis³
Vagner Ricardo Lunge⁴**

RESUMO

A maciez da carne bovina depende da ação de enzimas proteolíticas próprias do animal. Polimorfismos de nucleotídeo único nos genes das enzimas calpaína (CAPN) e calpastatina (CAST) demonstraram forte associação com a maciez em diversas raças bovinas em estudos prévios. Este trabalho objetivou detectar a ocorrência de três polimorfismos (CAPN1-316, CAPN1-4751 e CASTc:2832) em 50 reprodutores da raça Simental no estado do Rio Grande do Sul. Os resultados demonstraram a ocorrência de um alelo no CAPN1-316 (G) e dois no CAPN1-4751 (42% C, 58% T) e CASTc:2832 (94% A, 6% G). As frequências genotípicas foram 26% CC, 32% CT, 42% TT (CAPN1-4751) e 88% AA, 12% AG (CASTc:2832). Estas informações estão sendo utilizadas nos cruzamentos em programas de melhoramento genético bovino visando o aumento da maciez da carne.

Palavras-chave: Calpaína, calpastatina, maciez, SNP, Simental.

ABSTRACT

Bovine meat tenderness depends on the animal's own proteolytic enzymes action. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the calpain (CAPN) and calpastatin (CAST) genes were strongly associated with meat tenderness in many cattle breeds in previous studies. This study aimed to detect the occurrence of three SNPs (CAPN1-316, CAPN1-4751 and CASTc:2832) in 50 Simmental breeders in Rio Grande do Sul state. It was demonstrated the occurrence of one allele in CAPN1-316 (G) and two in CAPN1-4751 (42% C, 58% T) and CASTc:2832 (94% A, 6% G). The genotype frequencies were 26% CC, 32% CT, 42% TT (CAPN1-4751) and 88% AA, 12% AG (CASTc:2832). These results are being used in bovine breeding programs aiming to improve meat tenderness.

Keywords: Calpain, calpastatin, tenderness, SNP, Simmental.

¹ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

² Acadêmica do curso de Biotecnologia/UFRGS

³ Médico veterinário da Fazenda Santa Terezinha, Jaquirana, RS.

⁴ Professor - orientador do curso de Medicina Veterinária e do PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (vagner.lunge@gmail.com)

INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é essencial na economia nacional, sendo a segunda atividade que mais produziu no agronegócio em 2013 (BRASIL, 2014). O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, além de ser o maior exportador e o segundo maior produtor de carne bovina (USDA, 2014). Em 2013, 9,6 milhões de toneladas de carne bovina foram produzidas, sendo 7,6 milhões destinadas ao mercado interno. O consumo anual médio de carne bovina foi estimado em 37,9 kg/indivíduo no nosso país (CONAB, 2014).

A competitividade da bovinocultura de corte demanda estratégias de produção que tenham como objetivo o aumento da qualidade da carne bovina. O Programa Embrapa de Carne de Qualidade, por exemplo, baseia-se na premissa de que a existência de mercados estáveis depende da elaboração de produtos que satisfaçam as exigências dos consumidores (EMBRAPA, 2000). A carne deve corresponder às expectativas do consumidor no que se refere aos seus atributos de qualidade sensorial. A tendência atual é desenvolver produtos diferenciados pelo tipo de corte, peso, coloração, acidez, método de processamento, embalagem e marcas (JANK, 1996). No entanto, a qualidade final do produto depende muitas vezes da interação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos tais como a genética do animal, a idade e o sexo; e fatores extrínsecos como as condições de abate e os métodos de conservação (EMBRAPA, 2000). Além disso, também existe a influência do tempo e processo de envelhecimento (maturação) e cozimento (DESTEFANIS et al., 2008).

A capacidade de prever a maciez da carne é um dos principais desafios enfrentados pela indústria de carne bovina, pois o amaciamento natural no período *post-mortem* é variável entre as carcaças (MILLER et al., 2001). Este processo ocorre pela proteólise das miofibrilas devido à ação de enzimas endógenas. Duas isoformas da enzima calpaína, denominadas μ -calpaína (CAPN1) e m-calpaína (CAPN2), atuam digerindo as proteínas musculares, enquanto outra enzima, calpastatina (CAST), tem a função de inibir a ação das enzimas proteolíticas (CALVO et al., 2014).

