

# Factores genéticos que afectan a la dureza y grasa intramuscular de la carne de bovino

Tesis Doctoral

Laura Pilar Iguácel Quintana

Zaragoza, 2017



**Universidad**  
Zaragoza





TESIS DOCTORAL

**Factores genéticos que afectan a la dureza y grasa  
intramuscular de la carne de bovino**

Memoria presentada por

**Laura Pilar Iguácel Quintana**

Para optar al grado de doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, 2017





Avda.Montañana, 930

50059- ZARAGOZA

Tel: 34 976 71 64 71

Fax:34 976 71 63 35

D. JORGE HUGO CALVO LACOSTA, Doctor en Veterinaria con DNI 25453882N, Investigador ARAID de la Unidad de Tecnología en Producción animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA),

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada: “Factores genéticos que afectan a la dureza y grasa intramuscular de la carne de bovino” que se recoge en la presente memoria, y de la que es autora Laura Pilar Iguácel Quintana, y que ha sido realizada bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de Tesis inicialmente presentado y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar el grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, a 17 de marzo de 2017

Jorge Hugo Calvo Lacosta





Avda.Montañana, 930  
50059- ZARAGOZA  
Tel: 34 976 71 64 71  
Fax:34 976 71 63 35

Doña MIREIA BLANCO ALIBÉS, Doctora con DNI 25174536R, Investigadora de la Unidad de Tecnología en Producción animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA).

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada: “Factores genéticos que afectan a la dureza y grasa intramuscular de la carne de bovino” que se recoge en la presente memoria, y de la que es autora Laura Pilar Iguácel Quintana, y que ha sido realizada bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de Tesis inicialmente presentado y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar el grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, a 17 de marzo de 2017

Mireia Blanco Alibés





## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todos los que han participado, de una manera u otra, en esta Tesis doctoral.

Al Gobierno de Aragón por concederme la beca predoctoral que me ha permitido iniciarme en mi carrera investigadora.

A las asociaciones de vacuno, en concreto a la Asociación de criadores de raza Bovina Parda de Montaña (ARAPARDA) y Asociación Ganado Vacuno Pirenaico (ASAPI), a los ganaderos y veterinarios que nos han ayudado en la recogida de muestras de sangre para la Tesis. A FRIBIN, a los veterinarios y técnicos que trabajan en el matadero de Binéfar que nos ayudaron con las muestras de carne.

A Jorge y a Mireia, mis directores de Tesis, por guiarme en los buenos y en los malos momentos en este camino llamado Tesis.

A Isabel y a Marga, porque los resultados de sus proyectos fueron el inicio de esta Tesis. A Guillermo, Pere, Carolina y Angelines, que me enseñaron y me ayudaron a realizar las mediciones de la dureza y el contenido de grasa de la carne. A Malena, que me introdujo en el difícil mundo de la estadística, el SAS y los modelos mixtos.

A José Carlos, por permitirme realizar una estancia de 4 meses en el laboratorio de Biología Molecular de lipoproteínas y aterosclerosis de la Universidad de Cantabria. A Fonso y Javi, por enseñarme los entresijos del clonaje de bacterias, la transfección y “las lucis”.

A Pilar Sarto, la verdadera “jefa del laboratorio” de biología molecular del I + D, por enseñarme todas las maldades que pueden pasarte con las PCRs. A todos los “subecarios,” trabajos fin de máster y prácticas que han pasado por el laboratorio y han puesto su granito de arena en esta Tesis.

A Laura, por compartir congresos, cursos, viajes en avión (aunque sea “dormida”), karaokes en chino y muchas risas.

A Judit, por ser mi compañera de batallas en Santander, por las risas que nos echábamos cuando era jueves y “aún no habíamos ligao” y por la receta de la quiche.

A Olaia, por animarme en la recta final de la Tesis con los “venga que ya no queda nada!” y por hacer que los lunes sean menos duros gracias a la danza.

A Belén, Lucía, Michel, René y Alejandro, por los buenos ratos en la sala de becarios, en los cafés y a la hora de comer. A los becarios de la casa amarilla, Tamara, Sandra, José Antonio, Pablo y Agustí, que de vez en cuando han conseguido sacarme a cenar para evadirme de la Tesis.

A Chus, María, Sara Andrés, Sara Serrano, Pili, Piluca, Carlos Calvete y Elías por todos los descansos a la hora del café y esos bocatas de longaniza en el Chiringuito que hacen que se te olvide la ciencia y la investigación por un ratito. A Ana por preocuparse todos los días por nosotros, por sus amigurumis de vaquitas y ovejitas, además de dejar todo impecable. A Albertico, por alegrarme todos los días con sus comentarios cada vez que paso por recepción.

A todos los que en algún momento se preocuparon por mi Tesis, preguntándome ¿Ya sabes cuándo presentas? o ¿Qué tal vas con la Tesis?

A María por el diseño de la portada tan chula que tengo en la Tesis.

A Eva, Lucía, Silvia e Inma, que aunque nos veamos poco, cuando lo hacemos es como si no hubiese pasado el tiempo y la Tesis no existiese.

Al coro Enarmonía, porque cantar cada miércoles ha sido casi terapéutico para mí.

A mis padres, por apoyarme en todo lo que hago, cuidarme con esos tappers de comidas y aguantarme cuando las cosas de la Tesis no salían.

A Juanjo, por sacarme una sonrisa todos los días y empujarme a seguir hacia delante con todo lo que me proponga.

A todos, de corazón, gracias.

## Abreviaturas

### A

Ala Alanina

### C

*CAPN1* Calpaína

*CAST* Calpastatina

cDNA DNA complementario

CDS Región codante

### D

D' Desequilibrio de ligamiento

dbSNP Base de datos de variaciones genéticas cortas

*DGAT1* Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1

DNA Ácido desoxirribonucléico

### F

F Cebador directo

*FABP4* Proteína de unión a ácidos grasos 4

*FASN* Sintasa de ácidos grasos

FT Factores de transcripción

### G

GIM Grasa intramuscular

GWAS "Genome-wide association study"

### H

H / Hap Haplotipo

### L

LD Desequilibrio de ligamiento

*LEP* Leptina

LOD, valor Comparación de la probabilidad de que dos loci estén ligados, a la probabilidad de que no lo estén y se encuentren unidos por casualidad.

LT *Longissimus thoracis*

### M

M Maduración

miRNA microRNA

### P

PCR Reacción en cadena de la polimerasa  
"Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length

PCR-RFLPS Polymorphisms"

PCC Peso canal caliente

PI Pirenaica

PM Parda de montaña

## Q

qRT-PCR PCR cuantitativa en tiempo real

QTL Quantitative trait locus

## R

R Cebador reverso

*RORC* *Receptor huérfano asociado al RAR-γ*

RNA Ácido ribonucleico

RNAm RNA mensajero

## S

*SCD* *Estearoil-CoA desaturasa*

SIFT, valor “Sorting intolerant from tolerant”. Clasificación de las sustituciones aminoacídicas. Valores menores a 0,05 se clasifican como deletéreas y valores mayores o iguales a 0,05 como toleradas.

SNP Polimorfismo de un solo nucleótido

## T

*TG* *Tiroglobulina*

TH Temperatura de hibridación

Thr Treonina

## V

VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad

# Índice



## Índice de Contenidos

Agradecimientos .....	I
Abreviaturas.....	III
Índice .....	V
Índice de Contenidos.....	VII
Índice de Tablas.....	XV
Índice de Figuras.....	XXI
Resumen.....	XXV
Abstract .....	XXXI
Antecedentes y Revisión Bibliográfica .....	1
1. Importancia del vacuno de carne .....	3
2. Importancia de la calidad de la carne de vacuno .....	4
3. Estructura del músculo .....	7
4. Dureza de la carne .....	9
4.1. Conversión del músculo en carne.....	10
4.1.1. Proceso de tenderización .....	11
4.1.2. Papel de las proteínas que intervienen en el proceso de tenderización ...	12
4.1.3. Sistema calpaína-calpastatina .....	14
4.2. Factores que influyen en la dureza de la carne.....	18
4.2.1. Raza .....	19
4.2.2. Sexo .....	19
4.2.3. Alimentación .....	20
4.2.4. pH .....	21
4.2.5. Edad/desarrollo .....	21

## Índice

4.2.6.	Maduración .....	22
4.2.7.	Genética .....	22
4.3.	Genes candidatos para la dureza de la carne .....	23
4.3.1.	<i>Calpaína (CAPN1)</i> .....	23
4.3.2.	<i>Calpastatina (CAST)</i> .....	25
5.	Grasa intramuscular .....	28
5.1.	Factores que afectan al contenido de grasa intramuscular .....	29
5.1.1.	Raza .....	30
5.1.2.	Sexo .....	30
5.1.3.	Edad/desarrollo.....	31
5.1.4.	Alimentación .....	31
5.1.5.	Genética .....	32
5.2.	Genes candidatos para el contenido de grasa intramuscular.....	32
5.2.1.	<i>Sintasa de los ácido grasos (FASN)</i> .....	32
5.2.2.	<i>Proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)</i> .....	34
5.2.3.	<i>Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)</i> .....	34
5.2.4.	<i>Estearoil-CoA desaturasa (SCD)</i> .....	35
5.2.5.	<i>Leptina (LEP)</i> .....	36
5.2.6.	<i>Tiroglobulina (TG)</i> .....	36
5.2.7.	<i>Receptor huérfano asociado al receptor del ácido retinoico-γ (RORC)</i> .....	37
5.2.8.	<i>Calpaína (CAPN1)</i> .....	38
5.2.9.	<i>Calpastatina (CAST)</i> .....	39
	Objetivos .....	41
	Material y Métodos .....	45
1.	Material animal .....	47



2.	Muestreos.....	49
2.1.	Músculo <i>Longissimus thoracis</i> .....	49
2.1.1.	Biopsia para obtención de RNA.....	49
2.1.2.	Determinación de la textura Warner-Bratzler (dureza) de la carne y del contenido de grasa intramuscular y extracción de DNA.....	49
2.1.3.	Determinación del pH .....	50
2.2.	Sangre para la extracción de DNA .....	51
3.	Análisis de textura de la carne.....	51
4.	Determinación del contenido de grasa intramuscular.....	51
5.	Caracterización molecular de genes candidatos.....	52
6.	Técnicas básicas en biología molecular utilizadas para la caracterización de los genes de interés.....	52
6.1.	Extracción de DNA .....	52
6.2.	Extracción RNA .....	53
6.3.	Cuantificación RNA y DNA total.....	53
6.4.	Síntesis de cDNA .....	54
6.5.	Amplificación por PCR .....	54
6.6.	Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis.....	55
6.7.	Purificación .....	55
7.	Búsqueda de polimorfismos en los genes candidatos relacionados con la dureza de la carne .....	56
7.1.	Secuenciación a partir de DNA genómico de varios fragmentos de los genes <i>CAST</i> Y <i>CAPN1</i> .....	56
7.2.	Secuenciación a partir de DNA genómico del promotor del gen <i>CAST</i> .....	59
7.3.	Secuenciación a partir de cDNA .....	61
8.	Estudios de asociación.....	62

## Índice

8.1.	Genotipado mediante PCR-RFLPs .....	62
8.2.	Genotipado mediante sondas TaqMan.....	66
8.3.	Genotipado mediante sondas “Beacon” .....	68
8.4.	Genotipado del microsatélite.....	69
8.5.	Genotipado mediante secuenciación.....	70
9.	Estudio de la funcionalidad <i>in vitro</i> de la región 3’UTR del gen <i>CAST</i> .....	71
9.1.	Cultivo y mantenimiento de líneas celulares .....	72
9.2.	Clonaje y subclonaje de DNA.....	72
9.2.1.	PCR .....	73
9.2.2.	Ligación .....	73
9.2.3.	Transformación bacteriana .....	74
9.2.4.	Cultivo bacteriano.....	74
9.3.	Ensayos de actividad reportera.....	75
9.3.1.	Transfección temporal .....	75
9.3.2.	Medida de la actividad de la luciferasa.....	75
10.	Análisis bioinformáticos .....	76
11.	Análisis estadístico.....	78
11.1.	Valor animal .....	78
11.2.	Efectos sobre el esfuerzo máximo .....	78
11.2.1.	Estudio de asociación de los polimorfismos de genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> con la dureza de la carne madurada a tiempo intermedio.....	78
11.2.2.	Estudio de asociación de los polimorfismos de los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> con la dureza de la carne a distintos tiempos de maduración.....	79
11.2.3.	Estudio de asociación de haplotipos.....	81

11.3.	Estudio de asociación de los SNPs de los genes candidatos y el contenido de grasa intramuscular.....	82
	Resultados y Discusión .....	85
	CAPÍTULO I. Aislamiento de una nueva mutación en el gen <i>calpastatina</i> ( <i>CAST</i> ) y estudios de asociación con la dureza de la carne de vacuno .....	87
1.	Búsqueda de polimorfismos en los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> .....	91
1.1.	Estudios de asociación con el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> .....	94
1.1.1.	Efectos ambientales .....	95
1.1.2.	Efecto de los SNPs .....	98
1.1.2.1.	Efecto de los SNPs de <i>CAPN1</i> .....	98
1.1.2.2.	Efecto de los SNPs de <i>CAST</i> .....	99
1.2.	Análisis de los haplotipos y estudio de asociación .....	102
1.3.	Significación biológica del nuevo polimorfismo rs210072660 ( <i>CAST_2</i> ) asociado a la dureza de la carne .....	105
1.4.	Distribución de las frecuencias genotípicas. Detección rápida mediante discriminación alélica con sondas “Beacon” .....	106
	CAPÍTULO II. Estudios de asociación de los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> con la dureza de la carne a distintos tiempos de maduración.....	109
1.	Estudio de asociación de los polimorfismos de <i>CAST</i> y <i>CAPN1</i> .....	113
1.1.	Efectos ambientales.....	113
1.2.	Efectos de los SNPs .....	117
1.2.1.	Efectos de los SNPs del gen <i>CAPN1</i> .....	117
1.2.2.	Efectos de los SNPs del gen <i>CAST</i> .....	121
2.	Estudio de asociación de haplotipos .....	123

## Índice

CAPÍTULO III. Caracterización de la región 3'UTR del gen <i>CAST</i> , estudios de asociación de los polimorfismos encontrados con la dureza de la carne y del efecto funcional de los mismos .....	129
1. Estudio de asociación de los polimorfismos de la región 3'UTR de <i>CAST</i> ...	133
Efectos ambientales.....	135
1.1. Efectos de los SNPs.....	135
2. Análisis de los haplotipos y estudio de asociación con el esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> en distintas maduraciones .....	140
3. Análisis funcional de los SNPs en la región 3'UTR del gen <i>CAST</i> .....	145
3.1. Estudio <i>in silico</i> de los posibles sitios de unión de miRNA.....	146
3.2. Estudio de la actividad luciferasa .....	148
CAPÍTULO IV. Estudio de la región promotora del gen <i>CAST</i> y estudios de asociación con la dureza de la carne .....	153
1. Estudio de la región promotora del gen <i>CAST</i> .....	155
2. Estudio de asociación del microsatélite rs479041025 con la dureza de la carne .....	161
3. Estudio de asociación haplotípico.....	163
CAPÍTULO V. Estudios de asociación del contenido de grasa intramuscular con los genes <i>sintasa de los ácidos grasos (FASN)</i> , <i>proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)</i> , <i>acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)</i> , <i>estearoil-CoA desaturasa (SCD)</i> , <i>leptina (LEP)</i> , <i>tiroglobulina (TG)</i> , <i>receptor huérfano asociado al RAR-γ (RORC)</i> , <i>calpaína (CAPN1)</i> y <i>calpastatina (CAST)</i> .....	173
1. Estudios de asociación de polimorfismos de los genes <i>FASN</i> , <i>FABP4</i> , <i>DGAT1</i> , <i>SCD</i> , <i>LEP</i> , <i>TG</i> , <i>RORC</i> , <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> con el contenido de grasa intramuscular en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> . .....	177
1.1. Efectos ambientales .....	179

1.2. Efecto de los SNPs de los genes <i>FASN</i> , <i>DGAT1</i> , <i>SCD</i> , <i>LEP</i> , <i>TG</i> , <i>RORC</i> , <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> .	181
Discusión General.....	189
Conclusiones.....	197
Referencias Bibliográficas .....	203
Anexos .....	227



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Raza, sexo, alimentación, número de animales utilizados (n), edad al sacrificio, peso canal caliente (PCC) y engrasamiento (promedio $\pm$ desviación estándar) y días de maduración (M) para los estudios realizados en la presente Tesis sobre la dureza y grasa intramuscular en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> . ....	48
<b>Tabla 2.</b> Número de animales (n) utilizados para el estudio de la distribución de las frecuencias genotípicas de la nueva variante de la dureza de la carne.....	49
<b>Tabla 3.</b> Duración de la maduración ( $\pm$ desviación estándar) y número de muestras por maduración en Parda de Montaña y Pirenaica. ....	50
<b>Tabla 4.</b> Descripción de los cebadores de los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> para la búsqueda de nuevos polimorfismos.....	58
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de cebadores utilizados para la región promotora del gen <i>CAST</i> , temperatura de hibridación (TH) y talla del fragmento amplificado (pb). ....	60
<b>Tabla 6.</b> Secuencia de cebadores, temperatura de hibridación (TH) y talla del fragmento amplificado (pb) para la secuenciación del cDNA del <i>CAST</i> ( <i>Bos taurus calpastatin</i> ( <i>CAST</i> ), transcript variant 1, mRNA: NM_001030318).....	62
<b>Tabla 7.</b> SNPs genotipado mediante PCR-RFLPs, localización, referencia bibliográfica, posición relativa en la versión UMD 3.1 del genoma bovino y número de referencia del SNP (refSNP). ....	63
<b>Tabla 8.</b> Secuencia de cebadores, talla del fragmento amplificado en pb (PCR), concentración de $MgCl_2$ (mM) y cebadores ( $\mu M$ ), temperatura de hibridación en $^{\circ}C$ (TH) para la amplificación por PCR. Enzimas de restricción (Ez), temperatura de digestión en $^{\circ}C$ (T inc.) y patrón de bandas para la digestión enzimática en pb (PCR-RFLP).....	65
<b>Tabla 9.</b> SNPs genotipado mediante sondas TaqMan, localización, referencia bibliográfica, posición relativa al sistema coordinado UMD 3.1 y número de referencia del SNP (refSNP). ....	67
<b>Tabla 10.</b> Secuencia de cebadores y sondas, talla del fragmento amplificado (pb) y temperatura de hibridación (TH). ....	67

<b>Tabla 11.</b> Cebadores y sondas “Beacon” utilizadas para el genotipado del SNP rs210072660 ( <i>CAST_2</i> ).....	68
<b>Tabla 12.</b> Posición del microsatélite, número de referencia del SNP (refSNP), secuencia de las sondas y talla del fragmento amplificado (pb).....	70
<b>Tabla 13.</b> Secuencia cebadores utilizados para el genotipado mediante secuenciación de la región 3’UTR, temperatura de hibridación (TH) y fragmento amplificado (pb) .	71
<b>Tabla 14.</b> Cuatro haplotipos principales de la región 3’UTR del gen <i>CAST</i> que se han utilizado para el estudio de la funcionalidad in vitro. ....	72
<b>Tabla 15.</b> Secuencia de los cebadores empleados para el clonaje del fragmento de la región 3’UTR del gen <i>CAST</i> .....	73
<b>Tabla 16.</b> Polimorfismos encontrados en los exones 9 y 14 y los intrones 14 y 17 del gen <i>CAPN1</i> secuenciado a partir de DNA genómico.....	91
<b>Tabla 17.</b> Polimorfismos encontrados en el gen <i>CAST</i> (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253). ....	93
<b>Tabla 18.</b> Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> en las razas Parda de Montaña (PM) y Pirenaica (PI). ....	95
<b>Tabla 19.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> a maduración intermedia para los SNPs de <i>CAST</i> según la raza. ....	100
<b>Tabla 20.</b> Análisis de desequilibrio de ligamiento con el software PLINK.....	102
<b>Tabla 21.</b> Frecuencia, medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> tras una maduración intermedia para los haplotipos más frecuentes de <i>CAPN1</i> .....	103
<b>Tabla 22.</b> Frecuencia, medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> tras una maduración intermedia para los haplotipos más frecuentes de <i>CAST</i> .....	104
<b>Tabla 23.</b> Valor fenotípico y varianzas en la raza Parda de Montaña y Pirenaica para las maduraciones estudiadas.....	111



<b>Tabla 24.</b> Número de animales para cada genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos genotipados de los genes <i>CAST</i> y <i>CAPN1</i> , en las razas Parda de Montaña y Pirenaica. ....	113
<b>Tabla 25.</b> Efecto del SNP de la <i>CAPN1</i> sobre el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M) y la raza estudiada. ....	118
<b>Tabla 26.</b> Efecto del SNP del gen <i>CAST</i> sobre el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M) y la raza estudiada. ....	121
<b>Tabla 27.</b> Análisis de desequilibrio de ligamiento indicando los coeficientes de desequilibrio de ligamiento $D'$ y $r^2$ entre cada SNP, así como el valor LOD. ....	123
<b>Tabla 28.</b> Efecto de los haplotipos más frecuentes de <i>CAPN1</i> estudiados en las dos razas en el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M). Se muestran los resultados de los haplotipos con una frecuencia superior al 4%. ....	125
<b>Tabla 29.</b> Efecto de los haplotipos más frecuentes de <i>CAST</i> estudiados según la raza sobre el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> en función de la maduración...	126
<b>Tabla 30.</b> Polimorfismos encontrados en la región 3'UTR de <i>CAST</i> mediante secuenciación de un fragmento de 375 bp.....	133
<b>Tabla 31.</b> Número de animales para cada genotipo y frecuencia alélica de los SNPs del 3'UTR de <i>CAST</i> , en la población total y en las razas Parda de Montaña (PM) y Pirenaica (PI). ....	134
<b>Tabla 32.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> a maduración (M) corta, media y larga para los SNPs de la región 3'UTR de <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña. ....	137
<b>Tabla 33.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> a maduración (M) media y larga para los SNPs de la región 3'UTR de <i>CAST</i> en la raza Pirenaica.....	138
<b>Tabla 34.</b> Haplotipos estudiados en la región 3'UTR de <i>CAST</i> presentes en la raza Parda de Montaña y Pirenaica con una frecuencia superior al 1%. ....	142
<b>Tabla 35.</b> Efecto de los haplotipos (H) de <i>CAST</i> estudiados en la raza Parda de Montaña en el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M). ....	143

<b>Tabla 36.</b> Efecto de los haplotipos más frecuentes de <i>CAST</i> estudiados en la raza Pirenaica en el esfuerzo del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración. ...	144
<b>Tabla 37.</b> Localización, posición relativa en el genoma bovino (versión UMD3.1), tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP), variación aminoacídica y si afecta la unión de factores de transcripción (FT) o región codante (CDS) del polimorfismo en el gen de los polimorfismos localizados en la región 1xa.....	158
<b>Tabla 38.</b> Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y si afecta la unión de factores de transcripción (FT) de los polimorfismos localizados en la región 1xb en el gen <i>CAST</i> . .....	159
<b>Tabla 39.</b> Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y variación aminoacídica (AA) de los polimorfismos localizados en la región 1z en el gen <i>CAST</i> .....	160
<b>Tabla 40.</b> Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y si afecta la unión de factores de transcripción de los polimorfismos localizados en la región 1u en el gen <i>CAST</i> . .....	160
<b>Tabla 41.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración para los alelos más frecuentes del microsatélite de <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña. ....	162
<b>Tabla 42.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración para los alelos más frecuentes del microsatélite de <i>CAST</i> en la raza Pirenaica.....	162
<b>Tabla 43.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M) para el SNP <i>CAST_2</i> y el alelo 129 del microsatélite de <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña. ....	163
<b>Tabla 44.</b> Análisis de desequilibrio de ligamiento indicando los coeficientes de desequilibrio de ligamiento $D'$ y $r^2$ entre cada SNP, así como el valor LOD, el intervalo de confianza y la distancia entre ambos marcadores (pb).....	164

<b>Tabla 45.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico (H) compuesto por los SNPs <i>CAST_2</i> , <i>CAST_5</i> y el microsatélite gen <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña. ....	166
<b>Tabla 46.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico (H) compuesto por los SNPs <i>CAST_2</i> , <i>CAST_5</i> y el microsatélite gen <i>CAST</i> en la raza Pirenaica. ....	167
<b>Tabla 47.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> en los tres tiempos de maduración (M) para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico compuesto por los SNPs <i>CAST_2</i> , el microsatélite gen <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña. ....	169
<b>Tabla 48.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> en los tres tiempos de maduración (M) para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico compuesto por los SNPs <i>CAST_2</i> , el microsatélite gen <i>CAST</i> en la raza Pirenaica. ....	170
<b>Tabla 49.</b> Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo <i>Longissimus thoracis</i> según la maduración (M) para el SNP <i>CAST_2</i> , el alelo 129 del microsatélite y el haplotipo H2_129G compuesto por el microsatélite y <i>CAST_2</i> en la raza Parda de Montaña. ....	170
<b>Tabla 50.</b> Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis <i>FASN</i> , <i>DGAT1</i> , <i>SCD</i> , <i>LEP</i> , <i>TG</i> , <i>RORC</i> en la población total y para las razas Parda de Montaña y Pirenaica. ....	177
<b>Tabla 51.</b> Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> en las razas Parda de Montaña y Pirenaica. ....	178
<b>Tabla 52.</b> Efecto de los SNPs de los genes <i>FASN</i> , <i>DGAT1</i> , <i>SCD</i> , <i>LEP</i> , <i>TG</i> , <i>RORC</i> , <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> sobre el contenido de grasa intramuscular en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> en la raza Parda de Montaña y Pirenaica. ....	182



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Organización de la fibra muscular. Fuente: Adaptado de Ross y Pawlina (2007). .....	8
<b>Figura 2.</b> Dominios de la subunidad 80kDa del heterodímero de la proteína calpaína ( <i>CAPN1</i> ). Fuente: Adaptado de Braun y Gautel (2011).....	15
<b>Figura 3.</b> Dominios, subdominios y isoformas del gen <i>calpastatina</i> ( <i>CAST</i> ). Fuente: Adaptado de Storr <i>et al.</i> (2011). .....	16
<b>Figura 4.</b> Unión de la calpastatina a la calpaína. Fuente: Adaptado de <a href="http://pldserver1.biochem.queensu.ca/calpain/calpains.shtml">http://pldserver1.biochem.queensu.ca/calpain/calpains.shtml</a> . .....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema del gen <i>CAPN1</i> (UMD 3.1. BTA29:g.44064429-44089990) donde se indican los fragmentos amplificados y secuenciados a partir del DNA genómico (F.4, F.5, F.6).....	56
<b>Figura 6.</b> Esquema del gen <i>CAST</i> (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253) donde se indican los fragmentos amplificados y secuenciados a partir del DNA genómico (F.4, F.5, F.6).....	56
<b>Figura 7.</b> Estructura de la región promotora del gen <i>CAST</i> (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253), y estrategia usada para el aislamiento de la misma....	59
<b>Figura 8.</b> Estructura cDNA del gen <i>CAST</i> ( <i>Bos taurus calpastatin</i> ( <i>CAST</i> ), transcript variant 1, mRNA: NM_001030318.), y estrategia de amplificación usada para el aislamiento de la longitud total del cDNA del gen <i>CAST</i> .....	61
<b>Figura 9.</b> Promedio y desviación estándar del esfuerzo a maduración intermedia de cada lote de cada experimento. Las barras verticales indican la desviación estándar.	89
<b>Figura 10.</b> Efecto del sexo sobre el esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> tras una maduración intermedia en la raza Parda de Montaña y Pirenaica. Las barras verticales indican el error estándar. Dentro de una raza, letras diferentes indican diferencias al $P < 0,05$ con corrección de Bonferroni.....	96
<b>Figura 11.</b> Efecto de la alimentación sobre el esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> tras una maduración intermedia. Las barras verticales indican el error estándar. Dentro de una raza, letras diferentes indican diferencias al $P < 0,05$ con corrección de Bonferroni.....	97

<b>Figura 12.</b> Efecto de los SNPs de <i>CAPN1</i> sobre el esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> tras una maduración intermedia de las razas Parda de Montaña y Pirenaica. Las barras verticales indican el error estándar. ....	98
<b>Figura 13.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW. El color y el número indican el valor D' (desequilibrio de ligamiento).....	103
<b>Figura 14.</b> Frecuencias genotípicas del SNP <i>CAST_2</i> de las razas Parda de Montaña, Pirenaica, Serrana de Teruel y de animales mestizos.....	108
<b>Figura 15.</b> Evolución del esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> a lo largo de la maduración según el manejo en la raza Parda de Montaña. En cada maduración, diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). ....	114
<b>Figura 16.</b> Evolución del esfuerzo medido en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> a lo largo de la maduración según el manejo en la raza Pirenaica. En cada maduración, diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). ....	116
<b>Figura 17.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW. El color representa el valor de D' (desequilibrio de ligamiento) (desde D' =1 (rojo) hasta D'=0 (blanco) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP.....	123
<b>Figura 18.</b> Frecuencia de los haplotipos estudiados en <i>CAPN1</i> . Se muestran los haplotipos con una frecuencia superior al 4%.....	124
<b>Figura 19.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW en la raza Parda de Montaña. El color representa el valor de D' (desequilibrio de ligamiento) (desde D'=1 (rojo) hasta D'=0 (blanco)) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP. ....	140
<b>Figura 20.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW en la raza Pirenaica. El color representa el valor de D' (desequilibrio de ligamiento) (desde D'=1 (rojo) hasta D'=0 (blanco)) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP. ....	141
<b>Figura 21.</b> Frecuencia de los haplotipos estudiados en la región 3'UTR de <i>CAST</i> en la raza Parda de Montaña y Pirenaica. Se muestran los haplotipos con una frecuencia superior al 1%. ....	142

<b>Figura 22.</b> Región 3'UTR de <i>CAST</i> que contiene los diferentes SNPs en la que aparecen los posibles sitios de unión para los miRNAs que sólo se encuentran presentes en alguno de los haplotipos. Entre paréntesis se indica el haplotipo en el que se uniría el miRNA.....	147
<b>Figura 23.</b> Fragmento de DNA amplificado para llevar los estudios de la actividad luciferasa. Los nucleótidos en rojo indican el codón stop. En naranja se indican los cebadores utilizados para amplificar el fragmento clonado. En verde se indican los cebadores utilizados para genotipar mediante secuenciación los diferentes polimorfismos. Los SNPs están indicados en rojo.....	148
<b>Figura 24.</b> Actividad luciferasa (URL) de los cuatro haplotipos más importantes descritos y del vector pmirGLO que no contiene la zona 3'UTR del gen que se ha incluido como control positivo. Diferentes letras indican diferencias al $P < 0,05$ .....	149
<b>Figura 25.</b> Representación esquemática de la región 5' proximal aislada de los transcritos I, II y III. Se indica en azul la región promotora aislada para cada transcrito. ....	155
<b>Figura 26.</b> Predicción de islas CpG mediante el software MethPrimer. Predicción en las regiones promotoras de los transcritos I (1xa) y II (1xb). Las regiones sombreadas en azul indican islas CpG. Las líneas rojas indican dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados.....	156
<b>Figura 27.</b> Predicción de islas CpG mediante el software MethPrimer. Predicción en la región promotora del transcrito III (exón 1u). Las regiones sombreadas en azul indican islas CpG. Las líneas rojas indican dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados. .	156
<b>Figura 28.</b> Frecuencias alélicas del microsatélite del gen <i>CAST</i> para las razas Parda de montaña y Pirenaica.....	161
<b>Figura 29.</b> Desequilibrio de ligamiento en la región. El color representa el valor de $D'$ (desde $D' = 1$ (rojo) hasta $D' = 0$ (blanco)) y la numeración indica el valor de $r^2$ . ....	164
<b>Figura 30.</b> Frecuencias haplotípicas de los SNPs <i>CAST_2</i> , <i>CAST_5</i> y el microsatélite del gen <i>CAST</i> . Se indican los haplotipos que presentan una frecuencia superior al 1% en alguna de las dos razas.....	165
<b>Figura 31.</b> Frecuencias haplotípicas del SNP <i>CAST_2</i> , y el microsatélite gen <i>CAST</i> ....	168

**Figura 32.** Contenido en grasa intramuscular según la alimentación y el sexo en la raza Parda de Montaña. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con corrección de Bonferroni. .... 179

**Figura 33.** Contenido en grasa intramuscular según la alimentación y el sexo en la raza Pirenaica. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). ..... 180

**Figura 34.** Localización del gen *CAPN1* en el genoma bovino versión UMD3.1..... 187



## Resumen



En la presente Tesis se ha estudiado el efecto de factores ambientales (raza, alimentación y sexo) y genéticos [poliformismos (SNPs) de los genes *Calpaína* (*CAPN1*) y *Calpastatina* (*CAST*)] sobre la dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis* de terneros, madurada durante distintos periodos. Además, se ha evaluado el efecto de dichos factores ambientales y genéticos (polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis, *CAPN1* y *CAST*) sobre el contenido de grasa intramuscular.

