



## EMPREGO DE MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DE MACIEZ DE CARNE EM BOVINOS NELORE

Natani Iris **Pereira**<sup>1</sup>, Ana Carolina Januário de **Lima**<sup>2</sup>, Weber Vilas Boas **Soares**<sup>3</sup>, Eder **Pinatti**<sup>4</sup>,  
Maria Aparecida Cassiano **Lara**<sup>5</sup>

Nº 15706

**RESUMO** – *O objetivo deste trabalho foi conhecer as frequências alélicas e genotípicas para os genes calpaína e calpastatina, bem como a relação dos polimorfismos CAPN316, CAPN530, CAPN4751 e SNP2959 na maciez de carne. Um total de 55 bovinos da raça Nelore foi investigado pela técnica de PCR-RFLP, empregando-se as seguintes enzimas de restrição: BtgI, Avall, BsaI e Ddel. As frequências gênicas observadas para o marcador CAPN316 demonstraram que o alelo favorável “C” encontrava-se com frequências inferiores em relação à outra forma alélica “G”. Com relação ao marcador CAPN530, as frequências gênicas revelaram a predominância do alelo “G”. Os marcadores CAPN4751 e CAST2959 apresentaram maior variabilidade genética em relação aos demais. As frequências dos alelos favoráveis “C” (CAPN4751) e “A” (SNP2959) foram 0,26 e 0,5, respectivamente. Esses resultados revelam que o gado Nelore apresenta grande potencial para produção de carne com qualidade e que o uso de tais marcadores pode contribuir para a identificação de genótipos superiores para maciez de carne.*

**Palavras-chaves:** Calpaína, calpastatina, PCR-RFLP.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNESP, Rio Claro-SP; natani.iris75@gmail.com

2 Colaborador, Aluno de Pós-Graduação : Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa - SP

3 Colaborador, Pesquisador Científico, Instituto de Economia Agrícola, São Paulo- SP

4 Colaborador, Pesquisador Científico, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa - SP

5 Orientador: Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa – SP, malara@iz.sp.gov.br



**ABSTRACT-** *The aim of this study was to know the allele frequencies and genotypes to calpain and calpastatin gene, as well as the relationship of CAPN316, CAPN530, CAPN4751 polymorphisms and SNP2959 in tenderness of meat. A total of 55 Nelore cattle have been investigated by PCR-RFLP technique, using the following restriction enzymes: BtgI, Avall, BsaJ and DdeI. Gene frequencies observed for the CAPN316 marker demonstrated that the favourable allele "C" was with lower frequencies compared to the other allele "G" form. With respect to the CAPN530 marker, the gene frequencies revealed the prevalence of allele "G". The marker CAPN4751 and CAST2959 presented the greatest genetic variability in relation to others. The frequency of the favourable allele "C" (CAPN4751) and "A" (SNP2959) were 0.26 and 0.5, respectively. These results show that the Nelore present great potential for production of quality meat and that the use of these markers may contribute to the identification of superior genotypes for tenderness meat.*

**Key-words:** *Calpain, Calpastatin, PCR-RFLP*

## 1. 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. A principal característica observada pelo consumidor no momento de avaliar a carne é sua maciez, que é influenciada por genética, raça, idade do abate, sexo, alimentação, hormônio e, principalmente, *tratamentos post-mortem* (OLIVEIRA, 2000). A Goll *et al.* (1992) ressaltaram que as calpaínas são responsáveis por 90% ou mais da tenderização *post-mortem* da carne. As calpaínas participam da proteólise *post-mortem* que conduz a um aumento na maciez da carne e são inibidas pela calpastatina (KOOHMARAIE, 1994), por esta razão, os polimorfismos relacionados a esses genes tem sido alvo de muita pesquisa visando melhorar a qualidade da carne bovina. Page *et al.* (2002) sugerem que o gene CAPN1 codifica a protease  $\mu$ -calpaina, que degrada as proteínas miofibrilares durante o período *post-mortem*. Essa enzima tem sido considerada uma das principais envolvidas na maciez da carne. Dois SNPS no gene CAPN1, que produzem substituições de aminoácidos na proteína na posição 316 (glicina/ alanina) e 530 (valina/ isoleucina) têm sido associados com a maciez da carne em bovinos de origem *Bos taurus* (Page *et al.*, 2004). Já White *et al.* (2005) investigando o gene calpaína, descrevem um novo polimorfismo (CAPN4751) que resulta na substituição de citocina por



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

termina na posição 6545 do intron 17, relacionando o alelo “C” como favorável a produção de carne macia.

