

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Aplicação da proteômica na avaliação do efeito de marcadores moleculares para calpaína e calpastatina na maciez da carne bovina

Cristina Tschorny Moncau¹, Mirele Daiana Poleti², Fábio Mateus de Moraes¹, Alessandra Fernandes Rosa², Joanir Pereira Eler³, Júlio César de Carvalho Balieiro⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – FZEA/USP, Pirassununga. e-mail: crismoncau@usp.br

²Pós-doutoranda – FZEA/USP, Pirassununga

³Departamento de Medicina Veterinária – FZEA/USP, Pirassununga

⁴Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP, Pirassununga

Resumo: O objetivo do trabalho foi avaliar por meio da proteômica o efeito de marcadores associados ao complexo calpaína/calpastatina, na proteólise *post mortem* da carne de bovinos não castrados da raça Nelore. A determinação dos genótipos polimórficos (SNP) para os marcadores no gene da μ -calpaína (CAPN4751) e no gene da calpastatina (UOGCAST1) foram realizadas por meio de PCR em Tempo Real. Para as análises proteômicas foram selecionadas amostras inteiramente ao acaso, dentro de cada genótipo e para cada marcador avaliado, visando estudos alelos-específicos. As análises de variância da intensidade para os volumes de expressão normalizados (IVEN) indicaram 21 *spots* significativos ($P < 0,05$) para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1. As análises de correlação entre as IVEN destes *spots* e maciez da carne demonstraram estimativas de correlações medianas e significativas ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) em relação à maciez 14 dias em amostras de um e sete dias de maturação. Análises de regressão múltipla indicaram que alguns *spots* podem prever a maciez da carne aos 14 dias de maturação.

Palavras-chave: maciez, marcadores SNP, Nelore, proteômica, qualidade de carne

Application of proteomics in evaluation of effect of molecular markers for calpain and calpastatin in beef tenderness

Abstract: This study aimed to evaluate through of proteomic the effect of markers associated with complex calpain/calpastatin in the proteolysis *post mortem* in Nelore bulls. The determination of genotypes polymorphic (SNP) to markers in the gene μ -calpain (CAPN4751) and calpastatin (UOGCAST1), were performed using Real Time PCR. For analysis proteomics, samples were taken randomized and analyzed within each genotype for each marker and evaluated in order to study allele-specific. Analyses of variance of the intensity of expression for the normalized volumes (IENV) indicated 21 spots significant ($P < 0.05$) for the markers CAPN4751 and UOGCAST1. The correlation analysis between the spots IENV significant and meat tenderness demonstrated correlation estimates medians and significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared to the tenderness in samples of one, seven and 14 days ageing. Multiple regression analyses demonstrated that some spots, beyond the markers studied, may predict meat tenderness at 14 days aging.

Keywords: meat quality, Nelore, proteomics, SNP markers, tenderness

Introdução

O mercado mundial tem se tornado cada dia mais exigente por carnes de qualidade sensoriais marcantes, sendo a maciez o tributo mais desejado por compradores e indústria. O rebanho de corte brasileiro, um dos maiores do mundo, é composto em sua grande parte por animais *Bos indicus*, em especial o Nelore, o qual possui uma grande desvantagem quanto ao produto final, uma vez que apresenta uma pré-disposição em gerar carnes menos macias.

Diversas pesquisas têm avaliado possíveis marcadores relacionados à qualidade de carne em bovinos e, dentre eles, o gene CAST, que codifica a enzima calpastatina e o CAPN1, que codifica as enzimas calpaínas. A compreensão de como estes genes podem interagir tanto com o ambiente como com outros genes, ao longo da proteólise *post mortem*, pode ser importante para o entendimento do processo responsável pelo amaciamento da carne. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar diferenças no padrão de expressão de proteínas na carne em virtude do complexo calpaína/calpastatina em bovinos não castrados da raça Nelore com genótipos contrastantes para marcadores associados a essas enzimas, utilizando ferramentas proteômicas.