En el primer estudio (Capítulo I) se constató que la dureza de la carne madurada a un tiempo intermedio (7 días) procedente de terneros de raza Parda de Montaña y Pirenaica se vio afectada por el sexo y la alimentación. Ninguno de los 3 SNPs de *CAPN1* estudiados tuvieron efecto sobre la dureza de la carne. De los 5 SNPs de *CAST* estudiados, los SNPs rs110955059 (*CAST\_1*), rs210072660 (*CAST\_2*) y rs380750993 (*CAST\_4*) tuvieron efecto en la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña. Sólo el SNP *CAST\_2*, localizado en exón 7, produce un cambio aminoacídico, mientras que los otros 2 SNPs se localizan en regiones intrónicas del gen. Los estudios de asociación haplotípica corroboraron estos resultados, mostrando un alto desequilibrio de ligamiento en estos tres SNPs. Este SNP podría ser la mutación causal debido a su localización (exón 7) y a que causa una sustitución no conservativa en la secuencia aminoacídica (NM\_174003: p.Thr182Ala) en el dominio L de la proteína *CAST*, que podría afectar a la estabilidad del complejo calpaína-calpastatina influyendo en la concentración celular de calpaína libre. Ninguno de los SNPs de *CAST* tuvo efecto en la raza Pirenaica. Este SNP ha sido asociado, por primera vez, a la dureza de la carne.

En el segundo capítulo se incrementó el número de animales de ambas razas y se incluyeron medidas de la dureza de la carne a distintos tiempos de maduración (1 día: corta; 7 días: intermedia; y 14 días: larga). La dureza de la carne se vio afectada por el sexo, la alimentación y el tiempo de maduración de la carne en ambas razas. Los SNPs de *CAPN1* no afectaron a la dureza de la carne, excepto el SNP rs17872000 (*CAPN1\_3*) que presentó una tendencia en la raza Pirenaica. Los resultados obtenidos en el estudio de asociación individual de los SNPs y haplotípicos corroboran los efectos

## Resumen

encontrados en el estudio anterior con respecto al SNP rs210072660 (*CAST\_2*). Además, en la raza Pirenaica, se encontraron diferencias entre los genotipos del SNP rs109221039 (*CAST\_5*), aunque en el estudio haplotípico no ha podido descartar un efecto aditivo sobre la dureza de la carne de los SNPs rs210072660 (*CAST\_2*) y SNP rs109221039 (*CAST\_5*). El SNP rs109221039 (*CAST\_5*), está situado en la región 3'UTR del gen *CAST*. Esta región puede ser interesante por poseer sitios de unión a microRNAs (miRNAs) que regulan la transcripción y traducción del gen. Por este motivo, se realizó el estudio funcional de la región 3'UTR del gen *CAST*.

En el tercer capítulo, se estudió un fragmento de 375 pb de la región 3'UTR del gen *CAST*. Se detectó la presencia 11 SNPs, 8 previamente descritos y 3 no descritos hasta el momento. Los polimorfismos rs384811952 (*CAST\_8*) y rs379698624 (*CAST\_10*) afectaron a la dureza de la carne con maduración intermedia en la raza Parda de Montaña pero no en la maduración larga, aunque este efecto debe de ser tomado con cautela porque la frecuencia del alelo menos frecuente fue de 0,01. Los polimorfismos rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) y rs110607241 (*CAST\_12*) se asociaron a la dureza de la carne en la maduración intermedia y larga en la raza Pirenaica. Estos SNPs rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) se presentaron completamente ligados, mientras que estos con el rs110607241 (*CAST\_12*) presentaron un alto desequilibrio de ligamiento. Los estudios de asociación haplotípicos confirmaron las asociaciones individuales de los SNPs. A partir de los SNPs se eligieron 4 haplotipos que fueran los más frecuentes en las poblaciones estudiadas, y que además presentasen alelos alternativos para los SNPs rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) y rs110607241 (*CAST\_12*). En el estudio del efecto funcional de estos haplotipos, no se encontraron diferencias en la actividad luciferasa entre los mismos. Sin embargo, la actividad luciferasa de los 4 haplotipos fue un 30% inferior que la actividad del control, lo que hace pensar que la región 3'UTR del gen *CAST* es una zona activa.

En el cuarto capítulo, se estudió la región promotora del gen *CAST*. En total se aislaron 36 polimorfismos, de los cuales 9 se han aislado por primera vez. Debido a la

alta complejidad de la región, no se llevaron a cabo estudios de asociación entre los mismos y la dureza de la carne. Sólo se estudió la asociación de los alelos encontrados en el microsatélite CA rs479041025 en el promotor I y la dureza de la carne. El alelo 129 del microsatélite se asoció a la dureza de la carne en Parda de Montaña a tiempos de maduración intermedia, resultando significativa la comparación de 2 copias frente a 0 copias del alelo. Los efectos encontrados por el alelo 129 del microsatélite y el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) son muy similares y ambas mutaciones presentan un alto desequilibrio de ligamiento. De esta manera, no se ha podido descartar el posible efecto de otros SNPs encontrados en la región promotora del gen y en desequilibrio de ligamiento con el microsatélite y el SNP rs210072660 (*CAST\_2*), ni tampoco que el efecto detectado por el alelo 129 del microsatélite sea debido al SNP rs210072660 (*CAST\_2*).

En el quinto capítulo de la Tesis, se encontró que el contenido de grasa intramuscular de la carne se vio afectado por el sexo y la alimentación en ambas razas. En cuanto a los SNPs, no se encontraron asociaciones del contenido de grasa intramuscular con los SNPs de *la sintasa de los ácidos grasos (FASN)*, *proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)*, *acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)*, *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, *leptina (LEP)*, *tiroglobulina (TG)*, *receptor huérfano asociado al RAR- $\gamma$  (RORC)*, *CAPN1* y *CAST*, excepto en el SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) en la Parda de Montaña. Los animales con genotipo CT presentaron un menor contenido de grasa intramuscular que los de genotipo TT. Es posible que exista algún mecanismo mediante el cual el gen influye en el contenido de grasa intramuscular o bien este SNP podría estar en desequilibrio de ligamiento con el gen responsable del efecto sobre el contenido de grasa intramuscular.

Los resultados de la presente Tesis doctoral aportan información novedosa de utilidad en el ámbito de la investigación aplicada en bovino de carne, destacando el marcador genético rs210072660 (*CAST\_2*) que está siendo utilizado en el esquema de selección de la raza bovina Parda de Montaña.



# Abstract





In the present Thesis, the effects of breed, diet, gender and polymorphisms (SNPs) of *calpain* (*CAPN1*) and *calpastatin* (*CAST*) genes on toughness measured in the *Longissimus thoracis* muscle after different ageing periods were studied. Secondly, the effects of breed, diet, gender and SNPs of genes related with lipid metabolism and adipogenesis, and SNPs of *CAPN1* and *CAST* genes on intramuscular fat content were evaluated.

In the first chapter, meat toughness at intermediate ageing (7 days) of Parda de Montaña and Pirenaica cattle was affected by sex and diet. The association studies showed that none of the three polymorphisms of *CAPN1* had an effect on toughness. Toughness was affected by SNPs rs110955059 (*CAST\_1*), rs210072660 (*CAST\_2*) and rs380750993 (*CAST\_4*) in Parda de Montaña breed. The SNP *CAST\_2* is located in exon 7 and produces an amino acid change; whereas, the SNPs rs110955059 (*CAST\_1*) and rs380750993 (*CAST\_4*) are located in introns. The haplotype analysis supported these results, showing the SNPs rs110955059 (*CAST\_1*), rs210072660 (*CAST\_2*) and rs380750993 (*CAST\_4*) strong linkage disequilibrium. The SNP rs210072660 (*CAST\_2*) could be the causative mutation due to its location (exon 7) and because it produces a non - conservative amino acid substitution (NM\_174003: p.Thr182Ala) in the L domain of *CAST* protein, that could influence the stability of calpain-calpastatin complex affecting calpain concentration. None of the SNPs of *CAST* had effect on meat toughness in the Pirenaica breed. This is the first time the SNP *CAST\_2* has been associated with meat toughness.

In the second chapter, the number of animals of both breeds was increased and different ageing periods (1, 7 and 14 days *post-mortem*) were included. Meat toughness was affected by sex, diet and ageing in both breeds. None of the SNPs of *CAPN1* had effect on meat toughness, except for the SNP rs17872000 (*CAPN1\_3*) which tended to affect toughness in the Pirenaica cattle. The results of the association studies and haplotype analysis confirm the previous study in regard to SNP *CAST\_2*. The SNP rs109221039 (*CAST\_5*) was associated with meat toughness in Pirenaica breed. The additive effect of both SNPs on meat toughness could not be

## *Abstract*

discarded. The SNP rs109221039 (*CAST\_5*) was located in the 3'UTR region. This region could have putative binding sites of microRNAs (miRNAs) which regulate gene transcription and translation of the gene. For this reason, the functional effect of the 3'UTR region was studied.

In the third chapter, a 375bp fragment in the 3'UTR region of *CAST* gene was studied. Eleven polymorphisms were located in these fragment, three of them had not been described before. The SNPs rs384811952 (*CAST\_8*) and rs379698624 (*CAST\_10*) were associated with meat toughness at intermediate ageing in Parda de Montaña cattle. These results must be considered with caution due to the low minor allele frequency (0.01). The SNPs rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) and rs110607241 (*CAST\_12*) were associated with meat toughness at intermediate (7 days) and long (14 days) ageing in Pirenaica cattle. The SNPs rs109221039 (*CAST\_5*) and rs210861835 (*CAST\_7*) were completely linked, and both showed strong linkage disequilibrium with the SNP rs110607241 (*CAST\_12*). The association studies of haplotypes confirmed these results. For the functional study, the most frequent haplotypes with alternative allele for the SNPs rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) and rs110607241 (*CAST\_12*) were chosen. The functional study did not show differences between the luciferase activities of the haplotypes. However, their signal was 30% lower than that of the Control. It could be inferred that the 3'UTR of *CAST* gene is an active zone.

In the fourth chapter, the promoter region of the *CAST* gene was studied. Thirty-six polymorphisms were detected; nine of them had not been described before. Due to the high complexity of the promoter region, only the association of the microsatellite CA rs479041025 (located in promoter I) with meat toughness was studied. The 129 allele of the microsatellite was associated with meat toughness at intermediate ageing in Parda de Montaña cattle. Animals with 2 copies of allele 129 had meat tougher than animals with 0 copies. The effect of the allele 129 of the microsatellite and that of the SNP rs210072660 (*CAST\_2*) were very similar and both mutations showed strong linkage disequilibrium. Thereby, the possible effect of other

SNPs, described in the promoter region of the *CAST* gene that could be in linkage disequilibrium with both mutations could not be rejected. Also, it could not be clarified if the effect of the allele 129 of the microsatellite was due to the SNP rs210072660 (*CAST\_2*).

In the fifth chapter, intramuscular fat content was affected by sex and diet in Parda de Montaña and Pirenaica cattle. There was no association of intramuscular fat content with the SNPs of *fatty acid synthase (FASN)*, *fatty acid binding protein 4 (FABP4)*, *diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1)*, *stearoyl-CoA desaturase (SCD)*, *leptin (LEP)*, *thyroglobulin (TG)*, *RAR-related orphan receptor C (RORC)*, *CAPN1* and *CAST*. Only, the SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) was associated with intramuscular fat content in Parda de Montaña cattle. Animals with CT genotype showed less intramuscular fat content than animals with TT genotype. The SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) could influence somehow intramuscular fat content or the SNP could be in linkage disequilibrium with the SNP responsible for the effect on intramuscular fat content.

The results of the present study provide new information that could be beneficial in applied research on the beef industry. It is remarkable that the SNP rs210072660 (*CAST\_2*) is being used as a genetic marker in Parda de Montaña selection scheme.



# Antecedentes y Revisión Bibliográfica



## **1. Importancia del vacuno de carne**

En el año 2015, el sector vacuno representó el 6% de la Producción Final Agraria y el 16,49% de la Producción Final Ganadera en España. El sector vacuno de carne se encuentra en cuarta posición por detrás del sector porcino, lácteo y avícola en cuanto a importancia económica. Sin embargo, en el año 2013 fue el tercero en importancia económica, detrás del sector porcino y lácteo. El número de cabezas de vacuno ha ido disminuyendo progresivamente desde el año 2004 hasta el año 2013. Sin embargo, en los años 2014 y 2015 el censo ha aumentado hasta alcanzar 6.327.450 cabezas de ganado vacuno en enero de 2016 (SINTRAN, Sistema Integral de Trazabilidad Animal). Así, el número de animales sacrificados en el año 2015 fue de 2.352.835 cabezas, lo que supone un aumento del 7,9% respecto al año anterior según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2015). A pesar del incremento en la producción de carne de vacuno de los dos últimos años, el consumo de carne de vacuno siguió disminuyendo en 2015. Este descenso ha sido debido a la situación económica y a la variación de los hábitos de consumo. Según el Informe del consumo de alimentación, el consumo de carne fresca per cápita al año en 2015 fue de 5,69 kg. Aunque, como ya apuntaba Roncalés (1998), otra de las razones principales es la relación calidad/precio de este tipo de carnes.

En Aragón, el sector bovino de carne fue el tercer sector en importancia dentro de la Producción Final Agraria en el año 2015, representando el 15% de dicha Producción (Departamento de Desarrollo rural y Sostenibilidad, 2015). En 2015, Aragón se encontraba en el octavo puesto a nivel nacional con 331.758 cabezas de ganado bovino, representando un 5,37% del censo total de vacuno de España según el Instituto Aragonés de Estadística (IAEST, 2015). Además, en dicho año se sacrificaron 113.331 cabezas.

Aragón es una de las más importantes zonas de España de producción de vacuno de carne, fundamentalmente por su dedicación al cebo de terneros. Este cebo se produce principalmente en zonas del valle del Ebro. Sin embargo, han surgido cebaderos en las áreas de montaña del Pirineo, sobre todo de tipo cooperativo y

asociados a marcas comerciales. Esta iniciativa responde a la necesidad de los ganaderos de las explotaciones de vacas nodrizas de incrementar la competitividad de sus explotaciones, basada tanto en una producción de calidad, que garantice la salubridad del producto como el respeto del bienestar animal (Bernués *et al.*, 2003).

Esta Tesis se ha centrado en el estudio de las dos razas de vacuno más relevantes en Aragón, la raza Parda de Montaña y la raza Pirenaica. En diciembre de 2015, el censo total de animales de la raza Parda de Montaña era de 23.263 cabezas de ganado y un total de 403 ganaderías. El censo total para la raza Pirenaica fue de 2.106 animales y 48 ganaderías.

## **2. Importancia de la calidad de la carne de vacuno**

La calidad de la carne se puede definir en términos de seguridad (control de patógenos, toxinas, residuos), aspectos tecnológicos (maduración, envasado), sensoriales (terneza, jugosidad, sabor, color), dietéticos (composición química), de imagen (raza, sistema de producción, marca, denominación, etc.) (Geay *et al.*, 2001). Además, los consumidores también consideran importantes otras cuestiones tales como el bienestar animal, el respeto al medioambiente o la trazabilidad del producto (Hocquette *et al.*, 2005). Dentro de la calidad de la carne se pueden destacar tres atributos fundamentales: la dureza o la terneza, que es la característica organoléptica más importante para la mayoría de los consumidores, seguida de la jugosidad y el flavor (Ouali *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta que estos atributos son difíciles de evaluar antes de la compra, ya que no son visibles y son altamente variables (Verbeke *et al.*, 2010).

En este sentido, los consumidores cada vez son más conscientes de la importancia de la calidad de los alimentos que compra y de su relación con la salud, exigiendo un producto sano y de calidad. Concretamente, los consumidores de carne de vacuno buscan carne de una calidad elevada y constante. Su satisfacción está basada en la palatabilidad, es decir, en la combinación de sabor, jugosidad y terneza,



siendo esta última en la que más énfasis se ha hecho en las investigaciones internacionales (Ouali *et al.*, 2006). Porque:

1) Los consumidores consideran la ternera como el componente más importante de la carne (Miller, 1992).

2) Los consumidores pueden diferenciar la ternera y están dispuestos a pagar por ella (Boleman *et al.*, 1997).

3) La dureza/ternera es muy variable, más que la jugosidad y el sabor (Wheeler *et al.*, 1996).

4) Los consumidores pagan las piezas de carne de acuerdo a su expectativa de ternera (Koochmaraie *et al.*, 2000).

Dos de los caracteres complejos que intervienen en la calidad de la carne son los estudiados en esta Tesis: dureza y grasa intramuscular.

La dureza de la carne es una medida objetiva e instrumental que se define como la resistencia de la carne a ser cortada mientras que la ternera de la carne es una medida subjetiva que se define, como la dificultad o la facilidad con la que una carne se puede cortar o masticar. La dureza de la carne está influida por múltiples factores, que además interactúan entre ellos, como son: el manejo, la raza, el genotipo, la alimentación, el manejo previo al sacrificio y el aturrido, el método de sacrificio y el método de enfriamiento y conservación de la canal (Andersen *et al.*, 2005).

El contenido de grasa intramuscular afecta a la calidad de la carne por su influencia positiva sobre el flavor, la jugosidad y la ternera (Hocquette *et al.*, 2010). Así, niveles muy bajos de engrasamiento dan lugar a carnes poco sabrosas y poco jugosas. La grasa intramuscular contribuye entre un 10 y un 15% a la variación de la palatabilidad (Dikeman, 1987), la cual puede verse comprometida si el contenido de grasa es menor al 3%, pero mejora cuando los niveles de grasa intramuscular aumentan del 3% al 6% (Savell y Cross, 1988). Es un carácter de gran interés en la producción de carne de vacuno por su importancia económica (Hocquette *et al.*,

2007). Sin embargo, la cantidad de grasa intramuscular demandada por parte de los consumidores difiere entre países. Por ejemplo, los consumidores de Estados Unidos y Japón demandan carne con elevada cantidad de grasa intramuscular mientras que los de los países europeos demandan carne con baja cantidad de grasa intramuscular porque la asocian con la incidencia de ciertas enfermedades. La cantidad de grasa intramuscular también depende del manejo, la raza, el genotipo y la alimentación entre otros factores (Christensen *et al.*, 2011; Van Elswyk y McNeill, 2014).

Por lo tanto, la dureza y el contenido en grasa intramuscular de la carne dependen de factores ambientales y genéticos. A nivel genético, se considera que la herencia de ambos caracteres sigue un modelo genético aditivo, o sea que influyen en el carácter un número elevado de genes. En la actualidad, existen estudios que señalan la heredabilidad de estos fenotipos como moderada para el carácter de la dureza (0,22; Marshall, 1999) y media-alta para el contenido de grasa intramuscular de la carne (0,37; Ríos-Utrera y Van Vleck, 2004)), y que su expresión a nivel fenotípico presenta diferencias entre razas. Estos valores de heredabilidad muestran buenas posibilidades de avance en programas de selección con información sobre méritos genéticos de los reproductores basados en el control de rendimientos de la progenie. Sin embargo, para las características de rendimiento y calidad de la canal y de la carne, el progreso de mejora genética es limitado debido a que la recogida de información es difícil y costosa, observando los resultados en las siguientes generaciones.

Con estos antecedentes se hace necesario por tanto, el desarrollo de estrategias que, además de incrementar la calidad de la carne, permitan a los productores mantener una posición competitiva en el mercado, merced al valor añadido de producciones diferenciadas. Una de estas estrategias propuestas por la FAIP (Farm Animal Industrial Plattform, 2003) para lograr estos fines es incorporar la genómica a los esquemas de selección de las razas. La genómica es capaz de generar nuevas hipótesis biológicas que pueden ser estudiadas en más detalle. Esto tendrá un impacto en la caracterización de caracteres complejos, que están afectados por

interacciones entre distintos genes generalmente con pequeños efectos sobre los mismos. Una vez identificados los polimorfismos localizados en genes de interés y confirmado el efecto de los genes en las poblaciones de bovino analizadas, el genotipo de los mismos podrá incluirse en los diferentes catálogos de sementales, incrementando el valor del semental, y realizando selección asistida por marcadores para determinadas líneas de animales.

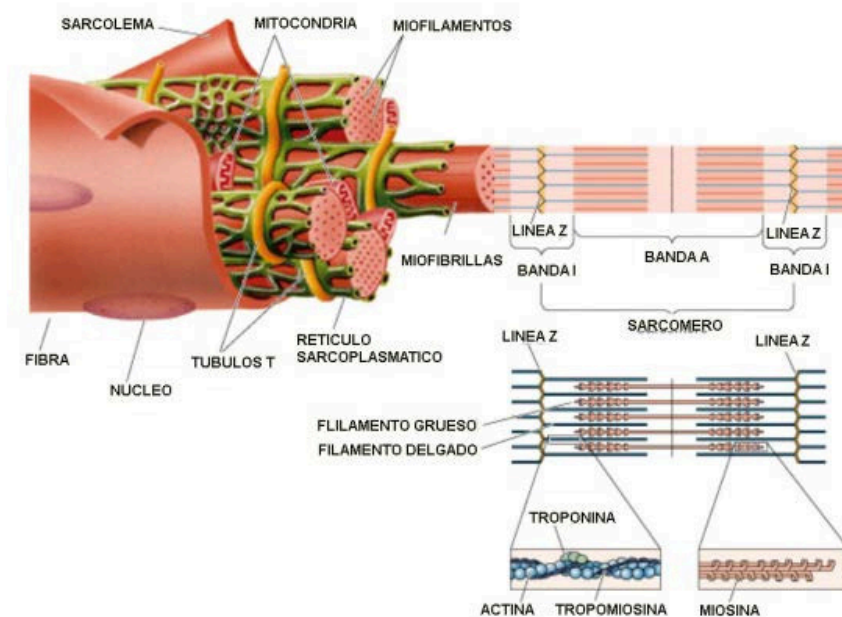
### **3. Estructura del músculo**

El tejido muscular esquelético estriado se fija a los huesos y se encarga del movimiento del esqueleto y del mantenimiento de la postura.

En el músculo esquelético cada célula muscular denominada fibra muscular, es un sincitio multinucleado. Se mantienen juntas gracias al tejido conjuntivo. El endomisio rodea a las fibras musculares individuales. El perimisio rodea a un grupo de fibras para formar un haz o fascículo. El epimisio es la vaina de tejido conjuntivo que rodea todo el conjunto de fascículos que forman el músculo. La subunidad estructural y funcional de la fibra muscular es la miofibrilla, que a su vez está compuesta por haces de miofilamentos. Existen dos tipos de miofilamentos, filamentos gruesos de miosina y filamentos finos de actina F, y sus proteínas asociadas tropomiosina y troponina. Los haces de miofilamentos están rodeados por un retículo endoplásmico liso (retículo sarcoplasmático) (Ross y Pawlina, 2007) (Figura 1).

La actina, la miosina, las troponinas y la tropomiosina son las principales proteínas miofibrilares. La actina representa el 25% del peso de las proteínas miofibrilares y tiene aproximadamente una masa de 43 kDa. (Murray *et al.*, 1990). La forma básica de la actina es la actina G, que es una cadena lineal delgada. Dos cadenas de actina G se polimerizan en una doble hélice lineal que en conjunto se denomina actina F. La tropomiosina es una molécula fibrosa lineal bicatenaria que se adhiere al surco de la hélice que forman las dos actinas G cuando se agrupan en la

forma actina F. A la tropomiosina se le unen a su vez las troponinas llamadas TnT, TnI y TnC. La fracción TnI interactúa con la miosina y la TnC tiene la capacidad de ligar calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La miosina constituye un 55% de la proteína miofibrilar y es un hexámero lineal asimétrico de unos 46 kDa. La miosina está constituida por dos filamentos gruesos y fibrosos de cabeza globular entrelazados en una doble hélice. La parte globular de la proteína puede interactuar con el ATP y la parte lineal se une a la actina F (Chacón, 2004).



**Figura 1.** Organización de la fibra muscular. Fuente: Adaptado de Ross y Pawlina (2007).

Las estriaciones transversales son la característica histológica del músculo estriado, apreciándose alternadas al microscopio de contraste de fase, unas bandas más claras (bandas I) y unas más oscuras (bandas A). Ambas bandas están divididas en dos mitades, estando la banda I dividida por una línea densa llamada línea Z. El sarcómero es la unidad contráctil básica del músculo estriado y está ubicado entre las dos líneas Z. Los filamentos gruesos de miosina están ubicados en la porción central del sarcómero (banda A) y los filamentos finos se fijan a la línea Z y se extienden dentro de la banda A hasta el borde de la banda H. Las porciones de dos sarcómeros

ubicadas a cada lado de la línea Z constituyen la banda I y sólo contienen filamentos finos (Ross y Pawlina, 2007) (Figura 1).

La grasa intramuscular es la grasa que se encuentra en el músculo. Químicamente, la grasa intramuscular es la suma de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol. La mayor parte de los fosfolípidos se encuentran en las membranas celulares. Los triglicéridos son la principal forma de reserva energética (Hocquette *et al.*, 2010). La grasa intramuscular depositada entre los fascículos de las fibras interrumpe la estructura del endomisio, separando y diluyendo las fibras de colágeno y desorganizando la estructura intramuscular del tejido conectivo lo que contribuye a reducir la dureza. Sin embargo, este mecanismo ocurre únicamente en músculos muy engrasados (Nishimura *et al.*, 1999). Este mecanismo es especialmente importante en la carne de animales más adultos que contienen un alto porcentaje de grasa intramuscular y mayor número de enlaces de colágeno, que son desfavorables para la terneza (Webb y O'neill, 2008).

#### **4. Dureza de la carne**

La dureza de la carne se define, como la dificultad o la facilidad con la que una carne se puede cortar. Los consumidores la consideran como la característica más importante de la calidad de la carne (Destefanis *et al.*, 2008; Koohmaraie, 1996; Koohmaraie y Geesink, 2006; Miller *et al.*, 2001), estando dispuestos a pagar precios superiores por carne de vacuno en la que se garantice la terneza de la misma (Feldkamp *et al.*, 2005; Lusk *et al.*, 2001; Shackelford *et al.*, 2001).

La dureza tiene dos componentes principales: el componente que resulta de las características del tejido conectivo (mayoritariamente, contenido y solubilidad del colágeno) y el componente miofibrilar. Este último componente está ligado estrechamente con las características de la fibra que controlan la fase de tenderización (proceso por el cual la carne se vuelve tierna). Esta fase se caracteriza por la proteólisis que tiene lugar *post mortem*, en el proceso biológico implicado en la

conversión de músculo a carne (Maltin *et al.*, 2003). El proceso de tenderización de la carne es complejo y depende de múltiples factores, incluyendo factores *ante mortem* (edad, raza, sexo, alimentación, estrés previo al sacrificio...) y *post mortem* (temperatura de enfriamiento, tiempo de maduración, envasado...) e interacciones entre ellos (Destefanis *et al.*, 2008). Lo que supone una falta de homogeneidad en el producto cárnico final.

Asimismo, el control genético del carácter dureza tiene una contribución relevante sobre la variabilidad total del carácter, tanto dentro de una raza, como entre razas (Crouse *et al.*, 1989; Koohmaraie, 1992a, b; Wheeler *et al.*, 1995). Sin embargo, existen análisis que indican que los factores genéticos y ambientales contribuyen de igual manera en la variación de la dureza (Wheeler *et al.*, 1995). Diversos estudios han encontrado que la heredabilidad del carácter es de 0,30 (Koch *et al.*, 1982). Esto implica que el 70% de la variación se explica por factores ambientales y los efectos no aditivos de los genes (dominancia y epistasia) (Odeh, 2003). Por otro lado, Shackelford *et al.* (1994) explican que aproximadamente el 65% de la variación de la dureza entre razas del ganado vacuno se debe a efectos genéticos y un 35% a efectos ambientales. Esto implica que puede ser controlada por factores ambientales como el tiempo de engorde, la energía de la dieta, el estrés, el enfriamiento de la canal, la maduración en cámara de frío, el método de cocción, etc., y finalmente por variantes genéticas asociadas al carácter dureza.

#### **4.1. Conversión del músculo en carne**

El proceso de conversión del músculo en carne se divide en tres fases (Sentandreu *et al.*, 2002):

La fase pre-rigor (30 minutos *post mortem*), durante la cual el músculo permanece excitable y se corresponde con la fase de supervivencia del sistema nervioso (Chrystall y Devine, 1985).

