ITEA (2002), Vol. **98A N.° 2**, 233-238

EXPRESIÓN DE LA HIPERTROFIA MUSCULAR Y POLIMORFISMO DEL GEN DE LA MIOSTATINA EN RAZAS BOVINAS DE PRODUCCIÓN CÁRNICA

M.E. Miranda*, M.Y. Boscher, J. Cañón*, F. Ménissier***, M. Vallejo*, S. Dunner***

* Laboratorio de Genética Molecular, Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UCM

** G.I.E., Labogena, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

*** INRA, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Introducción

El síndrome de la hipertrofia muscular (HM) es un fenómeno conocido desde hace largo tiempo que aparece en varias razas bovinas europeas. Su interés radica en el extremo desarrollo muscular mostrado por los animales, que por ello reciben el nombre de "culones". Se han descrito una serie de mutaciones responsables de la inactivación del gen de la *miostatina* como la causa genética de este carácter (GROBET *et al.*, 1998), así como otros polimorfismos que han permitido la definición de los distintos haplotipos presentes (MIRANDA *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2001). Utilizando la técnica OLA (*Oligonucleotide Ligation Assay*), se genotiparon animales pertenecientes a diferentes poblaciones bovinas de producción cárnica a los que se evaluó externamente, con el fin de determinar la asociación entre la presencia de los haplotipos del gen de la miostatina y la expresión de la HM.

Material y métodos

Material Biológico

Se muestrearon aleatoriamente 2041 terneros pertenecientes a ocho razas bovinas cárnicas europeas, de las cuales tres son españolas: *Asturiana de los Valles* (AV), *Pirenaica* (PI) y *Rubia Gallega* (RG) y cinco francesas: *Bazadaise* (BZ), *Charolaise* (CH), *Gasconne* (GA), *Maine-Anjou* (MA) y *Parthenaise* (PA). Todos ellos fueron calificados fenotípicamente (cuadro 1) asignando una puntuación entre 0 (ausencia de expresión) y 2 (expresión extrema del carácter) para catorce caracteres fenotípicos externos relacionados con la expresión de la HM. La suma de los mismos dio lugar a tres puntuaciones parciales: aspecto General (AG), caracteres más Expresivos (CE) y caracteres Asociados (CA). A su vez la suma de éstas permitió obtener una Puntuación Cular Total (PCT).

Cuadro 1. Caracteres evaluados en la "Puntuación Cular"

Clasificación del Animal (CLA)	0-2
Expresión de los Músculos (EM)	0-2
Ancho de Espalda (AE)	0-2
Aspecto General (AG)	**0-6**
Abultamiento de Hombros (AH)	0-2
Hipertrofia del Gran Dorsal (HGD)	0-2
Hipertrofia del Lomo (HL)	0-2
Abultamiento del Muslo (AM)	0-2
Inclinación de la Grupa (IG)	0-2
Surcos Intermusculares (SI)	0-2
Caracteres más Expresivos (CE)	**0-12**
Finura de Hueso (FH)	0-2
Defectos de Aplomos (DA)	0-2
Nacimiento de la Cola (NC)	0-2
Retracción del Vientre (RV)	0-2
Finura de Piel (FP)	0-2
Caracteres Asociados (CA)	**0-10**
Puntuación Cular Total (PCT)	**0-28**

Genotipado

Se optimizó un único análisis OLA para la detección de las nueve mutaciones que modifican la secuencia aminoacídica de la miostatina: seis de ellas inactivantes (nt821, Q204X, E226X, C313Y, E291X y nt419) y tres con cambio de sentido (S105C y D182N), siendo la tercera de tipo sinónimo (F94L). El estudio previo realizado de los haplotipos del gen de la miostatina (Miranda *et al.*, 2001) permite afirmar que el diagnóstico de cada una de estas mutaciones define un haplotipo distinto. Tan solo la ausencia de mutaciones no corresponde a un único haplotipo (Miranda *et al.*, 2001), por lo que es representada como 0.

