PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Estudo da influência dos genes calpaína (*CAPN*1) e calpastatina (*CAST*) na dureza da carne bovina

Jackeline Karsten Kirinus[1*], Mireia Blanco Alibés[2], Guillermo Ripoll García[2], Isabel Casasús Pueyo[2], Malena Serrano[3], Jorge Hugo Calvo Lacosta[4]

[1*]Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *E-mail: jackeline.kirinus@gmail.com. Autor para correspondência.

[2]Pesquisador do Centro de Investigación e Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Unidad de Tecnología en Producción Animal, Zaragoza, Espanha.

[3]Pesquisador INIA, Departamento de Mejora Genética Animal, Madrid, Espanha.

[4]Pesquisador ARAID; CITA, Zaragoza, Espanha.

Resumo

A qualidade da carne é formada por diferentes parâmetros, entre eles, a maciez é um dos mais importantes para o consumidor. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização dos diferentes SNPs para estudos de associação entre os genes calpaína (*CAPN*1) e calpastatina (*CAST*) na dureza da carne bovina das raças Parda de Montaña e Pirenaica realizado aos sete dias pós sacrífício. Após a estimação de valor genético dos animais para o

caráter da dureza, procedeu-se com o sequenciamento de diferentes fragmentos do DNA de animais extremos. Posteriormente realizou-se a técnica de PCR-RFLPs para genotipagem de três SNPs do gene *CAPN*1 e quatro SNPs do gene *CAST* de todos os animais. Três SNPs de *CAST* foram associados com a dureza da carne. Os genótipos GG, AA e GG para os SNPs *CAST*_1, *CAST*_2 y *CAST*_4 respectivamente, estavam relacionados a uma carne mais dura (p<0,05). O SNP *CAST*4, modifica um sítio de união de um possível microRNA, podendo alterar a estabilidade do RNA, desta forma, esse SNP poderia ser um bom candidato para associação com a dureza da carne na população estudada.
Palavras-chave: maciez, polimorfismos, SNPs.

Study of the influence of genes calpain (*CAPN*1) and calpastatin (*CAST*) in toughness of beef

Abstract

The quality of beef is formed by different parameters, among them, the tenderness is the most important for the consumer. The aim of this study was to characterize the different SNPs of calpain (*CAPN*1) and calpastatin (*CAST*) genes and their relationship with meat toughness after 7 days of ageing in Parda de Montaña and Pirenaica beef cattle breeds. After estimating the animal value of toughness, several fragments of DNA of extreme animals were sequenced. Three SNPs of *CAPN*1 gen and four SNPs of *CAST* gen were genotyped by PCR-RFLP for all animals. Three SNPs of CAST were associated with beef toughness. The genotypes GG, AA and GG for SNPs *CAST*_1, *CAST*_2 and *CAST*_4 were linked to a tougher meat (p <0.05), respectively. As SNP *CAST*_4 modifies one bonding site of a possible microRNA, it may alter the stability of the RNA, thus this SNP could be a good candidate for association with meat toughness in the studied population.
Keywords: tenderness, polymorphisms, SNPs.

INTRODUÇÃO

A qualidade da carne é considerada como complexa e multivariada; podendo ser influenciada por múltiplos fatores e suas interações, entre eles: raça, sexo, idade, alimentação, genética, manejo prévio ao sacrifício, método de sacrifício, resfriamento e conservação. A qualidade da carne é formada por diferentes parâmetros, entre eles, a maciez é um dos mais importantes para o consumidor. Em bovinos, 46% da variação da maciez é de origem genética e 54% ambiental. Nesse sentido, inúmeros pesquisas vêm sendo propostas para analisar os parâmetros específicos de dureza da carne bovina a nível genético (SCHENKEL et al., 2006; KEMP & PARR, 2012).

Assim, vários métodos de detecção de maciez da carne são conhecidos, a fim de avaliar as características desejáveis neste produto (HOCQUETTE ET AL., 2005). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização dos diferentes SNPs para estudos de associação entre os genes calpaína (CAPN*1*) e calpastatina (*CAST*) na dureza da carne bovina das raças Parda de Montaña e Pirenaica realizado aos sete dias pós sacrífício.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 194 animais de duas raças diferentes: Parda de Montaña (n= 143) e Pirenaica (n= 51). Foi obtida a maciez da carne medido por meio de célula Warner-Brazler para os sete dias do sacrifício destes animais mediou pelo esforço (kg/cm^2). Através de modelos mixtos os quais permitem ter em conta os fatores sistemáticos (fixos) que podem afetar a dureza da carne, assim como os efeitos aleatórios, foi considerado o valor genético de cada animal pelo caráter da dureza. Após esta classificação, selecionou-se 30 animais extremos e procedeu-se com o sequenciamento de fragmentos da DNA destas amostras.

Foram desenhados *primers* específicos para os seguintes fragmentos identificados na posição UMD 3.0 (GenBank): *CAPN1*_1 (1827088), *CAPN*1_2 (1843665), *CAPN*1_3 (1845653), *CAST*_1 (98533962), *CAST*_2 (98545188*), *CAST*_3 (98579573) e *CAST*_4 (98579663).

