

Frecuencias genotípicas de polimorfismos de nucleótido único hallados en genes de calpaína y calpastatina de reproductores bovinos del Chaco

Jastrzebski, F.A.*; Sosa, F.E.; Sandoval, G.L.; Almirón, E.C.; De Biasio, M.B.
Cátedra de Bioquímica, Servicio Veterinario de Biología Molecular- Facultad de Ciencias
Veterinarias- Universidad Nacional del Nordeste. *fernandojastreski@gmail.com

Proyecto de Investigación “Estudios Bioquímico–Moleculares aplicables a la Producción y Sanidad de Carnes”, CB02/2013 incluido en el Programa “Alternativas para la Producción de Carnes de calidad en el Nordeste Argentino” Aprobado por resol. N° 873/2013 por la Secretaría General de Ciencia y Técnica- UNNE.

La seguridad alimentaria, seguida por la palatabilidad, son las propiedades en las cuales el consumidor pone más énfasis en el momento y reiteración de compra de la carne y su satisfacción depende de un conjunto de propiedades de la misma tales como su terneza, jugosidad y sabor. Sin duda, la terneza es entre esos atributos uno de los que el consumidor privilegia como criterio de calidad. Trabajos recientes han demostrado que la terneza en carnes se debe, en gran medida, al proceso de maduración *pos-mortem* realizado principalmente por dos enzimas: calpaína y calpastatina¹. Las calpaínas tienen como sustratos preferenciales los componentes de las bandas Z, pero no atacan a la actina ni a la miosina², son independientes de ATP y producen *in vivo* los cambios observados en las miofibrillas, siendo capaces de alterar la densidad de la línea del disco Z. Están directamente implicadas en el inicio de la proteólisis de componentes de las miofibrillas como la titina y la nebulina, y también de la desmina, constituyente principal de los filamentos intermedios. Algunos autores sugieren que son las responsables del 95% de la degradación inicial de las proteínas y que catalizan su ruptura haciéndolos disponibles al proteosoma y las enzimas lisosomales que completarían la degradación.

Existen dos isoformas ubicuas de Calpaínas sarcoplásmicas (cisteína-proteasas): μ -calpaína y M-calpaína que son reguladas por calcio e inhibidas por calpastatina y muchas otras de distribución específica según tejido, entre ellas la p94 o calpaína III en músculo esquelético, cuyo rol aún no se ha clarificado en el proceso de maduración. Las M-calpaínas y μ -calpaínas se nombran en función de las concentraciones de Ca^{++} requeridas para su actividad; que son de 0,2 a 1mM para la M-calpaína y de 5 a 50 μ M para la μ -calpaína. Ellas son también llamadas respectivamente calpaína II y calpaína I; que corresponden al orden de elución en una columna cromatográfica de intercambio de aniones (tipo DEAE). Estas proteasas tienen una estructura heterodimérica compuesta por dos subunidades: una grande (80kD, con 4 dominios: I, II, III, IV) y otra pequeña (30kD, con 2 dominios: V y VI). La subunidad mayor es la porción catalítica (tiene el sitio activo, dominio II) y la pequeña es la porción reguladora o quizá estabilizadora de la subunidad catalítica y es idéntica para las isoenzimas I y II ya que es codificada por un único gen. A los dominios III se liga la calpastatina y a los dominios IV se une el Ca^{++4} .

La Calpaína es la enzima principal de estos procesos de maduración y las variantes más activas de la enzima confieren mayor terneza a la carne. Es importante comentar que la actividad de esta enzima depende de factores, como la acidez, la temperatura y la presencia de Calcio, de allí la importancia del cuidado de estas variables, evitando el estrés previo a la faena. La Calpastatina es a su vez una enzima que interviene en la regulación de la actividad de la Calpaína mediante la inhibición de su efecto cuando el proceso de maduración ha alcanzado determinado progreso. En forma inversa a la Calpaína, las variantes menos activas de la Calpastatina confieren mayor terneza⁴.