Análisis Estadístico

Se calcularon las frecuencias de los distintos genotipos presentes dentro de las poblaciones estudiadas. Con el fin de estudiar el efecto del genotipo sobre la expresión de la HM se llevó a cabo un Análisis de Varianza y un test de significación de DUNCAN entre las puntuaciones medias de los caracteres fenotípicos, utilizando el programa GLM de SAS (SAS, Inst. Inc. Cary, NC). También se efectuó un Análisis de Correspondencia (CORRESP, SAS Inst. Inc. Cary, NC) entre los genotipos y las diferentes puntuaciones (0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0) de cada uno de los catorce caracteres fenotípicos considerados. Asimismo los datos fueron analizados mediante un Análisis Dis-

criminante (DISCRIM, SAS Inst. Inc. Cary, NC) ejecutando el procedimiento STEPWISE de selección de variables para ser incluidas en el modelo.

Resultados

Frecuencias Genotípicas

En este estudio se han detectado 6 de las mutaciones diagnosticadas, dando lugar a los genotipos que aparecen en la cuadro 2 con sus respectivas frecuencias porcentuales. La mutación inactivante nt821 es la más difundida entre las poblaciones bovinas, y a su vez, la mutación F94L es hallada en gran número de poblaciones. En algunas razas se detecta una sorprendente variabilidad genotípica, como en PA o en PI, que muestran la influencia de otras poblaciones. De igual modo, la presencia de genotipos con dos mutaciones inactivantes es superior a la esperada en las poblaciones PA, MA o RG.

Análisis de Varianza

En la mayoría de las razas la PCT es significativamente mayor para los genotipos doblemente inactivantes (cuadro 3). Sin embargo, esto no ocurre en PA, PI y RG, probablemente debido a una deficiente calificación fenotípica. Se aprecian otras particularidades entre las razas, ya que el genotipo carente de mutaciones (0) alcanza puntuaciones fenotípicas diferentes en las distintas razas. La presencia de la mutación F94L junto a una mutación inactivante (nt821 o Q204X) acentúa el efecto fenotípico de ésta última, no distinguiéndose del que muestra cualquiera de estas cuando se halla en homocigosis.

Análisis de Correspondencia

En la figura 1 se representan las distintas variables frente a los ejes 1 y 2 que contribuyen con el 70% y el 17 % de la inercia respectivamente. En esta representación gráfica se observa la relación entre las puntuaciones fenotípicas más altas y los genotipos doblemente inactivantes o que portan en heterocigosis la mutación F94L junto a una mutación inactivante. A su vez, dentro de los genotipos doblemente inactivantes se aprecia una diferencia en las puntuaciones otorgadas, pero con los datos existentes no se puede asegurar que se deba al efecto distinto de los haplotipos ya que en general no se dan simultáneamente en una misma población.

Análisis Discriminante

La puntuación fenotípica discrimina en mayor medida los genotipos presentes del gen de la miostatina en las razas CH y GA (como indica el bajo valor de λ Wilks que presentan) (cuadro 4). Es destacable que los caracteres que presentan mayor capacidad discriminativa difieren entre razas, ya que tanto en AV como en CH y MA es la puntuación CLA la que alcanza mayor valor F, mientras que en GA es la denominada RV.

Discusión

Estos resultados además de confirmar el patrón de herencia parcialmente recesivo del "carácter culón" han permitido observar como la presencia de la mutación F94L en heterocigosis junto a una mutación inactivante, logra una expresión de la HM similar a la de los genotipos que portan dos muta-

