

# POLIMORFISMO DEL GEN CALPAÍNA EN RAZAS VACUNAS POR LA TÉCNICA PCR-RFLP

## POLYMORPHISM OF THE CALPAIN GENE IN CATTLE BY PCR-RFLP ANALYSIS

Lara, M.A.C.<sup>1</sup>, R.F. Nardon<sup>1</sup>, G. Bufarah<sup>1</sup>, J.J.A.A. Demarchi<sup>2</sup>, J.R. Sereno<sup>3</sup>, S.A. Santos<sup>3</sup> y U.G.P. Abreu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Zootecnia/ Apta/ Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Cx. Postal. 60. 13.460-000, Nova Odessa. São Paulo. Brasil. E-mail: malara@iz.sp.gov.br

<sup>2</sup>Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Extremo Oeste/ APTA/ SAA. Cx. Postal. 67. 16.900-000, Andradina, SP. Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Pantanal. Cx. Postal. 109. 79.320-9000. Corumbá, MS. Brasil.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Caracterización genética. Marcador genético. Terneza de carne.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Genetic characterization. Genetic marker. Meat tenderization.

### RESUMEN

Se estudió la variabilidad de la subunidad reguladora del gen calpaína-II bovina mediante PCR-RFLP empleando la enzima de restricción *HhaI*. Se caracterizaron 253 bovinos, de razas europeas especializadas para carne (Hereford, Aberdeen Angus) o leche (Frisona), cebuínas (Gir, Guzerá y Nelore) y naturalizadas brasileñas (Caracú, Junqueira y Pantaneira). Dos formas alélicas fueron observadas: *CAPN2<sup>A</sup>* y *CAPN2<sup>B</sup>*. La primera fue más frecuente en las razas Hereford y Aberdeen Angus (estimación de frecuencias 0,8667 y 0,6034, respectivamente). Para las razas cebuínas y naturalizadas brasileñas, las frecuencias de *CAPN2<sup>A</sup>* fueron 0,0834 y 0,4667 respectivamente. Se formula la hipótesis de una posible relación entre alelo *CAPN2<sup>A</sup>* con la terneza de la carne. Si ello es confirmado, permitirá identificar precozmente los animales de interés, favoreciendo el progreso genético de las poblaciones bovinas. Esto para el Pantaneiro y otras razas naturalizadas brasileñas, así como para las poblaciones criollas de la América del

Sur, muchas de éstas en proceso avanzado de extinción, podría incentivar su expansión, en función de los valores económicos que podrían ser agregados y su potencial para el mejoramiento de la palatabilidad de la carne.

### SUMMARY

The variability of the regulatory subunit of the gene calpain-II was studied through PCR-RFLP analysis using the restriction enzyme *HhaI*. A total of 253 cattle of specialized European breeds to meat (Hereford, Aberdeen Angus) and milk (Friesian), as well as zebu breeds (Gyr, Guzerá, Nelore) and Brazilian naturalized breeds (Caracú, Junqueira, Pantaneira) was characterized. The two alleles identified in the study were assigned to *CAPN2<sup>A</sup>* and *CAPN2<sup>B</sup>*. The first one was more frequent in Hereford and Aberdeen Angus, whose frequencies were 0.8867 and 0.6034, respectively. For Brazilian naturalized

*Arch. Zootec. 54: 305-310. 2005.*

and zebu breeds, the frequencies of *CAPN2<sup>A</sup>* were 0.0834 and 0.4667, respectively. We considered the hypothesis of a possible relation of *CAPN2<sup>A</sup>* allele with meat tenderization. If confirmed, it will allow identify the interesting animals precociously, favoring the genetic progress of the cattle populations. This for Pantaneiro and other National breeds, as well as for the Creole populations of the South America, many of these in advanced process of extinction, could stimulate its expansion, based on the economic values that could be added and its potential for the improvement of the meat tenderization.

#### INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria y la palatabilidad, son las propiedades más valoradas en la compra de la carne. La terneza forma parte de la calidad sensorial que junto con el sabor y la jugosidad determinan las variaciones en la palatabilidad de la carne.

El desarrollo de marcadores genéticos relacionados con la palatabilidad viene siendo incentivado por el mercado consumidor por la dificultad para identificar animales con características deseables.

Durante el *rigor mortis*, el tamaño del sarcómero se reduce, causando una compactación del contenido miofibrillar, lo que ocurre concomitantemente con la maduración de la carne. La terneza final es resultante de la eficacia de la degradación enzimática para alterar las estructuras compactadas de las miofibrillas. De los procesos biológicos envueltos en la calidad final de la carne la actividad del sistema de las calpaínas parece ser el factor principal (Delgado *et al.*, 2001a y 2001b).

Dos isoenzimas han sido descritas, denominadas  $\mu$ -calpaína (calpaína I) y m-calpaína (calpaína II), que se hidrolizan para producir proteinasas en la presencia del calcio, en concentraciones micro-molar y mili-molar, respectivamente (Ilian *et al.*, 1998). Estas isoenzimas son dímeras, compuestas por dos subunidades: una de 30 kDa y, la otra, de 80kDa. La unidad mayor presenta cuatro dominios (I-IV). La menor, es idéntica para CAPN1 y CAPN2 y presenta dos dominios (V-VI) (Simon *et al.*, 1988).

Algunas enzimas proteolíticas y sus genes inhibitorios, de cuyos productos y alelos se conoce la fisiología, han sido descritos como genes candidatos para el estudio de QTL (*quantitative trait locus*), siendo la calpaína un fuerte candidato relacionado con la terneza de carne (Smith *et al.*, 2000).

La calpaína es una proteasa citoplasmática responsable del efecto iniciador de la degradación de proteínas miofibrilares, durante el proceso de abastecimiento de la carne bajo refrigeración, y su actividad está relacionada con la terneza de carne (Huff-Lonergan-Lonergan *et al.*, 1996). Por esta razón los estudios bioquímicos y genéticos relacionados con los sistemas proteolíticos de la calpaína se consideran decisivos para aclarar los cambios fisiológicos en la estructura muscular durante el período *post mortem*, cuyos resultados contribuirán a la mejoría de la calidad de carne. El presente estudio trata de establecer la variabilidad del gen calpaína (*CAPN2*) en bovinos de razas europeas especializadas, cebuínas y naturalizadas brasileñas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 253 bovinos de razas europeas especializadas para carne (Aberdeen Angus, Hereford) y leche (Frisona), cebuínas (Gir, Guzerá y Nelore) y naturalizadas brasileñas (Caracú, Junqueira y Pantaneiro).

El ADN genómico fue obtenido a partir de muestras de sangre con el empleo de un kit comercial de purificación (PROMEGA).

Las secuencias utilizadas en la amplificación del gen CAPN2, descrita por Zhang *et al.* (1996), fueron las siguientes: 5'-CCC CTC GCA CAC ATT ACT CCA AC, complementaría al gen calpaína entre el nucleótido 293 (extremad 5') y 315 (extremad 3'), y 3'-ATA CGG CCT GCC ACT TTT TGA TG, correspondiente a la región entre el nucleótido 558 (extremad 5') y 580 (extremad 3').

La reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ l, a partir de 200 ng de ADN molde, empleándose la siguiente solución: 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 264  $\mu$ M de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada cebador y 2,5 U Taq polimerasa *Platinun* (Invitrogen). El PCR fue conducido en el *Termociclador Express Hybaid*, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridación de 60°C por 27 s y extensión de 72°C por 90 s), y una extensión final de 72°C por 30 min. Para la digestión de 10  $\mu$ l del producto amplificado fueron empleadas 10 U de la enzima de restricción *HhaI*, a la temperatura de 37°C durante 3 horas. Los

análisis del RFLP fueron realizados en gel de poliacrilamida al 5 p.100, mediante técnica de coloración con nitrato de plata.

