



VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal *São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008*

Associação entre marcador molecular ligado ao gene da calpaína e escore de repelência a parasitas em bovinos da raça Nelore¹

Francisco Rodrigo Martins^{2,3}, Roulber Carvalho Gomes da Silva³, José Bento Sterman Ferraz³, Joanir Pereira Eler³, Diego de Córdova Cucco³, Fernanda Marcondes de Rezende³, Júlio Cesar Carvalho Balieiro³, Elisângela Chicaroni de Mattos³, Minos Esperandio de Carvalho³, Flávio Vieira Meirelles³

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela FAPESP (Processo 06/57968-3)

²Mestrando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – USP/FZEA. e-mail:chicomartins@usp.br

³Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia, Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP.

Resumo – O estudo da característica de resistência a parasitas em bovinos visa à obtenção de animais possuidores de genótipos adaptados ao meio ambiente de criação extensiva no Brasil, assim permitindo que melhores resultados econômicos sejam alcançados. Dessa forma, este trabalho foi conduzido utilizando informações de escores de repelência a parasitas correlacionando com marcadores moleculares para o gene da calpaína. Foi observada associação significativa entre o marcador CAPN530 ($P=0,0459$) e repelência na população analisada. Esse achado permite que seja realizada a seleção de animais com maior resistência a parasitas, auxiliando a melhoria desta característica economicamente importante.

Palavras-chave: bovinos de corte, frequência genotípica, polimorfismos, resistência parasitária.

Association of calpain gene molecular marker and parasite resistance score in Nelore cattle

Abstract – The study of the parasite resistance trait in bovines aims to obtain animals with suitable genotypes to the environment of extensive creation in Brazil, which allows the reach of better economic results. Thus, this work was conducted using information of score of parasite resistance correlated with molecular markers for the calpain gene. Significant association was observed between marker CAPN530 ($P=0.0459$) and parasite resistance in the analyzed population. This finding allows the selection of animals with higher resistance, assisting the improvement of this important economic trait.

Keywords: beef cattle, genotypic frequency, polymorphisms, parasite resistance

Introdução

O estudo da característica de resistência de bovinos a parasitas visa à obtenção de animais possuidores de genótipos que levem a altas produções, mas que sejam também adaptados ao meio ambiente de criação extensiva no Brasil. Esses animais

produtivos e adaptados poderiam otimizar os custos e tornar a produção mais rentável. Considerados, atualmente, um dos principais entraves à intensificação da pecuária de leite e de corte, os parasitas afetam consideravelmente a produtividade e a economia de produção.

A validação de marcadores moleculares ligados à resistência a parasitas torna possível estudar com mais precisão os efeitos dos genes envolvidos com esta característica. A seleção assistida por marcadores (SAM) pode aperfeiçoar significativamente o ganho genético a cada geração e impulsionar a produtividade da pecuária, sendo assim integrada às demais biotecnologias disponíveis para identificar e multiplicar os animais geneticamente superiores.

Davis e DeNise (1998) citam várias aplicações dos polimorfismos genômicos e concluem que a SAM será uma tecnologia de grande impacto. No entanto, Dekkers (2004) alertou que o otimismo com relação a SAM deveria ser menor, ou seja, seria necessário validar os resultados nas populações alvo para poder utilizar marcadores genéticos com confiabilidade.

As calpaínas representam uma família de proteases de cisteína dependentes de cálcio e são conhecidamente atuantes no processo de maturação de carne influenciando significativamente a maciez. Estudos indicam que a subunidade maior da calpaína Sm-p80 está associada à resposta imune em humanos (Wiegertjes et al., 2005).

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar as frequências gênicas e genóticas de marcadores moleculares presentes no gene CAPN1 bem como avaliar a relação desses marcadores moleculares com a característica de repelência a parasitas em bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido com informações de escores de repelência e amostras de sangue de 266 bovinos Nelore nascidos nos anos de 2002 a 2004, criados a pasto e sem a utilização de parasiticidas há pelo menos 30 dias. Os animais foram avaliados por escores de repelência (REP) – medida visual que demonstra a infestação por ectoparasitas (carrapato, mosca-do-chifre e berne). Essa característica revela a sensibilidade à mosca do chifre e aos carrapatos, sendo apresentada em escores que oscilam de 1 (maior infestação de ectoparasitas) a 5 (maior repelência a ectoparasitas).