La fase de rigor, en el que los componentes energéticos (ATP, glucógeno) se agotan, y que puede ser altamente variable dependiendo del tipo de músculo,

especie animal y condiciones de enfriamiento de la canal. En esta fase finaliza el aporte de oxígeno y nutrientes al músculo y esto da como resultado un cambio a un metabolismo anaerobio. El pH muscular desciende a consecuencia de la acumulación de ácido láctico, llegando a valores de 5,5 – 5,6 entre las 16 y 36 h *post mortem* (Honikel, 2004). La desaparición del ATP que mantiene la integridad estructural del músculo provoca una despolarización de las membranas lo que ocasiona la salida de  $Ca^{+2}$  del retículo sarcoplásmico al espacio miofibrilar. Como consecuencia, se produce la formación del complejo actina-miosina que da lugar al acortamiento permanente del sarcómero, dando lugar a una tensión y rigidez muscular que conduce a la instauración del *rigor mortis* (Koochmaraie, 1996).

La última fase post-rigor, de maduración o tenderización de la carne, se produce un debilitamiento de la estructura miofibrilar.

#### **4.1.1. Proceso de tenderización**

El proceso natural de tenderización, por el cual la carne se ablanda, es complejo. La dureza de la carne depende de la arquitectura e integridad de las células del músculo esquelético, de la actividad de las proteasas endógenas en la célula y de la matriz extracelular (McCormick, 2009).

En esta fase se produce la degradación de las proteínas responsables del mantenimiento de la integridad de la estructura del músculo, por acción de enzimas proteolíticas endógenas. Se observan entre otros los siguientes cambios: debilitamiento o degradación de los discos Z, degradación de la proteína desmina quizá debido a la ruptura de puentes entre las miofibrillas, degradación de la proteína titina que liga los filamentos de miosina en el sentido longitudinal de las miofibrillas y degradación de la proteína nebulina, responsable de las uniones transversales en la banda I de los sarcómeros (Goll *et al.*, 1998).

La tenderización se considera como un proceso multi-enzimático en el que están implicados varios sistemas proteolíticos (Ouali *et al.*, 2006). Las principales proteínas que intervienen en el proceso de tenderización van a ser descritas a continuación.

#### **4.1.2. Papel de las proteínas que intervienen en el proceso de tenderización**

##### **Catepsinas**

Las catepsinas son un grupo de enzimas compuesto tanto por endo- como exopeptidasas localizadas principalmente en los lisosomas (De Duve *et al.*, 1955). Fue el primer sistema enzimático que se relacionó con el mecanismo *post mortem* de la tenderización. Se han identificado más de 15 catepsinas lisosomales, pero sólo 8 (B, L, H, S, F, K, D, E) se han encontrado en el músculo esquelético (Barnier, 1995).

A pesar de los primeros indicios que las relacionaban con la tenderización de la carne, estudios posteriores no las han considerado importantes por su localización y su limitado acceso al sustrato. Los lisosomas son incapaces de envolver la estructura miofibrilar y no se han encontrado fragmentos miofibrilares en los lisosomas (Hui, 2012). Sin embargo, no puede descartarse su contribución en el proceso de proteólisis *post mortem*. Se ha descrito que la catepsina B degrada la miosina y en menor grado la actina. La catepsina L actúa sobre la miosina, actina,  $\alpha$ -actinina, troponina-T y troponina-I. Y la catepsina H actúa sobre la miosina (Allen y Goll, 2003).

##### **Proteasomas**

Los proteasomas fueron descubiertos por Wilk y Orłowski (1980). Los proteasomas son un complejo multicatalítico con actividad proteasa que están involucrados en la regulación de multitud de procesos celulares, mediante la degradación de proteínas en el citosol y núcleo (Coux *et al.*, 1996). Los proteasomas se expresan en el músculo esquelético y son capaces de causar la proteólisis de las miofibrillas (Robert *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1995) hasta 7 días *post mortem* a pH inferiores a 6 (Lamare *et al.*, 2002). Sin embargo, el papel de los proteasomas en la tenderización de la carne todavía no está claro. Aunque se ha demostrado que su actividad proteolítica *in vitro* parece no ser la misma que en el músculo en la etapa *post mortem* (Juárez *et al.*, 2012a).



## Caspasas

Las caspasas son proteasas cisteína-aspartato específicas que están implicadas en la rotura de la proteína muscular. Se han asociado al establecimiento efectivo de la apoptosis relacionado con el proceso de tenderización (Lepetit y Culioli, 1994).

El papel de las caspasas en la apoptosis, que se produce en la etapa *post mortem*, todavía está en estudio (Ouali *et al.*, 2006). Underwood *et al.* (2008) examinaron la actividad de la caspasa 3 durante la maduración *post mortem* y aunque ésta estaba activa, no se encontró correlación con la dureza del músculo.

Las caspasas pueden influir en la proteólisis *post mortem* a través de su interacción con el sistema calpaína – calpastatina, ya que este sistema puede regular negativamente la actividad de las caspasas. Por otro lado, las caspasas regulan de manera positiva e indirecta la actividad del sistema calpaína mediante la disminución de la capacidad de unión entre calpastatina y calpaína (Neumar *et al.*, 2003).

## Chaperonas o proteínas HSP

Las chaperonas, o proteínas HSP (por sus siglas en inglés Heat Shock Proteins), juegan un papel crucial en las células, no sólo protegiendo del deterioro al resto de proteínas celulares, sino también reparando las proteínas dañadas, e inhibiendo las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis (Gotoh *et al.*, 2004).

Varias HSP han sido identificadas como marcadores asociados a la ternura de la carne: Hsp40, Hsp20, Hsp27, Hsp60, Hsp70-1A/B, Hsp70-8, Hsp70-Grp75 y HspB5 codificadas por los genes *DNAJA1*, *HSPB6*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1B*, *HSPA8*, *HSPA9* y *CRYAB*, respectivamente (Picard *et al.*, 2015). Entre ellas destaca la expresión del gen *DNAJA1* que está inversamente relacionada con la ternura de la carne en vacuno evaluada mediante análisis sensorial (Bernard *et al.*, 2007b). Este gen codifica la Hsp40 que es una co-chaperona de la Hsp70, que inhibe la apoptosis (Gotoh *et al.*, 2004). Diversos estudios han mostrado las propiedades anti-apoptóticas de Hsp40, Hsp70 y Hsp27, asociando bajos niveles de expresión de los mismos a un incremento de la dureza de la carne, facilitando la muerte celular y la actividad de las caspasas

durante el periodo *post mortem* (Bernard *et al.*, 2007a; Bjarnadóttir *et al.*, 2010; Bjarnadóttir *et al.*, 2011). Sin embargo, son necesarios más estudios para saber si las HSP son únicamente indicadores de la proteólisis *post mortem* y la tenderización de la carne o si tiene un papel mecánico en el proceso de maduración (Hui, 2012).

### **Sistema calpaína-calpastatina**

Este sistema está formado por unas proteasas calcio-dependientes que fueron descritas por primera vez en cerebro de rata por Guroff (1964). Es un sistema formado por varias enzimas, de las cuales las más estudiadas son  $\mu$ - y m-calpaína, y su inhibidor endógeno, la calpastatina. A continuación describiremos las principales características de este complejo, estudiado en la presente Tesis doctoral.

#### **4.1.3. Sistema calpaína-calpastatina**

##### **Calpaína**

La calpaína (*CAPN1*) es una enzima proteolítica, encargada de degradar las proteínas musculares durante la etapa de maduración *post mortem*. Existen varias isoformas de la enzima calpaína, las dos mejor caracterizadas son calpaína 1 o  $\mu$ -calpaína y calpaína 2 o m-calpaína. Estas isoformas requieren la presencia de calcio para su actividad. De manera general,  $\mu$ -calpaína requiere concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  micromolares (10 - 50  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ) para que tenga actividad completa. Mientras que m-calpaína se activa con 0,3 – 1,0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Hui, 2012).

Ambas isoformas son heterodímeros compuestos por dos subunidades de 80kDa y 28kDa (Suzuki, 1990). La subunidad pequeña es idéntica en ambas y está dividida en los dominios V y VI. No se conoce la función exacta de esta subunidad. La subunidad grande de ambas isoformas está compuesta por cuatro dominios (I, II, III Y IV) y tiene función catalítica (Figura 2).



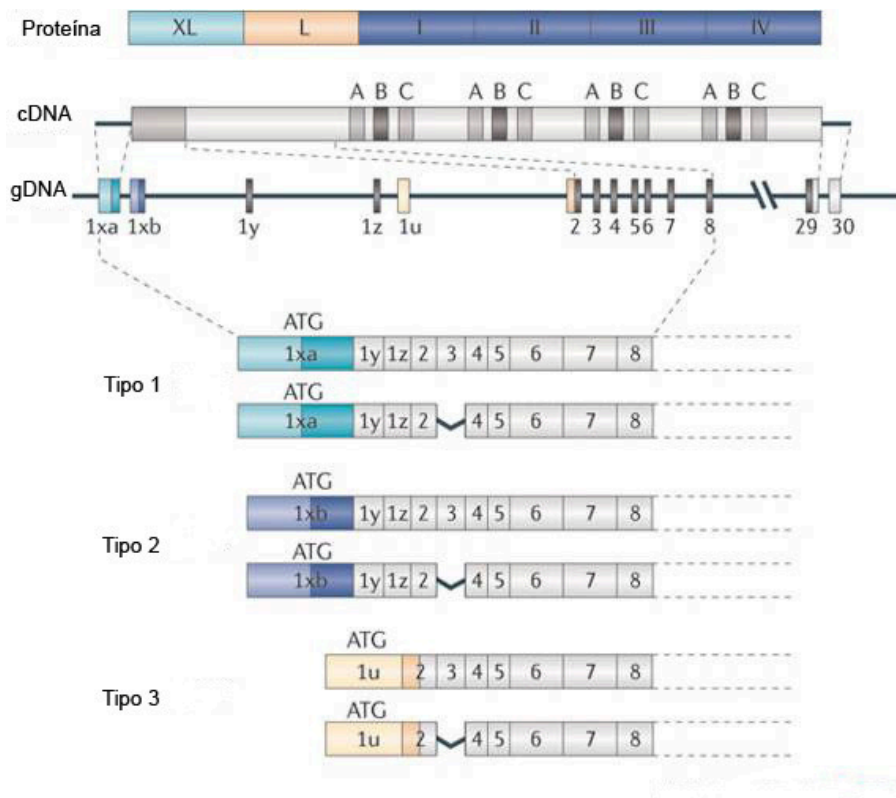
**Figura 2.** Dominios de la subunidad 80kDa del heterodímero de la proteína calpaína (CAPN1). Fuente: Adaptado de Braun y Gautel (2011).

El dominio II es el que contiene la triada catalítica Cys-His-Arg y es el dominio proteolítico. Aunque otros estudios han demostrado que el dominio II puede no presentar actividad proteolítica por sí mismo (Nishimura y Goll, 1991). Esto sugiere que la actividad proteolítica de esta enzima puede depender de regiones de la molécula que estén más alejados del sitio activo (Strobl *et al.*, 2000). El Dominio III no es homólogo a ninguna otra proteína, está unido al dominio catalítico (dominio II) y al dominio responsable de la unión con el  $\text{Ca}^{2+}$  (dominio IV), y puede estar implicado en la unión con fosfolípidos (Tompa *et al.*, 2001) y en la regulación de la actividad de la calpaína debido a su participación en interacciones electrostáticas (Strobl *et al.*, 2000). Los dominios IV y VI contienen las cinco manos-EF en donde puede unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ . Una mano-EF es un dominio estructural de proteínas del tipo hélice-bucle-hélice, que se encuentra en un gran número de proteínas que se unen al calcio. Consta de dos hélices  $\alpha$  (hélice E y hélice F) unidas por una región corta de aproximadamente doce aminoácidos, formando la zona de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (McKee y McKee, 2003).

Los efectos de la enzima calpaína en las miofibrillas del músculo durante el proceso de tenderización se conocen bastante bien. Al principio, la calpaína contribuye a la eliminación de las miofibrillas en la línea  $\text{N}_2$  (estructura paralela a la línea Z). Después, elimina la línea Z que desaparece en su totalidad. La eliminación de la línea Z causa la degradación de las miofibrillas. La calpaína libera la  $\alpha$ -actina de la línea Z sin provocar su degradación, tampoco causa la degradación de la actina, ni de la miosina. Sin embargo, esto provoca la degradación de tropomiosina, troponina I y T y de proteínas del citoesqueleto como titina, desmina, nebulina o vinculina (Kemp *et al.*, 2010; Koohmaraie y Geesink, 2006).

### Calpastatina

La calpastatina (CAST) es un inhibidor endógeno de las proteinasas  $\mu$ -calpaína y m-calpaína. La calpastatina aislada de músculo esquelético de bovino tiene 706 aminoácidos (Killefer y Koohmaraie, 1994). La proteína está organizada en cuatro dominios inhibitorios (I, II, III y IV) de aproximadamente 140 aminoácidos cada uno y un dominio NH<sub>2</sub>-terminal, que se denomina dominio L. Este dominio L no tiene actividad inhibitoria pero determina la localización de la calpastatina en la célula (De Tullio *et al.*, 2009) (Figura 3). La calpastatina aislada en hígado y corazón bovino tiene un dominio más, denominado región XL, el cual está formado por 68 aminoácidos (Cong *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Dominios, subdominios y isoformas del gen *calpastatina* (CAST). Fuente: Adaptado de Storr *et al.* (2011).

En cada dominio inhibitorio hay tres subdominios A, B y C (Maki *et al.*, 1988; Uemori *et al.*, 1990). Los subdominios A y C interactúan con la calpaína en dos sitios

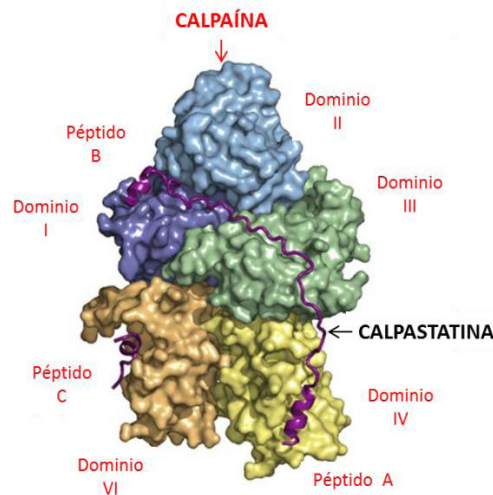
separados entre sí, enrollándose alrededor de la calpaína y causando su inhibición (Figura 4). El subdominio B, entonces, bloquea el sitio activo de la calpaína. Aunque el papel inhibitorio del subdominio B parece claro, el mecanismo por el cual ejerce su efecto no lo está. Cada subdominio está codificado por un solo exón y cada dominio está codificado por cuatro exones; tres codifican los subdominios y un cuarto codifica la parte final del subdominio C (Maki *et al.*, 1989) (Figura 3).

Existen 4 isoformas de la calpastatina en la especie bovina, denominadas tipo I, II, III y IV. Las tres primeras han sido aisladas en el músculo esquelético, en el cardíaco y en el hígado. La isoforma tipo IV sólo ha sido aislada en testículo (Goll *et al.*, 2003). Estas isoformas son el resultado de la existencia de diferentes promotores y mecanismos de *splicing* o empalme alternativo en el dominio L (Wendt *et al.*, 2004). La calpastatina presenta cuatro promotores, que se localizan en el extremo 5' de los exones 1xa, 1xb, 1u y 14t, a partir de los cuales se sintetizan las isoformas I, II, III y IV, respectivamente (Raynaud *et al.*, 2005) (Figura 3).

La diferencia entre la actividad transcripcional de los promotores del gen de la *calpastatina* entre especies y su diferente respuesta a estímulos es probablemente debida en parte a la variación en la expresión del gen entre especies, razas e individuos y que por lo tanto contribuirá a la variación en la dureza de la carne (Kemp *et al.*, 2010).

### **Unión calpaína-calpastatina**

Una molécula de calpastatina puede inhibir a cuatro moléculas de calpaína en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cong *et al.*, 1998). Este ion es esencial para que esta interacción se produzca, ya que en presencia del mismo se forman  $\alpha$ -hélices en los subdominios A y C de la calpastatina (Yang *et al.*, 1994). Los subdominios A y C de la calpastatina interaccionan con los dominios IV Y VI de las calpaínas, respectivamente. Así, el subdominio B de la calpastatina queda próximo al sitio activo de las calpaínas (dominios I y II) bloqueando el acceso de los sustratos al mismo (Figura 4) (Kiss *et al.*, 2008; Pfizer *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Unión de la calpastatina a la calpaína. Fuente: Adaptado de <http://pldserver1.biochem.queensu.ca/calpain/calpains.shtml>.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula modifica la localización intracelular de la calpaína, que se encuentra de forma difusa en el citosol, y de la calpastatina, que se acumula cerca del núcleo en estructuras granulares sin membranas. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a las calpaínas, provocando que éstas se asocien a la cara interna de la membrana plasmática para captar más  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio, la calpastatina difunde al citosol contrarrestando el efecto proteolítico de las calpaínas (De Tullio *et al.*, 1999).

#### 4.2. Factores que influyen en la dureza de la carne

Existe un gran número de factores a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta que el alimento es consumido, que hacen variar la dureza de la carne. Tal y como se ha explicado con anterioridad, la dureza de la carne depende de factores ambientales y genéticos. De los factores ambientales, hay factores intrínsecos y extrínsecos al animal. Los factores intrínsecos, propios del animal, son la raza, la edad, el sexo o la especie. Al grupo de factores extrínsecos pertenecen la alimentación, el sistema de producción, el estado sanitario de los animales, el estrés o bienestar animal, el manejo previo, durante y posterior al faenado de la canal, pH, tiempo y temperatura de refrigeración de maduración de la

canal, maduración de la carne o el modo de cocinado. En este apartado abordaremos algunos de los más importantes que han sido estudiados en la presente Tesis doctoral, centrándonos principalmente en los aspectos genéticos que son la base principal de trabajo de esta Tesis.

#### 4.2.1. Raza

Existe un gran número de razas de ganado bovino de origen europeo (*Bos taurus*) dedicado a la producción de carne. Estas razas han sido una gran fuente de diversidad genética y se han utilizado para el cruzamiento entre ellas (Albertí *et al.*, 2008). En un estudio llevado a cabo en terneros de 15 razas europeas se encontró una variación en la dureza de la carne entre razas desde 43,8 hasta 67,4 N/cm<sup>2</sup> medida en el músculo *Longissimus thoracis*. Las razas con los mayores valores de dureza son Simmental, Highland y Marchigiana, y las razas con los menores valores de dureza Avileña-Negra Ibérica, Charolesa, Casina y Pirenaica (Christensen *et al.*, 2011). Dichas diferencias entre razas fueron atribuidas a probables diferencias en el colágeno total, colágeno insoluble y proporción de tipos de fibras. En este sentido, si clasificamos las razas según su precocidad, las razas precoces presentan un mayor contenido de colágeno insoluble y por tanto, muestran una carne más dura que las razas más tardía (Sañudo *et al.*, 1998).

Por otro lado, a nivel enzimático, se han observado diferencias entre razas en cuanto a la degradación proteica del músculo, que sugieren que la actividad enzimática difiere según la raza (Marino *et al.*, 2013).

#### 4.2.2. Sexo

El efecto del sexo (machos vs. hembras o castrados) sobre la dureza de la carne no está claro, tal y como apuntan las revisiones realizadas por Field (1971) y Seideman *et al.* (1982). En estudios más recientes que comparan hembras con machos, la carne de las hembras es más tierna que la de los machos (Bureš y Bartoň, 2012; Mberema *et al.*, 2016; Velik *et al.*, 2008; Węglarz, 2010). Por el contrario, no encontraron diferencias en la dureza de la carne madurada 7 - 8 días de machos

castrados y enteros (Monteiro *et al.*, 2014; Prado *et al.*, 2014). Cuando se compararon hembras con machos castrados no se encontró asociación entre el sexo y la dureza de la carne (Gruber *et al.*, 2011). Estas diferencias entre estudios podría deberse a la utilización de animales de diferentes razas, pesos, dietas y sistemas de manejo.

Las diferencias en dureza entre sexos podría deberse al contenido en colágeno total y insoluble del músculo. Los machos tiene una cantidad de colágeno significativamente superior a las de los machos castrados y hembras (Modzelewska-Kapituła y Nogalski, 2014; Zhang *et al.*, 2010), por el efecto anabólico de la testosterona en la síntesis del colágeno (Boccard *et al.*, 1979; Gerrard *et al.*, 1987). Según Modzelewska-Kapituła y Nogalski (2014), los músculos de los machos muestran un mayor contenido de colágeno insoluble que los castrados, lo que indica un mayor número de enlaces intermoleculares entre las cadenas de polipéptidos que forman el colágeno, que se ha demostrado que tienen un gran impacto sobre la dureza de la carne (Jeremiah *et al.*, 2003; Torrescano *et al.*, 2003).

#### **4.2.3. Alimentación**

La alimentación es uno de los factores que más influye en la calidad de la carne por tener un efecto regulador sobre los procesos biológicos que tienen lugar en el músculo y que finalmente determinarán la calidad del producto (Andersen *et al.*, 2005). Sin embargo, existe una gran controversia sobre el efecto de la alimentación en la dureza. Según Muir *et al.* (1998), tanto el tipo de alimento como el nivel de alimentación pueden afectar a la dureza de la carne. El acabado del vacuno en pasto puede producir una carne más dura que si el acabado es con concentrado (Bennett *et al.*, 1995; Hedrick *et al.*, 1983; Mitchell *et al.*, 1991). Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias en la medida de la dureza de la carne entre la alimentación de pasto y pienso cuando los animales se sacrifican a edad y engrasamiento similar (Blanco *et al.*, 2010; Duckett *et al.*, 2007; Latimori *et al.*, 2008; Realini *et al.*, 2004). De manera similar, Muir *et al.* (1998) en una revisión concluyeron que si los animales son sacrificados a pesos similares es posible que no se observen diferencias de la dureza. Andersen *et al.* (2005) relacionaron el descenso en la tasa de degradación proteica



con un posible incremento de la dureza de la carne, probablemente relacionado con el nivel de alimentación.

#### **4.2.4. pH**

El pH final de la carne es consecuencia de la depleción muscular de la reserva de glucógeno previa al sacrificio y afecta a la calidad de la carne. Se han descrito varios factores de estrés como responsables de la depleción de glucógeno: tiempo y manejo durante el transporte de los animales de la granja al matadero, mezcla de diferentes lotes, tiempo de espera, factores climáticos, condiciones patológicas y factores genéticos (Silva *et al.*, 1999). El pH final puede afectar a la calidad de la carne, así como a la dureza (Purchas y Aungsupakorn, 1993). Varios autores han demostrado que tanto a valores bajos de pH final como a valores altos, la carne es más tierna que las muestras que presentan pH finales intermedios (Jeleníková *et al.*, 2008; Pulford *et al.*, 2008). Aunque otros autores han descrito una relación lineal entre dureza y pH (Silva *et al.*, 1999). Además, existe un efecto directo del pH sobre la actividad de la calpaína y calpastatina (Hwang y Thompson, 2001; Sierra *et al.*, 2012).

#### **4.2.5. Edad/desarrollo**

La dureza de la carne aumenta con la edad del animal, en especial cuando se han estudiado rangos de edad muy amplios que abarcan de pocos meses a varios años (Hiner y Hankins, 1950; Shorthose y Harris, 1990; Tuma *et al.*, 1962). Sin embargo, existen estudios en los que no se han encontrado diferencias entre grupos de animales de diferente edad (Koochmaraie *et al.*, 1995; Riley *et al.*, 1986; Shackelford y Koochmaraie, 1995). Se ha atribuido el incremento de dureza al aumento del contenido total de colágeno y una disminución del colágeno soluble (Reagan *et al.*, 1976). Pero la evolución del colágeno no es clara con la edad (Boccard *et al.*, 1995), la evolución del colágeno total e insoluble depende del grado de madurez del animal y difiere según el tipo de raza estudiado (rústicas vs. especializadas) (Blanco *et al.*, 2013). Podría ser que el tipo de enlaces de colágeno afectasen a la dureza de la carne (Purslow, 2005).

La variación de la dureza de la carne con la edad puede explicarse por el gran número de factores que interaccionan con la edad cronológica del animal. Dependiendo de la raza, el sexo o el sistema de producción, los animales muestran diferente tasa de crecimiento, por lo que animales con edades similares pueden reflejar diferentes grados de madurez (Juárez *et al.*, 2012a).

#### **4.2.6. Maduración**

La maduración de la carne ha sido descrita como uno de los factores *post mortem* más importantes (Juárez *et al.*, 2012a). En este sentido, Juárez *et al.* (2012b) señalaron que aproximadamente el 60% de la variabilidad en la dureza de la carne es debida al proceso de maduración de la misma. Bratcher *et al.* (2005) concluyó que la carne clasificada por la USDA como de menor calidad debería ser madurada al menos 14 días, mientras que la carne de categoría superior ya es tierna a los 7 días de maduración.

Además, la maduración de la carne depende de la raza. Avilés *et al.* (2013a) describen una disminución en la dureza de la carne entre los días 1 y 16 de maduración, sin embargo, la disminución es mayor en los animales cruzados con Limusín que los cruzados con Charoles o Retinta. Campo *et al.* (2000) encontraron que la interacción entre la raza y la maduración (de 1 a 21 días) afectaba a la dureza de la carne en terneros de distintas razas españolas agrupadas en cuatro tipos de razas: de doble musculatura, de crecimiento rápido, de doble propósito y rústicas.

#### **4.2.7. Genética**

La variabilidad en la dureza de la carne también se debe a la genética, aunque su contribución difiere entre estudios. Los principales genes que se han relacionado con la dureza de la carne han sido la *calpaína (CAPN1)* y *calpastatina (CAST)* (Koohmaraie, 1992a). Sin embargo, tal y como se verá más adelante, la asociación de distintos polimorfismos de ambos genes y la dureza de la carne aún no está clara y depende en gran medida de la raza estudiada (Allais *et al.*, 2011). En el siguiente apartado se

detallan SNPs descritos en la bibliografía en los genes *CAPN1* y *CAST*, en los que se centra esta Tesis.

### 4.3. Genes candidatos para la dureza de la carne

#### 4.3.1. Calpaína (*CAPN1*)

Page *et al.* (2002) fueron los primeros en realizar un estudio de asociación entre el gen de la *calpaína* y la dureza de la carne. Para ello, realizaron un estudio de asociación haplotípico de 10 polimorfismos del gen de la *calpaína* (exón 6, intrón 7, intrón 8, exón 9, exón 13 y intrón 18) con la dureza de la carne en machos Piedmontese x Angus y Jersey x Limusín. El análisis de asociación reveló que los SNPs rs17872000 (*CAPN1\_316*, según la nomenclatura utilizada en la bibliografía descrita) y rs17871051 (*CAPN1\_530*, según la nomenclatura utilizada en la bibliografía descrita) se encuentran asociados a la dureza de la carne a los 3 y 14 días de maduración. El SNP *CAPN1\_316* es una sustitución en el exón 9 de citosina por una guanina (C/G) que produce un cambio aminoacídico de glicina a alanina (AAI23636.1: p.Gly316Ala), mientras que el SNP *CAPN1\_530* cambia una adenina por una guanina produciendo un cambio aminoacídico de valina por isoleucina (AAI23636.1:p.Val530Ile). Más tarde, Page *et al.* (2004) confirmaron estos resultados en carne madurada durante 14 días en dos poblaciones, una de ellas formada por animales cruzados de Simmental x Angus, y otra de animales cruzados de Angus, Charolés, Gelviah, Limusín, Hereford, Red Angus y Simmental x Angus, Hereford y Marc III.

El efecto entre el SNP *CAPN1\_316* y la dureza de la carne madurada durante 14 días también fue confirmado en *Bos taurus*, *Bos indicus* y sus cruces (Bonilla *et al.*, 2010; Rubio Lozano *et al.*, 2016). Avilés *et al.* (2013a) encontraron efecto del SNP *CAPN1\_316* y la dureza de la carne cruda en animales de raza Charolesa pero no en Limusín ni en Retinta. Por otro lado, no encontraron asociación entre este SNP y la dureza de la carne madurada 2 días en ganado Hanwoo (Lee *et al.*, 2014b) y a los 10 días de maduración en una muestra de animales de 30 razas diferentes (Dunner *et al.*, 2013).

Contradiciendo el efecto encontrado por Page *et al.* (2002) del SNP *CAPN1\_530* sobre la dureza de la carne a los 3 y 14 días de maduración, no se encontró efecto de dicho SNP en carne cruda de raza Charolesa, Limusín y Retinta, en carne madurada 2 días en ganado Hanwoo o en carne madurada 10 días en una muestra de animales de 30 razas diferentes (Avilés *et al.*, 2013a; Dunner *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014b).

Otro SNP fue descrito por White *et al.* (2005) en el intrón 17, rs17872050 (*CAPN1\_4751*, nomenclatura utilizada en la bibliografía descrita), en el que se describen diferencias favorables para el genotipo CT frente al homocigoto TT en un cruce de las razas Brahman x Hereford. Esta asociación ha sido confirmada posteriormente por otros autores tanto en Hereford, Angus, Red Angus, Limusín, Charolesa, Gelviah y Simmental y en cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Casas *et al.*, 2006) y Nellore (Curi *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2010).

Un test comercial, GeneStar Tenderness (Bovigen LLC Harahan, LA), incluye, además de otros SNPs, los SNPs *CAPN1\_316* (Page *et al.*, 2002) y *CAPN1\_4751* (White *et al.*, 2005). Estos test han sido validados por Van Eenennaam *et al.* (2007) en las razas Brangus, Red Angus, Hereford, Brahamam y en Charolés x Angus. Sin embargo, Tait *et al.* (2014) no encontraron asociación de ambos SNPs con la dureza de la carne en una población compuesta por Angus, Hereford, Red Poll, y Pinzgauer a 14 días de maduración.

Natrass *et al.* (2014) estudiaron la posible influencia de los polimorfismos *CAPN1\_316*, y *CAPN1\_4751* en la expresión del gen *CAPN1* en el músculo *L. lumborum* en razas Brahman y Angus. Describieron que mientras el SNP *CAPN1\_316* no influye en la expresión del gen, si lo hace el SNP *CAPN1\_4751*, de manera que se asoció una mayor expresión del gen al alelo asociado con una carne más tierna en los diferentes estudios.

Finalmente, un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) con la dureza de la carne en el músculo *Longissimus dorsi* a los 14 días de maduración mediante el chip bovino de Illumina de 50K y 96 SNPs localizados en un intervalo de 186 kb de los genes *CAPN1* y *CAST* (McClure *et al.*, 2012), en los que se analizaron animales de las

razas Hereford, Angus y cruces de Simmental, Charolés y Limusín con Angus y encontraron las regiones donde se sitúan los genes *CAPN1* y *CAST* asociadas a la dureza de la carne. En concreto, en el gen *CAPN1* apareció asociado en las 5 poblaciones analizadas. Estos autores concluyeron que las mutaciones descritas anteriormente en otros trabajos, asociadas a la dureza de la carne, no son las mutaciones causales en su estudio.