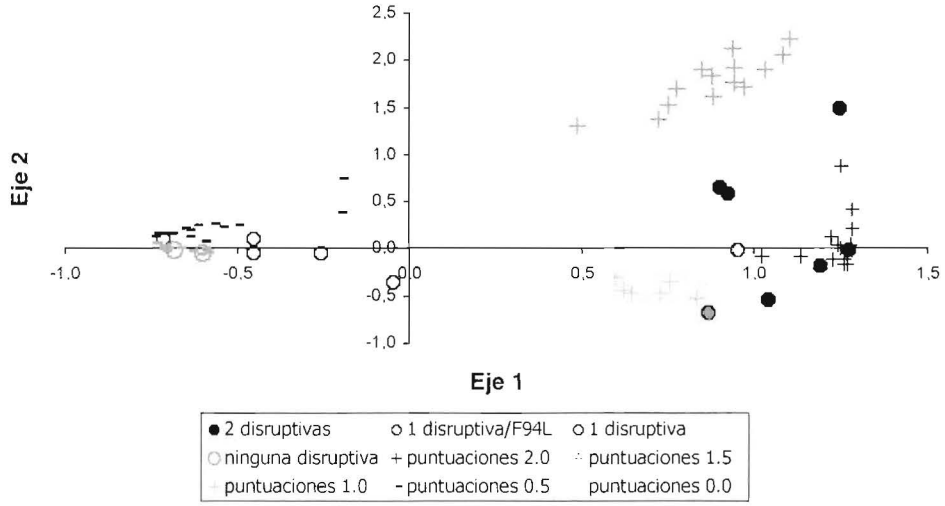


Figura 1. Representación gráfica del análisis de correspondencia entre genotipos y categorías fenotípicas. Tal y como figura en la leyenda del gráfico, los puntos representan los genotipos, diferenciados por el número de mutaciones disruptivas que portan. Los guiones representan las setenta combinaciones fenotípicas diferenciadas para las cinco puntuaciones posibles

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas dentro de las 8 poblaciones estudiadas. Los genotipos se distinguen por el número de mutaciones disruptivas que portan (gris oscuro: dos; gris medio: una junto a la mutación F94L; gris claro: una; blanco: ninguna)

Genotipos	AV	BZ	CH	GA	MA	PA	PI	RG
nt821-nt821	74,0					77,1	1,4	28,7
Q204X-Q204X			33,3					
E226X-E226X					17,4	0,4		
C313Y-C313Y				10,4				
nt821-E226X						10,7		
Q204X-nt821			0,5			1,8		
nt419-E226X					9,8			
nt821-nt419						4,4	0,2	
nt419-F94L							2	
nt821-F94L	0,4					1,5	22,1	0,9
Q204X-F94L			3,3					
nt419-0					8,6		0,7	
nt821-0	23,5					3,0	5,5	61,4
Q204X-0			14,3					
E226X-0					37,3	0,4		
C313Y-0				59,2				
F94L-F94L						0,7	21,4	
F94L-0			5,7				33,2	0,9
0-0	2,1	100	42,9	30,4	26,9		13,5	8,1
N.° total	238	47	210	299	327	271	416	233

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza realizado para la PCT dentro de cada una de las 8 razas. Los genotipos se distinguen por el número de mutaciones disruptivas que portan (gris oscuro: dos; gris medio: una junto a la mutación F94L; gris claro: una; blanco: ninguna).

Genotipos	AV	BZ	CH	GA	MA	PA	PI	RG
nt821-nt821	19,1[a]					8,58[a]	4,58[bc]	14,8[a]
Q204X-Q204X			23,2[a]					
E226X-E226X					18,6[a]	8,50[a]		
C313Y-C313Y				23,0[a]				
nt821-E226X						8,47[a]		
Q204X-nt821			22,0[a]			10,9[a]		
nt419-E226X					18,8[a]			
nt821-nt419						6,50[a]	0,5[c]	
nt419-F94L							7,69[ba]	
nt821-F94L	16,0[ab]					0,88[a]	6,72[bac]	14,0[a]
Q204X-F94L			18,4[a]					
nt419-0					4,48[b]		12,2[a]	
nt821-0	7,5[c]					4,38[a]	6,80[bac]	13,9[a]
Q204X-0			6,50[b]					
E226X-0					4,15[b]	9,00[a]		
C313Y-0				2,0[b]				
F94L-F94L						3,50[a]	4,90[bc]	
F94L-0			2,50[b]				4,37[bc]	12,5[a]
0-0	10,2[bc]	13,0	1,73[b]	0,57[c]	2,69[b]		6,08[bac]	14,1[a]
N.° total	16,18	13,03	10,27	3,76	7,74	8,25	5,48	14,14