Estudos de sequenciamento, genotipagem e avaliação fenotípica demonstraram a ocorrência de alelos dos genes CAPN1, CAPN2 e CAST devido a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*). Um SNP na CAST (CASTc:2832) e dois na CAPN1 (CAPN1-316 e CAPN1-4751) demonstraram ter uma forte associação com a força de cisalhamento (principal medida física de maciez de carne) em estudos prévios (PAGE et al., 2002; WHITE et al., 2005; JOHNSTON e GRASER, 2010; ALLAIS et al., 2011). Estes três SNPs são atualmente considerados marcadores genéticos de maciez, sendo inclusive analisados em testes laboratoriais comerciais, como por exemplo o *GeneSTAR® Tenderness* (Catapult Genetics, Albion, Queensland, Austrália).

Os métodos laboratoriais mais utilizados na avaliação de SNPs nos genes da calpaína e da calpastatina são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Diversas variações da PCR já foram descritas para

esta finalidade, entre as quais PCR em tempo real (BARENDSE et al., 2008), PCR-RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism* (SCHENKEL et al., 2006), PCR-SSCP do inglês *Single-strand Conformation Polymorphism* (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009) e PCR-sequenciamento (BARENDSE et al., 2008; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2009). O método majoritariamente utilizado é a PCR em tempo real (devido à rapidez na avaliação dos resultados), contudo a técnica PCR-RFLP (que realiza a identificação dos polimorfismos pela digestão com enzimas de restrição sítio-específicas) apresenta menor custo sem prejuízo da acurácia da avaliação (SCHENKEL et al., 2006).

Os objetivos deste estudo foram (1) implementar procedimentos de análise dos SNPs CASTc:2832, CAPN1-316 e CAPN1-4751 por PCR-RFLP, (2) detectar a ocorrência e analisar a frequência destes SNPs em reprodutores da raça Simental no Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas amostras de 50 bovinos (sangue e/ou pelo), sendo 27 fêmeas e 23 machos, todos da raça Simental da linhagem Sul-africana. Os animais eram provenientes da Fazenda Santa Teresinha, no município de Jaquirana, estado do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram armazenadas em freezer (-20°C), enquanto os pelos foram mantidos na temperatura ambiente em recipientes isolados.

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com uma média de 15 pelos de cada animal (todos com bulbos capilares) e/ou 0,1 mL de sangue. O método de extração foi o de adsorção em sílica com o uso de reagentes comerciais NewGene Prep e PreAmp, conforme instruções do fabricante (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil).

Amplificação por PCR

A viabilidade das amostras de DNA extraídas de pelo e sangue foi avaliada com uma técnica de PCR em tempo real de detecção de DNA mitocondrial bovino previamente descrita (KRCMAR e RENCOVA, 2005). As reações foram realizadas em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Os resultados foram avaliados através de um gráfico, onde foi definido o ciclo limite de detecção (CT, *Cycle Threshold*).

A amplificação para a detecção dos SNPs foi realizada pela técnica de PCR convencional utilizando-se iniciadores (*primers*) relatados em trabalhos prévios (WHITE et al., 2005; ALLAIS et al., 2011). Os tubos com as reações de amplificação foram colocados em termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems™) e submetidos a duas condições diferenciadas, conforme o SNP alvo: (1) um ciclo a 95° C por 3 minutos e 35 ciclos a 95° C por 15 segundos, 60° C por 40 segundos 60° C e 72° C por 1 minuto (para CAPN1-316 e CAST) e (2) um ciclo a 95° C por 3 minutos e 35 ciclos a 95° C por 15 segundos, 65° C por 40 segundos e 72° C por 1 minuto (CAPN1-4751).

Digestão com Endonucleases de Restrição

A avaliação dos SNPs foi realizada por digestão com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos no DNA. Os produtos da PCR dos SNPs CAST e CAPN1-4751 foram digeridos com a enzima *Dde* I a 37° C, enquanto os do SNP CAPN1-316 foram digeridos com a enzima *Bsa* I a 60° C, ambos por uma hora. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e reveladas com solução de nitrato de prata. Os padrões foram avaliados visualmente (Tabela 1).