Adicionalmente, a calpastatina, enzima inibidora das calpaínas, tem sido considerada como a principal reguladora da atividade proteolítica no *post-mortem*. Barendse (2002) identificou uma transição de guanina para adenina no SNP2959 (região não traduzida 3'UTR), na qual o alelo A é o favorável, por estar relacionado á carne mais macia. Desse modo, o conhecimento da variabilidade dos 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 e a sua relação com a maciez de carne de bovinos Nelore.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 55 bovinos da raça Nelore, pertencentes a outro projeto de pesquisa conduzido na Universidade de São Paulo, Pirassununga, foi investigado. Os animais foram abatidos ao atingirem o acabamento de 4 mm de espessura de gordura na área do olho de lombo, após jejum hídrico e alimentar. As meias carcaças foram pesadas e armazenadas em câmara fria. Após 24 horas, duas amostras do músculo (*Longissimus dorsi*) com espessuras em cerca de 2,5 cm foram retiradas da seção Hankins e Howe (seção HH - 9-11<sup>a</sup> costelas), para a avaliação da maciez de carne. Essas amostras foram processadas conforme descrito no Manual de Cozimento e Avaliação Sensorial da Carne (Cross et al., 1978). A força de cisalhamento (FC), perdas por evaporação e drenagem durante o cozimento foram obtidas a partir de amostras “*in natura*” e submetidas ao processo de maturação (0 a 2<sup>o</sup>C) por 14 dias. Para a determinação de FC usou-se o aparelho do tipo *Warner-Bratzler Shear* fabricado por *G-R Electrical Manufacturing Company*.

O DNA genômico foi obtido a partir de 10-20 mg de músculo *Longissimus dorsi*. As amostras de carne foram misturadas em 300 µl de tampão de lise pH 8,0 (Tris 0,5M, EDTA 0,1M, SDS 2%) e 5µL proteinase k (10mg/mL), incubadas a 55<sup>o</sup>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<sup>o</sup>C. O DNA foi precipitado adicionando-se 700µl de isopropanol e lavado em 200µL de etanol 70%, empregando-se a centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram ressuspensas em 50 µL de água ultrapura, quantificadas e diluídas para uma concentração de 50ng/µl.



### 2.1. CAPN316

Para as análises do CAPN316 (AF252504), um fragmento com 839 pb (localizado entre o intron7 e exon 10) foi amplificado e clivado com a enzima *BtgI*. Para a PCR foi utilizado aproximadamente 125 ng de DNA para um volume final de 25 µL, contendo tampão 1x (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,15 µM de cada *primer* (F: 5'-TAGAGCTGCCTCTCTCAGCAGTTT-3' e R: 5'-ACGCATGAAGTCTCGGAAGGACAT-3') e 1 unidade de *Taq DNA-polimerase*. Após desnaturação inicial a 95°C por 5 min, a amplificação foi realizada em 35 ciclos a 94°C por 45 seg, 64,5°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 5 U da enzima *BtgI* a 37°C durante 3 horas. Os RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e visualizados após coloração com prata, descrita por Sanguinetti *et al.*, 1994.

### 2.2. CAPN530

Para as análises do marcador CAPN530 (AF248054) um fragmento com 318 pb foi amplificado e hidrolisado com a enzima de restrição *Avall*. 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 MgCl<sub>2</sub>, 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*. Após desnaturação inicial a 95°C por 3 min, a amplificação foi realizada em 35 ciclos a 94°C por 40 seg, 61,0°C por 40 seg e 72°C por 40 seg, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de 6 µL do produto amplificado foi digerido com 2,5 U da enzima *Avall* a 37°C durante 3 horas. Os RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e, os produtos de restrição, visualizados após coloração com prata.

### 2.3. CAPN4751

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 MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,20 µM de cada *primer* (F: 5'-ATAGGAAGGGCTTGGGTTGGGAT-3' e R: 5'-AAACTCCACAGCGTAAACCAGACG-3') e 0,5U 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. 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 após coloração com prata, descrita por Sanguinetti *et al.*, 1994.

