



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

POLIMORFISMOS NO GENE CAST EM DIFERENTES RAÇAS DE OVINOS DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Jessica Cristina Gonçalves dos Santos¹; Bruno do Amaral Crispim²; Leonardo de Oliveira Seno³; Fernando Miranda de Vargas Junior³; Alexéia Baruffati Grisolia⁴

UFGD-FCA, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, E-mail: jessicawandscheer@hotmail.com

¹Bolsista de iniciação científica PIBIQ-CNPq. ²Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia. ³Professores Doutores da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD. ⁴Orientadora, Professora Doutora da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD.

Resumo

A ovinocultura é uma atividade da produção animal que vem apresentando crescimento e com isso existe a necessidade de atender as exigências dos consumidores no que se refere à qualidade da carne. A calpastatina possui um papel importante no desenvolvimento muscular e na qualidade da carne, pois em altas concentrações inibe a ação da Calpaína que desempenha a maciez da carne. Por este motivo, buscou-se com esse trabalho, identificar genótipos relacionados com o gene da calpastatina de ovinos das raças Pantaneira (n = 50), Ille de France (n = 50), Suffolk (n = 50) e Bergamácia (n = 50). A identificação genotípica foi realizada por meio de PCR, seguida pela digestão com a enzima *MspI*. Os produtos amplificados e digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Três genótipos (MM, MN e NN) e dois alelos (M e N) foram observados em todas as raças. Respectivamente as frequências genotípicas de MM, MN e NN foram de 58, 23 e 19% na raça pantaneira, de 28, 34 e 38% na raça Bergamácia, de 80, 16 e 4% na raça Suffolk e de 82, 12 e 6% na raça Ile de France. O alelo M foi mais presente na população com frequência de 72%. Estes resultados revelam que o genótipo dominante MM, pode estar relacionado à qualidade da carne, uma vez que sua incidência foi mais recorrente em raças selecionadas para produção de carne, já o genótipo NN foi mais freqüente em raças voltadas para a produção de leite como a Bergamácia.

Palavra chave: Calpastatina, PCR-RFLP, maciez

Introdução

A ovinocultura é uma atividade econômica que vem se desenvolvendo no Brasil, nos últimos anos houve um aumento na produção e também no consumo de produtos ligados a cadeia produtiva de ovinos. Sendo que a qualidade da carcaça é um dos fatores mais importantes neste segmento (BARROS & SIMPLÍCIO, 2001).

A dificuldade que a ovinocultura encontra é a produção de carcaças de qualidade, que é ainda uns fatores que limitam a produção em larga escala no Brasil. Para atender as exigências quanto á qualidade da carne de ovinos é necessário o conhecimento de fatores que influenciam nas características desejadas para assim obter alto índice de qualidade e assim atrair mais consumidores de carne ovina (BRESSAN et al., 2001).

Os fatores *ante-mortem* e *pos-mortem* são responsáveis pela qualidade final da carcaça (BONAGURIO et al., 2003). Pois, após o abate vários processos bioquímicos acontecem nos músculos até que se transformem em carne e tais processos dependem de fatores *ante-mortem* que respondem à expressão gênica e produzem as proteínas firmadoras dos complexos que envolvem a qualidade da carne (SORIA & CORVA, 2004) e também dependem dos fatores *post-mortem* que levam a transformação do músculo em carne (MOODY et al., 1970).

A maciez é uma das características organolépticas mais desejadas pelos consumidores, e esta característica está relacionada tanto pelos processos *ante-mortem* (genética, idade, sexo, alimentação) quanto pelos processos *post-mortem* devido ao *rigor mortis* em que a carcaça é exposta (estimulação elétrica, esfriamento da carcaça, maturação, pH e cozimento) (ASGHAR & PEARSON, 1980).