Nuestro objetivo consistió en realizar un análisis de marcadores genéticos de terneza basado en detectar en el genoma bovino, por métodos de biología molecular, variaciones polimórficas en los genes que codifican las enzimas mencionadas. La detección de polimorfismos de nucleótidos únicos en los genes de estas enzimas sirve para identificar animales con alta, media o nula predisposición para carnes genéticamente tiernas. Se analizó (PCR-RFLP) sangre anticoagulada de reproductores

bovinos machos Angus, Hereford y sus cruza con Brahman (n=75) de cuatro establecimientos: 3 de ellos localizados en Las Breñas y uno en Puerto Tirol, Chaco. Se extrajo ADN genómico (CTAB) y se amplificaron regiones de interés de los genes de la subunidad mayor de CAPN1, subunidad menor reguladora de CAPN2, un fragmento del exón 12 de CAST y un fragmento del extremo 3' no traducido del gen de CAST, produciendo fragmentos de 709pb, 1800pb, 624pb y 269pb, que fueron digeridos por las enzimas de restricción Btg I, Hha I, Alu I y Dde I. La amplificación y los productos de restricción se verificaron por electroforesis y transiluminación UV de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En todos los casos se describieron dos variantes alélicas, una asociada a la presencia de carnes tiernas (A) y otra asociada a carnes duras (B). Al analizar los resultados obtenidos para los genotipos A/A (homocigota blando/ blando), A/B (heterocigota) y B/B (homocigota duro/duro) para cada polimorfismo hallamos los siguientes resultados: la frecuencia para los alelos "tiernos" de CAPN2 fue de 0,35; con un 12 % de homocigosis (ho) y 45% de heterocigosis (he). Los respectivos datos para el polimorfismo en gen de CAPN1 fueron: frecuencia de 0,20 con 0% de ho y 40% de he. En el caso del polimorfismo en el exón 12 de CAST, la frecuencia fue de 0,63 y los porcentajes fueron ho= 39% y he = 49%. Finalmente la frecuencia para el polimorfismo en la región 3' no traducida de CAST fue 0,73, con 53% de ho y 39% de he. Hubo diferencias ($p < 0,0001$) entre las frecuencias de alelos tiernos de CAPN y CAST entre ambos grupos, como así también la correlación negativa ($p = 0,016$) entre los valores de ambos marcadores.

Como se puede observar en los resultados expuestos las frecuencias de los alelos favorables para carnes tiernas en ambos polimorfismos de genes de calpains es relativamente bajo, coincidente con otros trabajos realizados para estas razas en nuestro país, lo que podría atribuirse a la participación de cebú en la composición genética de la raza, ya que a pesar de su adaptación y rusticidad, tienen reconocidas desventajas en la calidad de las carnes y particularmente en la terneza. Por todo esto creemos que el conocimiento del status genotípico de genes cuyos productos participan de alguna manera en el proceso de tiernización de la carne, permite hacer una selección de reproductores asistida por marcadores que favorezcan ese atributo y faciliten la implementación de sistemas de manejo tendientes a aumentar su prevalencia en la población.

Bibliografía

- 1- Soria L. A. y Corva P. M. (2004). "Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza e la carne bovina". Arch. Latinoam. Prod. Anim. 12 (2): 73-88
- 2- Koohmaraie, M. (1992). "Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains". J Anim Sci. 70(12):3697-708.
- 3- Sorimachi H, Tsukahara T, Okada-Ban M, Sugita H, Ishiura S, Suzuki K. (1995) "Identification of a third ubiquitous calpain species--chicken muscle expresses four distinct calpains". Biochim Biophys Acta. 1261(3):381-93.
- 4- Lara, M.A.C., Nardon R. F., Bufarah G., Demarchi J. J. A. A, Sereno J. R., Santos S. A. y Abreu U.G. P. (2005). "Polimorfismo del gen Calpaína en razas vacunas por la técnica PCR-RFLP". Arch. Zootec. 54:305-310.