#### 2.4. SNP2959

Para as análises do SNP2959 (AF150246), um fragmento com 257pb foi amplificado e clivado com a enzima *Ddel*. Para a reação de PCR foi utilizado 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'ATTCTCCCCACAGTGCCTGTAA3' e R: 5'GCGCTTCCTGGTCTGTCCAG3') e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase. Após a desnaturação inicial a 95°C por 3 min, a amplificação foi realizada em 35 ciclos a 94°C por 45 seg, 60°C por 45 seg e 72°C por 2 min e 20 seg, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de 6 µL do produto amplificado foi digerido com 0,3 unidades de *Ddel* a 37°C por 6 horas. Os fragmentos de DNA foram tratados com *Blue Green Dye* (LGC Biotecnologia) separados em gel de agarose 1,5%, visualizados em um transiluminador com luz branca.

Para analisar o efeito de cada marcador sobre a maciez da carne foi usado o PROC MIXED do SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC), ajustando o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + GA_i + M_j + \beta_{idade} + \beta_{peso} + e_{ijk},$$

em que,  $Y_{ijk}$  é a observação fenotípica de maciez,  $\mu$  é a média geral,  $GA_i$  é o grupo de abate,  $M_i$  é o efeito fixo dos genótipos marcadores (CAPN316, CAPN530, CAPN4751, SNP2959)  $\beta_{idade}$  é o efeito linear da idade do animal ao abate como co-variável,  $\beta_{peso}$  é o efeito linear do peso do animal ao abate como co-variável, e  $e_{ijk}$  é o erro aleatório. Cada marcador foi ajustado independentemente no modelo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada no presente estudo permitiu investigar os quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes calpaína e calpastatina em bovinos da raça Nelore. Como pode ser visto na Tabela 1, as frequências alélicas observadas para o marcador CAPN316 demonstraram que o alelo favorável “C” encontrava-se em frequência inferior em relação à forma alélica “G”. No entanto, 2% da população investigada apresentaram o genótipo CG, conforme apresentado na Tabela 1. Com relação ao marcador CAPN530, foi observado que o alelo “G”, considerado favorável no gado europeu, apresentou-se praticamente fixado na população investigada, o que não era esperado já que o gado Nelore, em geral, apresenta carne mais dura quando comparada com o europeu. Esse resultado sugere que o marcador CAPN530 não é uma



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

ferramenta adequada para a seleção de zebuínos, como é o caso do Nelore. Lara *et al* (2012) investigando carnes de origem *Bos taurus indicus*, não detectaram efeitos significativos do marcador CAPN530 na força de cisalhamento.

Dentre os marcadores do gene calpaína, o marcador CAPN 4751 foi o que apresentou a maior variabilidade genética em relação aos demais. Como pode ser visto na Tabela 1, o alelo favorável “C” para maciez de carne foi detectado na população investigada, cuja frequência foi 0,28. Além disso, 5% dos animais apresentaram em homozigose para o alelo “C”, o que demonstra o seu potencial genético para produção de carne macia. Considerando que esse marcador se relaciona á maciez e possui um grande número de animais heterozigotos (CT), sugere cruzamentos direcionados a fim de aumentar a frequência do genótipo favorável (CC) na população.

**Tabela 1.** Estimativas de frequências genotípicas de cada marcador

Marcador	Genótipo	Frequência genotípica	Frequências alélicas	Frequências alélicas
CAPN 316	C/C	0		
	C/G	0,02	F(C)=0,02	F(G)= 0,98
	G/G	0,98		
CAPN 530	A/A	0		
	A/G	0,04	F(A)=0,09	F(G)=0,91
	G/G	0,96		
CAPN 4751	C/C	0,05		
	C/T	0,42	F(C)=0,26	F(G)=0,74
	T/T	0,53		
CAST 2959	A/A	0,22		
	A/G	0,64	F(A)=0,54	F(G)=0,46
	G/G	0,14		

Com relação ao marcador CAST2959, as frequências do alelo favorável “A” e do genótipo “AA” demonstram também o potencial genético da população investigada para produção de carne macia, já que as frequências dos genótipos AA e AG foram maiores que GG, relacionado à alta atividade enzimática de calpastatina, inibidora da calpaína. Em estudos anteriores, Lara *et al.* (2010) detectaram efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) do marcador CAST2959 nos valores de força de cisalhamento, sendo o efeito médio de substituição para o alelo favorável “A” estimado em -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. Outra justificativa para o excesso de heterozigoto (AG) observado seria devido ao pequeno número de indivíduos investigados ou a seleção a favor do alelo “A”.

