NUEVO SNP DE LA *CALPASTATINA* (*CAST*) ASOCIADO CON LA TERNEZA DE LA CARNE DE BOVINO

L. P. Iguácel[1], J. H. Calvo[1, 2], J. K. Kirinus[3], M. Serrano[4], G. Ripoll[1], I. Casasús[1], M. Joy[1], L. Pérez-Velasco[1], P. Sarto[1], P. Albertí[1], M. Blanco[1].
[1] CITA Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.lpiguacel@aragon.es [2] ARAID [3] Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil [4] INIA, Madrid

INTRODUCCIÓN

Los consumidores consideran la terneza como el atributo más importante de la calidad de la carne (Ouali et al., 2006). La tenderización de la carne es muy variable y los consumidores exigen productos homogéneos, por lo tanto, la predicción y certificación de la terneza de la carne es de gran importancia para la industria cárnica.

En la etapa *post-mortem*, la calpaína (CAPN1) es la responsable de la rotura de las proteínas miofibrilares del músculo, mientras que la calpastatina (CAST) inhibe la actividad de la CAPN1. El incremento *post-mortem* de la actividad de CAST ha sido relacionada con una disminución de la terneza de la carne (Koohmaraie et al., 1995; Chung y Davis, 2012). En 1995, Koohmaraie et al. propusieron la utilización de los polimorfismos de *CAST* para predecir la terneza de la carne bovina. Diferentes SNPs del gen *CAST* se han asociado con la terneza en diferentes razas bovinas (Casas et al., 2006, Barendse et al., 2007, Allais et al., 2011).

El objetivo de este estudio fue el aislamiento de SNPs del gen *CAST* y la caracterización de sus efectos en la terneza de la carne con el fin de proporcionar información que mejore la selección genética de los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 196 animales, terneros enteros, castrados y hembras de las razas Parda de Montaña (n=144) y Pirenaica (n=52) procedentes de diferentes experimentos realizados en el CITA desde 2003 a 2010. De cada animal se registró dieta (D), género (G), raza (R), peso (PS) y edad al sacrificio. Tras 24 horas a 4ºC, se extrajo el músculo *Longissimus thoracis* de la décima costilla de cada canal izquierda. Dicho filete se envasó al vacío y se maduró durante 6 días para determinar la textura instrumental. Los filetes se cocieron en agua (temperatura interna 70ºC). Una vez enfriados, se cortaron paralelepípedos con una sección de 10mmx10mm y 30mm de largo que fueron seccionados perpendicularmente con una célula Warner-Bratzler, registrándose el esfuerzo máximo (Kg/cm^2). Se estimó el valor animal de la terneza mediante un modelo mixto con la dieta, género, raza, peso y edad al sacrificio como efectos fijos y el animal como efecto aleatorio.

Se extrajo el DNA de las 196 muestras de carne mediante kit comercial. Igualmente, de los animales de los que se disponía el músculo *Longissimus thoracis*, obtenido y conservado en condiciones adecuadas, se extrajo el RNA y se retrotranscribió a cDNA. Se seleccionaron 5 animales de raza Parda de Montaña y 3 de raza Pirenaica con valores extremos de las estimas del efecto del animal sobre la terneza y se amplificó y secuenció el transcrito 2 del gen *CAST* (GenBank acc. number NM_174003) a partir del cDNA. Con la finalidad de identificar posibles posiciones polimórficas, las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante los programas BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/). La hidropaticidad de la proteína se estudió mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982). De los SNPs encontrados en la secuenciación se realizó el genotipado de las mutaciones que producen un cambio aminoacídico. Dicho genotipado se realizó mediante PCR-RFLPs y sondas TaqMan.