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron estimadas a través del programa GENESOP (Raymond y Rousset, 1995) que también fue empleado para verificar el equilibrio de Hardy-Weinberg.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio presenta la variabilidad genética de la subunidad menor reguladora de m-calpaína, que se ha denominado CAPN2, para nueve razas vacunas. Un fragmento de, aproximadamente, 1800 pb, de las cuales 288 pb son secuencias codificadoras, localizadas entre los exones 4 y 8, fue amplificado para la detección de la mutación.

Dos formas alélicas fueron observadas, *CAPN2<sup>A</sup>* y *CAPN2<sup>B</sup>*, por la técnica de PCR-RFLP empleándose la enzima *HhaI* (GCG'C). El alelo *CAPN2<sup>A</sup>* fue caracterizado por la presencia de dos sitios de restricción, resultando tres fragmentos, con 900, 620 y 280 pb. El alelo *CAPN2<sup>B</sup>* presentó solamente un sitio de restricción, originando dos fragmentos, con 1520 y 280 pb. Como se ve en la **figura 1**, los animales homocigotos AA presentaron tres bandas (900, 620 y 280 pb), los homocigotos BB, dos bandas (1520 y 280 pb) y, los heterocigotos AB, cuatro bandas (1520, 900, 620 y 280 pb).

En todas las poblaciones, excepto Junqueira, los desvíos entre frecuencias genotípicas observadas y esperadas según el teorema de Hardy-

Weinberg no fueron significativos ( $p > 0,05$ ), sugiriendo equilibrio genético para el *locus* CAPN2.

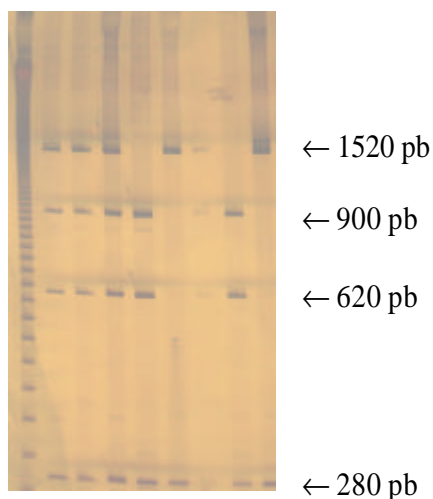
Como puede verse en la **tabla I**, el alelo *CAPN2<sup>A</sup>* fue el más frecuente en las razas Hereford y Aberdeen Angus, especializadas para la producción de carne con buena calidad y, el alelo *CAPN2<sup>B</sup>*, en las razas cebuínas (Gir, Guzera y Nelore). Las frecuencias estimadas para las razas Hereford y Aberdeen Angus están de acuerdo con

las registradas por Zhang *et al.* (1996), entre 0,74 y 0,95. Estos mismos autores estudiando una raza japonesa, llamada Wagyu, de carne muy valorada por su buena palatabilidad, verificaron que la frecuencia del alelo *CAPN2<sup>A</sup>* estaba próxima a 1,0.

Con relación a la raza Frisona, buena productora de leche, el alelo *CAPN2<sup>A</sup>* fue observado en frecuencia muy próxima a la estimada por Juszcuk-Kubiak *et al.* (2002).

Considerando que la calidad de la carne de razas de origen británico es superior a la de razas cebuínas, proponemos la hipótesis de que el alelo *CAPN2<sup>A</sup>* pueda ser marcador para la terneza de carne. De esto modo, el producto génico de *CAPN2<sup>A</sup>* podría conferir una actividad proteolítica mayor que la variante codificada por el alelo *CAPN2<sup>B</sup>*.