#### **4.3.2. Calpastatina (CAST)**

Lonergan *et al.* (1999) y Chung *et al.* (1999) fueron de los primeros autores que estudiaron la relación entre el gen *CAST* y la variabilidad en la dureza de la carne de bovino, aunque no obtuvieron asociaciones significativas. En el primer estudio, se analizó la asociación de polimorfismos anónimos mediante enzimas de restricción (RFLP) con la actividad de la calpastatina en 83 animales cruzados de 8 razas diferentes. En el segundo, analizaron la asociación entre los polimorfismos de conformación de cadena simple de DNA (SSCPs) con la resistencia al corte, el índice de fragmentación de miofibrillas y la actividad de la enzima en 47 toros de raza Angus. En ninguno de los dos estudios se seleccionaron animales con valores extremos para el carácter dureza y por lo tanto, los efectos aleatorios ambientales y genéticos pudieron contribuir a la falta de relación del gen *CAST* y la dureza de la carne (Barendse, 2002).

Barendse (2002) encontró una asociación entre el polimorfismo rs109221039 (*CAST\_2959*, según la nomenclatura utilizada en la bibliografía descrita) y la dureza de la carne. En este estudio en el que se estudiaron animales de las razas Angus, Belmont Red, Braham, Hereford, Santa Gertrudis y Shorthorn el genotipo GG fue asociado a la carne más dura. Esta asociación ha sido confirmada posteriormente en diferentes razas y cruces como son: Hereford, Angus, Red Angus, Limusín, Charolés, Gelviah y Simmental y cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Casas *et al.*, 2006); en Jersey x Limusín, Angus y cruces de Hereford (Morris *et al.*, 2006); Charolés x Angus (Van Eenennaam *et al.*, 2007); cruces de Angus, Rubia Gallega, Canchim, con Nellore (*Bos indicus*) (Curi *et al.*, 2009); Angus, Hereford, Murray Grey y Shorthorn y razas *Bos*

*indicus* (Johnston y Graser, 2010); 3 razas puras chinas (Li *et al.*, 2010) y Angus (Tait *et al.*, 2014).

Otro polimorfismo asociado a la dureza fue encontrado por Schenkel *et al.* (2006) en el intrón 5 (rs110955059). El estudio fue llevado a cabo en animales cruzados (Angus, Limusín, Charolés y Simmental) de diferente sexo (machos, hembras y castrados). En este caso, el genotipo CC es el que presentan los animales con una carne más tierna frente a los genotipos GG en diferentes días de maduración (2, 7 y 21 días *post mortem*). Asimismo, este SNP ha sido estudiado por Pinto *et al.* (2010) en la raza Nellore en el que se encontró un efecto aditivo del genotipo CC sobre el GG (-0,17, -0,21 y -0,25 kg a 7, 14 y 21 días de maduración, respectivamente). Sin embargo, en machos y hembras cruzados de *Bos indicus* y *Bos taurus* a 14 días de maduración *post mortem* no se encontró una asociación significativa con la dureza de la carne (Curi *et al.*, 2010).

Los SNPs descritos por Barendse (2002) y Schenkel *et al.* (2006) han sido incluidos en sendos test comerciales. El test Gene Star Tenderness (Bovigen LLC Harahan, LA) incluye el SNP descrito por Barendse (2002), mientras que el test Igenity Tender-GENE (MerilLimited, Duluth; GA) contiene el SNP identificado por Schenkel *et al.* (2006). Van Eenennaam *et al.* (2007) validaron ambos test en diferentes razas y cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus*, confirmándose los resultados obtenidos con anterioridad, a 14 días de maduración de la carne.

En la región promotora del gen *CAST* también se han encontrado polimorfismos con efecto sobre la expresión del gen, que podrían explicar las diferencias que se encontraron en la actividad de *CAST* (Pringle *et al.*, 1997). Además, en el promotor 1xa se ha descrito un microsatélite, repetición en tándem de los nucleótidos CA, como un posible marcador para caracteres genéticos y de calidad de la carne (Nonneman *et al.*, 1999).

Se han descrito varios SNPs en otras zonas del gen *CAST*. Por ejemplo, en el estudio del gen realizado por de Motter *et al.* (2009) mediante comparación de secuencias de DNA y mRNA disponible en GenBank, definieron varios SNPs en la

región del 3'UTR y en los exones 6, 7, 18 y 24. Allais *et al.* (2011) buscaron la asociación en animales de tres razas diferentes y tres polimorfismos del gen *CAST*. Dos en la región 3'UTR, uno de ellos el estudiado por Barendse (2002) y otro en el intrón 8 (BTA7: g.98536799A>G UMD 3.1). El SNP descrito por Barendse (2002) sólo se asoció a la dureza de la carne en la raza Charolesa a 14 días de maduración. El otro polimorfismo de la región 3'UTR (BTA7: g. 98581038A>G UMD 3.1) situado a 1375 pb en sentido 3', presentó asociación con la dureza de la carne en la raza Rubia de Aquitania. El estudio de Allais *et al.* (2011) demuestra que los efectos de los marcadores no pueden ser aplicados en todas las razas, ni siquiera en poblaciones de bovino de la misma raza.

En un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) con la dureza de la carne en el músculo *Longissimus dorsi* a los 14 días de maduración mediante el chip bovino de Illumina de 50K y 96 SNPs localizados en un intervalo de 186 kb del gen *CAST* (McClure *et al.*, 2012) con animales de las razas Hereford, Angus y cruces de Simmental, Charolés y Limusín con Angus, encontraron las regiones donde se sitúan los genes *CAPN1* y *CAST* asociadas a la dureza de la carne. En concreto, el gen *CAST* apareció asociado a las razas Hereford, Charolés y Limusín. Estos autores concluyeron que las mutaciones descritas anteriormente en otros trabajos, asociadas a la dureza de la carne, no son las mutaciones causales en su estudio.

Por tanto, parece necesario estudiar los distintos SNPs descritos e incluso buscar nuevas mutaciones que permitan explicar la variabilidad encontrada en la dureza de la carne en cada una de las razas y una vez confirmado el efecto de los genes, se podrían incluir los diferentes SNPs en los esquemas de selección de las poblaciones analizadas.

## **5. Grasa intramuscular**

Tal como se ha explicado con anterioridad, la grasa intramuscular juega un papel importante en los atributos de calidad de la carne, incluyendo las propiedades sensoriales y consideraciones saludables. Una mejor comprensión de los mecanismos biológicos que determinan la cantidad de la grasa intramuscular sigue siendo un punto crítico de la investigación, para satisfacer las expectativas de los consumidores y asegurar la competitividad de la producción de carne en todo el mundo.

La grasa intramuscular generalmente se determina químicamente. Sin embargo, en países como EE.UU y Australia, estiman subjetivamente la grasa intramuscular mediante apreciación visual. El veteado es el término utilizado en la industria cárnica para referirse a la apariencia visual de la grasa intramuscular entre los haces de fibras musculares. En el sistema de clasificación de la Unión Europea no se contempla dicha clasificación.

Existen resultados contradictorios sobre la relación entre el contenido de grasa y la dureza. Algunos estudios confirman que el contenido de grasa intramuscular en la carne influye positivamente en la terneza (Pannier *et al.*, 2010a), pero otros sugieren que tiene un efecto negativo (Romans *et al.*, 1965). La relación entre ambos se cree que es indirecta (Miller, 2002) y se estima que el veteado explica el 5% de la variación de la terneza de la carne de bovino (Wheeler *et al.*, 1994). Según Shackelford *et al.* (1994) la grasa intramuscular y la dureza de la carne están estrechamente relacionadas genéticamente ( $r = -0,27$ ).

El desarrollo de los depósitos adiposos ocurre en el orden: abdominal, intermuscular, subcutáneo y finalmente intramuscular (Pethick *et al.*, 1993). La grasa intramuscular es el último tejido adiposo en depositarse, aunque el tejido empieza a desarrollarse en el destete (Harper y Pethick, 2004). El metabolismo lipídico se asocia especialmente al metabolismo energético en el animal. Los lípidos son sintetizados y depositados (lipogénesis) o degradados (lipólisis) en respuesta al balance energético del animal (Pethick *et al.*, 2004).



En los rumiantes, los lípidos que proviene de la dieta, son degradados a ácidos grasos libres mediante la lipólisis, los cuales se saturan posteriormente mediante la biohidrogenación que es llevada a cabo por los microorganismos que se encuentran en el rumen (Lee y Moore, 1959). Los ácidos grasos procedentes del rumen llegan al intestino delgado, donde son atacados por las sales biliares. Éstas emulsionan, y fragmentan los ácidos grasos para que actúen sobre ellas las enzimas lipolíticas. Igualmente, los fosfolípidos microbianos son digeridos y contribuyen a la formación de ácidos grasos los cuales serán absorbidos a través de la pared del intestino. Los ácidos grasos se incorporan a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o como complejos de ácidos grasos no esterificados que se asocian con la albúmina en la sangre. Las lipoproteínas VLDL y los quilomicrones son los principales responsables del transporte de los ácidos grasos. Durante el transporte, la lipoproteína lipasa de los capilares del músculo esquelético, tejido adiposo y mamario libera los ácidos grasos y el glicerol, que posteriormente son utilizados para obtener energía o para sintetizar triglicéridos (Vernon *et al.*, 1999). La síntesis *de novo* en el hígado de los rumiantes es muy baja en comparación con otras especies (Bauchart *et al.*, 1996). El hígado no tiene gran capacidad para formar y exportar lipoproteínas ricas en triglicéridos, por lo que la mayoría de las lipoproteínas de los rumiantes proceden de la absorción intestinal.

### **5.1. Factores que afectan al contenido de grasa intramuscular**

Tal y como se ha explicado en apartados previos, el contenido de grasa intramuscular depende de factores ambientales y genéticos. A continuación, se van a describir algunos de los factores más importantes que han sido estudiados en la presente Tesis, centrándonos principalmente en los aspectos genéticos que son la base principal de trabajo de esta Tesis.

### **5.1.1. Raza**

Entre las razas de vacuno, existen diferencias no solo en el grado de engrasamiento sino también en la estructura y distribución de las vetas de grasa en el músculo (Albrecht *et al.*, 2006). En las razas con mayor engrasamiento el contenido de grasa intramuscular aumenta un 1%, de media, cuando se produce un aumento del 5% en el contenido de la grasa de la canal (Goutefongea y Dumont, 1990). Christensen *et al.* (2011) en un estudio llevado a cabo en 15 razas europeas, indicaron que las razas con un mayor contenido en grasa total son las razas Roja Danesa y Holstein, mientras que Piamontesa, Limusín y Asturiana de los Valles contienen la menor cantidad de grasa total.

La composición química del músculo es relativamente constante, sin embargo el contenido de lípidos es muy variable entre razas, individuos de la misma especie y músculos (Hocquette *et al.*, 2010). El contenido de grasa intramuscular varió desde 3% al 11% en diferentes músculos en un estudio en 25 canales de la raza Aberdeen de Canadá (Jeremiah *et al.*, 2003). Esto podría deberse al diferente metabolismo, oxidativo o glicolítico, en las fibras musculares (Hocquette *et al.*, 2000) o a factores relacionados con la cría de los animales (Renand *et al.*, 2003).

### **5.1.2. Sexo**

El estatus hormonal en el vacuno está directamente relacionado con la distribución de la grasa y la proteína en el músculo (Fritsche y Steinhart, 1998). Químicamente, la carne de los machos tiene un contenido de proteína, cenizas y humedad mayor; y un contenido de grasa menor que la carne de las hembras (Sharaf Eldin *et al.*, 2013). El rendimiento superior de los machos frente a las hembras o los machos castrados se debe a los esteroides, principalmente a la testosterona y el estradiol, que se producen en los testículos (Lee *et al.*, 1990). La testosterona se une a receptores en los músculos y estimula la incorporación de proteínas, lo que aumenta la masa muscular sin un aumento del tejido adiposo (Dayton y White, 2008).

Diversos estudios han encontrado que los terneros enteros presentan menor cantidad de grasa intramuscular que los castrados (Destefanis *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2013; Padre *et al.*, 2006). Purchas *et al.* (2002) encontraron en animales de raza Angus con distintos rangos de edad (16-18 meses y 24-28 meses) y distintos niveles de crecimiento (rápido, restringido y lento), que la carne de los terneros castrados presentaba mayor grasa intramuscular, dando como resultado una carne más tierna y jugosa que la de los machos enteros. Sin embargo, las diferencias dependen de la edad del animal a la castración y de la edad de sacrificio de los terneros (Marti *et al.*, 2013).

En las razas bovinas asturianas, los estudios sobre el efecto de la castración en la calidad del producto han mostrado un incremento significativo del engrasamiento intramuscular en animales castrados, tanto cebados en intensivo (Oliván, 2001a; Oliván, 2001b; Oliván *et al.*, 2003; Osoro *et al.*, 2001) como en extensivo (Oliván, 2001a; Oliván, 2002).

### **5.1.3. Edad/desarrollo**

El depósito de lípidos en todos los depósitos de grasa, incluido el depósito de grasa intramuscular, aumentan con la edad y la tasa de crecimiento (Zembayashi, 1994). Según los estudios del desarrollo de los animales, la grasa intramuscular es de desarrollo tardío (Vernon, 1981) en relación con otros depósitos de grasa, depositándose primero la abdominal, después intermuscular, a continuación, subcutánea y finalmente intramuscular. (Pethick *et al.*, 2005).

### **5.1.4. Alimentación**

Las dietas que promueven el aporte de glucosa al músculo pueden incrementar la deposición de grasa intramuscular (Hocquette *et al.*, 2010). Esto se puede conseguir maximizando la fermentación en el rumen para producir precursores de la gluconeogénesis (propionato) o incrementando la digestión del almidón en el intestino delgado. Dichas dietas incrementan las concentraciones de hormonas anabólicas (insulina) que estimulan la lipogénesis y además, aportan mayor glucosa a

los adipocitos intramusculares. En este sentido, los terneros alimentados con forraje suelen presentar menor contenido de grasa intramuscular o veteado que los alimentados con pienso (Muir *et al.*, 1998; Van Elswyk y McNeill, 2014).

Sin embargo, en otros estudios, en animales castrados de la raza Rubia Gallega, no observaron el efecto del sistema de acabado sobre el contenido de grasa intramuscular (Varela *et al.*, 2004). Tampoco se observaron diferencias entre el acabado en pasto, ensilado y concentrado en animales cruzados (French *et al.*, 2000). Si los animales son sacrificados con pesos similares, es posible que esas diferencias no puedan ser detectadas (French *et al.*, 2000; Steen *et al.*, 2003).

#### **5.1.5. Genética**

En la bibliografía se han descrito varios marcadores genéticos asociados al contenido de grasa intramuscular, a continuación se describen brevemente los genes y marcadores que han sido asociados a este carácter y que van a ser validados en esta Tesis en las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

### **5.2. Genes candidatos para el contenido de grasa intramuscular**

#### **5.2.1. Sintasa de los ácidos grasos (FASN)**

La enzima FASN es un complejo multienzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga. El dominio de la tioesterasa (TE) del complejo de la FASN es el responsable de la terminación de la síntesis de los ácidos grasos y por tanto juega un papel esencial en la determinación de la longitud de la cadena del producto de la FASN. En este dominio se han descrito varios SNPs, entre ellos, el SNP rs41919985 asociado a la composición de los ácidos grasos del músculo *Longissimus dorsi* en la raza Angus (Zhang *et al.*, 2008). Este polimorfismo produce un cambio aminoacídico de alanina a treonina. Barendse (2011) en un estudio de asociación por haplotipos describió por primera vez el efecto del gen *FASN* sobre la grasa intramuscular en un ganado compuesto por razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Mazzucco *et al.* (2016) describieron, en las razas Angus, Hereford y sus cruces, una asociación

entre el polimorfismo rs41919985 y el porcentaje de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi*. Bartoň *et al.* (2016) estudiaron la asociación entre el polimorfismo rs41919985 descrito por Zhang *et al.* (2008) y otro SNP descrito por Abe *et al.* (2009) (AF285607: c. 16024A>G) con la cantidad y composición de la grasa intramuscular en el músculo *Longissimus lumborum* en la raza Fleckvieh. No encontraron efecto de los dos SNPs con la cantidad de grasa, aunque sí con la cantidad de algunos ácidos grasos. Por otro lado, Oh *et al.* (2012) y Lee *et al.* (2014a) encontraron una asociación positiva entre el veteado y la cantidad de grasa intramuscular visible en la carne, y 5 SNPs del gen *FASN* (NM\_001012669: g.12870 T > C, g.13126 T > C, g.15532 C > A, g.16907 T > C y g.17924 G > A) en el ganado coreano (Hanwoo), en el músculo *Longissimus dorsi*, y japonés, en el músculo *Longissimus*, respectivamente. También, se han llevado a cabo muchos estudios en los que no se ha encontrado una asociación entre los polimorfismos de *FASN* y los depósitos de grasa, como por ejemplo los realizados en ganado Hanwoo (Kim *et al.*, 2017), Wagyu (Matsuhashi *et al.*, 2011) y en toros Fleckvieh (Bartoň *et al.*, 2016). El diferente grado de engrasamiento de estas razas, y edad de sacrificio de los animales, puede influir en los resultados de asociación tan variables en este gen.

En un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) mediante análisis de haplotipos con el array beadchip bovino de Illumina de 50K se encontró una asociación sugestiva del gen *FASN* con el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* en una población de animales compuesta por razas procedentes de los troncos *Bos taurus* y *Bos indicus* (Barendse, 2011).

Finalmente, hay que destacar que Jeong *et al.* (2012) encontraron una correlación positiva entre la abundancia de mRNA de *FASN* y el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* (13,3%) en la raza Wagyu.

### 5.2.2. Proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)

Esta proteína intracelular es específica de los adipocitos, transporta los ácidos grasos desde la membrana celular a los lugares de oxidación de éstos o hacia los lugares de síntesis de triglicéridos o fosfolípidos (Veerkamp y Maatman, 1995).

La importancia de *FABP4* en el contenido de la grasa intramuscular ha sido demostrada en varios estudios (Jurie *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). El SNP descrito por Michal *et al.* (2006) (rs41729173) fue asociado al porcentaje de la grasa intramuscular en el músculo *Longissimus* en animales cruzados Waygu x Limusín. Igualmente, Shin *et al.* (2012) encontraron una asociación entre el SNP NC\_007312.4 : g.3691G>A localizado en el exón 3 y el grado de veteado en el músculo *Longissimus dorsi* en la raza Hanwoo. Avilés *et al.* (2013b) estudiaron este mismo polimorfismo en animales cruzados de las razas Retinta, Charolesa y Limousin, con un incremento de 0,155% de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus* por cada copia del alelo G de este marcador. Por el contrario, no se ha encontrado asociación entre la grasa intramuscular en los músculos *Longissimus thoracis et lumborum* y *Semimembranosus* y dicho SNP en distintas razas del tronco *Bos taurus* evaluadas conjuntamente (Pannier *et al.*, 2010b). Tampoco se ha encontrado asociación entre la grasa intramuscular del músculo *Longissimus lumborum* y el SNP de *FABP4* (AAFC\_01136716.1: g.7516G>C) en ganado *Bos indicus* (Curi *et al.*, 2011).

### 5.2.3. Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)

Acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) es una enzima microsomal que cataliza el último paso de la síntesis de los triglicéridos, desempeñando un papel fundamental en los procesos fisiológicos donde intervienen los triglicéridos (Cases *et al.*, 1998). Se identificaron dos polimorfismos (rs109234250 y rs109326954) que implicaba un cambio aminoacídico (NP\_777118.2:p.Lys232Ala) (Winter *et al.*, 2002), y afectaba al contenido de la grasa intramuscular en el músculo *Semitendinosus* en la raza Holstein y Charoles, y en el del músculo *Longissimus* en la raza Charolés pero no la raza Holstein (Thaller *et al.*, 2003). En la raza Angus se encontró una asociación de estos dos polimorfismos con la grasa intramuscular tanto en el músculo *Longissimus*

*dorsi* como en el *Semitendinosus* (Anton *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2012) encontraron los dos SNPs descritos con anterioridad de la *DGAT1* asociados al contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus* en la raza Simmental China. Igualmente, estos autores encontraron un haplotipo compuesto por estos dos SNPs y dos del gen *SCD* asociados al contenido de grasa intramuscular y a la dureza de la carne en el músculo *Longissimus*. Otros estudios en los que se incluyen animales de distintas razas también encuentran efecto de los SNPs de *DGAT1* sobre el contenido en grasa intramuscular (Li *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013). Por contra, Pannier *et al.* (2010a) no encuentran asociación entre los SNPs descritos por Winter *et al.* (2002) y la grasa intramuscular en los músculos *Longissimus thoracis et lumborum* y *Semimembranosus* en animales cruzados de varias razas comerciales (Charolesa, Hereford, Limusín, Simmental, Friesian y Holstein–Friesian). Igualmente, en animales de las razas Nelore, Angus x Nelore, Rubia Gallega x Nelore, Canchim y cruces de Brangus y Braunvieh (Curi *et al.*, 2011), cruzados de las razas Retinta, Charolés y Limusín (Avilés *et al.*, 2013b) o toros Fleckvieh (Bartoň *et al.*, 2016), tampoco se han encontrado asociaciones entre el contenido de grasa intramuscular y estos SNPs.

#### **5.2.4. Esteroil-CoA desaturasa (SCD)**

Esteroil-CoA desaturasa (SCD) es una enzima responsable de la conversión de los ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados. La mayor parte de los trabajos en los cuales se explora la variabilidad del gen *SCD* están hechos en bovino donde un SNP no sinónimo en el exón 5 (BTA26:g.21144685C>T UMD 3.1) resulta en un cambio aminoacídico de alanina por valina. Dicho SNP se asoció al contenido de grasa intramuscular en los músculos *Longissimus* y *Semimembranosus* de animales cruzados de razas irlandesas (Reardon *et al.*, 2010). Otro estudio, también asocia este mismo SNP al veteadado en el músculo *Longissimus* en la raza Hanwoo (Oh *et al.*, 2011). Como se ha comentado con anterioridad, Wu *et al.* (2012) también encontraron un haplotipo compuesto por dos SNPs del gen *DGAT1* y dos del gen *SCD* asociados al contenido de grasa intramuscular y a la dureza de la carne en raza Simmental China. Igualmente, el análisis individual del SNP del exón 5 del gen *SCD*

(BTA26:g.21144685C>T UMD 3.1) también resultó asociado al contenido de grasa intramuscular. Por otro lado, Avilés *et al.* (2013b) no encontraron asociación con la grasa intramuscular en el músculo *Longissimus* en animales cruzados de las razas Retinta, Charolesa y Limusín. Tampoco se ha encontrado asociación en animales cruzados de Angus, Charolés, y Hereford (músculo *Longissimus thoracis*) (Li *et al.*, 2013), Brangus (músculo *Longissimus lumborum*) (Baeza *et al.*, 2013) o Limusín y Angus (en el músculo *Semimembranosus*) (Ward *et al.*, 2010).

#### **5.2.5. Leptina (LEP)**

La leptina (LEP) es una hormona peptídica que ha sido sintetizada y secretada principalmente por los adipocitos blancos (Zhang *et al.*, 1994). Se han descrito un gran número de variaciones en el gen de *LEP*, en el exón 2 (Buchanan *et al.*, 2002), exón 3 (Pannier *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013) y en su promotor (Nkrumah *et al.*, 2005; Schenkel *et al.*, 2005). El SNP rs29004488 descrito por Buchanan *et al.* (2002), produce un cambio aminoacídico de arginina por cisteína (ENSBTAP00000019853.4:p.Cys25Arg) y fue asociado a un aumento del contenido de grasa intramuscular en el músculo *Semitendinosus* en raza Red Angus (Anton *et al.*, 2011), y en el músculo *Longissimus dorsi* en razas de *Bos taurus*, *Bos indicus* y sus cruces (Mazzucco *et al.*, 2016). También se encontró efecto del SNP rs29004488 de *LEP* pero no del rs109406937 sobre el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis* en animales Simmental (Orrù *et al.*, 2011). No obstante, no ha encontrado asociación de este SNP con el contenido de grasa intramuscular en ganado cruzado Holstein x Charolés (Lagonigro *et al.*, 2003), en varias poblaciones animales de cruces comerciales (Avilés *et al.*, 2013b; Schenkel *et al.*, 2005), ni en las razas Charolesa, Hereford, Limousin, Simmental, Friesian y Holstein–Friesian (Pannier *et al.*, 2009), y tampoco en Brangus (Corva *et al.*, 2009).

#### **5.2.6. Tiroglobulina (TG)**

La tiroglobulina (TG) es un precursor de las hormonas tiroideas. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en la regulación del metabolismo y tienen efectos sobre el crecimiento de los adipocitos, la diferenciación y la homeostasis de los depósitos



de grasa (Ailhaud *et al.*, 1992; Casas *et al.*, 2005; Darimont *et al.*, 1993; Smas y Sul, 1995). La variación (BTA14:g.9509279C>T UMD 3.1) en la región 5' del gen *TG* ha sido asociado con el veteado de la carne y se utiliza en programas de selección asistida por marcadores, mediante un kit comercial denominado GeneSTAR Quality Grade, para mejorar el contenido de grasa intramuscular en la carne. En este sentido, un incremento en el veteado o deposición de grasa intramuscular de la carne se ha asociado con el genotipo TT (Anton *et al.*, 2011; Barendse, 1999; Barendse *et al.*, 2004; Burrell *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2011; Thaller *et al.*, 2003) estando en muy baja proporción en las poblaciones analizadas (Casas *et al.*, 2007). Sin embargo, es posible que dicho efecto se de en unas razas y no en otras dado que tanto Barendse *et al.* (2004) como Thaller *et al.* (2003) mostraron que el efecto del SNP de *TG* sobre el contenido de grasa o veteado era dependiente de la raza. Además, Pannier *et al.* (2010b) no encontraron asociación entre este SNP y la grasa intramuscular en cruces de *Bos taurus*. Tampoco se encontró asociación en poblaciones de origen europeo o asiático (Zhang *et al.*, 2015), o Simmental (Rincker *et al.*, 2006). Por otra parte, Rincker *et al.* (2006) describieron que la duración del cebo también afecta al efecto del SNP de *TG* sobre el contenido de la grasa intramuscular.

#### **5.2.7. Receptor huérfano asociado al receptor del ácido retinoico-γ (RORC)**

El gen *RORC* es un receptor de la vitamina A, miembro de la superfamilia de receptores de la hormona tiroidea y esteroidea, teniendo los niveles de retinol y ácido retinoico en sangre un efecto significativo sobre la grasa intramuscular (Evans, 1988; Petkovich *et al.*, 1987). Barendse *et al.* (2007a) detectó 9 polimorfismos en el gen, uno de los cuáles (rs137721616) localizado, en el exón 7, se ha asociado con el contenido de la grasa intramuscular y el veteado en ganado de las raza Angus, pero no en la raza Hereford ni Brahman, y tampoco cuando se consideró las tres razas conjuntamente (Barendse *et al.*, 2010). De igual forma el alelo T también se ha asociado a un mayor contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* en ganado cruzado de las razas Retinta, Charolesa y Limousin (Avilés *et al.*, 2013b).

### 5.2.8. Calpaína (CAPN1)

El gen *CAPN1* también se ha asociado, recientemente, con el contenido de grasa intramuscular. Barendse (2011) sugirió la asociación del gen *CAPN1* con el contenido de grasa intramuscular en la carne en *Longissimus dorsi* en una población de animales compuesta por razas procedentes de los troncos *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Varios han sido los autores que han estudiado el efecto de varios polimorfismos del gen *CAPN1* en la grasa intramuscular de la carne de vacuno, aunque los resultados son contradictorios. Li *et al.* (2013) asociaron el SNP *CAPN1\_316* con el veteadado de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* en las razas Angus, Charolesa, Hereford, Limusín y Simmental. Sin embargo, otros autores no han encontrado asociación con el contenido de grasa intramuscular en la raza Hanwoo (músculo *Longissimus lumborum*) (Lee *et al.*, 2014b) en cruces comerciales de *Bos taurus* y *Bos indicus* (músculo *Longissimus dorsi*) (Bonilla *et al.*, 2010), ni en ganado de la raza Nellore, Angus x Nellore, Canchim, cruces de Brangus y cruces de Braunvieh (músculo *Longissimus dorsi*) (Curi *et al.*, 2010). El polimorfismo *CAPN1\_4751*, anteriormente asociado a la dureza de la carne, ha sido asociado al contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* en la raza Charolesa (Muñoz Mejía *et al.*, 2012). Aunque otros autores no encuentran este mismo efecto en las raza Nellore y sus cruces (músculo *Longissimus dorsi*) (Curi *et al.*, 2010) ni cruces comerciales de *Bos taurus* y *Bos indicus* en razas Mejicanas (músculo *Longissimus dorsi*) (Bonilla *et al.*, 2010). Otros autores han estudiado otros polimorfismos no descritos en la presente Tesis doctoral. Cheong *et al.* (2008a) estudiaron 12 polimorfismos del gen *CAPN1* aunque sólo un SNP localizado en la región 3'UTR (AF221129: c.2151\*479C>T) se asoció al nivel de veteadado de la carne en la raza Hanwoo. Lee *et al.* (2014b), estudiaron otros dos polimorfismos (AF221129: c.580A>G y c.658C<T) que no se asociaron al contenido de grasa intramuscular también en ganado Hanwoo.

### 5.2.9. *Calpastatina (CAST)*

Varios autores han estudiado el posible efecto que pueda tener el gen *CAST* sobre el contenido de grasa intramuscular. Sin embargo, no encontraron asociación entre el polimorfismo NM\_174003.2: c.155C>T descrito por Barendse *et al.* (2007b) y el veteado de la carne en la raza Angus, Charolés, Hereford, Limusín y Simmental en el músculo *Longissimus thoracis* (Li *et al.*, 2013). Tampoco se ha encontrado asociación de este mismo SNP con el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus lumborum et thoracis* en una población de animales cruzados (Flekvieh, Charolés, Simmental, Galoway y Rubia de Aquitania) en la República Checa (Kaplanová *et al.*, 2013). Tampoco se encontró asociación entre el contenido de grasa intramuscular del músculo *Longissimus dorsi* con el polimorfismo rs110955059 (Curi *et al.*, 2010) ni con el polimorfismo *CAST\_2959* (Curi *et al.*, 2009) en animales de las razas Nelore, Angus x Nelore, Rubia Gallega x Nelore, Canchim y cruces de Brangus y Braunvieh.