A calpastatina (CAST) é uma proteína inibidora da enzima calpaína impedindo na sua atuação e na degradação miofibrilar *post-mortem*, diminuindo a maciez da carne. A expressão dos genes e interação calpaína/calpastatina influenciam na qualidade da carne, especificamente na sua maciez, o gene CAST então, pode ser utilizado como marcador molecular para associar com dados de qualidade de carne (BAGATOLI, 2011).O uso de marcadores moleculares é uma das ferramentas que pode contribuir para seleção de características que aumentem a qualidade da carne, incluindo a maciez (KOOHMARAIE, et al., 2002).

Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi caracterizar ovinos de diferentes raças para o gene CAST através da técnica de PCR-RFLP.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular em tubos Vacutainer (4,5 mL) com EDTA de um grupo composto de 200 animais das raças sendo eles: Pantaneira (50), Suffolk (50), Ile de France (50) e Bergamácia (50) provenientes de rebanhos da região de Mato Grosso do Sul. As amostras de sangue após coletadas foram refrigeradas a -20°C até o momento de extração do DNA que foi realizada segundo o protocolo adaptado por Crispim et al. (2011).

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à espectrofotometria (Nanophometer Implen 300) para a quantificação da concentração e pureza dos ácidos nucleicos. Sendo que o padrão utilizado para determinar a aplicabilidade das amostras para a amplificação foi a concentração de $50\text{ng}/\mu\text{L}$ e razão de variando de 1,6 à 1,8. Essas amostras também foram visualizadas a partir da eletroforese em gel de agarose 2% e fotografadas em fotodocumentador (UVP) para visualização da qualidade do DNA.

O gene CAST foi amplificado por meio da PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando os primers CAST F: $5'-\text{TGG GGC CCA ATG ACG CCA TCG ATG}-3'$ e CAST R: $5'-\text{GGT GGA GCA GCA CTT CTG ATC ACC}-3'$, produzindo um fragmento de 622pb (PALMER et al., 1998). A PCR foi realizada no termociclador (BIORAD) e constituiu de umadesnaturação preliminar de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 59°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min e extensão final por 7 min a 72°C .

Posteriormente a amplificação as amostras foram visualizadas através da eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo como mostra a Figura 1.

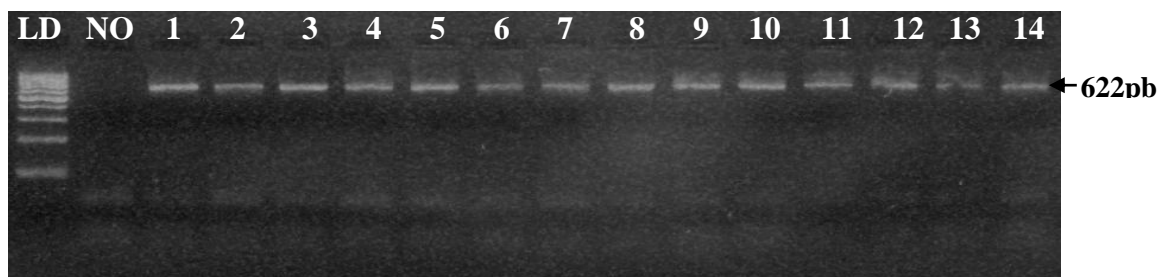


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. As colunas de 1 a 10 representam os produtos amplificados do gene CAST de 622 pb. LD: padrão de

Posterior a amplificação os produtos de PCR foram digeridos pela enzima *MspI* (*Moraxella species*) por 4 horas a 37°C . A enzima foi utilizada para determinar os genótipos, sendo que o *MspI* digere o alelo M, mas não o alelo N. Os produtos da digestão foram

separados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio conforme a Figura 2.