ciones inactivantes. Este efecto fenotípico desconocido hasta el momento puede ser la causa subyacente a la difusión de la mutación F94L en numerosas razas, entre ellas algunas en las que los genotipos doblemente inactivantes son muy poco frecuentes como la Pirenaica. Además estos resultados estimulan la investigación del posible efecto fenotípico de las nuevas mutaciones recientemente descritas S105C y D182N (MIRANDA *et al.*, 2001).

La expresión de la HM varía con la raza, como evidencia el hecho de que los individuos genotípicamente normales reciben puntuaciones muy dispares, unido a las diferencias mostradas en la capacidad discriminante de los caracteres fenotípicos entre las razas. Este estudio ha reflejado la desigualdad existente entre las puntuaciones asignadas a las diversas mutaciones inactivantes. Debido a la falta de datos fenotípicos fiables de distintas mutaciones presentes en la misma población no es posible asegurar que estas diferencias se deban al efecto desigual de las mutaciones o a la acción de otros factores propios de la raza.

Cuadro 4. Resultados del análisis discriminante. Se muestra la potencia discriminativa (VALOR F) de las distintas variables dentro de razas, así como la potencia del modelo construido con las variables incluidas en cada PASO (λ de Wilks).

Razas	Paso	Variables	Valor F	λ de Wilks	PR > F
AV	1	CLA	59,81	0,5660	<,0001
	2	FH	6,61	0,5216	0,0003
	3	AE	5,92	0,4845	0,0007
	4	IG	3,11	0,4657	0,027
	5	HL	1,96	0,4541	0,121
CH	1	CLA	177,03	0,1873	<,0001
	2	IG	8,91	0,1536	<,0001
	3	NC	4,45	0,1383	0,0007
	4	AM	3,74	0,1266	0,0029
	5	FH	3,19	0,1172	0,0085
	6	EM	2,42	0,1105	0,0369
	7	HGD	2,91	0,1029	0,0148
	8	AE	2,19	0,0975	0,0573
	9	FP	2,4	0,0919	0,0384
GA	1	RV	435,68	0,2536	<,0001
	2	AM	23,55	0,2187	<,0001
	3	HL	11,15	0,2032	<,0001
	4	FH	6,15	0,1951	0,0024
	5	FP	7,36	0,1857	0,0008
	6	IG	4	0,1807	0,0194
	7	DA	5,26	0,1744	0,0057
	8	NC	3,2	0,1706	0,0424
	9	AE	2,08	0,1682	0,127
	10	EM	2,59	0,1652	0,0768
MA	1	CLA	123,65	0,3943	<,0001
	2	IG	8,22	0,3577	<,0001
	3	EM	5,55	0,3345	0,0002
	4	FH	2,28	0,3252	0,0602
	5	EA	2,6	0,3149	0,0364

Bibliografía

GROBET L., PONCELET D., ROYO L.J., BROUWERS B., PIROTTIN D., MICHAUX C., MÉNNISSIER F., ZANOTTI M., DUNNER S., GEORGES M, 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. Mammalian Genome 9: 210-213.

MIRANDA M.E., DUNNER S., AMIGUES Y., BOSHER M.-Y., BOURGEOIS-BOSSAERT F., CAÑÓN J., CORTÉS O., GEORGES M., GROBET L., HANSET R., MAUGRION P., MÉNISSIER F., 2000. SNP screening at the myostatin gene level in European cattle breeds. 27th International Conference on Animal Genetics (ISAG), p. 93.

MIRANDA ME., CAÑÓN J., MÉNISSIER F., HANSET R., WILLIAMS J., DUNNER S., 2001. Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas Europeas. IX Jornadas sobre Producción Animal (ITEA). Nº 22, p. 39.