A la vista de los diferentes SNPs que ya han sido descritos en la bibliografía y la variabilidad de resultados encontrada para cada raza, que puede ser debido a la alimentación recibida, al rango de grasa intramuscular, al músculo estudiado, parece necesario validar los distintos polimorfismos descritos en las razas autóctonas Pirenaica y Parda de Montaña antes de incluirlas en los esquemas de selección de las mismas, así como buscar nuevos marcadores que puedan estar asociados a los fenotipos estudiados.



# Objetivos



Mediante la realización de la presente Tesis doctoral se pretende buscar y validar marcadores genéticos asociados a la dureza y contenido de grasa intramuscular de la carne de bovino en las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

Este objetivo general se pretende abordar a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Validación de la asociación de polimorfismos descritos en los genes *calpaína* (*CAPN1*) y *calpastatina* (*CAST*) asociados a la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* de las razas Parda de Montaña y Pirenaica.
2. Búsqueda de nuevos polimorfismos, caracterización de los mismos, y estudios de asociación en el gen *calpastatina* (*CAST*) con la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* de las razas Parda de Montaña y Pirenaica.
3. Validación de la asociación de polimorfismos descritos en los genes *sintasa de los ácidos grasos* (*FASN*), *proteína de unión a ácidos grasos 4* (*FABP4*), *acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1* (*DGAT1*), *estearoil-CoA desaturasa* (*SCD*), *leptina* (*LEP*), *tiroglobulina* (*TG*), *receptor huérfano asociado al RAR- $\gamma$*  (*RORC*), *calpaína* (*CAPN1*) y *calpastatina* (*CAST*) asociados al contenido de grasa intramuscular de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* de las razas Parda de Montaña y Pirenaica.





# Material y Métodos



## 1. Material animal

Las muestras y datos obtenidos para el desarrollo de esta Tesis proceden de experimentos realizados en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) realizados desde el año 2003 hasta el 2013.

En la Tabla 1 se detallan los experimentos en los cuales se determinó la dureza de la carne y el porcentaje de la grasa intramuscular del músculo *Longissimus thoracis*. Los datos de los ensayos 1 al 10 se utilizaron para el aislamiento de una nueva variante génica asociada a la dureza de la carne (Capítulo I - Resultados y Discusión). En los estudios de validación de los resultados encontrados en el Capítulo I en una población mayor (Capítulo II - Resultados y Discusión), caracterización de la región 3'UTR del gen *CAST*, estudios de asociación y efecto funcional (Capítulo III - Resultados y Discusión), caracterización del promotor del gen *CAST* (Capítulo IV - Resultados y Discusión) y los estudios de asociación de polimorfismos con grasa intramuscular (Capítulo V - Resultados y Discusión) se utilizaron, además de los experimentos nombrados con anterioridad, los experimentos 11 y 12.

Los animales de los ensayos 1-12 fueron sacrificados en mataderos comerciales autorizados [Mercazaragoza (Zaragoza) y Fribin (Binéfar)] de acuerdo con la legislación Europea (directiva 86/609/EEC) de protección animal. Las canales se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas en cámaras de refrigeración del matadero.

Finalmente, para el estudio de la distribución de las frecuencias genóticas de la nueva variante de la dureza de la carne mediante sondas "Beacon" (Capítulo I - Resultados y Discusión) se han empleado animales de la raza Parda de Montaña y Pirenaica, y se ha incluido a la raza Serrana de Teruel, la tercera raza autóctona de ganado vacuno más importante en Aragón. Además, se han incluido animales mestizos principalmente cruces con la raza Frisona y Parda de Montaña. El número de animales analizados por raza y sexo aparece detallado en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Raza, sexo, alimentación, número de animales utilizados (n), edad al sacrificio, peso canal caliente (PCC) y engrasamiento (promedio  $\pm$  desviación estándar) y días de maduración (M) para los estudios realizados en la presente Tesis sobre la dureza y grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis*.

Exp.	Raza <sup>1</sup>	Sexo	Alimentación	n	Edad Sacrificio (d)	PCC (kg)	Engrasamiento (escala 1-15)	M (d)	Estudios <sup>2</sup>
1	PM	Entero	Forraje	7	350 $\pm$ 18,5	256 $\pm$ 12,0	11 $\pm$ 1,0	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
1	PM	Entero	Pienso	7	335 $\pm$ 23,9	263 $\pm$ 21,7	11 $\pm$ 1,0	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
1	PM	Entero	Pienso	7	336 $\pm$ 24,1	260 $\pm$ 9,2	10,2 $\pm$ 1,1	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
2	PM	Entero	Pienso	7	164 $\pm$ 9,9	142 $\pm$ 20,4	9 $\pm$ 0,5	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
2	PM	Entero	Forraje	8	225 $\pm$ 13,2	122 $\pm$ 9,8	5 $\pm$ 1,4	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
2	PM	Entero	Pienso	7	207 $\pm$ 8,6	130 $\pm$ 16,8	8 $\pm$ 1,0	1, 7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
3	PM	Castrado	Forraje	18	594 $\pm$ 23,6	309 $\pm$ 26,2	9 $\pm$ 0,9	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
4	PM	Castrado	Forraje	8	569 $\pm$ 47,5	293 $\pm$ 32,2	11 $\pm$ 1,4	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
4	PM	Castrado	60%Forraje:40%pienso	8	539 $\pm$ 39,0	280 $\pm$ 23,0	8 $\pm$ 0,7	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
4	PM	Entero	Pienso	7	439 $\pm$ 48,4	289 $\pm$ 41,8	10 $\pm$ 2,0	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
5	PM	Castrado	Forraje	8	609 $\pm$ 16,2	293 $\pm$ 29,0	8 $\pm$ 0,0	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
5	PI	Castrado	Forraje	8	614 $\pm$ 19,9	292 $\pm$ 33,4	8 $\pm$ 1,1	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
5	PI	Castrado	60%Forraje:40%pienso	8	587 $\pm$ 18,6	292 $\pm$ 27,2	8 $\pm$ 1,1	1, 9, 16	AI, VA, UTR, CA, GIM
6	PM	Entero	Pienso	21	297 $\pm$ 20,1	259 $\pm$ 12,3	10 $\pm$ 1,0	7	AI, VA, UTR, CA, GIM
7	PM	Entero	Forraje	16	372 $\pm$ 13,3	278 $\pm$ 32,2	11 $\pm$ 1,1	1, 10, 20	AI, VA, UTR, CA, GIM
8	PM	Entero	Pienso	15	362 $\pm$ 4,7	285 $\pm$ 22,6	4 $\pm$ 0,5	7	AI, VA, UTR, CA, GIM
9	PI	Entero	Pienso	12	328 $\pm$ 22,6	267 $\pm$ 13,0	11 $\pm$ 1,0	7	AI, VA, UTR, CA, GIM
10	PI	Castrado	Pienso	8	433 $\pm$ 8,1	289 $\pm$ 21,3	9 $\pm$ 1,1	7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
10	PI	Entero	Pienso	8	384 $\pm$ 20,5	289 $\pm$ 19,8	10 $\pm$ 0,6	7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
10	PI	Hembra	Pienso	8	444 $\pm$ 13,1	271 $\pm$ 33,1	10 $\pm$ 1,2	7, 14	AI, VA, UTR, CA, GIM
11	PM	Entero	Pienso	105	378 $\pm$ 37,8	319 $\pm$ 34,8	9 $\pm$ 2,9	7, 14	VA, UTR, CA, GIM
12	PI	Entero	Pienso	16	338 $\pm$ 46,2	308 $\pm$ 59,7	6 $\pm$ 0,7	7	VA, UTR, CA, GIM
12	PI	Hembra	Pienso	4	344 $\pm$ 13,8	226 $\pm$ 5,4	7 $\pm$ 1,5	7	VA, UTR, CA, GIM

<sup>1</sup>PM: Parda de Montaña; PI: Pirenaica; <sup>2</sup>AI: aislamiento nueva variante de la dureza de la carne; VA: Validación de los resultados obtenido en una población mayor; UTR: Caracterización de la región 3'UTR del gen *CAST*, estudios de asociación y efecto funcional; CA: Caracterización del promotor del gen *CAST*; GIM: estudios de asociación de polimorfismos con grasa intramuscular.

**Tabla 2.** Número de animales (n) utilizados para el estudio de la distribución de las frecuencias genotípicas de la nueva variante de la dureza de la carne.

Raza	Exp.	Sexo <sup>1</sup>	n
Parda de Montaña	13	E	240
Conjunto mestizo	13	E	55
Pirenaica	13	E	99
Pirenaica	13	H	36
Serrana de Teruel	13	E	20
Serrana de Teruel	13	C	14

<sup>1</sup>E: entero; C: castrado; H: hembra.

## 2. Muestras

### 2.1. Músculo *Longissimus thoracis*

#### 2.1.1. Biopsia para obtención de RNA

Tras el sacrificio y desangrado del animal, se tomó una muestra del músculo *Longissimus thoracis* a la altura de la 6ª costilla en los experimentos 2 y 10. La biopsia se realizó con un sacabocados estéril de 6 mm (Stiefel Laboratories, Madrid, España). A continuación, el tejido biopsiado fue introducido en 5 ml de RNAlater (QIAGEN, Madrid, España). Posteriormente, el tejido se congeló a -80 °C hasta la extracción del RNA.

#### 2.1.2. Determinación de la textura Warner-Bratzler (dureza) de la carne y del contenido de grasa intramuscular y extracción de DNA

Tras las 24 horas de refrigeración, se extrajeron de la 6ª a la 7ª-10ª costilla de la canal izquierda, según los tiempos de maduración de cada experimento. En la Tabla 1 aparecen los tiempos de maduración de cada experiencia. En los ensayos con una maduración de 7 días se extrajo de la 6ª a la 7ª costilla. En los de mayor tiempo de maduración se extrajo de la 6ª a la 9ª-10ª costilla, dependiendo del peso canal del animal. Las costillas de los ensayos 1 al 10 se transportaron inmediatamente al CITA para su procesado. Las costillas de los ensayos 11 al 12, por motivos logísticos del

matadero, permanecieron en sus cámaras 24 horas a 4 °C y se transportaron al día siguiente al CITA para su procesado.

En el matadero experimental del CITA se extrajo el músculo *Longissimus thoracis*. El músculo se cortó en filetes de un grosor de 3,5 cm para la textura y 2 cm para la determinación del contenido de grasa intramuscular. Todos los filetes se envasaron al vacío. Los filetes destinados a la determinación de la textura se mantuvieron a 4 °C para su maduración.

Se agruparon los tiempos de maduración en tres categorías: corta (1 día), intermedia (7, 9 y 10 días) y larga (14, 16 y 20 días). El número de muestras según la maduración y la duración promedio de la maduración está detallado en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Duración de la maduración ( $\pm$  desviación estándar) y número de muestras por maduración en Parda de Montaña y Pirenaica.

	Parda de Montaña		Pirenaica	
	días	n	días	n
Corta	1,0 $\pm$ 0,0	110	1,0 $\pm$ 0,0	16
Intermedia	7,6 $\pm$ 1,01	249	7,4 $\pm$ 0,84	72
Larga	14,8 $\pm$ 1,58	214	14,4 $\pm$ 0,84	44

Los filetes para determinación de grasa intramuscular se congelaron inmediatamente. Posteriormente, se liofilizaron y molieron. Antes y después de la liofilización se pesó la muestra para determinar el contenido en materia seca. Se conservó una muestra de carne liofilizada para la extracción de DNA.

### 2.1.3. Determinación del pH

En los ensayos del 1 al 10, la determinación del pH se realizó utilizando un pHmetro el día posterior al sacrificio, midiéndolo de manera directa en uno de los filetes extraídos de la canal. Los valores encontrados de pH en las muestras de carne fueron inferiores a 6,0 valor que se considera límite para carne DFD (dark, firm, dry) por lo que no se han incluido los valores de pH en los análisis estadísticos en la presente Tesis doctoral. El pH de los ensayos 11 a 12 no se registró debido a que hubiera sido una medida tomada el día 2 post-sacrificio.

## **2.2. Sangre para la extracción de DNA**

Las muestras de sangre para la extracción de DNA, se tomaron en granja de la vena coccígea del animal, o en el matadero en el momento del desangrado de la canal tras el sacrificio. Las muestras de sangre obtenidas antes de la puesta a punto de la extracción de DNA a partir de la sangre, se centrifugaron a 3.500 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Se tomó el plasma con una pipeta y se congeló a -20 °C.

## **3. Análisis de textura de la carne**

Las muestras de carne congeladas, se sumergieron en agua para su descongelación. Una vez descongeladas, las muestras se cocinaron en baño termostático con agua a 75 °C hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C. La temperatura interna de las muestras fue controlada con un aparato datalogger Testo 177-T4 equipado con cuatro sondas tipo T (Instrumentos Testo, S.A., España). Al finalizar la cocción, las muestras se extrajeron del baño y se dejaron enfriar durante la noche a temperatura ambiente. Las muestras se cortaron en, al menos, 10 prismas rectangulares de 10x10 mm<sup>2</sup> de sección y una longitud de 30 mm de largo, siguiendo una configuración longitudinal paralela a la dirección de las fibras (Honikel, 1998). El ancho y alto de cada muestra se midieron con un calibre digital Mitutoyo con una resolución de 0,01 mm (Mitutoyo Co., Japón).

La determinación de la textura se realizó empleando un INSTRON (Modelo 5543, Instron Limited, España) provisto de una célula Warner-Bratzler. La fuerza se aplicó perpendicularmente a la dirección de las fibras con una velocidad de 150 mm/min. El esfuerzo máximo (carga máxima por unidad de sección transversal de la muestra, en N/cm<sup>2</sup>) para cada animal se calculó realizando la media de los resultados de la totalidad de los prismas obtenidos en cada filete.

## **4. Determinación del contenido de grasa intramuscular**

El contenido de grasa intramuscular se determinó siguiendo el método Am 5-04 (AOCS, 2004) con un extractor Ankom (modelo XT10, Ankom Tecnología, Madrid, España).

## 5. Caracterización molecular de genes candidatos

En este trabajo se ha utilizado la estrategia del gen candidato o enfoque con hipótesis previa. En este sentido, se han estudiado genes asociados al carácter dureza de la carne (*CAPN1* y *CAST*) y al contenido de grasa intramuscular (*RORC*, *LEP*, *FABP4*, *TG*, *FASN*, *DGAT1* y *SCD*), en este último estudio también se han incluido los genes *CAST* y *CAPN1*.

A continuación, se va a describir brevemente las técnicas propias de la caracterización molecular de genes de interés haciendo referencia a los protocolos y kits comerciales utilizados en el laboratorio para la extracción de ácidos nucleicos, cuantificación, purificación, amplificación por PCR y separación de fragmentos en geles de agarosa. Posteriormente, se detallarán los protocolos que se han puesto a punto para el aislamiento y búsqueda de polimorfismos en los genes *CAPN1* y *CAST*, así como para el genotipado y caracterización de polimorfismos de interés localizados en los genes *CAPN1*, *CAST*, *RORC*, *LEP*, *FABP4*, *TG*, *FASN*, *DGAT1* y *SCD*, con el objetivo de llevar a cabo estudios de asociación.

## 6. Técnicas básicas en biología molecular utilizadas para la caracterización de los genes de interés

### 6.1. Extracción de DNA

Se utilizó el Kit FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit (Blood/CulturedCell) (FAVORGEN, IBIAN, España) para la extracción de DNA de muestras sanguíneas o suero y el Kit FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Sample (FAVORGEN, IBIAN, España) para la extracción de DNA de músculo, siguiendo los protocolos del fabricante. Estos protocolos de extracción consisten en una primera incubación con proteinasa K y agentes caotrópicos que provocan la lisis celular y preparan la muestra para los siguientes pasos. En el segundo paso, la adición de etanol crea las condiciones necesarias de unión del DNA a las partículas de sílica de las membranas de las columnas. Los contaminantes presentes en la muestra son eliminados



mediante sucesivos lavados de la columna con diferentes soluciones comerciales. Finalmente, el DNA es eluido específicamente en una solución tamponadora de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino.

## 6.2. Extracción RNA

El RNA total se extrajo del músculo *Longissimus thoracis* utilizando el reactivo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para lisar las células. Posteriormente, la muestra se separa en dos, fases acuosa y orgánica, seguida por la extracción y precipitación de RNA total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa. Previamente, el tejido se disgregó y homogeneizó utilizando el homogeneizador de tejido OMNI TH (OMNI International, Fuencarral, España). Todas las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta la síntesis de DNA complementario (cDNA).

## 6.3. Cuantificación RNA y DNA total

La concentración y presencia de contaminantes, tras la extracción de RNA y DNA, se determinó con el nanoespectrofotómetro (Implen, Madrid, España) mediante la cuantificación de la densidad óptica a 260 y 280 nanómetros respectivamente. La presencia de proteínas y otros inhibidores se estimó a partir de los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 considerando valores aceptables de  $[1,8 \pm 0,2]$ .

Después de la extracción del RNA, la integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y cálculo de la relación de las bandas de rRNA (RNA ribosómico) 28S respecto del 18S. Los valores correspondientes a la concentración de RNA en el eluido nos indicaron qué volumen de cada muestra debe ser considerado para que 1 µg de RNA sea retrotranscrito a cDNA.

#### 6.4. Síntesis de cDNA

Para evitar la posible amplificación de DNA genómico, las muestras se trataron con DNAsa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA utilizando el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la calidad del cDNA sintetizado, se realizó una PCR convencional del gen *β-actina* de expresión constitutiva en todos los tipos celulares. Los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

El cDNA se utilizó para amplificar la totalidad de la región codante del gen *CAST*.

#### 6.5. Amplificación por PCR

La reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar en un volumen de 25µl con la siguiente mezcla de reactivos (Biotools, España): 50-100 ng de DNA genómico, 200 nM de dNTPs, 0,1 – 0,5µM de cada cebador, 2-2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, 0,1% de Triton X-100, Taq-polimerasa 1 U/µl y el volumen de H<sub>2</sub>O Milli-Q necesario para alcanzar los 25 µl. En los apartados específicos para cada fragmento amplificado se describen las condiciones específicas. Para las PCRs en el promotor del gen *CAST* se utilizó kit Certamp Mix de (Biotools, España). En todos los experimentos de PCR se incluyeron controles negativos. Las tallas de los fragmentos amplificados y la secuencia de los cebadores empleados para cada fragmento amplificado se indican en las tablas 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13 y 15. Se emplearon 35 ciclos de amplificación estándar usando los termocicladores Biometra T3000 Thermocycler y BioRad MyCycler™. Las temperaturas de hibridación (TH) y tiempos de cada ciclo de amplificación están descritos en el apartado específico para cada gen.

## **6.6. Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis**

El análisis de los productos generados por PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al porcentaje adecuado para el tamaño de DNA amplificado en tampón TBE (Tris-Bórico 0,045mM, EDTA 1mM) teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para verificar el tamaño de los productos amplificados se utilizó marcador de talla de 1 kb y de 100 pb de (Biotools, España). Los fragmentos se visualizaron en un analizador de imágenes BiORAD modelo Gel Doc XR+ equipado con una pantalla de conversión Xcita Blue y con el software ImageLab vs. 4.0.

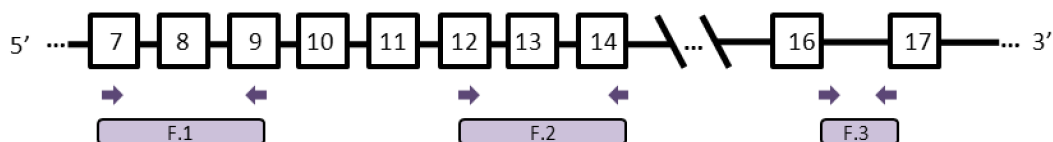
## **6.7. Purificación**

Previamente a la secuenciación de los fragmentos de interés fue necesario eliminar el máximo de impurezas presente en el producto PCR, debidas normalmente a la presencia de proteínas, cebadores u otras sales utilizadas, así como de agarosa cuando los fragmentos son cortados y extraídos directamente de un gel. Así, para PCRs inespecíficas, en las que además del fragmento de DNA objetivo se amplifican otros fragmentos inespecíficos, se realizó la extracción cortando las bandas de interés del gel de agarosa y purificando los fragmento de DNA amplificado mediante los kits comerciales Favorprep GEL/PCR purification Minikit (FAVORGEN, IBIAN, España) o Macherey-Nagel-Extract II purification kit (Macherey-Nagel, Alemania). En el caso de una PCR altamente específica, la purificación del fragmento amplificado se realizó directamente del producto de PCR mediante kit comercial Exo1-SAP (IBIAN, Zaragoza, España).

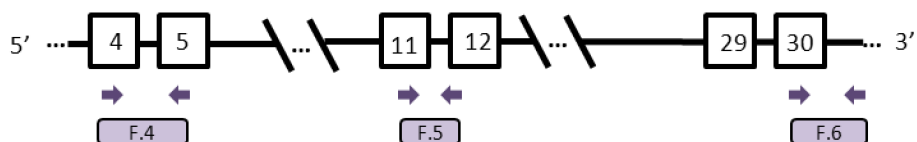
## 7. Búsqueda de polimorfismos en los genes candidatos relacionados con la dureza de la carne

### 7.1. Secuenciación a partir de DNA genómico de varios fragmentos de los genes *CAST* Y *CAPN1*

A partir del DNA genómico de 30 animales con valores extremos para el valor animal del carácter dureza, medido a partir del esfuerzo máximo, (ver apartado 11.1) se amplificaron 3 fragmentos del gen *CAPN1* (Figura 5) y 3 del gen *CAST* (Figura 6) en los que se habían descrito en otras razas polimorfismos asociados a la dureza de la carne.



**Figura 5.** Esquema del gen *CAPN1* (UMD 3.1. BTA29:g.44064429-44089990) donde se indican los fragmentos amplificados y secuenciados a partir del DNA genómico (F.4, F.5, F.6).



**Figura 6.** Esquema del gen *CAST* (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253) donde se indican los fragmentos amplificados y secuenciados a partir del DNA genómico (F.4, F.5, F.6).

Los cebadores para los tres fragmentos del gen *CAPN1* están descritos en Soria *et al.* (2010) mientras que los cebadores utilizados para el gen *CAST* fueron los descritos por Schenkel *et al.* (2006), Juszczuk-Kubiak *et al.* (2009) y (Li *et al.*, 2010) para el intrón 5, intrón 12 y exón 30/3'UTR, respectivamente. La PCR se llevó a cabo según la descripción realizada en el apartado 6.5 utilizando 100 ng de DNA genómico, 5 pmol

de cada cebador y 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Los ciclos de amplificación fueron los mismos que los descritos por Soria *et al.* (2010), Schenkel *et al.* (2006), Juszczuk-Kubiak *et al.* (2009) y Li *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Las condiciones de la PCR para los 6 fragmentos (F.1, F.2, F.3, F.4, F.5 y F.6) fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 6 minutos y 38 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación (TH) (Tabla 4) durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Los fragmentos amplificados se visualizaron y purificaron como se ha descrito en el apartado 6.6 y 6.7. Las muestras fueron preparadas y enviadas según especificaciones del servicio de secuenciación automática Sanger de STABVIDA (Portugal). Una vez recibidos los cromatogramas, se analizaron las secuencias nucleotídicas con el programa bioinformático Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>), y se llevaron a cabo los estudios de homología mediante el programa BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

En la Tabla 4 se describen las secuencias de los cebadores de los diferentes fragmentos amplificados, la temperatura de hibridación (TH) y la talla del fragmento amplificado (pb).

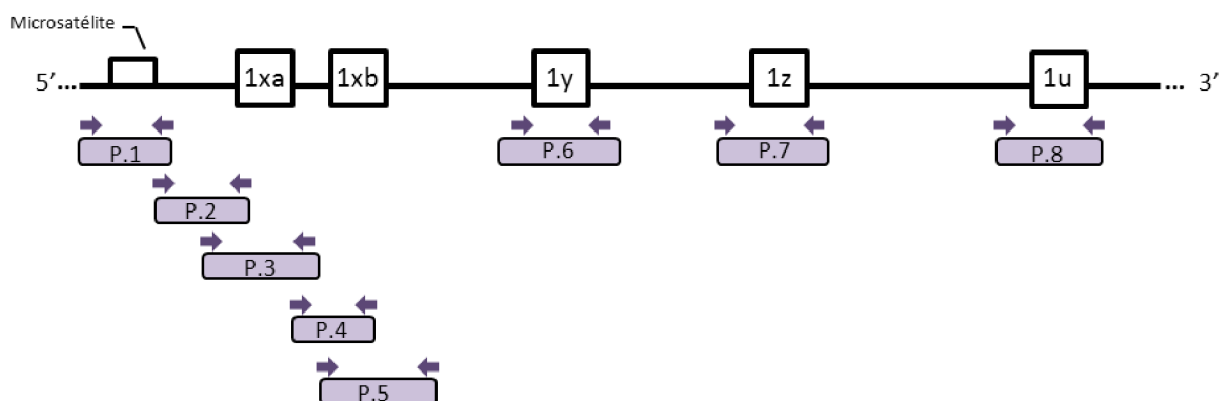
**Tabla 4.** Descripción de los cebadores de los genes *CAPN1* y *CAST* para la búsqueda de nuevos polimorfismos.

Gen	Fragmento amplificado	Referencia cebadores	Secuencia cebadores <sup>1</sup>	TH <sup>2</sup> °C	Tamaño (pb)
<i>CAPN1</i>	F.1 Exones 7, 8 y 9 Intrones 8 y 9	Soria <i>et al.</i> (2010)	F: 5'-CCAGGGCCAGATGGTGAA-3' R: 5'-CGTCGGGTGTCAAGTTGC-3'	62	709
	F.2 Exones 12, 13 y 14 Intrones 13 y 14	Soria <i>et al.</i> (2010)	F: 5'-AGCGCAGGGACCCAGTGA-3' R: 5'-TCCCCTGCCAGTTGTCTGAAG-3'	64	787
<i>CAST</i>	F.3 Intrón 17	Soria <i>et al.</i> (2010)	F: 5'-GAAGGGCTTGGTTGGATGTCGGCAGAG-3' R: 5'-AGGCTGGAGGGGTGTTCTCTGAGTGCCA-3'	74	215
	F.4 Exones 4 y 5 Intrón 5	Schenkel <i>et al.</i> (2006)	F: 5'-GAAAGTAAAGCCAAAGGAACA-3' R: 5'-ATTTCTGTATGGTGGCTGCTCACT-3'	62	408
	F.5 Exón 11 Intrón 12	Juszczuk-Kubiak <i>et al.</i> (2009)	F: 5'-GATGCCTTGTATCCGACTT-3' R: 5'-GGACTGGCAGATGAAGGAAA-3'	62	516
	F.6 Exón 30 / 3'UTR	Li <i>et al.</i> (2010)	F: 5'-ACATTCTCCCCACAGTGCC-3' R: 5'-GACAGAGTCTGCCTTTTGCTC-3'	62	375

<sup>1</sup>F: cebador directo. R: cebador reverso. <sup>2</sup>TH: Temperatura de hibridación.

## 7.2. Secuenciación a partir de DNA genómico del promotor del gen *CAST*

Como se ha descrito en el apartado 4.1.3., los diferentes transcritos de *CAST* se originan por la existencia de cuatro promotores, los cuales se localizan en la región 5' proximal a los exones 1xa, 1xb, 1u y 14t. Los tres promotores activos en músculo esquelético son los localizados en la región 5' proximal a los exones 1xa, 1xb, 1u. Con el objetivo de buscar polimorfismos que pudieran afectar a sitios de unión de factores de transcripción, y por lo tanto a la expresión del gen, se secuenció la región promotora del gen siguiendo el esquema que aparece en la Figura 7. La secuenciación de la región promotora del gen *CAST* se realizó a partir de DNA genómico. Se seleccionaron 30 animales con valores extremos para el carácter dureza y con genotipos alternativos para el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) (animales con estimas del fenotipo dureza altas: 7 AA, 8 AG; animales con estimas del fenotipo dureza bajas para el carácter dureza: 8 AA, 7 AG) de las raza Parda de Montaña y Pirenaica.



**Figura 7.** Estructura de la región promotora del gen *CAST* (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253), y estrategia usada para el aislamiento de la misma.

La PCR se llevó a cabo según la descripción realizada en el apartado 6.5 utilizando 100 ng de DNA genómico, 5 pmol de cada cebador y 2,25 mM de  $MgCl_2$ . Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>). Para la amplificación del fragmento P.3 se utilizó el kit de Biotools (España) para amplificaciones complejas en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 100 ng de DNA, 12,5  $\mu$ l del tampón de reacción (que incluye los dNTPs,  $MgCl_2$ , tampón de reacción,

## Material y Métodos

mezcla de enzimas polimerasas y aditivos que facilitan la desnaturalización del DNA), 8 pmol de cada cebador, y el volumen de H<sub>2</sub>O Milli-Q necesario para alcanzar los 25 µl. Las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación (Temperatura de hibridación descrita en la Tabla 5) durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30. Para el fragmento P.3 se utilizó 1 minuto de tiempo para cada paso de cada ciclo. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron y purificaron como se ha descrito al inicio en el apartado 6.6. y 6.7., y se secuenciaron mediante secuenciación Sanger en la empresa STABVIDA. El genotipado del microsatélite (identificado en el fragmento P.1) se detalla en el apartado 8.4.

**Tabla 5.** Secuencia de cebadores utilizados para la región promotora del gen *CAST*, temperatura de hibridación (TH) y talla del fragmento amplificado (pb).