Tabela 1. Informações sobre os genes, respectivos SNPs, enzimas de restrição e padrões esperados.

Gene	BTA ^a	Marcador	SNP	Fragmento Intacto (PB ^b)	Enzima de Restrição	Fragmento Digerido (PB ^b)
CAPN1	29	CAPN1-4751	C/T	144	<i>Dde</i> I	63 e 81
		CAPN1-316	C/G	65	<i>Bsa</i> I	27 e 38
CAST	7	CASTc:2832	A/G	83	<i>Dde</i> I	38 e 45

^a BTA = Cromossomo bovino (do inglês *Bos taurus* chromosome)

^b PB = Pares de Base

Controle de Qualidade

Realizou-se a Repetição Dos procedimentos analíticos a partir das amostras de animais selecionados aleatoriamente. Além disso, algumas amostras foram utilizadas como controles positivos e, portanto, foram frequentemente reavaliadas e comparadas com os seus resultados anteriores.

Avaliação das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas pela contagem direta de alelos e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg avaliados pelo teste de qui-quadrado (χ^2), onde valores de $P < 0,05$ indicaram diferença estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada uma comparação dos tipos de amostra (pelo e sangue) para análise. A avaliação de 15 amostras de sangue e pelo dos mesmos animais demonstrou que todas apresentaram resultado positivo, com uma média de CT de 21,7 (desvio padrão 1,1) nas amostras de sangue e 20,7 (desvio padrão 2,2) nas de pelo, não demonstrando diferença no procedimento de análise.

Após, os procedimentos de amplificação e genotipagem dos três SNPs foram implementados com a utilização de cinco amostras selecionadas aleatoriamente. Todas as cinco amostras apresentaram a amplificação do fragmento do tamanho esperado, conforme o SNP avaliado (Tabela 1).

A subsequente análise de todos animais, a partir das amostras de pelo, possibilitou a obtenção da informação do genótipo de cada animal e dos alelos presentes nesta população (Tabela 2). Foi observada a ocorrência de apenas um alelo para o marcador CAPN1-316 (100% G). As frequências alélicas do marcador CASTc:2832 foram 94% A e 6% G; e para o marcador CAPN1-4751 foram 42% C e 58% T. Foram observados os seguintes genótipos: GG para CAPN1-316; AA (88%) e AG (12%) para CASTc:2832; CC (26%), CT (32%) e TT (42%) para CAPN1-4751.

A realização do controle de qualidade em 11 amostras demonstrou que todas apresentaram exatamente os mesmos resultados em duas avaliações independentes. O teste χ^2 foi aplicado para avaliar se os genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população. Os genótipos do CASTc:2832 estão em equilíbrio, mas os do CAPN1-4751 não.

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas dos três marcadores estudados

Marcador	Genótipo	n	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica	Valor de P^a
CASTc:2832 (T1)	AA	44	0,88	A	0,94	0,652
	AG	6	0,12			
	GG	0	0	G	0,06	
CAPN1-316 (T2)	CC	0	0	C	0	n/a ^b
	CG	0	0			
	GG	50	1	G	1	
CAPN1-4751 (T3)	CC	13	0,26	C	0,42	0,015
	CT	16	0,32			
	TT	21	0,42	T	0,58	

^a Teste de qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

^b Não se aplica

A associação dos três polimorfismos investigados com maciez de carne já havia sido demonstrada em estudos com grande número de animais (WHITE et al., 2005; ALLAIS et al., 2011). Allais et al. (2011) estudaram mais de dois mil animais (raças Charolês, Limousin, Blonde d'Aquitaine e cruzamentos destas) e correlacionaram os genótipos encontrados para os SNPs CASTc:2832 e CAPN1-316 com a avaliação fenotípica da maciez da carne pela força de cisalhamento de Warner-Bratzler (*Warner-Bratzler shear force*). Os autores encontraram as seguintes frequências genotípicas para CASTc:2832: AA = 65% (n = 2144), AG = 32% (n = 1063) e GG = 3% (n = 103). A avaliação nos testes fenotípicos demonstrou que o alelo A é favorável para a maciez de carne. No presente estudo, 44 animais apresentaram genótipo AA (88%) e 6 apresentaram genótipo AG (12%). Os resultados demonstram que o alelo G é bem menos frequente nas populações estudadas. Já na avaliação do SNP CAPN1-316, as frequências genotípicas obtidas pelos mesmos autores foram: CC = 3% (n = 94), CG = 23% (n = 747) e GG = 74% (n = 2423).