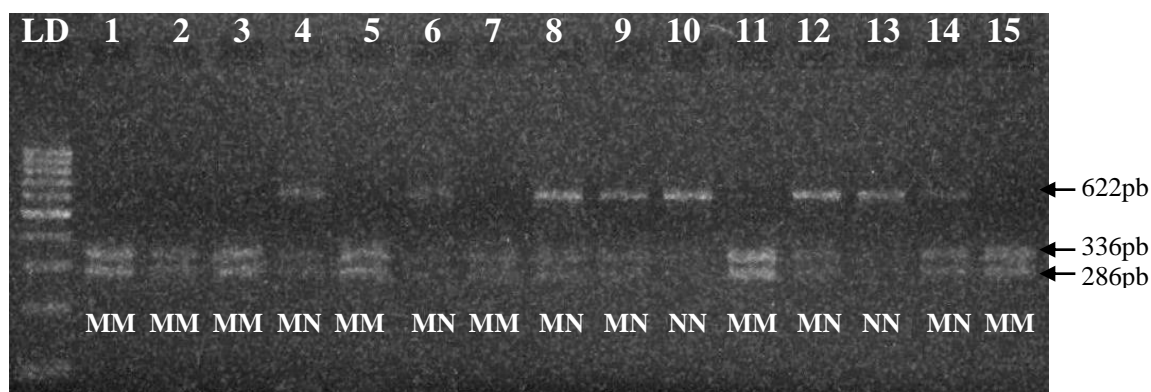


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2%. Produtos da digestão do gene CAST, genótipos MM (336 e 286pb); MN (622pb, 336pb e 286pb) e NN (622pb).

As frequências alélicas e genóticas, heterozigidade observada (HO) heterozigidade esperada (HE), equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram calculados a partir do software CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007).

Resultados e Discussão

Em todas as populações estudadas foram encontrados os três genótipos (MM, MN e NN) e, portanto, dois alelos (M e N). Conforme os resultados presentes na Tabela 1, observa-se que as raças Suffolk e Ille de France apresentaram os maiores valores de frequências alélicas para o alelo M 88% seguida para Pantaneira 70% e Bergamácia 45%, já o alelo N foi mais frequente na raça Bergamácia 55%, Pantaneira 30% e Suffolk e Ille de France com 12%.

Tabela 1. Resultados das frequências alélicas e genóticas para o gene da Calpastatina em ovinos das raças Pantaneira, Suffolk, Ile de France e Bergamácia

Raças	Frequência fenotípica	Frequência alélica	Ho	He	PIC	HW
Pantaneira	MM-0,58	M- 0,70 N- 0,30	0,23	0,42	0,33	**
	MN-0,23					
	NN-0,19					
Bergamácia	MM- 0,28	M- 0,45 N- 0,55	0,34	0,50	0,37	*
	MN- 0,34					
	NN- 0,38					
Suffolk	MM-0,8	M-0,88 N-0,12	0,16	0,21	0,19	NS
	MN-0,16					
	NN-0,04					
Ille de France	MM-0,82	M-0,88 N-0,12	0,12	0,21	0,19	**
	MN-0,12					
	NN-0,06					

Sabe-se que grande parte da variabilidade na maciez da carne *post-mortem*, onde ocorre à transformação do músculo em carne propriamente dita, é devido ao complexo enzimático calpaína-calpastatina, e que a calpastatina age inibindo a atuação da calpaína, e, portanto diminuindo a maciez da carne (BLECHA et al., 2009).

Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos por Palmer et al. (1998) que realizou estudos em ovinos Corriedale, raça produtora de carne, através de PCR-RFLP para o gene calpastatina utilizando a enzima de restrição *MspI* onde foram encontrados o alelo M com frequência de 77% e o alelo N com frequência de 23%. E semelhante a resultados obtidos por Dehnavi et al. 2012 em estudos realizados em ovinos Zel , raça produtora de carne, onde as frequências alélicas foram de 85,5% e 14,5% para M e N.

Entre as raças foi possível observar que, a Bergamácia, raça com aptidão para a produção de leite, diferenciou-se genotipicamente e alelicamente das outras, pois apresentou uma porcentagem maior de alelos N, o que não foi observado nas outras raças.