Fragmentos	Secuencia cebadores <sup>1</sup>	Tamaño (pb)	TH
P.1	F: 5'- <sup>2</sup> FAM-GTAAAGCCGCACAAAACACACCCAGG-3' R: 5'-CCTGGACCCTCTGGATGAGGAAGCGG-3'	157	64
P.2	F: 5'-CGGGCCATCTGAGTTGGTAA-3' R: 5'-TGKGAGGCAGCTTTCCGAC-3'	406	55
P.3	F: 5'-CTGGGAGAAGATACGGGACC-3' R: 5'-CCTTTTACCCTTATCCGCTT-3'	825	55
P.4	F: 5'-AGCCTAGGTGCTTACAGAG-3' R: 5'-TCTGAGAGGAGGTCACAAC-3'	356	58
P.5	F: 5'-CTTTTGCTCACTTGCTACTC-3' R: 5'-CCCAGGGACGATCACTCC-3'	542	58
P.6	F: 5'-GCCCTTTGGGATTAAGTCA-3' R: 5'-GCCAACATTTTAGTAGGAGATATTTG-3'	250	55
P.7	F: 5'-AATTTGCGGTTGACCACACT-3' F: 5'-TGACATGTCTGTTTTCCCTACAA-3'	234	52
P.8	F: 5'-AAAAGGGACTTCCACCATGA-3' F: 5'-CACCCAAGTTGACCCTTGAA-3'	390	55

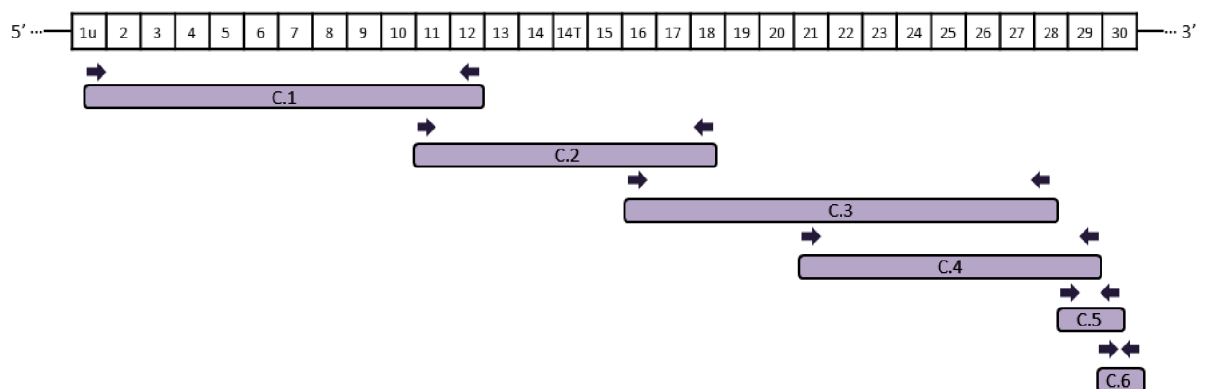
<sup>1</sup>F: cebador directo. R: cebador reverso. <sup>2</sup>Cebador marcado en posición 5' con el fluorocromo FAM.



### 7.3. Secuenciación a partir de cDNA

Para el gen *CAST*, se secuenció el cDNA total de 5 muestras de Parda de Montaña y 3 muestras de Pirenaica con genotipos alternativos para el SNP rs380750993 (*CAST\_4*) (Tabla 7) (3 AA, 3 AT y 2 TT) y con valores extremos para el valor animal del carácter dureza.

En la Figura 8, se representa la estrategia de amplificación seguida para el aislamiento de la longitud total del cDNA. En la Tabla 6, se muestran las secuencias de los cebadores de los diferentes fragmentos amplificados y la talla del fragmento amplificado (pb). Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>). La mezcla de reacción fue similar a la descrita en el apartado 7.1 secuenciación a partir de DNA genómico. Las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, temperatura de hibridación (TH) descrita en la Tabla 6 durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 30 y 45 segundos para los fragmentos 5-6 y 1-2-3-4, respectivamente. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron y purificaron como se ha descrito en los apartados 6.6 y 6.7, y se secuenciaron mediante secuenciación Sanger en la empresa STABVIDA (Portugal).



**Figura 8.** Estructura cDNA del gen *CAST* (*Bos taurus calpastatin* (*CAST*), transcript variant 1, mRNA: NM\_001030318.), y estrategia de amplificación usada para el aislamiento de la longitud total del cDNA del gen *CAST*.

**Tabla 6.** Secuencia de cebadores, temperatura de hibridación (TH) y talla del fragmento amplificado (pb) para la secuenciación del cDNA del *CAST* (*Bos taurus calpastatin* (*CAST*), transcript variant 1, mRNA: NM\_001030318).

Fragmento	Secuencia cebadores <sup>1</sup>	PCR (pb)	TH (°C)
C.1	F: 5'-CAGAAGCCAAGGCTATTCCA-3' R: 5'-TGGCATCCTTTTCCACTTTC-3'	855	53
C.2	F: 5'-GATGCCTTGTCATCCGACTT-3' R: 5'-AGGCTTCAACAGCATCGTCT-3'	616	55
C.3	F: 5'-AGCCCCTGAGTGAATCAGAA-3' R: 5'-TGGAAGCAGGCTTCTGTCT-3'	969	53
C.4	F: 5'-GTCCTCCTCGATGCTCTGTC-3' R: 5'-TCAGCTTTTGGCTTGGAAAGT-3'	602	55
C.5	F: 5'-GGAAAGCAAAGGATTCCACA-3' R: 5'-TGAGGCATCGTTTTCCAAAT-3'	426	55
C.6	F: 5'-ACATTCTCCCCACAGTGCC-3' R: 5'-GACAGAGTCTGCGTTTTGCTC-3'	375	62

<sup>1</sup>F: cebador directo. R: cebador reverso.

## 8. Estudios de asociación

### 8.1. Genotipado mediante PCR-RFLPs

Para los estudios de asociación de los genes *CAST*, *CAPN1*, *RORC*, *LEP*, *FABP4*, *TG*, *FASN* y *SCD* se utilizó la técnica PCR-RFLPs (“Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphisms”), con excepción del rs384020496 (*CAST\_3*) del gen *CAST*. Por otro lado, el SNP del gen *CAST*, rs210072660 (*CAST\_2*), se optimizó su genotipado mediante discriminación alélica por sondas “Beacon”. En la Tabla 7 se detalla la localización de los polimorfismos genotipados mediante PCR-RFLPs.

Para los SNPs de los genes *CAST* y *CAPN1* se genotiparon en una primera fase en los animales de los experimentos 1-10. Posteriormente, se validaron los resultados en una población mayor que incluyeron los animales de los experimentos 11 y 12. Los SNPs de los genes *RORC*, *LEP*, *FABP4*, *TG*, *FASN*, y *SCD* se genotiparon en los animales pertenecientes a los experimentos 1 - 12 (Tabla 1).

**Tabla 7.** SNPs genotipado mediante PCR-RFLPs, localización, referencia bibliográfica, posición relativa en la versión UMD 3.1 del genoma bovino y número de referencia del SNP (refSNP).

Gen	SNP (Alias)	Localización	Referencia	Posición UMD 3.1	refSNP
CAPN1	CAPN1_1 (316)	Exón 9	Page <i>et al.</i> (2002)	BTA29: g.44069063G>C	rs17872000
	CAPN1_2 (530)	Exón 14	Page <i>et al.</i> (2002)	BTA29: g.44085642G>A	rs17871051
	CAPN1_3 (4751)	Intrón 17	White <i>et al.</i> (2005)	BTA29: g.44087629T>C	rs17872050
CAST	CAST_1	Intrón 5	Schenkel <i>et al.</i> (2006)	BTA7: g.98533961C>G	rs110955059
	CAST_2	Exón 7	En este trabajo	BTA7: g.98535683A>G	rs210072660
	CAST_4	Intrón 12	En este trabajo	BTA7: g.98545188T>A	rs380750993
	CAST_5 (2959)	3'UTR	Barendse (2002)	BTA7: g.98579663A>G	rs109221039
RORC	RORC	Exón 7	Barendse <i>et al.</i> (2007a)	BTA3: g.19010079T>G	rs137721616
LEP	LEP	Exón 2	Buchanan <i>et al.</i> (2002)	BTA4: g.93262056C>T	rs29004488
FABP4	FABP4	3'UTR	Michal <i>et al.</i> (2006)	BTA14: g.46832359C>G	rs41729173
TG	TG	5'UTR	Barendse (1999)	BTA14: g.9509285C>T	rs717495489
FASN	FASN	Exón 34	Roy <i>et al.</i> (2006)	BTA19: g.51402032A>G	rs41919985
SCD1	SCD1	Exón 5	Taniguchi <i>et al.</i> (2004)	BTA26: g.21144707C>T	rs208932125

Para la amplificación de la región que contiene los SNPs, se utilizaron los cebadores y las condiciones (concentración de cebadores y  $MgCl_2$ ) que se detallan en la Tabla 8. La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo los protocolos que a continuación se describen.

Las condiciones de la PCR para los SNPs rs17872000 (CAPN1\_1), rs17871051 (CAPN1\_2), rs17872050 (CAPN1\_3), rs110955059 (CAST\_1), rs380750993 (CAST\_4) y rs109221039 (CAST\_5) fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 6 minutos y 38 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación (TH, Tabla 8) durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Para el SNP rs210072660 (CAST\_2) las condiciones fueron 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C

## Material y Métodos

durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos, y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

Para aumentar la rapidez en el genotipado del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) a partir de muestras de sangre, se puso a punto el Kit de PCR directo Phusion Blood (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Para la amplificación por PCR con este kit se emplearon las siguientes condiciones: 1 µl de sangre con EDTA o heparina, 10 µl de buffer de Phusion Blood (2x), 0,5 µM de concentración final de cada uno de los cebadores, 0,4 µl de enzima Phusion Blood II DNA Polimerasa, y el volumen de H<sub>2</sub>O Milli-Q necesario para alcanzar los 20 µl. El protocolo seguido para la amplificación fue 1 ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 5 minutos, y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 98 °C durante 1 segundo, hibridación 59 °C durante 5 segundos y extensión a 72 °C durante 15 segundos, y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 1 minuto. Posteriormente, el producto de PCR es centrifugado a 4000 rpm durante 1-3 minutos, recogiendo 10 µl del sobrenadante para llevar a cabo la digestión.

Para los polimorfismos de los genes *RORC*, *LEP*, *FABP4*, *TG*, *FASN* y *SCD1* las condiciones fueron 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación (TH, Tabla 8) durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos, y un ciclo de extensión final de 72°C durante 5 minutos.

El producto resultante de la PCR se digirió con las enzimas de restricción detalladas en la Tabla 8. Las condiciones de digestión fueron las siguientes: 10 µl de producto PCR, 1,5 µl de tampón 10x específico de la enzima, 1 U de la enzima de restricción y H<sub>2</sub>O Milli-Q hasta completar 15 µl. La temperatura de incubación durante la digestión se describe en la Tabla 8. La incubación se llevó a cabo durante un mínimo de 6h. Los patrones de restricción con las diferentes enzimas se detallan en la Tabla 8. La visualización de los patrones de restricción se realizó en geles de agarosa al 3 - 4 % en tampón TBE 0,5x y tinción con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

**Tabla 8.** Secuencia de cebadores, talla del fragmento amplificado en pb (PCR), concentración de MgCl<sub>2</sub> (mM) y cebadores (μM), temperatura de hibridación en °C (TH) para la amplificación por PCR. Enzimas de restricción (Ez), temperatura de digestión en °C (T inc.) y patrón de bandas para la digestión enzimática en pb (PCR-RFLP).

Gen	SNP	Secuencia cebadores <sup>1</sup>	Referencia cebadores	PCR	MgCl <sub>2</sub>	Cebadores	TH,	Ez.	T inc.	PCR-RFLP
CAPN1	CAPN1_1	F: 5'-CCAGGGCCAGATGGTAA-3'	Soria <i>et al.</i> (2010)	709	2,5	0,32	62	BtgI	37	C: 371, 251, 87
		R: 5'-CGTCGGGTGCAGGTTGC-3'								G: 622, 87
CAPN1	CAPN1_2	F: 5'-AGCGCAGGGACCCAGTGA-3'	Soria <i>et al.</i> (2010)	787	2,5	0,32	64	PfiF1	37	G: 598, 122, 60, 7
		R: 5'-TCCCCTGCCAGTTGCTGAAG-3'								A: 598, 182, 7
CAPN1	CAPN1_3	F: 5'-GAAAGGCTTGGGTTGGGATGTCGGCAGAG-3'	Soria <i>et al.</i> (2010)	215	2,5	0,32	74	BsaI	60	C: 126, 89
		R: 5'-AGGCTGGAGGGGTGTTCTGAGTGCCA-3'								T: 215
CAST	CAST_1	F: 5'-GAAAGTAAAGCCAAAGGAACA-3'	Schenkel <i>et al.</i> (2006)	408	2,5	0,32	62	RsaI	37	G: 211, 197
		R: 5'-ATTTCTGATGGTGGCTCACT-3'								C: 408
CAST	CAST_2	F: 5'-TGCATCATGTCCAGCAGA-3'	En este trabajo	238	2,2	0,28	55	HhaI	37	A: 238
		R: 5'-CACGTGTGCTCACCTTGTGAGTGGTA-3'								G: 178, 60
CAST	CAST_4	F: 5'-GATGCTTGTATCCGACTT-3'	Juszczuk-Kubiak <i>et al.</i> (2009)	516	2,5	0,32	62	BseYI	37	A: 516
		R: 5'-GGACTGGCAGATGAAGGAAA-3'								T: 259, 257
CAST	CAST_5	F: 5'-ACATTTCCCCACAGTGCC-3'	Li <i>et al.</i> (2010)	375	2,5	0,32	62	DdeI	37	A: 247, 128
		R: 5'-GACAGAGTGCAGTTTGTCTC-3'								G: 375
RORC	RORC	F: 5'-GCATACTCTCCTTCTCCTCTCT-3'	Barendse <i>et al.</i> (2007a)	194	2,2	0,24	64.8	MnII	37	G: 100, 44
		R: 5'-CGTCTACGAACTCCTCTGTGC-3'								T: 144
LEP	LEP	F: 5'-ATGGCTGTGGACCCCTGTATC-3'	Buchanan <i>et al.</i> (2002)	94	2,2	0,24	64.8	BtsCI	50	C: 94
		R: 5'-TGGTGTATCCTGGACCTTCC-3'								T: 90, 4
FABP4	FABP4	F: 5'-GCTTCCAGAAATGGTTAG-3'	Michal <i>et al.</i> (2006)	556	2,2	0,24	53	EcoRI	37	C: 337, 219
		R: 5'-TTTGCCAAACACATGGAACA-3'								G: 556
TG	TG	F: 5'-TCAAGAAATCCACCTGCAATG-3'	En este trabajo	199	2,2	0,24	58	BstYI	60	T: 199
		R: 5'-AACCAGGGACGAAATGTGT-3'								C: 146, 53
FASN	FASN	F: 5'-ACCTTGACACGGCTCAACTC-3'	En este trabajo	210	2,5	0,24	57	MscI	37	A: 116, 94
		R: 5'-TAGCCCTTGTCTGCAGGTG-3'								G: 210
SCD1	SCD1	F: 5'-TTATTCCGTTATGCCCTTGG-3'	En este trabajo	234	2,2	0,24	57	AclI	37	C: 107, 69, 58
		R: 5'-GGAGAGGGGTATAAAACAGG-3'								T: 165, 69

<sup>1</sup>F: cebador directo. R: cebador reverso.

## 8.2. Genotipado mediante sondas TaqMan

La discriminación alélica mediante sondas TaqMan se llevó a cabo en el termociclador a tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Madrid, España). Para realizar esta técnica se necesitan dos cebadores específicos de la secuencia para amplificar la región, y dos sondas, cada una de ellas marcada con un fluorocromo, específica para cada alelo. Cada una de las dos sondas TaqMan utilizadas en el ensayo son complementarias para cada uno de los alelos del SNP. En el extremo 5' de la sonda se encuentra el fluorocromo y en el 3' una molécula inhibidora de fluorescencia o "quencher", cuando ambos se encuentran cercanos no se emite fluorescencia. Sin embargo, durante la PCR cuando hay una unión específica de una de las sondas, la DNA polimerasa progresa sobre la cadena de DNA en la síntesis de la complementaria, ésta desplaza y posteriormente hidroliza la sonda mediante su actividad 5' → 3' exonucleasa. Al separarse, la sonda emite fluorescencia.

La discriminación alélica del SNP rs384020496 (*CAST\_3*) del gen *CAST* (Tabla 9) se realizó en un volumen final de 10 µl, conteniendo 1 µl de DNA (50-100 ng), 0,175 µl de la mezcla de cebadores y sondas (36 µM y 8 µM de cebadores y sondas, respectivamente), 5 µl del tampón de reacción TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Madrid, España) y el volumen de H<sub>2</sub>O Milli-Q necesario para alcanzar los 10 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 10 minutos, y 40 ciclos a 92 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. El diseño de cebadores y sondas fue llevado a cabo por Applied Biosystems (Madrid, España) mediante la herramienta bioinformática "Custom TaqMan® Assay Design Tool" (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>). Las secuencias de cebadores y sondas, y la temperatura de hibridación aparecen en la Tabla 10.

Para la detección de la sustitución de dos nucleótidos del gen *DGAT1* (rs109234250 y rs109326954) (Tabla 9) se realizó en un volumen final de 10 µl, conteniendo 1 µl de DNA (50-100 ng), 0,25 µl de la mezcla de cebadores y sondas (36 µM y 8 µM de cebadores y sondas, respectivamente), 5 µl del tampón de reacción

Premix Ex Taq PCR master mix (2x) (Takara, Japón), 0,1 µl Rox Reference Dye II (50x) (Takara, Japón), y el volumen de H<sub>2</sub>O Milli-Q necesario para alcanzar los 10 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 30 segundos, y 40 ciclos a 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 34 segundos. Las secuencias de cebadores y sondas, y la temperatura de hibridación aparecen en la Tabla 10.

Las sondas y cebadores del SNP del gen *DGAT1* (rs109234250 y rs109326954) son los mismos que los descritos por Li *et al.* (2013), cuyo diseño está disponible por parte de Applied Biosystems mediante la herramienta bioinformática “Custom TaqMan® Assay Design Tool” (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>). La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante el software SDS asociado al termociclador ABI7500.

**Tabla 9.** SNPs genotipado mediante sondas TaqMan, localización, referencia bibliográfica, posición relativa al sistema coordinado UMD 3.1 y número de referencia del SNP (refSNP).

Gen	SNP	Loc.	Referencia	Posición UMD 3.1	RefSNP
<i>CAST</i>	<i>CAST_3</i>	Exon 7	En este trabajo	BTA7: g.98535716G>A	rs384020496
<i>DGAT1</i>	<i>DGAT1</i>	Exón 8	Winter, 2002	BTA14: g.1802264- g.1802265GC>AA	rs109234250 y rs109326954

**Tabla 10.** Secuencia de cebadores y sondas, talla del fragmento amplificado (pb) y temperatura de hibridación (TH).

SNP	Secuencia cebadores y sondas <sup>1</sup>	PCR (pb)	TH (°C)
<i>CAST_3</i>	F: 5'-GATCTCCGGTGGTGGAAAGAG-3'	82	60
	R: 5'-ACGTGTGCTCACCTTGTC-3'		
	Sonda 1: 5'-ATCTGCCGAACCAGC-3' <sup>1</sup>		
	Sonda 2: 5'-ATCTGCCAAACCAGC-3' <sup>1</sup>		
<i>DGAT1</i>	F: 5'-CGCTTGCTCGTAGCTTTGG-3'	88	60
	R: 5'-CGCGGTAGGTCAGGTTGTC-3'		
	Sonda VIC: 5'-CGTTGGCCTTCTTAC-3' <sup>1</sup>		
	Sonda FAM: 5'-TTGGCCGCCTTAC-3' <sup>1</sup>		

<sup>1</sup>El nucleótido subrayado es el sitio de variación. F: cebador directo. R: cebador reverso.

### 8.3. Genotipado mediante sondas “Beacon”

Con el objetivo de optimizar el tiempo de genotipado y disminuir el tiempo entre la toma de muestra de sangre y el envío de resultados a empresas interesadas en el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) se puso a punto la discriminación alélica mediante sondas “Beacon”. Para realizar la discriminación alélica del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) se sintetizaron dos sondas de una longitud de 36 nucleótidos cada una. Esta cadena de nucleótidos se divide en dos secciones, con una parte central de 22 nucleótidos que reconoce la secuencia diana de DNA y forma un bucle debido a que se encuentra flanqueada por dos fragmentos complementarios entre sí, que fuerzan a la sonda a adquirir una configuración de horquilla. En los extremos de estos brazos se unen covalentemente un fluorocromo y una molécula inhibidora de fluorescencia o “quencher”. Los cebadores se diseñaron utilizando el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). El diseño de las sondas fue llevado a cabo por la empresa Microsynth (<http://www.microsynth.ch/>) (Tabla 11). Los animales genotipados mediante esta técnica fueron los del experimento 13 que aparecen en la Tabla 2.

**Tabla 11.** Cebadores y sondas “Beacon” utilizados para el genotipado del SNP rs210072660 (*CAST\_2*).

Sondas	Secuencia cebadores y sondas <sup>1</sup>	PCR (pb)
Directo	5'-CTACAAGATGCTCACTAGG-3'	
Reverso	5'-GTGTGCTCACCTTGTCAG-3'	
Beacon - T	FAM 5'-CGCGATCCAGGAACAG <u>T</u> GCTCTTTCCACCGATCGCG-3'BHQ-1 <sup>1</sup>	200
Beacon - C	VIC 5'-CGCGATCCAGGAACAG <u>C</u> GCTCTTTCCACCGATCGCG-3'BHQ-1 <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> El nucleótido subrayado es el sitio de variación.

Para la optimización de la concentración de los cebadores y sondas se realizaron 2 ensayos con 2 concentraciones de cebadores directo y reverso (200 y 100 nM), así como con diferente concentración de sondas (500 y 250 nM). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador a tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Madrid, España). La amplificación se realizó en un volumen final de 10 µl,



conteniendo 1  $\mu\text{l}$  de DNA (50-100 ng), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada una de las sondas, 5  $\mu\text{l}$  del tampón de reacción Premix Ex Taq (2x) (Takara, Japón), 0,1  $\mu\text{l}$  Rox Reference Dye II (50x) y el volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q necesario para alcanzar los 10  $\mu\text{l}$ . Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 30 segundos, y 50 ciclos a 95 °C durante 5 segundos y 58 °C durante 34 segundos. La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante el software SDS asociado al termociclador ABI7500.

#### 8.4. Genotipado del microsatélite

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats), muy abundantes en los genomas de eucariotas, están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. En este caso, se estudió un microsatélite en la región promotora del gen *CAST* (rs460530185), situada a una distancia de 1,4Kb del inicio de la transcripción en dirección 5' (Cong *et al.*, 1998). El microsatélite está formado por repeticiones de citosina-adenina (CA).

Para llevar a cabo el genotipado de las muestras para este microsatélite se realizó en primer lugar la reacción de amplificación de un fragmento que contenía el microsatélite utilizando uno de los cebadores marcado con fluorescencia en la posición 5' (Tabla 12). Se utilizaron los cebadores y condiciones de amplificación descritas por Nonneman *et al.* (1999). Se siguió el protocolo estándar de PCR descrito en el apartado 6.5 y con 0,24  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores y 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 3 minutos y 35 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación a 64 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

La separación de los diferentes fragmentos se llevó a cabo mediante electroforesis capilar usando un secuenciador automático (3130xl genetic analyzer,

Applied Biosystems, Madrid, España). Para ello el producto de la PCR se diluyó en 10 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Se tomó 1 µl del producto diluido y se adicionaron 10 µl de formamida Hi-Di, y 0,25 µl de Std 500 LIZ (Applied Biosystems, Madrid, España) como marcador interno de talla. La muestra preparada se envió al servicio de Biología molecular del Parque Científico Tecnológico de Aula Dei (<http://www.pctauladei.com/>) donde se llevó a cabo la electroforesis capilar. Para la visualización de los resultados se utilizó el programa GeneScan® (Applied Biosystems, Madrid, España). Los animales genotipados fueron los de los experimentos 1-12.

**Tabla 12.** Posición del microsatélite, número de referencia del SNP (refSNP), secuencia de las sondas y talla del fragmento amplificado (pb).

UMD 3.1	RefSNP	Sondas	Secuencia sondas	PCR (pb)
BTA7: g.98444372- 98444380	rs460530185	CSTF4	5'-GTAAAGCCGCACAAAACACACCCAGG-3'	126 - 154
		CSTR4	5'-CCTGGACCCTCTGGATGAGGAAGCGG-3'	

### 8.5. Genotipado mediante secuenciación

En la región 3'UTR del gen *CAST* se encuentran 11 SNPs. Con el fin de optimizar y abaratar su genotipado se puso a punto una PCR que abarcaba estos polimorfismos. La reacción de la PCR se llevó a cabo según se ha descrito en el apartado 6.5 con el kit para reacciones complejas Certamp Mix (Biotools, España), con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2,5mM y de 0,32 µM de cada uno de los cebadores. Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 5 minutos y 38 ciclos de amplificación con el siguiente perfil: desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, hibridación a 62 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, hubo un ciclo de extensión final de 72 °C durante 5 minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron y purificaron como se ha descrito en los apartados 6.6. Y 6.7. Las muestras fueron preparadas y enviadas según especificaciones del Servicio de secuenciación automática Sanger de STABVIDA (Portugal). Una vez recibidos los cromatogramas, se analizaron las secuencias nucleotídicas con el programa bioinformático Bioedit

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). La secuencia de los cebadores aparece en la Tabla 13. Los animales secuenciados fueron los de los experimentos 1-12.

**Tabla 13.** Secuencia cebadores utilizados para el genotipado mediante secuenciación de la región 3'UTR, temperatura de hibridación (TH) y fragmento amplificado (pb).

Cebadores <sup>1</sup>	Secuencia cebadores	TH (°C)	Fragmento (pb)
CAST_UTR-2F:	5'-ACATTCTCCCCACAGTGCC-3'	62	375
CAST_UTR-2R:	5'-GACAGAGTCTGCGTTTTGCTC-3'		

<sup>1</sup>F: cebador directo. R: cebador reverso.

## 9. Estudio de la funcionalidad *in vitro* de la región 3'UTR del gen *CAST*

Para estudiar la actividad de la región 3'UTR del gen *CAST*, se utilizó la técnica de actividad reportera mediante luciferasa para determinar si el SNP rs109221039 (*CAST\_5*) u otros identificados en el estudio de la región 3'UTR, tienen un efecto funcional. Tras el genotipado mediante secuenciación de la región 3'UTR, se realizó el análisis haplotípico con los 11 SNPs encontrados con el software PLINK (Purcell *et al.*, 2007) (Tabla 14). En este estudio de funcionalidad *in vitro*, se utilizaron los cuatro haplotipos más frecuentes. Para ello, se amplificaron estos cuatro haplotipos mediante PCR, se clonaron, se transfectaron a células C2C12 y se midió la actividad reportera de la enzima luciferasa.

**Tabla 14.** Cuatro haplotipos principales de la región 3'UTR del gen *CAST* que se han utilizado para el estudio de la funcionalidad in vitro.

SNP	Posición UMD 3.1	refSNP <sup>1</sup>	Haplotipos			
			H1	H2	H3	H4
<i>CAST_6</i>	BTA 7: g.98579574G>A	rs41255587	G	A	A	A
<i>CAST_5</i>	BTA 7: g.98579663A>G	rs109221039	A	G	A	G
<i>CAST_7</i>	BTA 7: g.98579691T>C	rs210861835	T	C	T	C
<i>CAST_8</i>	BTA 7: g.98579733G>C	rs384811952	G	G	G	G
<i>CAST_9</i>	BTA 7: g.98579763G>A	En este trabajo	G	G	G	A
<i>CAST_10</i>	BTA 7: g.98579792C>T	rs379698624	C	C	C	C
<i>CAST_11</i>	BTA 7: g.98579842G>A	rs208500290	G	A	G	G
<i>CAST_12</i>	BTA 7: g.98579852C>T	rs110607241	C	T	C	T
<i>CAST_13</i>	BTA 7: g.98579856G>A	En este trabajo	G	G	G	G
<i>CAST_14</i>	BTA 7: g.98579864G>C	rs109939022	G	C	C	C
<i>CAST_15</i>	BTA 7: g.98579865C>T	En este trabajo	C	C	C	T

<sup>1</sup> refSNP: número de referencia del SNP.

### 9.1. Cultivo y mantenimiento de líneas celulares

Para estudiar la actividad de la región 3'UTR del gen *CAST* se utilizó la línea celular C2C12 (ATCC Number: CRL-1772), obtenida originariamente por Yaffe y Saxel (1977) a partir de mioblasto de músculo esquelético del muslo de ratones C3H. Las células se cultivaron en medio DMEM-GlutaMAX (Gibco® BRL, Life Technologies™, California, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. La incubación de las células se realizó a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>. Para la diferenciación a mioblasto, se utilizó el medio de diferenciación DMEM-GlutaMAX (Gibco® BRL, Life Technologies™, California, EE.UU.) suplementado con suero de caballo al 2%, 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina.

### 9.2. Clonaje y subclonaje de DNA

La estrategia que se ha seguido en esta técnica consiste, primero, en el clonaje de un producto de PCR en el vector comercial pGEM®-T Easy (Promega, España), seguido de un subclonaje en el vector pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target

Expression (Promega, España). El inserto que se utilizó para el subclonaje proviene de la digestión del plásmido generado en el primer clonaje. Lo que se pretende con esta estrategia es cambiar el inserto a un vector para células eucariotas, que pueda ser utilizado para la medición de la actividad reportera del gen luciferasa. A continuación detallaremos, brevemente, las técnicas utilizadas en este proceso, haciendo referencia a los protocolos y kits comerciales utilizados en el laboratorio.

### 9.2.1. PCR

La región 3'UTR del gen *CAST* fue amplificada mediante PCR a partir de DNA genómico. Se utilizó el sistema Expand High Fidelity PCR system de Roche (Basilea, Suiza), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>) y la síntesis de cebadores se llevó a cabo por la empresa Biolegio BV (Nijmen, Países Bajos). En el extremo 5' de cada uno de los cebadores se añadieron las secuencias diana de las enzimas de restricción *XhoI* y *Sall*, para generar el inserto con extremos cohesivos que se insertará en el vector. El producto PCR se purificó mediante QIAquick® Gel Extraction Kit (Hilden, Alemania). En la Tabla 15 se muestran las secuencias de los cebadores, la temperatura de hibridación y la talla del fragmento amplificado.

**Tabla 15.** Secuencia de los cebadores empleados para el clonaje del fragmento de la región 3'UTR del gen *CAST*.

Cebadores	Diana para subclonaje	Secuencia de cebadores <sup>1</sup>	TH <sup>2</sup>	Frag. (pb)
<i>CAST_LUC_F</i>	<i>XhoI</i>	5'-CCCTCGAGCAGCGGGTAGATGGTGACTTCTG-3'	60	750
<i>CAST_LUC_R</i>	<i>Sall</i>	5'-CCGTCGACTGGCAGAGATCAAGCCATGTGA-3'		

<sup>1</sup>La secuencia correspondiente a las dianas de los enzimas de restricción aparece subrayada.

<sup>2</sup>TH: temperatura de hibridación (°C).

### 9.2.2. Ligación

El fragmento de DNA purificado (inserto) se ligó, como ya se ha comentado con anterioridad, en una primera fase al vector pGEM®-T Easy (Promega, España), y

posteriormente se subclonó en el vector pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression (Promega, España) empleando la enzima Ligasa T4 (Takara, Otsu, Japón) y siguiendo las condiciones estándar del protocolo.