Foram coletados em torno de 10 mL de amostra de sangue venoso de cada animal para extração do DNA genômico utilizando o método de extração e precipitação em NaCl. Foram analisados três marcadores *SNP* (*single nucleotide polymorphisms*) presentes no gene da calpaína: o marcador CAPN316, localizado no éxon 9, o marcador CAPN530 localizado no éxon 14, e o CAPN4751, no éxon 18 (Page et al., 2002; White et al., 2005). A caracterização e a determinação dos genótipos foram realizadas por meio de PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). Para isto, foi utilizado o sistema de detecção TaqMan[™] em que *primers* e sondas pareiam na região do DNA, permitindo a identificação dos diferentes genótipos para cada marcador de interesse. Para a reação de PCR foram utilizados aproximadamente 120 ng de DNA para uma reação de 25 µL, contendo 0,2 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em 32 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 minuto a 72 °C.

As frequências gênicas e genóticas para cada marcador foram estimadas por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos. Os efeitos dos genótipos encontrados para os três marcadores sobre a variável de repelência foram avaliados a partir do seguinte modelo $Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + e_{ijkl}$, em que: Y_{ijkl} = valor

observado para o escore de repelência (1 a 5); μ = constante inerente à observação; C_i = efeito fixo de grupo de contemporâneos; S_j = efeito aleatório de reprodutor, com média 0 e variância σ^2_s ; M_k = efeito fixo do genótipo para marcador; e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ^2_e .

Resultados e Discussão

As frequências genótípicas e gênicas dos três marcadores estudados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Frequências genótípicas e gênicas dos marcadores.

Marcador	Frequência Genotípica	Frequência Gênica
CAPN530 (n = 129)	F(AA) = 0,32 F(AG) = 0,52 F(GG) = 0,16	f(A) = 0,58 f(G) = 0,42
CAPN316* (n = 241)	F(CG) = 0,97 F(GG) = 0,03	f(G) = 0,99 f(C) = 0,01
CAPN4751* (n = 241)	F(CT) = 0,62 F(TT) = 0,93	f(C) = 0,03 f(T) = 0,97

*Não foram encontrados indivíduos com genótipos específicos para os marcadores CAPN316 (CC) e CAPN4751 (CC)

Para o marcador CAPN530, a frequência do alelo considerado favorável, para a característica repelência a parasitas, “G” foi menor, em relação ao alelo “A”. Para este mesmo marcador White et al. (2005) relataram frequência do alelo favorável “A” de 0,137 em animais da raça Brahman; e Carvalho (2007) encontrou 0,048, para esse mesmo alelo, em 229 animais da raça Nelore. Os marcadores CAPN316 e CAPN4751 apresentaram um dos alelos próximo à fixação na população analisada. Os efeitos de associação dos marcadores SNP estudados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Médias de quadrados mínimos e erros padrão associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores estudados.

Marcador	Genótipos	Escore de Repelência
CAPN530	AA	3,19 ± 0,11 ^b
	AG	3,43 ± 0,09 ^{ab}
	GG	3,65 ± 0,16 ^a
CAPN316	CG	3,59 ± 0,35 ^a
	GG	3,36 ± 0,06 ^a
CAPN4751	CT	3,37 ± 0,20 ^a
	TT	3,36 ± 0,05 ^a

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada marcador, diferem entre si ($P < 0,05$)

No presente estudo foram observados efeitos significativos para o marcador CAPN530 ($P=0,0459$). Os marcadores CAPN316 e CAPN4751 não apresentaram efeito de associação significativo ($P>0,05$) para característica de repelência a parasitas. Como ainda não existem trabalhos relacionando os marcadores deste gene com resistência de

bovinos a parasitas pressupomos que as subunidades da calpaína estão relacionadas à resposta imune nesta espécie.

Conclusões

Foi verificado efeito significativo para o marcador molecular CAPN530 na característica de repelência a parasitas em bovinos da raça Nelore. Estes achados reforçam o potencial de utilização de marcadores moleculares, via Seleção Assistida por Marcadores (SAM), para melhoria de características economicamente importantes. A seleção para maior resistência a parasitas afetará positivamente a cadeia produtiva de bovinos de corte em vários dos seus segmentos.

Agradecimentos

Ao Condomínio Pecuário Irmãos Penteado Cardoso Ltda. pela cessão de dados e amostras de DNA, Merial/ Igenity pela genotipagem dos animais e FAPESP pelo financiamento do projeto.

Literatura Citada

- CARVALHO, M.E. et al. Associação de polimorfismos no gene da μ -calpaína com a maciez da carne em animais da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais ...**, Jaboticabal, 2007.
- DAVIS, G. P.; DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2331-2339, 1998.
- DEKKERS, J.C.M. Commercial application of markers and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, v.82, p.313-328, 2004. Suplemento E.
- PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**. v.80, p.3077-3085, 2002.
- WHITE, S. N. et al. 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 of Animal Science**, v.83, p.2001-2008, 2005.
- WIEGERTJES, G. F.;et al. Parasite infections revisited. **Developmental and Comparative Immunology**, v.29, p.749-758, 2005.