

Estabelecimento de cultura celular primária de mioblastos de bovinos com diferentes genótipos para um SNP no gene *CAST*: resultados preliminares

Alexandre de Lima Oliveira¹; Marina Ibelli Pereira Rocha¹; Suelen Scarpa Mello¹; Vanessa Candiotti Buzatto²; Simone Cristina Méo Niciura³

¹Aluno de mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, alexandre_lobio@hotmail.com.

²Aluna de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP.

³Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

O estabelecimento de cultura celular primária é um processo complexo, no qual as células de um tecido em estudo são isoladas e cultivadas em meio nutritivo para o seu crescimento. Associadas às miofibras do tecido muscular estão um conjunto de células indiferenciadas chamadas de células satélites, que depois de isoladas e cultivadas *in vitro* são chamadas de mioblastos. As células satélites são responsáveis pelo crescimento e pela regeneração do tecido muscular, e por meio da fusão das células satélites formam-se os miotubos multinucleados. No músculo bovino, a maciez da carne é influenciada pela extensão da degradação de proteínas da fibra muscular no período pós-morte promovida pela μ -calpaína, uma das enzimas responsáveis pelo amaciamento do músculo esquelético. Por outro lado, calpastatina, codificada pelo gene *CAST*, atua como inibidor da calpaína e diminui a proteólise. Além do controle na proteólise pós-morte, essas proteínas também estão envolvidas no processo de diferenciação das células satélites em miotubos por meio da degradação controlada das proteínas de membrana, o que favorece a fusão celular. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer culturas primárias de mioblastos de tecido muscular bovino de animais com diferentes genótipos para o polimorfismo do tipo SNP A>G no éxon 30 do gene *CAST*. Para tanto, procedeu-se a extração de DNA de leucócitos de 21 animais por precipitação com sal. A seguir, os animais foram genotipados por discriminação alélica em PCR em tempo real com sondas de hidrólise TaqMan. As reações consistiram de 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix, 1X de ensaio TaqMan contendo *primers* e sondas e 30 ng/ μ L de DNA, em volume final de 5 μ L. Foram identificados 10 animais GG, 3 animais AA e 8 animais AG. Para o estabelecimento das culturas, amostras de tecido muscular foram coletadas do músculo *Longissimus dorsi* no quinto espaço intercostal imediatamente após o abate. As amostras de músculo foram transportadas em gelo ao laboratório, fragmentadas e incubadas por 10 dias na presença de gelatina e em meio de proliferação DMEM/Ham-F12 com 15% de soro fetal bovino. Após esse período, a confirmação da pureza foi feita utilizando anticorpo primário anti-desmina, anticorpo secundário conjugado a FITC e visualização sob microscópio de epifluorescência. Os resultados mostraram que a imunofluorescência anti-desmina foi positiva, o que confirmou a pureza das culturas de mioblastos obtida por meio dessa metodologia. Uma vez que foram obtidas amostras de músculo de bovinos de cada um dos três possíveis genótipos para o SNP no gene *CAST*, nas etapas futuras será avaliada a influência do polimorfismo na expressão do gene *CAST* em células musculares em cultivo e na diferenciação dos mioblastos em miotubos *in vitro*. Além disso, por meio do tratamento das células com agentes desmetilante e inibidor de acetilação, será possível identificar os eventos epigenéticos, como a metilação do DNA e a acetilação de histonas, que podem regular a expressão do gene *CAST* em bovinos.

Apoio financeiro: CAPES, FAPESP.

Área: Biotecnologia