### **9.2.3. Transformación bacteriana**

Esta técnica permite la entrada de DNA exógeno en bacterias competentes. En este caso, se introdujo el producto obtenido de la ligación (plásmido) en bacterias competentes *Escherichia coli* DH-5 $\alpha$  junto con el producto de la ligación mediante tratamiento con choque térmico.

Tras el choque térmico, se adicionaron 800  $\mu$ l de medio de cultivo líquido LB (Luria-Bertani) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación. Las bacterias se centrifugaron, y el precipitado se volvió a suspender en 100  $\mu$ l de LB. Finalmente, se realizó la siembra en superficie en placas de medio LB-agar con Ampicilina (AP) 100  $\mu$ g/ml. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

La presencia del inserto en las colonias que crecieron en estas placas se comprobó mediante PCR o digestión con las enzimas de restricción (*Xho*I y *Sal*I). Las que resultaron positivas se enviaron a secuenciar para comprobar si el inserto era correcto (STABVIDA, Portugal).

### **9.2.4. Cultivo bacteriano**

Con el objetivo de aumentar la producción de plásmido y obtener mayor cantidad para la posterior fase de transfección, las colonias positivas se cultivaron en medio de cultivo líquido LB a 37 °C durante toda la noche. Se utilizaron los Kits GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-aldrich, España) y QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, España) para la extracción del DNA plasmídico a partir de 5 ml (Miniprep) o 500 ml (Maxiprep) de cultivo, siguiendo las condiciones estándar del protocolo.

### 9.3. Ensayos de actividad reportera

#### 9.3.1. Transfección temporal

La introducción del plásmido dentro de las células C2C12, se realizó empleando el sistema de transfección de polímeros policatiónicos JetPEI™ (Poly plus transfection, Francia). Se transfectaron 2 µg de plásmido luciferasa con el inserto. El plásmido se diluyó en 100 µl de NaCl (150 mM), a dicha dilución se adicionó la solución de JetPEI™ (4 µl de JetPEI™ en 100 µl de NaCl 150 mM). La mezcla se agitó mediante vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguidamente, se añadió gota a gota la mezcla sobre las células y se mantuvieron 48 h a 37 °C, en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Para la transfección, se utilizaron placas de 35 mm de diámetro con una confluencia de las células del 70%.

#### 9.3.2. Medida de la actividad de la luciferasa

En primer lugar, se lavaron las células con PBS (1x) (tampón fosfato salino) (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), y a continuación se lisaron en placa con 200 µl del tampón Reporter Lysis buffer 1x (Promega, España) según las instrucciones del fabricante. Los extractos se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante.

Para la determinación de la actividad de la enzima luciferasa se utilizó el Sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, España) que contiene una disolución del sustrato para la enzima luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) y una solución que produce la inactivación de esta actividad y, además, contiene el sustrato para la enzima luciferasa de *Renilla reniformis*.

En el luminómetro (Glomax 20/20, Promega, España) se midió la luz emitida por cada muestra (2 repeticiones/pocillo y 2 pocillos/muestra o vector vacío) con la solución del sustrato para la luciferasa de luciérnaga. Finalmente, la medida de la actividad luciferasa se normalizó con respecto a la medida obtenida añadiendo de manera inmediata la solución que contenía un tampón de inactivación de la primera

actividad enzimática y el sustrato de luciferasa de *Renilla reniformis* sobre la muestra, siguiendo el protocolo del fabricante.

## **10. Análisis bioinformáticos**

Se utilizaron programas relacionados con la búsqueda de datos en sistemas integrados y en bases de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), diseño de cebadores con el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), y alineamiento, búsqueda de secuencias y estudios de homologías con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La búsqueda de secuencias dianas para enzimas de restricción y patrón teórico de digestión de un fragmento de DNA se llevó a cabo mediante herramientas informáticas NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) y (<http://rebase.neb.com/rebase/rebtools.html>). Para la búsqueda de los posibles sitios de unión de microRNA (miRNA) en la región 3'UTR se usó el programa Microinspector (<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>). Para la predicción de posibles islas CpG susceptibles de ser metiladas en la región promotora del gen *CAST* se utilizó el programa Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>) predijo los posibles sitios de unión a factores de transcripción.

Variante Effect Prediction (VEP) (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) del Ensembl fue utilizado para estudiar el efecto funcional de las sustituciones nucleotídicas encontradas. VEP indica si se produce una sustitución aminoacídica, indicando el posible impacto de la misma sobre la funcionalidad de la proteína mediante dos valores o aproximaciones: SIFT y PolyPhen.

El programa SIFT toma la secuencia de DNA que se consulta y utiliza la información para predecir alineaciones múltiples de sustituciones toleradas y deletéreas para cada posición de la secuencia que se consulta. SIFT es un procedimiento de múltiples etapas que comienza con la búsqueda de secuencias



similares, luego elige secuencias estrechamente relacionadas que pueden compartir función similar a la secuencia que se desea analizar, obtiene la alineación de estas secuencias elegidas, y calcula las probabilidades normalizadas para todas las sustituciones posibles de la alineación. Posiciones con probabilidades normalizadas menores a 0,05 se predicen como perjudiciales y aquellos valores mayores o iguales a 0,05 se predicen como tolerados.

PolyPhen-2 es una herramienta automática para la predicción de posibles efectos de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de una proteína humana. Esta predicción se basa en una serie de características que comprenden la información de la secuencia, filogenéticas y estructurales que caracterizan a la sustitución. Para una sustitución de un aminoácido en una proteína, PolyPhen-2 utiliza varias secuencias diferentes y características basadas en la estructura del sitio de sustitución y las suministra a un clasificador probabilístico. PolyPhen-2 intenta identificar una proteína de consulta como una entrada en el subconjunto de proteínas humanas en las base de datos UniProtKB / Swiss-Prot. Los parámetros calculados dan como resultado distintos tipos de clasificación en cuanto a la sustitución que se evalúa. Estos son "benigno", "posiblemente perjudicial", "probablemente dañinos" o "desconocido".

Finalmente, los programas que utilizamos para el análisis del desequilibrio de ligamiento entre SNPs y construcción de los haplotipos fueron PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>), BEAGLE 4.1 (<https://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle.html>) y Haploview (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>). PLINK fue también utilizado para estudiar si los SNPs estaban el equilibrio de Hardy-Weinberg.

## 11. Análisis estadístico

### 11.1. Valor animal

El efecto del valor animal en el carácter dureza (esfuerzo máximo, N/cm<sup>2</sup>) se estimó en los animales de los ensayos 1 al 10 mediante el ajuste a un Modelo Lineal Mixto usando el procedimiento HPMIXED en SAS (versión 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC, EE.UU.). El modelo incluyó como factores fijos el sexo (*S*), la raza (*R*), la dieta (*D*) y la interacción de raza con la dieta (*R* × *D*); como covariables el peso al sacrificio (*PS*) y la edad al sacrificio (*ES*); y como efectos aleatorios el animal (*A*) y el efecto residual (*e*). La varianza de los animales se considera heterogénea para la raza ( $A \sim N(0, \sigma_{AB}^2)$ ) y la varianza homogénea para el efecto residual ( $e \sim N(0, \sigma^2)$ ). La ecuación para el modelo fue:

$$y = u + S + R + D + (R \times D) + b(PS) + b(ES) + A + e$$

En el caso del efecto del valor animal en el carácter del contenido de grasa intramuscular se estimó de manera similar al del carácter dureza de la carne.

### 11.2. Efectos sobre el esfuerzo máximo

#### 11.2.1. Estudio de asociación de los polimorfismos de genes *CAPN1* y *CAST* con la dureza de la carne madurada a tiempo intermedio.

La asociación entre los 8 polimorfismos seleccionados de los genes *CAPN1* y *CAST* [(rs17872000 (*CAPN1\_1*), rs17871051 (*CAPN1\_2*), rs17872050 (*CAPN1\_3*), rs110955059 (*CAST\_1*), SNP rs210072660 (*CAST\_2*), rs384020496 (*CAST\_3*), rs380750993 (*CAST\_4*) y rs109221039 (*CAST\_5*)] (Capítulo I) con la dureza de la carne se llevó a cabo en los animales de los ensayos 1 al 10, mediante el ajuste al modelo lineal mixto usando el procedimiento HPMIXED (High Performance Mixed procedure) del SAS.

El modelo incluyó la interacción de la raza con el genotipo del SNP ( $R \times G$ ), el sexo anidado a la raza  $S(R)$ , y la interacción de la dieta con la raza ( $D \times R$ ) como efectos fijos; el peso al sacrificio anidado a la raza ( $PS(R)$ ) se incluyó como covariable; y el animal ( $A$ ) y el efecto residual ( $e$ ) se incluyeron como efectos aleatorios. La varianza de los animales se considera heterogénea para la raza ( $A \sim N(0, \sigma_{AB}^2)$ ) y la varianza homogénea para el efecto residual ( $e \sim N(0, \sigma^2)$ ). La ecuación para el modelo fue:

$$y = \mathbf{u} + (\mathbf{R} \times \mathbf{G}) + \mathbf{S}(\mathbf{R}) + (\mathbf{R} \times \mathbf{D}) + \mathbf{b}(PS(\mathbf{R})) + \mathbf{A} + \mathbf{e}$$

Se estimaron las medias mínimo cuadráticas (LSMeans) y error estándar de cada genotipo según la raza. Se utilizó el test de Bonferroni de comparaciones múltiples para comparar entre las medias mínimo cuadráticas. Todos los polimorfismos se analizaron independientemente con el mismo modelo estadístico.

### **11.2.2. Estudio de asociación de los polimorfismos de los genes *CAPN1* y *CAST* con la dureza de la carne a distintos tiempos de maduración.**

Se realizó el estudio de asociación de los SNPs [rs17872000 (*CAPN1\_1*), rs17871051 (*CAPN1\_2*), rs17872050 (*CAPN1\_3*), rs210072660 (*CAST\_2*), rs109221039 (*CAST\_5*)] (Capítulo II), [rs41255587 (*CAST\_6*), rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*), rs384811952 (*CAST\_8*), BTA 7: g.98579763G>A (*CAST\_9*), rs379698624 (*CAST\_10*), rs208500290 (*CAST\_11*), rs110607241 (*CAST\_12*), BTA 7: g.98579864G>C (*CAST\_13*), rs109939022 (*CAST\_14*) y BTA 7: g.98579865C>T (*CAST\_15*)] (Capítulo III) y [rs460530185 (microsatélite), SNP rs210072660 (*CAST\_2*) y rs109221039 (*CAST\_5*)] (Capítulo IV) con el esfuerzo máximo (N/cm<sup>2</sup>) para la raza Parda de Montaña y la Pirenaica por separado en los animales de los ensayos 1 al 12.

El estudio de asociación entre los SNPs anteriormente citados de los genes *CAST* y *CAPN1* con la dureza de la carne (esfuerzo máximo, N/cm<sup>2</sup>) se llevó a cabo mediante el ajuste a un modelo mixto de medidas repetidas usando el procedimiento MIXED en SAS (versión 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se aplica la corrección de Satterthwaite para el ajuste de los grados de libertad. Esta corrección se recomienda cuando no

existe un número igual de datos por animal o hay datos que faltan (Kaps y Lamberson, 2009). Se testaron diferentes matrices de varianza-covarianza para modelizar la estructura de la covarianza del modelo mixto. La matriz de varianza-covarianza elegida fue VC (variance components) porque fue la matriz que convergió de menor valor para los criterios BIC (Bayesian Information Criterion) y AIC (Aikake Information Criterion).

### **Raza Parda de Montaña**

El modelo incluye como factores fijos: el SNP o el número de copias de cada alelo para el microsatélite (se codificaron incluyendo 0, 1 o 2), el tiempo de maduración, y su interacción ( $SNP \times M$ ), la dieta anidada al sexo y su interacción con el tiempo de maduración ( $D(S) \times M$ ) y el experimento ( $E$ ). Además, inicialmente se incluyeron el peso canal y edad al sacrificio como covariables, sin embargo como no resultaron significativos en ninguno de los modelos se eliminaron. El efecto animal ( $A$ ) y el efecto residual ( $e$ ) fueron incluidos como efectos aleatorios.

$$y = u + D(S) \times M + SNP \times M + E + A + e$$

### **Raza Pirenaica**

En la raza Pirenaica se dispone de menos observaciones, y sólo hay dos experimentos con más de un tiempo de maduración por lo que el modelo es diferente del utilizado en Parda de Montaña.

El modelo incluye como factores fijos: el SNP o el número de copias de cada alelo para el microsatélite (se codificaron incluyendo 0, 1 o 2), el tiempo de maduración, y su interacción ( $SNP \times M$ ) y la dieta anidada al sexo y su interacción con el tiempo de maduración ( $D(S) \times M$ ). Inicialmente se incluyeron el peso canal y edad al sacrificio como covariables, sin embargo como no resultaron significativos en ninguno de los modelos se eliminaron. El efecto animal ( $A$ ), Experimento y el efecto residual ( $e$ ) fueron incluidos como efectos aleatorios.

$$y = u + D(S) \times M + SNP \times M + A + E + e$$

Se estimaron las medias mínimo cuadráticas (LSMeans) y error estándar de cada genotipo y dieta anidada en el sexo para cada tiempo de maduración. Se utilizó el test de Bonferroni de comparaciones múltiples para comparar entre las medias mínimo cuadráticas. Todos los polimorfismos se analizaron independientemente con el modelo estadístico correspondiente a cada raza.

### 11.2.3. Estudio de asociación de haplotipos.

Se utilizó el software PLINK (Purcell *et al.*, 2007) para estimar el desequilibrio de ligamientos entre los 3 SNPs del gen *CAPN1* [(rs17872000 (*CAPN1\_1*), rs17871051 (*CAPN1\_2*), rs17872050 (*CAPN1\_3*)] y 5 SNPs del gen *CAST* [rs110955059 (*CAST\_1*), SNP rs210072660 (*CAST\_2*), rs384020496 (*CAST\_3*), rs380750993 (*CAST\_4*) y rs109221039 (*CAST\_5*)] mediante el coeficiente de correlación múltiple,  $r^2$ . En el caso del Capítulo II se estimó el desequilibrio de ligamiento entre los 3 SNPs del gen *CAPN1* [(rs17872000 (*CAPN1\_1*), rs17871051 (*CAPN1\_2*), rs17872050 (*CAPN1\_3*)] y 2 SNPs del gen *CAST* [rs210072660 (*CAST\_2*) y rs109221039 (*CAST\_5*)], mientras que en el Capítulo III se estimó en los 11 SNPs aislados en la región 3'UTR [rs41255587 (*CAST\_6*), rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*), rs384811952 (*CAST\_8*), BTA 7: g.98579763G>A (*CAST\_9*), rs379698624 (*CAST\_10*), rs208500290 (*CAST\_11*), rs110607241 (*CAST\_12*), BTA 7: g.98579864G>C (*CAST\_13*), rs109939022 (*CAST\_14*) y BTA 7: g.98579865C>T (*CAST\_15*)]. En el Capítulo IV el desequilibrio de ligamiento se calculó para el microsatélite situado en la región promotora (rs460530185) y dos SNPs del gen *CAST* [SNP rs210072660 (*CAST\_2*) y rs109221039 (*CAST\_5*)].

Los valores para el test de equilibrio de Hardy-Weinberg y la heterocigosidad observada y esperada para cada SNP se calcularon usando PLINK. El estudio de las fases de ligamiento de los SNPs se llevó a cabo con el software PLINK usando el algoritmo E-M (Expectation-Maximisation) para asignar los haplotipos individuales para los Capítulos I, II y III. En el caso del Capítulo IV, se utilizó el programa Beagle que permite estimar las fases haplotípicas cuando en los estudios se incluyen microsatélites.

La asociación entre los haplotipos y la dureza de la carne en el Capítulo I se llevó a cabo en los animales de los ensayos 1 - 10, mediante el procedimiento HPMIXED en SAS. El modelo al que se ajustó fue similar al que se usó para el estudio de asociación de los SNPs, pero incluye el efecto de la raza anidada al haplotipo ( $H(R)$ ). Los haplotipos para cada individuo se codificaron incluyendo 0, 1 o 2 para indicar el número de copias de cada haplotipo. La ecuación del modelo fue el siguiente:

$$y = u + H(R) + S(R) + (R \times D) + b(PS(R)) + A + e$$

En el caso de los Capítulos II, III y IV se utilizaron los animales de los ensayos 1 - 12, mediante el procedimiento HPMIXED en SAS, analizando la raza Parda de Montaña y la Pirenaica por separado. El modelo al que se ajustó fue similar al que se usó para el estudio de asociación de los SNPs, pero incluye el efecto de la interacción del tiempo de maduración con el haplotipo ( $H \times M$ ). Los haplotipos para cada individuo se codificaron incluyendo 0, 1 o 2 para indicar el número de copias de cada haplotipo. La ecuación del modelo fue el siguiente:

$$y = u + D(S) \times M + H \times M + E + A + e$$

Sólo se consideraron los haplotipos con una frecuencia igual o superior al 1%. Se estimaron las medias mínimo cuadráticas (LSMeans) y error estándar de cada haplotipo según la raza. Se utilizó el test de Bonferroni de comparaciones múltiples para comparar entre las medias mínimo cuadráticas. Todos los haplotipos se analizaron independientemente con el mismo modelo estadístico.

### 11.3. Estudio de asociación de los SNPs de los genes candidatos y el contenido de grasa intramuscular

El estudio de asociación entre los SNPs de los genes *TG*, *RORC*, *LEP*, *FASN*, *DGAT1*, *FABP4*, *SCD1*, *CAPN1* y *CAST* con el contenido de grasa intramuscular se llevó a cabo mediante el ajuste a un modelo mixto usando el procedimiento MIXED en SAS (versión 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se aplica la corrección de Satterthwaite para el ajuste de los grados de libertad.

### Raza Parda de Montaña

El modelo incluye como factores fijos: el SNP (**SNP**) y el sexo anidado a la dieta (**S(D)**); y el peso canal caliente (**PCC**) y la edad al sacrificio como covariables. Sin embargo, la edad al sacrificio no fue significativa en ninguno de los modelos por lo que se eliminó de ellos. En el modelo se incluyeron como efectos aleatorios el experimento y el efecto residual.

$$y = u + S(D) + SNP + PCC + E + e$$

### Raza Pirenaica

El modelo incluye como factores fijos: el SNP (**SNP**) y el sexo anidada a la dieta (**S(D)**); y el peso canal caliente y la edad al sacrificio como covariables. Sin embargo, ninguno de estos parámetros fue significativo en ninguno de los modelos por lo que se eliminaron de ellos. En el modelo se incluyeron como efectos aleatorios el experimento y el efecto residual.

$$y = u + S(D) + SNP + E + e$$

Se estimaron las medias mínimo cuadráticas (LSMeans) y error estándar de cada genotipo y dieta anidada en el sexo para cada tiempo de maduración. Se utilizó el test de Bonferroni de comparaciones múltiples para comparar entre las medias mínimo cuadráticas.





# Resultados y Discusión

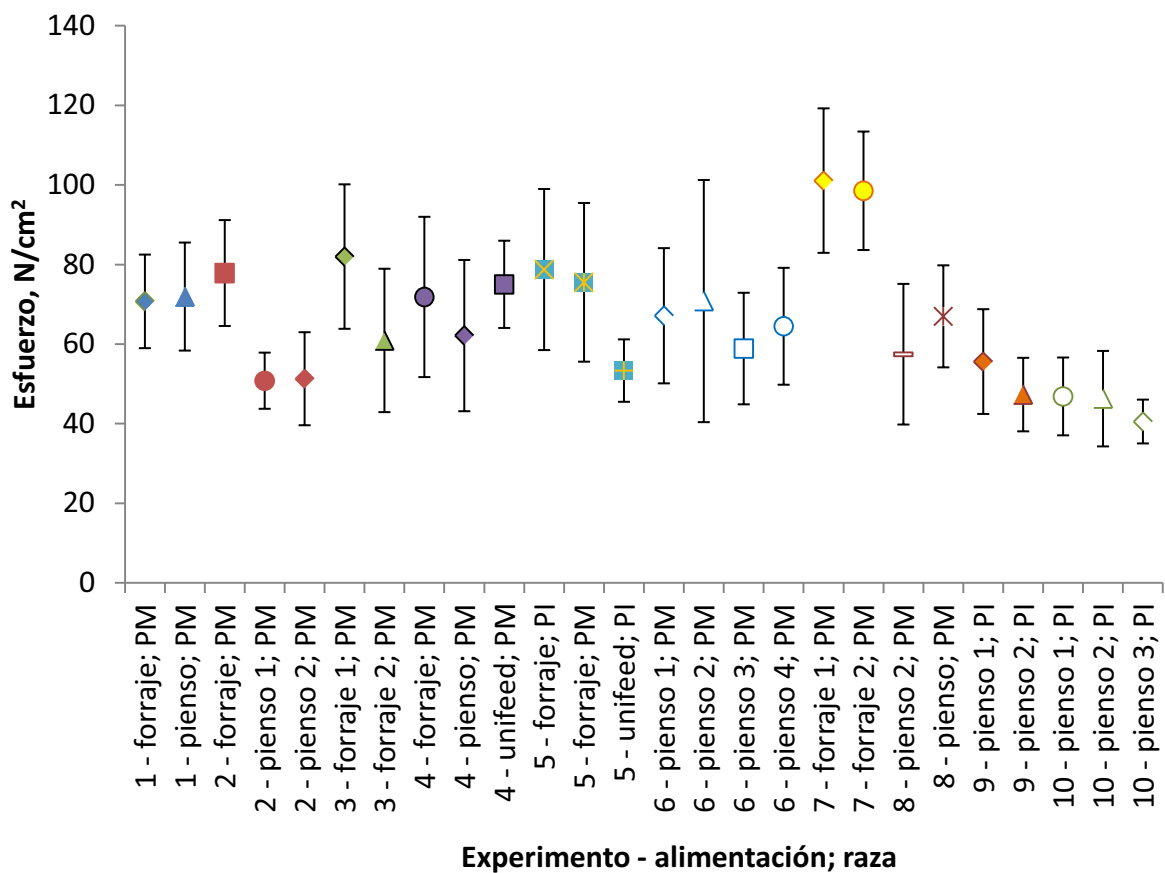
En este apartado se presentan los resultados obtenidos para dar cumplimiento a los objetivos planteados en este trabajo. Como consecuencia del trabajo desarrollado en la realización de la Tesis doctoral que se presenta, se ha publicado un artículo, una patente y varias comunicaciones a congresos (ver Anexos) en los cuáles se basará la exposición de resultados y discusión de la presente memoria.



CAPÍTULO I. Aislamiento de una nueva mutación en el gen *calpastatina (CAST)* y estudios de asociación con la dureza de la carne de vacuno



En los ensayos realizados desde el año 2003 hasta el 2013 (experimentos 1-10, Tabla 1 de Material y Métodos) en los que se evaluó el carácter esfuerzo en el músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia ( $7,9 \pm 0,08$  días) se constató que existía una elevada variabilidad entre animales del mismo sexo, misma alimentación, y peso y edad al sacrificio similares. En la Figura 9 se representan los valores promedio y desviación estándar de cada lote de animales analizado, considerando todos los experimentos.



**Figura 9.** Promedio y desviación estándar del esfuerzo a maduración intermedia de cada lote de cada experimento. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Por este motivo, se evaluó la proporción de varianza fenotípica del carácter esfuerzo debida al animal en cada una de las razas estudiadas. El valor fenotípico del esfuerzo máximo fue  $70,77 \pm 20,49$  y  $53,00 \pm 16,59$  N/cm<sup>2</sup> para las razas Parda de

Montaña y Pirenaica, respectivamente. La varianza fenotípica y la varianza animal para el esfuerzo fueron mayores en Parda de Montaña ( $\sigma_f^2 = 420,01$ ;  $\sigma_a^2 = 284,13$ ) que en Pirenaica ( $\sigma_f^2 = 275,27$ ;  $\sigma_a^2 = 138,7$ ). La varianza residual fue 0,99. De esta manera la varianza debida al animal fue de un 67,6 y 50,4% para Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente. Esta elevada variabilidad atribuible al animal podría deberse a factores genéticos, y en concreto a genes de gran efecto como se han descrito para la dureza de la carne.

En vista de estos resultados, se decidió estudiar los genes *CAST* y *CAPN1*, que como ya se ha comentado en la revisión bibliográfica están muy relacionados con el carácter dureza de la carne. Para ello, se secuenciaron 3 fragmentos de DNA genómico tanto de *CAPN1* como de *CAST* y posteriormente se secuenció la mayor parte del cDNA del gen *CAST* con el objetivo de buscar polimorfismos asociados a este fenotipo. Se realizó un estudio de asociación entre los polimorfismos y haplotipos encontrados y el fenotipo dureza de la carne en la población estudiada. Por último, se puso a punto una metodología más rápida para la detección de una nueva variante génica asociada al carácter dureza.

## 1. Búsqueda de polimorfismos en los genes *CAPN1* y *CAST*

El rango del valor animal para el carácter esfuerzo y el número de los animales seleccionados para la búsqueda de polimorfismos por raza fue el siguiente:

Parde de Montaña:

- 10 animales entre -33,77 y -16,95.
- 10 animales entre 20,07 y 48,18.

Pirenaica:

- 5 animales entre -31,18 y -6,18.
- 5 animales entre 13,95 y 22,31.

A partir del DNA genómico de estos 30 animales se amplificaron 3 fragmentos del gen *CAPN1* (exón 9, exón 14/intrón 14 e intrón 17) y 3 del gen *CAST* (intrón 5, intrón 12 y exón 30/3'UTR) en los que se habían descrito, anteriormente, polimorfismos asociados a la dureza de la carne en otras razas.

En el gen *CAPN1* se encontraron 7 SNPs (Tabla 16), de los cuales tres de ellos se encontraban en zona codificante. Dos de las mutaciones encontradas, en el exón 9 (rs17872000; *CAPN1\_1*) y en el exón 14 (rs17871051; *CAPN1\_2*) habían sido previamente descritas por Page *et al.* (2002), y denominadas en la bibliografía como *CAPN1\_316* y *CAPN1\_530*, respectivamente.

**Tabla 16.** Polimorfismos encontrados en los exones 9 y 14 y los intrones 14 y 17 del gen *CAPN1* secuenciado a partir de DNA genómico.

BTA	Localización	Posición en UMD 3.1	Ref SNP	Nomenclatura
29	exón 9	g.44069056G>A	rs433866111	
	exón 9	g.44069063G>C	rs17872000	<i>CAPN1_1</i>
	exón 14	g.44085642G>A	rs17871051	<i>CAPN1_2</i>
	intrón 14	g.44085769C>T	rs17871058	
	intrón 14	g.44085989C>T	rs17871059	
	intrón 17	g.44087629T>C	rs17872050	<i>CAPN1_3</i>
	intrón 17	g.44087655G>A	rs17872051	

El tercer SNP en zona codificante fue una sustitución silente localizada en el exón 9 (BTA29: g.44069056G>A). Los otros 4 SNPs encontrados se localizan en 2 intrones. De estos 4 SNPs, uno del intrón 17 (rs17872050; *CAPN1\_3*) ya fue descrito por White *et al.* (2005) y denominado en la bibliografía como *CAPN1\_4751*. Los polimorfismos *CAPN1\_1* y *CAPN1\_2*, y el *CAPN1\_3* fueron genotipados para los estudios de asociación porque ya habían sido asociados anteriormente con la dureza de la carne.

En el gen *CAST* se aislaron 14 polimorfismos a partir de la secuenciación del intrón 5, intrón 12 y exón 30/3'UTR a partir de DNA genómico (Tabla 17). Ninguno de estos polimorfismos está localizado en zona codificante.

En el intrón 5 se encontraron 3 SNPs, de los cuales el *CAST\_1* (rs110955059) fue descrito por primera vez por Schenkel *et al.* (2006). Dichos autores encontraron relación entre el SNP y la dureza de la carne madurada a distintos tiempos de maduración. Asimismo, este SNP ha sido estudiado en posteriores estudios (p. ej. Pinto *et al.* (2010) en la raza Nellore, Curi *et al.* (2010) en cruzados de *Bos indicus* y *Bos taurus* y Avilés *et al.* (2013a) en la raza Limusín). En el intrón 12 se encontraron 4 SNPs, el SNP rs380750993 (*CAST\_4*), que no había sido anteriormente descrito, se eligió por su localización en la parte media del gen, en el intrón 12. En el exón 30 o región 3'UTR fueron localizados 11 SNPs, 8 de los cuales modifican posibles sitios de unión a miRNA (ver Capítulo III). El SNP *CAST\_5* descrito por primera vez por Barendse (2002), modifica un posible sitio de unión del miRNA BTA-miR-542-5p. En este mismo estudio, se encontró asociación entre el SNP y la dureza de la carne. Esta asociación ha sido estudiada posteriormente por diversos autores en diferentes razas y cruces (Casas, 2006; Curi *et al.*, 2009; Johnston y Graser, 2010; Lee *et al.*, 2014b; Li *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2006; Tait *et al.*, 2014; Van Eenennaam *et al.*, 2007).



**Tabla 17.** Polimorfismos encontrados en el gen *CAST* (UMD 3.1. BTA7:g.98444979-98581253).

Secuenciación	Polimorfismo	Localización	Posición en UMD 3.1	Ref SNP	Nom. Tesis <sup>1</sup>
DNA	indel	intrón 5	g. 7:98533778 - 7:98533779 -/T	rs518385158	
DNA	SNP	intrón 5	g.98533869T>C	rs209238027	
DNA	SNP	intrón 5	g.98533961C>G	rs110955059	CAST_1
DNA	indel	intrón 12	g.98545049-98545051 ACA/-	rs797781081	
DNA	SNP	intrón 12	g.98545111C>T	rs797998695	
DNA	indel	intrón 12	g.98545150delG	rs385836076	
DNA	SNP	intrón 12	g.98545188T>A	rs380750993	CAST_4
cDNA	SNP	exón 6	g.98534197T>C	rs109677393	
cDNA	SNP	exón 9	g.98541469C>T	rs110741130	
cDNA	SNP	exón 9	g.98541475G>A	rs109531514	
cDNA	SNP	exón 8	g.98539771C>T	rs208769026	
cDNA	SNP	exón 7	g.98535683A>G	rs210072660	CAST_2
cDNA	SNP	exón 7	g.98535716G>A	rs384020496	CAST_3
cDNA	SNP	exón 24	g. 98566770G>C	No descrito	
cDNA	SNP	exón 24	g.98566734C>T	No descrito	
cDNA	SNP	exón 21	g.98563530A>G	rs382777604	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554376T>C	rs385988348	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554382T>C	No descrito	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554385T>C	rs379869591	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554388G>A	rs109917981	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554418T>C	rs109617221	
cDNA	SNP	exón 18	g.98554427T>C	rs385318650	
cDNA	SNP	exón 17	g.98552479T>C	rs110165615	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579574A>G	rs41255587	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579663A>G	rs109221039	CAST_5
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579691T>C	rs210861835	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579763G>A	No descrito	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579842A>G	rs208500290	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579852C>T	rs110607241	
cDNA/DNA	SNP	exón 30	g.98579856G>A	No descrito	

<sup>1</sup> Nom. Tesis: Nomenclatura Tesis

Los SNPs descritos por Barendse (2002) y Schenkel *et al.* (2006) han sido incluidos en sendos test comerciales. El test “Gene Star Tenderness” (Bovigen LLC Harahan, LA) incluye el SNP descrito por Barendse (2002), mientras que el test “Igenity Tender-GENE” (Merial Limited, Duluth; GA) contiene el SNP identificado por Schenkel *et al.* (2006). En la presente Tesis el SNP *CAST:c.155C>T* (NM\_174003) descrito por Barendse *et al.* (2007b) que produce un cambio aminoacídico en la posición p.Pro52Leu (GenBank NM\_174003) se encontró fijado para la población estudiada. Este SNP ha sido también asociado en dos análisis de asociación que incluía las razas Angus, Brahman, Belmont Red, Hereford, Murray Grey, Santa Gertrudis y Shorthorn (Barendse *et al.*, 2007b) y Agnus, Charolés, Limusín, Hereford y Simental (Ekerljung, 2012).

