

## Avaliação de diferentes combinações genóticas para polimorfismos no gene da $\mu$ -calpaína e calpastatina associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore

Carvalho, M. E.<sup>1</sup>; Eler, J. P.<sup>2</sup>; Afaz, A. L. M.<sup>3</sup>; Ferraz, J. B. S.<sup>2</sup>; Regitano, L. C. A.<sup>4</sup>; Meirelles, F. V.<sup>2</sup>; Balieiro, J. C. C.<sup>2</sup>

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

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

<sup>3</sup> Aluno de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP. Pirassununga, SP. Bolsista FAPESP.

<sup>4</sup> Pesquisadora do CPPSE/EMBRAPA. São Carlos, SP.

### Introdução

Por muito tempo a carne bovina foi comercializada como um produto tendo a única opção relacionada à qualidade, os cortes comumente conhecidos. No entanto, as exigências atuais dos consumidores não estão restritas somente a esta característica, e cada vez mais buscam novos produtos de maior qualidade. Assim, é crescente o movimento dos agentes da cadeia em busca de alternativas. Uma das maneiras utilizada para promover a diferenciação, é a busca por qualidades intrínsecas do produto final. Variações genéticas que possam ser associadas com características de qualidade da carne e que garantam maior satisfação aos consumidores, vêm assumindo papel de destaque por parte de pesquisadores do mundo inteiro. Entre essas características, a maciez da carne é sem dúvida, uma das mais importantes. Portanto, existe grande interesse pela seleção de animais cuja genética seja favorável a maior maciez da carne, particularmente em animais de origem *Bos indicus*, que representam a base da produção de carne no Brasil. Estudos têm evidenciado que as proteases neutras ativadas por íons de cálcio, denominadas calpaínas e seu inibidor enzimático, a calpastatina, são parcialmente responsáveis pela proteólise *pos mortem*, conduzindo ao aumento progressivo da maciez da carne. Polimorfismos no gene da  $\mu$ -calpaína já foram reportados por PAGE et al, (2004), CASAS et al (2005), WHITE et al, (2005), CASAS et al (2006) e no gene da calpastatina por SCHENKEL et al, (2006), influenciando significativamente a maciez da carne em trabalhos com raças taurinas e alguns cruzamentos. No entanto, estudos da utilização de polimorfismos em genes ligados à maciez da carne em animais da raça Nelore, ainda são pouco explorados.

### Objetivos

O objetivo do trabalho foi avaliar os diferentes polimorfismos no gene da  $\mu$ -calpaína e calpastatina, bem como seus efeitos conjuntos em relação à maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

### Material e Métodos

**Animais avaliados.** Foi extraído o DNA de 292 animais da raça Nelore, empregando-se o método de extração e precipitação das proteínas em NaCl a partir de amostras

de sangue. **Análise de maciez.** 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. Os bifes foram identificados individualmente, embalados a vácuo (embaladoura 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 (WBSF)*. **Identificação dos polimorfismos.** A caracterização e determinação dos genótipos para os marcadores CAPN (316, 530 e 4751) e CAST 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 e possuem a seqüência depositada no *GenBank* para os marcadores da  $\mu$ -calpaína e calpastatina. As proporções de indivíduos heterozigotos e homozigotos para cada loco foram estimadas por meio das leituras de fluorescências das sondas e foram utilizadas para a determinação das frequências genóticas em cada marcador. Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 10 ng de DNA para uma reação de 10  $\mu$ l, contendo 5  $\mu$ l TaqMan® Universal Master Mix (2x) e 0,250  $\mu$ l do *Assay Mix (40x)* da Applied Biosystems, em 38 ciclos de 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 58°C e 1 minuto à 72°C. **Efeito das combinações genóticas dos polimorfismos sobre a maciez da carne.** Para avaliar as implicações dos resultados moleculares sobre a característica da maciez da carne, foram utilizadas as informações obtidas dos testes de maciez (*Shear Force*) como variável dependente. Apenas marcadores que apresentaram todos os possíveis genótipos e com frequências observadas superiores a 4% foram utilizados para avaliação dos efeitos nas diferentes combinações genóticas em relação maciez da carne. Essas análises, considerando os diferentes dias de maturação, foram realizadas a partir do modelo proposto por White et al. (2005). O modelo pode ser representado da seguinte forma:  $Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + G_k + \beta_1(I_{ijkl} - \bar{I}) + e_{ijkl}$ , em que:  $Y_{ijkl} = \acute{e}$

o valor observado para a característica maciez;  $\mu =$  é uma constante inerente a todas as observações;  $C_i =$  é o efeito fixo de grupo de contemporâneos  $i$ ;  $S_j =$  é o efeito aleatório de reprodutor  $j$ , com média 0 e variância  $\sigma_s^2$ ;  $G_k =$  é o efeito fixo da combinação genotípica dos marcadores em questão;  $\beta_1 =$  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 estimativas de médias, desvios-padrão, coeficientes de variação, mínimos e máximos para as variáveis avaliadas encontram-se no Quadro 1. Observa-se que as médias da maciez decresceram com o avanço em dias da maturação. Estes resultados corroboram com processos *pos mortem* sofridos pela carne, uma vez que as proteases agem na desestruturação de algumas fibras musculares, propiciando maior maciez na carne maturada. O coeficiente de variação da idade ao abate observado (5,3%), demonstra a homogeneidade do lote avaliado. Já os coeficientes de variação relacionados à maciez para os diferentes dias de maturação, foram superiores ao coeficiente de variação observado para a idade ao abate dos animais. No Quadro 2 estão apresentadas as freqüência genotípicas observadas para cada marcador molecular avaliado. Foram verificadas baixas freqüências para algumas formas genotípicas nos