Como pode ser visto na Tabela 2, os valores médios de FC observados para cada genótipo em amostras de carne maturada aos 14 dias foram menores em relação aos valores de FC obtidos



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

após 24 horas de maturação, como era esperado. Tais valores indicam a atuação dos sistemas responsáveis pela proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas no *post mortem*, como é o caso do complexo enzimático calpaína-calpastatina. No caso do genótipo CG do marcador CAPN316 não houve diminuição do FC na carne maturada aos 14 dias, o que não era esperado. Com relação ao marcador CAPN 4751 do gene calpaína, os animais heterozigotos (CT) apresentaram em média uma diferença de FC(-1,91) maior do que os homozigotos (TT, CC).

Os valores encontrados no marcador CAST2959 sugerem que a calpastatina não apresentou uma atividade capaz de inibir a atividade da calpaína. Isto porque, no caso do genótipo favorável AA, a baixa atividade da calpastatina sobre a ação proteolítica da calpaína resultou no valor de FC menor em relação aos demais genótipos (AG, GG) após os 14 dias da maturação.

Os valores de FC devem ser melhor analisados, com maior número de animais para permitir a avaliação do efeito complexo do sistema enzimático calpaína-calpastatina. Além disso, os genótipos observados deverão ser analisados na forma de haplótipos com a finalidade de verificar a melhor combinação genotípica capaz de influenciar o potencial genético dos animais para a produção de carne com qualidade.

**Tabela 2.** Valores médios de força de cisalhamento por genótipo nos tempos 0 e 14 dias

Tempo	CAPN316		CAPN530		CAPN4751			CAST 2959		
	CG	GG	AG	GG	CC	CT	TT	AA	AG	GG
FC: 0 dias	5,08	4,81	5,34	4,76	4,67	4,88	4,78	4,84	4,79	4,91
FC: 14 dias	6,18	2,99	3,36	3,02	3,19	2,94	3,12	2,93	3	3,44
Diferença	1,09	-1,80	-1,98	-1,72	-1,48	-1,91	-1,65	-1,91	-1,79	-1,38

As análises de variância, no entanto, não revelaram efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) dos marcadores investigados na FC, excetuando para o marcador CAPN316.

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.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os marcadores CAPN4751 e CAST2959 podem contribuir para o conhecimento do potencial do gado Nelore para a maciez da carne, permitindo a seleção de genótipos superiores. CAPN316 e CAPN530 são ineficientes como marcadores de maciez em Nelore.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

## **5. AGRADECIMENTOS**

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro e ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa pela oportunidade.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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.

CROSS, H.R.; BERNHOLDT, H.F.; DIKEMAN, M.E. et al. 1978. **Guidelines for cookery and sensory evaluation of meat.** Chicago: American Meat Science Association/National Livestock Meat Board. 24p.

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, Chicago. Proceedings... Chicago: National Livestock and Meat Board, 1992. p25-36.

KOOHMARAIE, M. Nebraska:USA. **Meat Animal Research Center**, 11p. 1994.

LARA M.A.C.; GUTMANIS G.; SOARES, W.V.B.; ROCHA L.A.; CUNHA E.A.; CAVALCANTE-NETO A.; SILVA R.C.B.; RIBEIRO M.N.; HERLING, V.R. Caracterização genética de raças nativas e comerciais de ovinos com base em snps no gene leptina. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v.2, p.215-219, 2012.

LARA, M A C ; FARIA, M.H.; RESENDE, F.D. ; ANDREA J.P.; SIQUEIRA, G. R. ; PINATTI E. ; CAVALCANTE, A.N . **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 Zoogenéticos, 2010, João Pessoa. Memoriais. Campina Grande: UFPB; Instituto Nacional do Semiárido, 2010. v. XI. p. 586-589.

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. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3077-3085, 2002.

PAGE B.T., CASAS E., QUAAS R.L., THALLMAN R.M., HEELER T.L., SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE M., WHITE S.N., BENNETT G.L, KELLE J.W., DIKEMAN M.E.; SMITH T.P. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3474-3481, 2004.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E., SIMPSON A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.915-919, 1994.

WHITE S.N., CASAS E., WHEELER T.L., SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE M., RILEY D.G, CHASE C.C., JOHNSON JR., D.D., KEELE J.W. E SMITH T.P.L. 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, p.2001-2008, 2005.