Las características de la canal presentan variabilidad genética; las diferencias genéticas en cuanto a la palatabilidad y actividades de las calpaínas y calpastatina han sido investigadas entre y dentro de razas vacunas (Wulf *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1999; Page *et al.*, 2002). Hay evidencias que apuntan una posible relación entre genotipos de la  $\mu$ -calpaína (CAPN1) y m-calpaína (CAPN2) con la terneza de carne (Smith *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 1999). Page *et al.* (2002), estudiando 10 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) del gen CAPN1, sugieren que dos mutaciones, la A316G (cambio del nucleótido C por G, en el exón 9, resultando en la modificación del aminoácido alanina por glicina, en la posición 316) y la V530I (cambio del nucleótido G por A, en el exón 14, resultando en la



**Figura 1.** Análisis del polimorfismo *HhaI* en el gen *CAPN2* a través de la técnica PCR-RFLP. Patrón eletroforético de los tres genotipos separados en gel de 5 p.100 poliacrilamida. Pozo 1: marcador 50 pb ADN Ladder; pozo 2 y 3: genotipo AB; pozo 5 y 8: genotipo AA; pozo 6 y 9: genotipo BB. (Analysis of *HhaI* polymorphism at the *CAPN2* gene by PCR-RFLP. Electrophoretic patterns of the three genotypes separated on 5 percent polyacrilamylde gel. Lane 1: 50 pb DNA Ladder; lane 2, 3, 4 and 7: genotype AB; lane 5 and 8: genotype AA; lane 6 and 9: genotype BB).

POLIMORFISMO DEL GEN VACUNO CALPAÍNA POR LA TÉCNICA PCR-RFLP

modificación del aminoácido valina por isoleucina, en la posición 530), podrían estar asociadas con la palatabilidad de la carne.

La superioridad de las razas europeas para producir carne de calidad, ha sido bien documentada. Según Dikeman (2003), las razas cebuínas Brahman y Sahiwal presentan carnes menos blandas que las razas Angus, Hereford, Limousin, Charolais, Chianina, Jersey, Devon, Suiza, Gelbvieh, Simental y Maine-Ajou. En Brasil, Nardon *et al.* (2001) y Razook *et al.* (2002) empleando el método Warner-Bratzler, considerado un buen predictor de terneza de la carne, comparan ani-

males cebuínos (Gir, Guzerá y Nelore) con una raza naturalizada brasileña (Caracú) para la que los valores de la fuerza de cizalla fueron menores, indicando que su carne es más tierna.

Si se confirma que el alelo *CAPN2<sup>A</sup>* es marcador para terneza de la carne bovina, será posible identificar precozmente los animales de interés económico, favoreciendo el progreso genético de nuestras razas cebuínas y naturalizadas, así como la actividad sostenible de los ganaderos involucrados. Esto, para el Pantaneiro y otras razas naturalizadas brasileñas, así como para las poblaciones criollas de la América del Sur, muchas en proceso avanzado

**Tabla I.** Frecuencias genotípicas y alélicas para el locus *CAPN2* en razas vacunas. (Genotypic and allelic frequencies for *CAPN2* gene in cattle breeds).

Razas	N	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		Bibliografía
		AA	AB	BB	<i>CAPN2<sup>A</sup></i>	<i>CAPN2<sup>B</sup></i>	
Hereford	30	0,7333	0,2667	-	0,8667	0,1333	1
Aberdeen Angus	29	0,4134	0,3793	0,2073	0,6034	0,3966	"
Frisona	11	-	0,5454	0,4546	0,2727	0,7273	"
Caracu	40	0,1500	0,625	0,225	0,4625	0,5375	"
Junqueira	3	-	1		0,5000	0,5000	"
Pantaneiro	8	0,1250	0,6250	0,2500	0,4375	0,5625	"
Gir	21	-	0,0952	0,9048	0,0476	0,9524	"
Guzerá	74	-	0,1622	0,8378	0,0811	0,9119	"
Nelore	37	-	0,2432	0,7568	0,1216	0,8784	"
Angus	10				0,74-0,95	0,05-0,26	2
Hereford	68				"	"	"
Wagyu	10				"	"	"
Brahman	17				0,06-0,10	0,90-0,94	"
Pardo-Suizo	9				"	"	"
Guernsey	5				"	"	"
Limousin	9				"	"	"
Frisona	31	0,1	0,4	0,5	0,39	0,61	3
Angus	47				0,44	0,56	4