marcadores CAPN316 e 530, sendo que para o marcador CAPN530, não foram obtidos animais com genótipos AA. Este fato impede a avaliação conjunta destes marcadores, em análises de associação que contemplem combinações genotípicas de dois ou mais marcadores simultaneamente na presente amostra. Distribuição dos animais (N), estimativas para os contratos e os erros padrão associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4751 e CAST, avaliados simultaneamente para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias, estão apresentados no Quadro 3. Os resultados encontrados no presente trabalho, demonstraram que o alelo "C" é favorável para marcadores da  $\mu$ -calpaína e calpastatina, propiciando menores valores de "Shear Force" (expressos os desvios em kilogramas), indicando maior maciez da carne. WHITE et al, 2005 e SCHENKEL et al, 2006, relataram efeitos significativos para maciez da carne quando analisaram os dois marcadores em análises individuais (*single markers analysis*). A associação significativa da maciez da carne com combinações genotípicas para outros dois diferentes polimorfismos da calpaína também já foi relatado por PAGE et al, (2004), trabalhando com animais de origem taurina. As nove possíveis combinações genotípicas encontradas nos indivíduos avaliados, demonstraram para as três datas de maturação, a existência de efeitos significativos. A medida que as combinações dos genótipos incluem as formas alélicas favoráveis, nesse caso os alelos "C", foram verificadas quedas nas estimativas de "Shear Force", em kilogramas, caracterizando o aumento da maciez nos diferentes dias de maturação da carne.

Quadro 1. Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX) para a maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias, bem como, para idade dos animais ao abate.

Característica Avaliada <sup>a</sup>	N	MED	DP	CV(%)	MIN	MAX
WBSF-7d <sup>b</sup> , kg	292	5,94	1,45	24,37	2,33	9,99
WBSF-14d <sup>c</sup> , kg	292	4,83	1,28	26,52	1,32	9,34
WBSF-21d <sup>d</sup> , kg	292	4,35	1,13	25,98	1,61	7,73
IDABATE, meses	292	24,21	1,29	5,32	21,50	27,22

<sup>a</sup> Expressa os desvios em kilogramas força pelo Warner Blaztler Shear Force(WBSF);

<sup>b</sup> WBSF-7d = maciez da carne com sete dias de maturação, avaliada por WBSF; <sup>c</sup> WBSF-14d = maciez da carne com quatorze dias de maturação, avaliada por WBSF; <sup>d</sup> WBSF-21d = maciez da carne com vinte e um dias de maturação, avaliada por WBSF.

Quadro 2. Freqüência genotípicas observadas para os marcadores moleculares avaliados

CAPN316		CAPN530		CAPN4751		CAST1	
Genótipos	Freqüência	Genótipos	Freqüência	Genótipos	Freqüência	Genótipos	Freqüência
CG	1	AA	0	CC	13	CC	126
GC	1	GA	39	TC	90	CG	132
GG	289	GG	253	TT	189	GG	34
Total	291		292		292		292

Quadro 3. Distribuição dos animais (N), estimativas para os contrastes (EST) e os erros padrão (EP) associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores CAPN4751e CAST, avaliados simultaneamente, para características maciez da carne maturada aos 7, 14 e 21 dias.

Característica Avaliada <sup>a</sup>	Marcador CAPN4751	Marcador CAST					
		CC		CG		GG	
		EST±EP	N	EST±EP	N	EST±EP	N
WBSF-7d <sup>b</sup> , kg	CC	-1,35±1,11	2	-1,12±0,60	8	-0,89±0,89	3
	TC	-0,90±0,39	41	-0,67±0,41	39	-0,44±0,57	10
	TT	-0,46±0,36	83	-0,23±0,36	85	0,00±0,45	21
P=0,0175							
WBSF-14d <sup>c</sup> , kg	CC	-1,46±0,97	2	-1,16±0,52	8	-0,87±0,77	3
	TC	-1,02±0,34	41	-0,73±0,35	39	-0,44±0,49	10
	TT	-0,58±0,31	83	-0,29±0,31	85	0,00±0,39	21
P=0,0023							
WBSF-21d <sup>d</sup> , kg	CC	-1,34±0,87	2	-1,12±0,47	8	-0,90±0,70	3
	TC	-0,89±0,31	41	-0,67±0,32	39	-0,45±0,45	10
	TT	-0,44±0,28	83	-0,22±0,28	85	0,00±0,35	21
P=0,0038							

<sup>a</sup> Expressa os desvios em kilogramas força pelo Warner Blaztler Shear Force(WBSF);

<sup>b</sup> WBSF-7d = maciez da carne com sete dias de maturação, avaliada por WBSF; <sup>c</sup> WBSF-14d = maciez da carne com quatorze dias de maturação, avaliada por WBSF; <sup>d</sup> WBSF-21d = maciez da carne com vinte e um dias de maturação, avaliada por WBSF.

## Conclusões

Diferenças na maciez da carne em relação às combinações genotípicas, para os polimorfismos da  $\mu$ -calpaína e da calpastatina sugerem a possibilidade da utilização de ferramentas moleculares visando o aumento da qualidade da carne em bovinos da raça Nelore. Estudos futuros devem ser realizados em amostras de tamanho superior ao utilizado neste trabalho, possibilitando encontrar para os marcadores CAPN 316 e 530, todas as formas genotípicas e com frequências que permitam análises conjuntas.

## Referências

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

PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOMARAIE, 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. *J. Anim. Sci*, v. 82, n.12, p.3474-81, 2004.

SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; JIANG, Z. MANDELL, I. B.; YE, X.; LI, H., WILTON, J. W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal Animal Science*, v. 84, n. 2, p.291-299, 2006.

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.

Apoio: FAPESP