El efecto de los polimorfismos estudiados sobre la terneza de la carne se obtuvo mediante el ajuste a un Modelo Lineal Mixto mediante el procedimiento MIXED del SAS, en el que se incluyen como efectos fijos: genotipo del SNP (S), género anidado a la raza (G(R)) y la interacción entre la dieta y la raza (D x R) y como covariables el peso al sacrificio anidado a la raza (PS(R)). Los efectos aleatorios fueron el animal anidado a la raza (A ~ N (0, σ2AR)) y el residuo (e ~ N (0, σ↓e↑2)). La ecuación del modelo fue la siguiente:

$y = u + S + G(R) + D \times R + b(PS(R)) + animal(R) + e$

donde y es el esfuerzo (kg/cm^2) (terneza), μ es la media de la población, y b es el coeficiente de regresión lineal de y en PS(R), relacionando la variación de la característica como una función del peso al sacrificio en cada raza. Se realizó un segundo análisis incluyendo la

interacción entre el genotipo del SNP y la raza como efecto fijo (S x R). Finalmente, se realizó la comparación directa por pares de las medias mínimo-cuadráticas con la corrección de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la secuenciación del transcrito 2 del gen CAST, se encontraron 23 SNPs de los cuales sólo 2, situados en el exón 7, producen un cambio aminoacídico Thr182Ala y Glu193Arg (en relación a la secuencia de referencia depositada en el GenBank NM_174003).

El SNP Thr182Ala fue identificado anteriormente mediante alineamiento de las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank (Motter et al., 2009) pero no fue caracterizado. Los autores concluyeron que no tendría ningún efecto sobre la función de la proteína, lo cual contradice los resultados expuestos en este trabajo.

En el presente estudio, la terneza se asoció con el SNP Thr182Ala (P = 0,001) pero no con Glu193Lys (P = 0,68) (Tabla 1). En el primer SNP, la carne del genotipo GG resultó ser menos tierna que la de los genotipos AG y AA. Cuando se analizaron los efectos de los SNPs en cada una de las razas por separado, sólo se encontraron efectos en la raza Parda de Montaña pero no en la raza Pirenaica (Tabla 2) debido, probablemente, al bajo número de animales genotipados y a la distribución desigual de los genotipos (AA: 32,7%; AG 53,8%, GG: 13,5%).

El efecto del genotipo del SNP Thr182Ala sobre la terneza fue mayor (0,65 y 0,84 desviaciones estándar para el total de la población y para la Parda de Montaña, respectivamente) que la encontrada por otros autores para otros SNPs en el gen *CAST* (0,20-0,40; Casas et al., 2006, Allais et al., 2011). Además, los genotipos AG y AA tuvieron una terneza similar. Este resultado podría indicar un efecto autosómico recesivo de la mutación Thr182Ala para la terneza de la carne bovina, mientras que otras mutaciones descritas en este gen muestran un efecto autosómico codominante.

El SNP Thr182Ala se localiza en el dominio L de la proteína. La función de este dominio no se conoce bien, pero Melloni et al. (2006) y De Tulio et al. (2009) demostraron que este dominio puede interaccionar con el dominio DII de la calpaína, a través de la secuencia de aminoácidos codificada por los exones 4 - 7. Esta interacción es muy específica, pero la estabilidad del complejo de la calpaína-calpastatina depende de las cargas electrostáticas localizadas en las regiones que interactúan. En este sentido, la hidropaticidad asociada a cada aminoácido varía desde -0,7 (Thr) hasta 1,8 (Ala) (escala de Kyte-Doolittle). Además, Thr es uno de los aminoácidos fosforilables, y como observaron De Tullio et al. (2009), la introducción de grupos fosfato negativos afecta negativamente a la estabilidad de esta interacción. Por lo tanto, la sustitución de Thr por Ala podría implicar una unión más estable entre la calpaína y calpastatina. Barendse et al. (2007) encontraron un cambio aminoacídico Pro52Leu en el dominio L asociado con la terneza de la carne, que producía un cambio en la hidropaticidad de la calpastatina. Según dichos autores, el cambio de hidropaticidad en esta región podría afectar a la unión de calpastatina con las membranas celulares y con la calpaína.

En conclusión, el polimorfismo Thr182Ala de *CAST* podría ser responsable de una parte de la varianza en la terneza de la carne en la población estudiada de la raza Parda de Montaña. Es necesario evaluar el efecto de los genotipos de Thr182Ala sobre la actividad de la calpastatina para confirmar los efectos de este nuevo polimorfismo encontrado. El SNP identificado puede ser útil para la industria como un marcador genético para identificar la carne de mayor dureza y adaptar su maduración para garantizar una carne de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C. & Renand, G. 2011. Journal of Animal Science 89: 1-11. • Barendse, W., Harrison, B.E., Hawken, R.J., Ferguson, D.M., Thompson, J.M., Thomas, M.B. & Bunch, R.J. 2007. Genetics 176 (4): 2601-10. • Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase, C.C., Johnson, D.D. & Smith, T.P.L. 2006. Journal of Animal Science 84 (3): 520-5. • Chung, H. & Davis, M. 2012. Meat Science 90: 711-4. • De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Averna, M., Antolini, R., Pontremoli, S. & Melloni, E. 2009. Biochimica et Biophysica Acta 1790 (3): 182-7. • Dekkers, J.C.M. 2004. Journal of Animal Science 82