Posteriormente, foi realizada a técnica de PCR-RFLP´s para a caracterização dos estudos de associação dos diferentes SNPs de todas as amostras. A extração de DNA foi mediante kits contendo colunas de silica para sangue e tecidos (BIOTOOLS®). A amplificação do DNA foi realizada a partir de um fragmento específico que contém o SNP estudado. Em seguida, o produto de amplificação foi digerido com enzimas de restrição com o objetivo de detectar diferentes padrões de restrição do genótipo para cada SNPs. Os resultados foram verificados em gel de agarose 1,5%, corados com Syber Green e visualizados sob luz ultravioleta em equipamento Gel Doc (BIO-RAD CHEMIDOC MP GEL IMAGING SYSTEM). Após, procedeu-se com a análise estatística com o auxílio do programa Mixed do SAS 9.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variância fenotípica do caráter de esforço da amostras dos animais analisados foi de 4.322 e a variância devido ao animal foi de 1.712. Portanto, a proporção da variância fenotípica devido ao animal foi de 39,62%. Estes resultados sugerem a hipótese da existência de diferenças a nível genético entre os animais.

Os resultados do sequenciamento realizados no gene da calpaína mostraram que somente foram encontrados SNPs que produziam alteração de aminoácidos na proteína (*CAPN*1_1, *CAPN*1_2 e *CAPN*1_3), os quais já haviam sido descritos na literatura (PAGE et al., 2002; WHITE et al., 2005). Quando considerou-se toda a população analisada não foi encontrada diferença significativa entre a dureza da carne e o gene *CAPN*1.

No gene da calpastatina, foi encontrado três SNPs associados significativamente a dureza da carne. Deste modo, através da técnica de PCR-RFLP´s observou-se que os genótipos GG, AA e GG para os SNPs *CAST*_1, *CAST*_2 e *CAST*_4 respectivamente, estavam associados a uma carne mais dura ($p<0,05$; Tabela 1).

Tabela 1 - Estimador animal da dureza para o genótipo e significação do SNP na estimativa da dureza

--------*CAST*_1----------		---------*CAST*_2---------		-------*CAST*_4----------	
Genótipo	Estimador dureza	Genótipo	Estimador dureza	Genótipo	Estimador dureza
CC	-0.06	AA	0.79[b]*	AA	-0.03
CG	-0.12	AT	-0.10	AG	-0.10
GG	0.66[a]*	TT	-0.08	GG	0.87[c]*

Legenda: a = 0.014; b = 0.006; c = 0.024; * = P<(0,05).

Alguns dos SNPs encontrados já tinham sido previamente associados ao caráter da maciez em outras raças (*CAST*_1, *CAST*_3 e *CAST*_4) (BARENDSE et al., 2002; SCHENKEL et al., 2006). Pode-se dizer que foi encontrada uma maior significação entre o SNP *CAST*_2, localizado no íntron 12 do gene, seguido pelo SNP *CAST*_4, localizado na região 3' UTR do gene. Como o SNP *CAST_2* está situado numa região intrônica, ele não codifica proteína, ou seja, não seria responsável pelo efeito sobre a maciez da carne. No entanto, o SNP *CAST*_4, modifica um sítio de união de um possível microRNA, podendo alterar a estabilidade do RNA, e logo teria efeito sobre o caráter. Assim, é possível que exista outro SNPs influenciando o caráter das raças estudadas.

CONCLUSÃO

Os três SNPs do gene da calpastatina encontrados neste trabalho estão associados com a dureza da carne nos sete dias pós sacrífício. Deste modo, devido a probabilidade do SNP *CAST*_4 influenciar o caráter das raças estudadas, ele poderia ser um bom candidato para associação com a dureza da carne. Assim, faz-se necessário continuar as pesquisas nesta população.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE), processo número 5145-11-2, concedida pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Aos membros do Centro de Investigación e Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza, Espanha. À INIA e Governo de Aragón pelo o financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

BARENDSE, W. DNA markers for meat tenderness. **International patent application PCT/AU02/00122.** International patent publication WO 02/064820 A1. 2002. Disponível em: < http://www.freepatentsonline.com/20040115678.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2012.

HOCQUETTE, J.F. et al. The future trends for research on quality and safety of animal products. **Italian Journal Animal Science**, v. 4, p. 49-72, 2005. Disponível em: <http://www.aspajournal.it/index.php/ijas/article/view/ijas.2005.3s.49/893>. Acesso em: 01 dez. 2012.

KEMP, C.M. & PARR, T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. **Meat Science**, v. 92, n. 252–259, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546815>. Acesso em: 05 dez. 2012.

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, p. 3077-3085, 2002. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/80/12/3077.long>. Acesso em: <09 mar. 2013>.

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. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/84/2/291.long>. Acesso em: <08 mar. 2013>.

WHITE, S. N. et al. A new SNP in *CAPN1* is associated with tenderness in cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2001-2008, 2005. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/83/9/2001.long>. Acesso em: <18 mar. 2013>.