Material e Métodos

Bovinos não castrados da raça Nelore, criados a pasto e terminados em confinamento, foram abatidos seguindo técnicas de abate humanitário. Bifes de *Longissimus dorsi* foram coletados entre a 10ª e 12ª costela, embalados a vácuo e maturados por um, sete e 14 dias. A maciez foi mensurada pela força de cisalhamento (FC), conforme protocolo AMSA (1995). A genotipagem dos animais foi realizada em PCR usando *TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems)*. Foram selecionados 17 animais de interesse de acordo com os genótipos para os marcadores CAPN4751 e UOCAST1, para realização de análise proteômica, onde foram separados em 6 *pools* de acordo com as combinações genotípicas. Os dados foram analisados com o auxílio dos procedimentos MIXED, CORR e REG do programa *Statistical Analysis System (SAS)*, versão 9.1.3.

Resultados e Discussão

Na análise de variância dos volumes de expressão normalizado (IVEN) dos *spots*, dentro de cada tempo de maturação e considerando a correção de Bonferroni para múltiplos testes, indicaram que: (i) para as amostras de um dia foram observados média de 154 *spots*, onde cinco mostraram efeito significativo; (ii) em amostras de sete dias de maturação foram observados média de 179 *spots*, onde nove *spots* foram significativos; e, (iii) para as amostras de 14 dias de maturação foram observados 159 *spots*, sendo que sete deles tiveram efeito significativo (Figura 1).

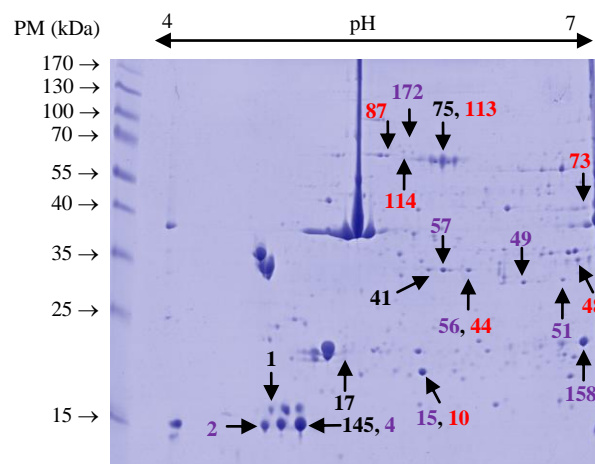
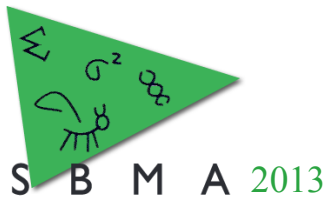


Figura 1. Gel de eletroforese bidimensional com os 21 *spots* significativos ($P < 0,05$), sendo 5 *spots* (em preto) para um dia, 9 *spots* (em roxo) para 7 dias e 7 *spots* (em vermelho) para 14 dias.

Foram realizadas análises de correlação entre as IVEN dos *spots* que manifestaram expressões significativamente distintas, bem como, entre o número de alelos favoráveis para cada marcador avaliado, e as variáveis indicadoras da qualidade da carne.

Para as análises da carne um dia em relação à variável maciez aos 14 dias de maturação, foi observada a existência de três estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$). Em relação à maciez no dia sete e no dia um, foi verificada apenas uma estimativa mediana e significativamente diferente de zero em ambos os tempos. Nas análises da carne com sete dias de maturação, foi possível verificar a existência de sete estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero em relação à variável maciez 14 dias, cinco em relação a maciez sete dias e duas em relação a maciez um dia. E para as análises das amostras com 14 dias de maturação, verificou-se a existência de cinco estimativas de correlações medianas e significativamente diferentes de zero associada à variável maciez 14 dias, três em relação à variável maciez sete dias e duas em relação à variável maciez um dia (Tabela 1).