(Suppl), E313-E328. • Koohmaraie, M., Killefer, J., Bishop, M.D., Schakelford, S.D., Wheeler, T.L. & Arbona, J.R. 1995. In "Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality", European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology pp. 395-410..• Kyte, J. & Doolittle, R. 1982. Journal of Molecular Biology 157: 105-32.• Melloni, E., Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F. & Pontremoli, S. 2006. Journal of Biological Chemistry 281 (34): 24945-54. • Motter, M.M., Corva, P., Krause, M., Perez Cenci M. & Soria, L. 2009. Journal of Basic and Applied Genetics 20 (1): 15-24. • Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. & Sentandreu, M.A. 2006 Meat Science 74: 44-58.

Agradecimientos: L. P. Iguácel recibe una beca del Gobierno de Aragón y J. K. Kirinus del Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior. Este estudio fue parcialmente financiado por proyectos de investigación INIA (INIA-RZP-2009-005, RZP-2010-002, RTA-2010-057) y grupos de investigación del Gobierno de Aragón (A11 y A49).

Tabla 1. Efecto fijo de tipo 3 y comparaciones por pares de las medias mínimo-cuadráticas de los polimorfismos en el gen CAST en el esfuerzo del M. Longissimus thoracis tras 7 días de maduración (Kg/cm^2).

SNP	F-value	Pr>F	Genotipo		
			AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
Thr182Ala	6,97	0,001	0,05±0,24	-1,35±0,39**	-1,40±0,38**
Glu193Arg	0,38	0,680	0,10±0,96	-0,15±0,93	-0,25±0,28

* P< 0,05; ** P< 0,01.

Tabla 2. Efecto fijo de tipo 3 y comparaciones por pares de las medias mínimo-cuadráticas de raza x genotipo SNP de los polimorfismos en el gen CAST en el esfuerzo del M. Longissimus thoracis tras 7 días de maduración (Kg/cm^2).

SNP	F-value	Pr>F	Genotipo		
			AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
Thr182Ala	3,80	0,008			
Parda de Montaña			0,03 ± 0,33	-1,77 ± 0,54*	-1,80 ± 0,55*
Pirenaica			0,11 ± 0,37	-0,90 ± 0,57	-1,01 ± 0,54
Glu193Arg	0,42	0,794			
Parda de Montaña			0,12 ± 1,35	-0,37 ± 1,32	-0,49 ± 0,38
Pirenaica			0,02 ± 1,37	0,.08 ± 1,33	0,06 ± 0,44

* P< 0,05;

A NEW SNP IN *CALPASTATIN* (*CAST*) GENE ASSOCIATED WITH BEEF TENDERNESS

ABSTRACT: Calpastatin (CAST) inhibits µ- and m-calpain activity and, therefore, regulates *post-mortem* proteolysis, being some SNPs in *CAST* gen associated to meat tenderness. In this work, a new SNP located at exon 7 (position BTA29: 98535683 on UMD 3.0) was associated to meat tenderness (P= 0.001). Beef from GG genotype was tenderer than that from AG and AA genotypes, which had similar tenderness. This mutation change the amino acid sequence at position Thr182Ala and could change the electrostatic charges localized in the interacting regions between the calpastatin L-domain and calpain. Moreover, heterozygous genotypes did not show either differences with the tender genotype or intermediate tenderness indicating an autosomal recessive inheritance effect of the Thr182Ala mutation for beef tenderness. The effect of the genotype of the Thr182Ala mutation on tenderness was higher (0.65 SD and 0.84 SD for the Total and Parda de Montaña populations, respectively) than those found previously for other SNPs in the *CAST* gene. Further studies are necessary to test the effect of the *CAST* Thr182Ala genotypes on calpastatin activity to confirm the effects of this new SNP found in the current experiment.

Keywords: Tenderness, CAST, SNP, beef.