1= Presente estudio; 2= Zhang *et al.*, 1996; 3= Juszczuk-Kubiak *et al.*, 2002; 4= Chung *et al.*, 1999.

de extinción, podría incentivar su expansión, en función de los valores eco-

nómicos que podrían ser agregados al producto.

### BIBLIOGRAFÍA

- Chung, H.Y., M.E. Davis, H.C. Hines and D.M. Wulf. 1999. Effects of calpain proteolysis and calpain genotypes on meat tenderness of Angus bulls. *Research and Review*, 1999, Special Circular, 170-99. [http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170\\_4.html](http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170_4.html).
- Delgado, E.F., G.H. Geesink, J.A. Marchello, D.E. Goll and M. Koohmaraie. 2001a. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J. Anim. Sci.*, 79: 398-412.
- Delgado, E.F., G.H. Geesink, J.A. Marchello, D.E. Goll and M. Koohmaraie. 2001b. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J. Anim. Sci.*, 79: 2097-2107.
- Dikeman, M.E. 2003. Metabolic modifiers and genetics: effects on carcass traits and meat quality. *Brazil. J. Food Technol.*, 6: 1-38.
- Huff-Lonergan, E., T. Mitsuashi, D.D. Beekman, F.C. Parrish, D.G. Olson and R.M. Robson. 1996. Proteolysis of specific muscle structural proteins by m-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 74: 993-1008.
- Ilian, M.A., R.S. Gilmour and R. Bickersstaffe. 1998. Quantification of ovine and bovine calpain I, calpain II and calpastatin mRNA by ribonuclease protection assay. *J. Anim. Sci.*, 76: 853-864.
- Juszczuk-Kubiak, E., S.J. Rosochacki and K. Wicinska. 2002. A note on restriction fragment length polymorphism for *Hhal* in the bovine calpain gene. *Anim. Sc. Pap. Rep.*, 20: 181-185.
- Nardon, R.F., A.G. Razook, A.A.M. Sampaio, L.O. Tedeschi, L.A. Figueiredo, C. Boin and M.L.P. Lima. 2001. Efeitos da seleção para peso pós-desmama e da raça do bovino na quantidade da porção comestível da carcaça e na qualidade da carne. *B. Industr Anim.*, 58: 21-34.
- Page, B.T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele and T.P.L. Smith. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.*, 80: 3077-3085.
- Razook, A.G., L.A. Figueiredo, A.C. Ruggieri, R.F. Nardon and J.N.S.G. Cyrillo. 2002. Desempenho em pastagens e características de carcaça da 16ª progênie dos rebanhos Nelore, Guzerá e Caracú de Sertãozinho, SP. *Rev. Brasil. Zootec.*, 31: 1367-1377.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP: a population genetics software for exact test and ecumeinism. *J. Hered.*, 86: 248-249.
- Simon, J., C. Arthur, P.A. Greer and J.S. Elce. 1988. Structure of mouse calpain small subunit gene. *Bioch. Biophys. Act.*, 1388: 247-252.
- Smith, T.P.L., E. Casas, C.E. Rexroad III, S.M. Kappes and J.W. Keele. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J. Anim. Sci.*, 78: 2589-2594.
- Wulf, D.M., J.D. Tatum, R.D. Green, J.B. Morgan, B.L. Golden and G.C. Smith. 1996. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousin sired steers and heifers. *J. Anim. Sci.*, 74: 2394-2405.
- Zhang, H.M., S.K. Denise and R.L. Ax. 1996. A novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. *J. Anim. Sci.*, 74: 1441.