E ainda, em resultados obtidos por Blecha et al. 2009 em bovinos das raças Angus e Bosmara para o gene da Calpastatina os valores para o alelo M foram maiores que o alelo N, com 88,6 % respectivamente. A presença do alelo M segundo Chung et al. 2001, está relacionada a carne mais macia e que a presença do alelo N está relacionada a uma carne menos macia, porém foi observado que a presença desses alelos (M e N) não estão relacionadas a qualidade da carne, pois não houve resultados significativos observados para força de cisalhamento.

Conclusão

O marcador CAST/*MspI* é uma ferramenta eficiente pois permitiu a identificação genotípica e fenotípica das populações de ovinos em estudo. E a partir desses resultados pode ser possível a seleção de animais que possuem alelos favoráveis para a maciez da carne se confirmada esta associação em estudos futuros.

Referências bibliográficas

ASGHAR, A; PEARSON, A.M. Influence of ante and postmortem treatments upon muscle composition and meat quality. **Advanced Food Research**, v.26, p.53-213, 1980.

BAGATOLI, A. **Expressão gênica da calpastatina e miostina associada com o desempenho e qualidade de carne em ovinos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Área de Concentração em Produção Animal, Maringá, PR, 2011.

BARROS, N.N.; SIMPLÍCIO, A.A. Produção intensiva de ovinos de corte: perspectivas e cruzamentos. In: **Simpósio Mineiro de Ovinocultura**, 1. Anais. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.21-49. 2001

BLECHA, I.M.Z.; MACHADO, C.O.F.; CARVALHO, T.D.; SIQUEIRA, F.; JUNIOR, R.A.A.T.; REGITANO, L.C.A. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *CAST/XmnI* em bovinos de corte. **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Maringá-PR, 2009.

BONAGURIO, S.; PÉREZ, J.R.O.; GARCIA, I.F.F. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com Texel abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1981-1991, 2003.

BRESSAN, C.; PRADO, O.V.; PÉREZ, J.R.O. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e Bergamácia sobre as características físico-químicas da carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.293-303, 2001.

CHUNG, H.Y.; DAVIS, M.E.; HINES, H.C. Relationship of two PCR-RFLP in the bovine calpastatin gene with calpastatin activity, meat tenderness and carcass traits. **International Society for Animal Genetics**, v.32, p.40-53, 2001.

CRISPIM B.A.; SILVA D.B.S.; BANARI A.C.; SENO L.O.; GRISOLIA A.B. Discriminação Alélica em Ovinos Naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por Meio de Marcadores de Microsatélites. **Journal of the Selva Andina Research Society**, v.3, p.3-13, 2012.

DEHNAVI, E.; AZARI, M.A.; HASANI, S.; NASSIRY, M.R.; MOHAJER, M.; AHMADI, A.R.K. Genetic variability of calpastatin and calpain genes in Iranian Zel sheep using PCR-RFLP and PCR-SSCP methods. **Iranian Journal of Biotechnology**, vol. 10, n.2, 2012.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, n.16, p.1099-1106, 2007.

KOOHMARAIE M; KENT M.P; SHACKELFORD S.D; VEISETH E; WHEELER T.L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship. **Meat Science**, 62(3): 345-352, 2002.

MOODY, W. G.; TICHENOR, D. A.; KEMP, J. D.; FOX, J. D. Effects of weight, castration and rate of gain on muscle fiber and fat cell diameter in two ovine muscles. **Journal of Animal Science**, v.31, p.676-680, 1970.

PALMER B.R.; ROBERTS N.; HICKFORD J.G.; BICKERSTAFFE R. Rapid communication: PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, v.67, p.1499-1500, 1998.

SORIA, L. A.; CORVA, P. M. Factores genéticos y ambientales que determinan La terniza de la carne bovina. **Archivos Latino americanos de Producción Animal**, v.12, p.73-88, 2004.