Através da força de cisalhamento de Warner-Bratzler, o alelo C foi determinado favorável para carne macia. No presente estudo, todos os 50 animais avaliados apresentaram o genótipo desfavorável GG, estando de acordo com a frequência majoritária observada previamente. Um estudo com maior número amostral deve ser realizado para avaliar a ocorrência do alelo favorável C e possível uso destes animais como reprodutores visando a maior disseminação deste alelo na população.

O SNP CAPN1-4751 foi analisado em um grande número de animais por White et al. (2005), sendo avaliado em descendentes mistos das raças Hereford, Angus, Red Angus, Simmental, Gelbvieh, Limousin e Charolês. Os achados indicaram que o alelo C do SNP CAPN1-4751 é favorável para a maciez da carne. Especificamente para os animais da raça Simmental, a frequência genotípica foi: CC = 34% (n = 187), CT = 47% (n = 260) e TT = 19% (n = 103). No presente estudo, as frequências genotípicas obtidas foram: CC = 26%, CT = 32% e TT = 42%. Foi demonstrada a ocorrência dos dois alelos possíveis na população, no entanto não foi possível estabelecer uma relação direta com o trabalho prévio.

Os três marcadores avaliados – CASTc:2832, CAPN1-316 e CAPN1-4751 – fazem parte do teste comercial australiano *GeneSTAR® Tenderness*, sendo identificados como marcadores de maciez T1, T2 e T3, respectivamente (JOHNSTON e GRASER, 2010). O teste ainda é composto por um quarto marcador (T4), um polimorfismo G/T encontrado na terceira família da calpaína (CAPN3) que não foi avaliado neste trabalho por ser polimórfico somente em zebuínos e animais mestiços de bovinos e zebuínos (BARENDSE et al., 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra que foi possível avaliar as frequências alélicas e genotípicas de três polimorfismos associados à maciez de carne em bovinos da raça Simmental. Estes resultados estão sendo utilizados em programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALLAIS, S. et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*, v. 89, n. 1, p. 1-11, 2011.
- BARENDSE, W. et al. Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle. *BMC Genetics*, v. 41, n. 9, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. *Valor Bruto da Produção*. Brasília: AGE, 2014.
- CALVO, J. H. et al. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Science*, v. 96, n. 2A, p. 775-772, 2014.
- CONAB. *Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1470&t=2>> Acesso em: jan. 2014.

- DESTEFANIS, G. et al. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. *Meat Science*, v. 78, n. 3, p. 153-156, 2008.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Programa Embrapa de Carne de Qualidade*. Campo Grande: Embrapa, 2000. p.75.
- JANK, M. S. *Competitividade do agronegócio brasileiro: discussão teórica e evidências no sistema carnes*. 1996. 195 f. Tese (Doutorado em Administração) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- JOHNSTON, D. J.; GRASER, H. U. Estimated gene 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. *Journal of Animal Science*, v. 88, n. 6, p. 1917-1935, 2010.
- JUSZCZUK-KUBIAK, E.; FLISIKOWSKI, K.; WICINSKA, K. A new SNP in the 3'UTR region of the bovine calpain small subunit (CAPNS1) gene. *Molecular Biology Reports*, v. 37, n. 1, p. 473-476, 2009.
- KRCMAR, P., RENCOVA, E. Quantitative Detection of Species-Specific DNA in Feedstuffs and Fish Meals. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 6, p. 1217-1221, 2005.
- MILLER, M. F. et al. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science*, v. 79, n. 12, p. 3062-3068, 2001.
- PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.
- 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, n. 2, p. 291-299, 2006.
- USDA. *USDA Foreign Agricultural Service*. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: jan. 2014.
- WHITE, S. N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, v. 83, n. 9, p. 2001-2008, 2005.