Nas análises de regressão múltipla para os *spots* significativos dentro do tempo de maturação um dia, o número de alelos favoráveis para o marcador CAPN4751 e *spot* 17 foram considerados os melhores preditores da maciez aos 14 dias. Na análise de regressão múltipla das amostras com maturação



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

sete dias, os *spots* dois e quatro foram selecionados como melhores preditores de maciez aos 14 dias. E para as análises de amostras da carne com 14 dias de maturação, os *spots* 10 e 48 explicaram melhor maciez da carne com 14 dias de maturação.

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre os valores de força de cisalhamento (FC) e variáveis indicadoras (número de alelos favoráveis para capastatina – UOG – e calpaína – CAPN e intensidades do volume de expressão normalizados dos *spots* – S) para amostras de carne com um, sete e 14 dias *post mortem*

Var.	1 dia <i>post mortem</i>			Var.	7 dias <i>post mortem</i>			Var.	14 dias <i>post mortem</i>		
	FC1d	FC7d	FC14d		FC1d	FC7d	FC14d		FC1d	FC7d	FC14d
UOG	-0,116	-0,288	-0,625	UOG	-0,116	-0,288	-0,625	UOG	-0,116	-0,288	-0,625
CAPN	-0,646	-0,558	-0,518	CAPN	-0,646	-0,558	-0,518	CAPN	-0,646	-0,558	-0,518
S_01	-0,008	-0,103	-0,091	S_02	-0,197	-0,558	-0,503	S_10	-0,317	-0,609	-0,540
S_17	0,114	0,32	0,662	S_04	0,226	0,578	0,403	S_44	0,609	0,428	0,425
S_41	0,282	0,353	0,41	S_15	-0,047	-0,174	-0,172	S_48	-0,386	-0,175	-0,475
S_145	-0,165	0,117	0,01	S_49	0,132	0,097	0,072	S_73	-0,314	-0,286	-0,746
				S_51	0,159	0,019	-0,071	S_87	-0,177	-0,495	-0,638
				S_56	0,535	0,539	0,741	S_113	-0,36	-0,084	-0,346
				S_57	0,403	0,544	0,761	S_114	0,141	-0,152	-0,225
				S_158	-0,231	-0,334	-0,685				
				S_173	-0,303	-0,164	-0,63				

*Coeficientes de correlação em negrito ($P < 0,05$) e em negrito e sublinhado ($P < 0,01$) são estatisticamente diferentes de zero

Pinto et al. (2010) estudaram a associação de SNPs CAPN4751 e UOGCAST1 com a maciez da carne em 638 Nelores. Ambos marcadores estudados tiveram associação com a maciez da carne com sete, 14 e 21 dias de maturação. Estes resultados mostram a importância destes marcadores, uma vez que explicam a variação funcional de maciez em Nelore.

Conforme relataram Zapata et al. (2009), a análise de regressão múltipla ($P < 0,05$) foi capaz de prever a maciez de sete dias através de análise de amostras de 36 horas *post mortem*. O mesmo foi feito com amostras de 72 horas *post mortem*, predizendo a maciez da carne aos 14 dias de maturação, corroborando com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Conclusões

As alterações significativas nas intensidades dos volumes de expressão normalizados em função dos genótipos para os marcadores CAPN4751 e UOGCAST1 sugerem que as taxas de expressão gênica foram diferenciadas entre os animais com diferentes combinações genotípicas para os marcadores em questão. A identificação dos *spots* com intensidade de volumes de expressão normalizados diferenciados permitirão o melhor entendimento do complexo mecanismo que determina a maciez da carne.

Literatura citada

- AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION – AMSA. Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat. **American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board**, Chicago, 1995.
- PINTO, L.F.B.; FERRAZ, J.B.; MEIRELLES, F.V. et al. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.1431-1442, 2010.
- ZAPATA, I.; ZERBY, H.N.; WICK, M. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and tenderness differential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4956-4963, 2009.