Finalmente, a partir de la secuenciación de 2.822 pb del gen *CAST* cDNA se han encontrado 23 SNPs, 7 de los cuales ya habían sido encontrados a partir de la secuenciación inicial (Tabla 17). De estos SNPs, los SNPs *CAST\_2* (rs210072660) y *CAST\_3* (rs384020496) localizados en el exón 7, producen un cambio aminoacídico en las posiciones p.Thr182Ala (*CAST\_2*) y p.Glu193Lys (*CAST\_3*) (GenBank NM\_174003). El SNP *CAST\_2* había sido identificado anteriormente mediante el alineamiento de las secuencias del gen *CAST* depositadas en GenBank en poblaciones bovinas, pero no había sido caracterizado (Motter *et al.*, 2009). Estos dos SNPs también fueron genotipados para los estudios de asociación.

### 1.1. Estudios de asociación con el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis*

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los 8 SNPs seleccionados para cada una de las razas y la población total se muestran en la Tabla 18.

Todos los SNPs se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ), excepto el SNP *CAPN1\_3* que presentó un déficit de animales heterocigotos en la población de Parda de Montaña y en la población total.

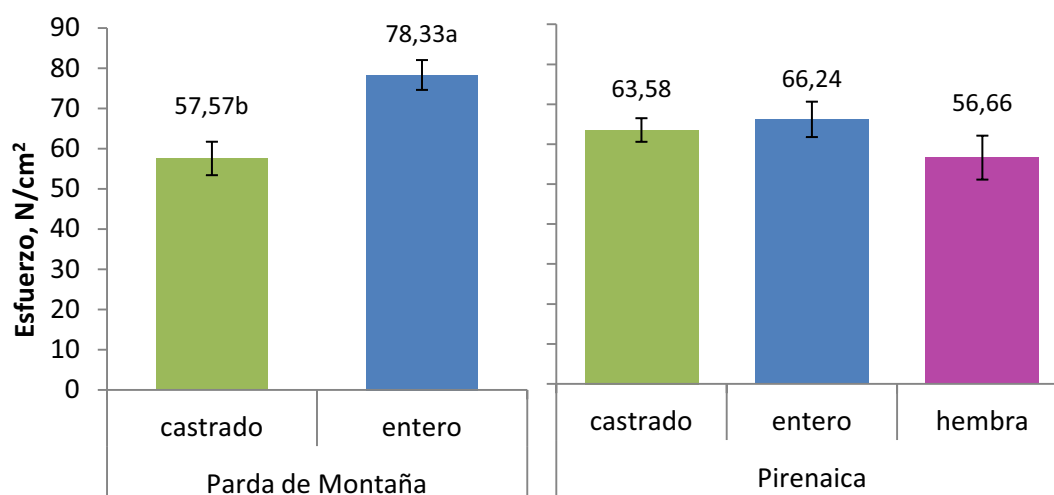
**Tabla 18.** Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes *CAPN1* y *CAST* en las razas Parda de Montaña (PM) y Pirenaica (PI).

SNP	Genotipo	n			Alelo	Frecuencia		
		Total	PM	PI		Total	PM	PI
<i>CAPN1_1</i>	GG	171	127	44	0,94	0,94	0,94	
	CG	23	17	6				
	CC	0	0	0				
<i>CAPN1_2</i>	GG	70	61	9	0,59	0,64	0,54	
	AG	88	58	30				
	AA	34	21	13				
<i>CAPN1_3</i>	CC	33	29	4	0,65	0,64	0,66	
	CT	71	44	27				
	TT	91	70	21				
<i>CAST_1</i>	CC	93	75	18	0,68	0,71	0,61	
	GC	79	52	27				
	GG	23	16	7				
<i>CAST_2</i>	AA	83	66	17	0,66	0,68	0,60	
	GA	93	65	28				
	GG	20	13	7				
<i>CAST_3</i>	AA	4	3	1	0,86	0,86	0,86	
	AG	46	33	13				
	GG	146	108	38				
<i>CAST_4</i>	TT	102	81	21	0,71	0,73	0,63	
	AT	72	48	24				
	AA	21	14	7				
<i>CAST_5</i>	AA	120	91	29	0,78	0,73	0,74	
	GA	64	45	19				
	GG	11	7	4				

### 1.1.1. Efectos ambientales

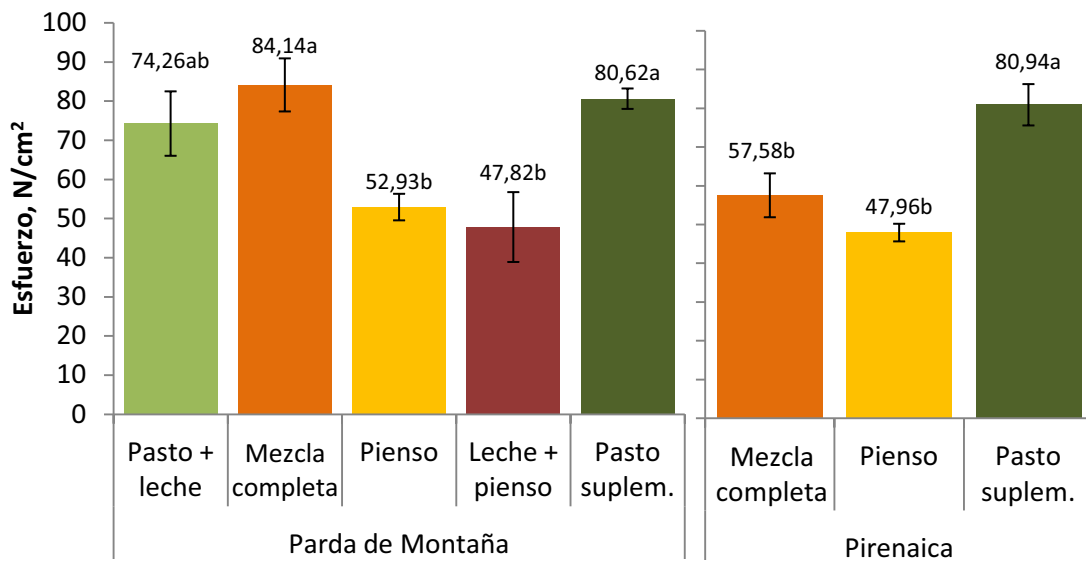
El efecto del sexo sobre el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* dependió de la raza estudiada ( $P < 0,001$ ). El esfuerzo se vio afectado por el sexo en la raza Parda de Montaña pero no en la raza Pirenaica (Figura 10). En la raza Parda de Montaña, la carne de los animales castrados fue un 26,5% más tierna que la de los machos enteros ( $P = 0,002$ ). Esta diferencia puede deberse en parte al hecho de que la castración puede afectar al tipo de fibras musculares (Brandstetter *et al.*, 1998).

Sin embargo, en la raza Pirenaica, la carne de machos enteros, castrados y hembras tuvo valores similares de esfuerzo. El diferente efecto de la castración sobre la dureza según la raza ya fue descrito por Mandell *et al.* (1997). Estos autores sugirieron que la diferencia de madurez de los machos entre razas puede ser la responsable de las diferentes respuestas a la castración. De hecho, la raza Pirenaica es de madurez tardía, mientras que la raza Parda de Montaña puede ser clasificada como intermedia (Piedrafita *et al.*, 2003). Por lo tanto, la diferencia de dureza entre animales castrados y enteros de la misma edad sería más evidente en la raza Parda de Montaña, ya que los animales están más cerca de la madurez.



**Figura 10.** Efecto del sexo sobre el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia en la raza Parda de Montaña y Pirenaica. Las barras verticales indican el error estándar. Dentro de una raza, letras diferentes indican diferencias al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

La alimentación afectó al esfuerzo en ambas razas (Figura 11). En la raza Parda de Montaña, las dietas basadas en pienso y las de leche y pienso produjeron carne más tierna que la obtenida con dietas forrajeras (mezcla completa y con pasto suplementado con concentrado). Los animales alimentados con pasto y leche mostraron valores intermedios. En la raza Pirenaica, los animales alimentados con mezcla completa y pienso presentaron carne más tierna que los animales alimentados con pasto suplementado con pienso ( $P < 0,05$ ).



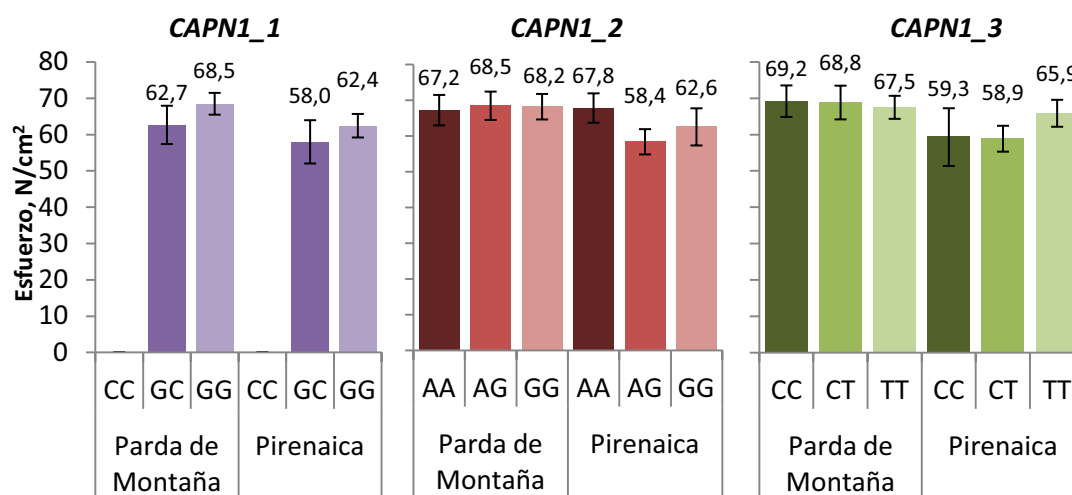
**Figura 11.** Efecto de la alimentación sobre el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia. Las barras verticales indican el error estándar. Dentro de una raza, letras diferentes indican diferencias al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

La dieta puede afectar a la dureza a través del tipo de dieta o del plano nutricional (Muir *et al.*, 1998). Según estos autores, estos factores no afectan a la dureza de la carne cuando los animales tienen un peso al sacrificio similar. En este estudio, el esfuerzo ha sido corregido por el peso al sacrificio, y por tanto las diferencias que se observan no se pueden atribuir a diferencias en este parámetro. En la revisión llevada a cabo por Andersen *et al.* (2005), los autores afirmaron que cuando hay una disminución de la tasa de degradación de proteínas, puede haber un incremento del crecimiento de la musculatura asociada a un aumento de la dureza, por ejemplo tras una restricción en el plano de nutrición o en machos enteros frente a castrados. Además, otros autores apuntan que las dietas pueden provocar diferencias en el contenido de grasa intramuscular (Blanco *et al.*, 2010), lo que puede repercutir en la dureza (French *et al.*, 2000). En el presente estudio, las dietas con mayor aporte energético resultan en carnes más tiernas que las dietas con menor aporte energético teórico.

### 1.1.2. Efecto de los SNPs

#### 1.1.2.1. Efecto de los SNPs de CAPN1

En el presente estudio, el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* no se vio afectado por ninguno de los 3 SNPs del gen *CAPN1* estudiados: *CAPN1\_1* ( $P = 0,39$ ), *CAPN1\_2* ( $P = 0,29$ ) y *CAPN1\_3* ( $P = 0,90$ ) en ninguna de las dos razas (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de los SNPs de *CAPN1* sobre el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia de las razas Parda de Montaña y Pirenaica. Las barras verticales indican el error estándar.

Esta falta de asociación puede ser debida al bajo número de animales genotipados, y a un número desequilibrado de genotipos en la población estudiada para el SNP *CAPN1\_1*, en el que no se encontraron animales con genotipo CC. En el estudio realizado por Allais *et al.* (2011) se describe una baja frecuencia de animales CC (< 1%) en la raza Charolés y Blanca de Aquitania. De la misma manera que ocurre en el presente estudio, tampoco se encontraron diferencias en la dureza de la carne para el SNP *CAPN1\_1* en cruces con las razas Retinta y Limusín, pero sí en Charolés a 7 días de maduración del músculo *Longissimus dorsi* (Avilés *et al.*, 2013a). Así mismo, no se detectó el efecto del SNP *CAPN1\_1* en la dureza de la carne en ganado Brahman a los 7 días de maduración en el músculo *Longissimus* (Casas *et al.*, 2005) ni en cruces con razas checas (Kaplanová *et al.*, 2013).

Otros estudios apoyan la falta de asociación descrita en este estudio entre el SNP *CAPN1\_2* y la dureza de la carne en las raza Brahman a 7 días de maduración (Casas *et al.*, 2005) y en la raza Hanwoo a 7 días de maduración (Lee *et al.*, 2014b).

Como se ha comentado anteriormente, White *et al.* (2005) encontraron una asociación entre *CAPN1\_3* (intrón 17) y la dureza de la carne en una población de la raza Brahman (*Bos indicus*), otra de razas *Bos taurus* y otra de animales cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus*. Esta asociación en la que se describen diferencias favorables para el genotipo CT frente al homocigoto TT ha sido confirmada posteriormente por otros autores en cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Curi *et al.*, 2009), y en la raza Nelore (Pinto *et al.*, 2010).

#### 1.1.2.2. Efecto de los SNPs de *CAST*

El efecto de los SNPs de *CAST* sobre la dureza de la carne a maduración intermedia dependió de la raza estudiada mostrando efecto en la carne de la raza Parda de Montaña (*CAST\_1*,  $P = 0,019$ ; *CAST\_2*,  $P = 0,008$ ; *CAST\_4*  $P = 0,011$ ), pero no en la raza Pirenaica (Tabla 19).

En la raza Parda de Montaña, para el SNP *CAST\_1*, la carne de los animales con el genotipo GC fue más tierna que la carne de animales con el genotipo GG, presentando el genotipo CC valores intermedios. Sin embargo, en la raza Pirenaica no hubo diferencias entre genotipos. El efecto observado en el presente estudio para el alelo G de *CAST\_1* en la raza Parda de Montaña fue mayor que el encontrado por Schenkel *et al.* (2006), donde el efecto fue de 1,66 N/cm<sup>2</sup>. Schenkel *et al.* (2006) asoció el genotipo CC con los animales con una carne más tierna frente a los genotipos GG (-11,27 N) y el genotipo GC tuvo una dureza intermedia a los 7 días de maduración. Este estudio fue llevado a cabo en animales cruzados (Angus, Limusín, Charolés y Simmental) de diferente sexo (machos, hembras y castrados). Así mismo, el efecto del genotipo CC frente a los genotipos CG y GG de este SNP ha sido encontrado por Pinto *et al.* (2010) en la raza Nellore.

**Tabla 19.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo (N/cm<sup>2</sup>) del músculo *Longissimus thoracis* a maduración intermedia para los SNPs de CAST según la raza.

SNP	P-valor <sup>1</sup>	Raza	Genotipo		
			CC	GC	GG
CAST_1	0,019	Parda de Montaña	67,99 ± 3,37ab	64,92 ± 3,42a	81,02 ± 5,23b
		Pirenaica	59,75 ± 4,11	59,92 ± 3,64	69,36 ± 5,05
CAST_2	0,008	Parda de Montaña	67,00 ± 3,43a	66,68 ± 3,20a	84,33 ± 5,60b
		Pirenaica	60,65 ± 4,26	59,54 ± 3,56	69,48 ± 5,04
CAST_3	0,795	Parda de Montaña	65,65 ± 13,30	64,49 ± 4,03	69,25 ± 3,15
		Pirenaica	62,83 ± 13,76	62,64 ± 4,61	62,02 ± 3,49
CAST_4	0,011	Parda de Montaña	82,67 ± 5,36a	65,44 ± 3,49b	67,15 ± 3,29b
		Pirenaica	69,17 ± 5,06	60,44 ± 3,78	59,15 ± 3,96
CAST_5	0,110	Parda de Montaña	68,02 ± 3,22	65,26 ± 3,66	80,42 ± 7,11
		Pirenaica	59,95 ± 3,68	60,59 ± 3,84	72,38 ± 6,27

<sup>1</sup> Raza x SNP.

Al igual que en la raza Pirenaica en la que no hubo efecto del genotipo del SNP CAST\_1, Avilés *et al.* (2013a) no encontraron asociación en carne cocinada en las razas Limusín, Charolés y Retinta. Sin embargo, este estudio asoció el alelo C a una carne más tierna midiendo la dureza de carne cruda (sin cocinar) en Limusín. Sin embargo, en un panel sensorial utilizando los mismos animales, fue el alelo G de este marcador el que apareció asociado a una carne más tierna (Avilés *et al.*, 2015).

Para el polimorfismo CAST\_2, los genotipos AA y GA mostraron valores más bajos para el carácter esfuerzo que el genotipo GG en la raza Parda de Montaña. No se encontraron diferencias en el carácter esfuerzo entre los genotipos AA y GA. Finalmente, para CAST\_4 el genotipo AA presentó mayor esfuerzo que el genotipo AT



y TT, pero no se encontraron diferencias significativas en la dureza entre los genotipos AT y TT en la raza Pirenaica.

En este estudio, los genotipos GG, GG Y AA de los SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* y *CAST\_4*, respectivamente, presentaron una fuerza de corte mayor que otros genotipos y un efecto negativo sobre la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña. En la raza Pirenaica, a pesar de no encontrar diferencias significativas, sí que se observó que estos genotipos presentaron una fuerza de corte mayor. Para estos tres SNPs las diferencias estimadas entre los genotipos fueron similares. Los genotipos heterocigotos, GC (*CAST\_1*), GA (*CAST\_2*) y AT (*CAST\_4*), no mostraron diferencias significativas con los genotipos CC (*CAST\_1*), AA (*CAST\_2*) y TT (*CAST\_4*), ni valores de dureza intermedia como había sido publicado con anterioridad (Allais *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2006; Chung y Davis, 2012; Schenkel *et al.*, 2006).

La asociación entre el SNP *CAST\_5* y la dureza encontrada por Barendse (2002), en la cual el genotipo GG fue asociado a la carne más dura, no fue encontrada en nuestro estudio. Este estudio se llevó a cabo en machos de las razas Angus, Belmont Red, Braham, Hereford, Santa Gertrudis y Shorthorn, y ha sido confirmado posteriormente en diferentes razas y cruces como son: Hereford, Angus, Red Angus, Limusín, Charolés, Gelviah y Simmental y cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Casas *et al.*, 2006); en Jersey x Limusín, Angus y cruces de Hereford (Morris *et al.*, 2006); Charolés x Angus (Van Eenennaam *et al.*, 2007); cruces de Angus, Rubia Gallega, Canchim, con Nellore (*Bos indicus*) (Curi *et al.*, 2009), Angus, Hereford, Murray Grey y Shorthorn y razas *Bos indicus* (Johnston y Graser, 2010); 3 razas puras chinas (Li *et al.*, 2010), Angus (Tait *et al.*, 2014), y Hanwoo (Lee *et al.*, 2014b).

En el presente estudio, las diferencias entre los genotipos alternativos para *CAST\_1*, *CAST\_2* y *CAST\_4* estuvieron entre 13,034 y 17,346 N/cm<sup>2</sup> sobre la media del esfuerzo máximo para la raza Parda de Montaña. Además, en el estudio de Schenkel *et al.* (2006) el genotipo heterocigoto tiene una dureza intermedia, lo que no ocurre en el presente estudio. Esto, unido a que los SNPs *CAST\_1* y *CAST\_4* no son mutaciones causales, sino que están localizadas en región intrónica, indican que el

polimorfismo *CAST\_2* podría ser la mutación causal del efecto encontrado en este estudio. En el estudio de Motter *et al.* (2009) se concluía que el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) no tenía ningún efecto sobre la función de la proteína, lo que contradice los resultados de este estudio.

## 1.2. Análisis de los haplotipos y estudio de asociación

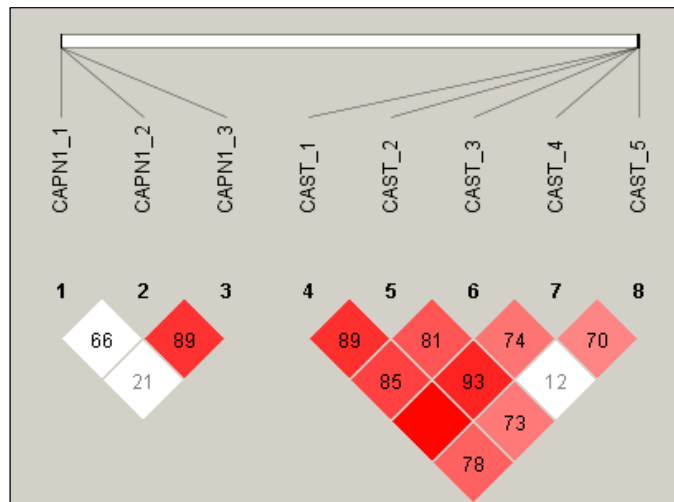
Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento se muestran en la Tabla 20 por parejas de SNPs. El desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de los genes *CAPN1* y *CAST* obtuvo unos valores desde 0,00006 a 0,02800, resultado esperado debido a su localización en diferentes cromosomas.

**Tabla 20.** Análisis de desequilibrio de ligamiento con el software PLINK.

SNP <sub>1</sub>	SNP <sub>2</sub>	r <sup>2</sup>
<i>CAPN1_1</i>	<i>CAPN1_2</i>	0,011
<i>CAPN1_1</i>	<i>CAPN1_3</i>	0,003
<i>CAPN1_2</i>	<i>CAPN1_3</i>	0,164
<i>CAST_1</i>	<i>CAST_2</i>	0,756
<i>CAST_1</i>	<i>CAST_3</i>	0,177
<i>CAST_1</i>	<i>CAST_4</i>	0,884
<i>CAST_1</i>	<i>CAST_5</i>	0,404
<i>CAST_2</i>	<i>CAST_3</i>	0,152
<i>CAST_2</i>	<i>CAST_4</i>	0,718
<i>CAST_2</i>	<i>CAST_5</i>	0,316
<i>CAST_3</i>	<i>CAST_4</i>	0,166
<i>CAST_3</i>	<i>CAST_5</i>	0,009
<i>CAST_4</i>	<i>CAST_5</i>	0,371

Este análisis señala la existencia de dos bloques de ligamiento que segregan conjuntamente (Figura 13), destacando el alto valor de desequilibrio de ligamiento constituido por los SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* y *CAST\_4* (r<sup>2</sup> de 0,71 a 0,88) en el segundo bloque de ligamiento. Es destacable, que 19 de los 20 animales con genotipo GG de *CAST\_2* fueron homocigotos para los alelos G y A de *CAST\_1* y *CAST\_4* indicando que

estos genotipos están en alto desequilibrio de ligamiento. Además el efecto detectado para el esfuerzo de la carne es similar en los tres SNPs.



**Figura 13.** Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW. El color y el número indican el valor D' (desequilibrio de ligamiento).

El análisis de haplotipos identificó 7 y 19 haplotipos para los de genes *CAPN1* y *CAST*, respectivamente. Para el gen *CAPN1*, 5 haplotipos tuvieron una frecuencia mayor al 1%, representando el 98,97% del total de los haplotipos identificados (Tabla 21). No se encontraron asociaciones entre los haplotipos de *CAPN1* con la dureza de la carne.

**Tabla 21.** Frecuencia, medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte (N/cm<sup>2</sup>) del músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia para los haplotipos más frecuentes de *CAPN1*.

Hap.	Frec.	P-valor <sup>1</sup>	Raza	nº copias del haplotipo (hap.)			
				0	1	2	
h1	GAT	39,5%	0,65	Parda de Montaña	69,53 ± 4,24	68,44 ± 6,12	65,41 ± 9,84
				Pirenaica	56,86 ± 9,75	56,05 ± 12,33	65,22 ± 14,70
h2	GGC	30,6%	0,98	Parda de Montaña	67,44 ± 3,20	69,98 ± 6,99	65,97 ± 9,58
				Pirenaica	58,61 ± 8,76	58,80 ± 10,12	60,72 ± 17,60
h3	GGT	23,2%	0,88	Parda de Montaña	67,96 ± 3,31	66,81 ± 7,01	68,62 ± 9,42
				Pirenaica	53,25 ± 10,46	60,33 ± 11,95	64,55 ± 16,18

<sup>1</sup> Interacción entre el haplotipo y la raza.

Para el gen *CAST*, 8 haplotipos tuvieron una frecuencia superior al 1%, que representa el 94,38% del total de haplotipos. Los haplotipos h2 (GGGAG) y h5 (CGGTA) mostraron diferencias con la dureza de la carne ( $P < 0,05$ ) (Tabla 22).

**Tabla 22.** Frecuencia, medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* tras una maduración intermedia para los haplotipos más frecuentes de *CAST*.

Hap.	Frec.	P-valor <sup>1</sup>	Raza	nº copias del haplotipo (hap.)		
				0	1	2
h1 CAGTA	61,0%	0,28	Parda de Montaña	94,27 ± 8,53	91,06 ± 10,08	99,48 ± 11,96
			Pirenaica	63,96 ± 11,74	59,60 ± 15,80	61,36 ± 18,27
h2 GGGAG	13,8%	0,04	Parda de Montaña	81,60 ± 7,76a	90,46 ± 9,96a	112,75 ± 14,42b
			Pirenaica	55,81 ± 11,89	58,62 ± 14,03	70,49 ± 20,01
h3 GGAAA	7,7%	0,90	Parda de Montaña	93,16 ± 8,78	96,71 ± 11,25	-
			Pirenaica	63,77 ± 9,84	61,70 ± 12,79	59,45 ± 24,38
h4 GGGAA	3,8%	0,30	Parda de Montaña	87,99 ± 6,12	100,24 ± 9,69	96,60 ± 20,27
			Pirenaica	61,45 ± 13,25	61,83 ± 16,62	-
h5 CGGTA	2,8%	0,003	Parda de Montaña	85,29 ± 8,84a	104,59 ± 11,55b	-
			Pirenaica	61,64 ± 14,52	-	-
h6 GGAAG	1,5%	0,96	Parda de Montaña	78,05 ± 14,49	79,09 ± 18,42	-
			Pirenaica	57,78 ± 22,74	61,06 ± 30,59	-
h7 CAGTG	1,5%	0,40	Parda de Montaña	84,35 ± 14,23	72,79 ± 18,97	-
			Pirenaica	60,17 ± 24,03	58,67 ± 29,45	-
h8 CAATG	1,0%	0,36	Parda de Montaña	86,00 ± 14,97	71,14 ± 18,93	-
			Pirenaica	61,92 ± 21,83	56,92 ± 31,65	-

<sup>1</sup> Interacción entre el haplotipo y la raza. En una fila, medias con letras diferentes indican diferencias al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

Los animales homocigotos h2/h2 (n = 7) producen carne menos tierna que los animales con una sola copia o con ninguna copia de h2 (Tabla 22). Los animales heterocigotos para este haplotipo tiene una dureza mayor que los que no tienen ninguna copia pero las diferencias no son significativas ( $P = 0,07$ ). Este haplotipo está compuesto por los alelos G, G y A de los SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* Y *CAST\_4*, respectivamente, que fueron asociados con la dureza de la carne en el estudio de asociación individual de los SNPs. Los animales con una copia del haplotipo h5 (n = 11) tienen una carne más dura que los animales sin ninguna copia de este haplotipo. No se encontraron animales homocigotos h5/h5. Este haplotipo contiene los alelos C, G y T para los SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* y *CAST\_4*, respectivamente, siendo el alelo G del SNP *CAST\_2* el único que se asocia a la dureza de la carne. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en los estudios de asociación individual de los SNPs, indicando que el SNP *CAST\_2* puede ser el causante del efecto encontrado en este estudio.

### **1.3. Significación biológica del nuevo polimorfismo rs210072660 (*CAST\_2*) asociado a la dureza de la carne**

Para valorar el impacto de este SNP sobre la dureza de la carne en las poblaciones estudiadas se calculó el porcentaje de varianza debida al SNP. La varianza fenotípica, animal y del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) para el esfuerzo de la carne en Parda de Montaña fue 420, 288 y 78,0, respectivamente, mientras que en Pirenaica fue de 275, 130 y 14,1. Por lo tanto, la proporción de varianza fenotípica explicada por el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) fue de 18,56 y el 5,11% para la raza Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente.

El polimorfismo rs210072660 (*CAST\_2*) se localiza en el exón 7 del gen *CAST* y causa un cambio en la secuencia aminoacídica en la posición 182 (NM\_174003: p.Thr182Ala). La sustitución Thr182Ala es una sustitución no conservativa. Los análisis *in silico* del efecto del cambio aminoacídico sobre la funcionalidad de la proteína mostraron que la sustitución Thr182Ala era tolerable con valores de SIFT de 1. El programa Polyphem también la definió como benigna. Este cambio aminoacídico está

localizado en el exón 7, en el dominio L de la proteína. La función del dominio L no está clara, pero se ha descrito que puede interactuar con el dominio DII de la calpaína en su forma inactiva (libre de calcio) a través de la secuencia aminoacídica que se encuentra entre los exones 4 y 7 (De Tullio *et al.*, 2009; Melloni *et al.*, 2006). El nivel de proteólisis y de tenderización en la carne depende de la concentración de calpaína inactiva, y la asociación entre la calpaína, todavía inactiva, con la calpastatina citosólica puede regular esta concentración. A concentraciones nanomolares de  $\text{Ca}^{2+}$  la calpaína permanece inactiva, pero la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula activa la calpaína. Esta interacción calpaína-calpastatina es altamente específica, pero la estabilidad del complejo calpaína-calpastatina depende de las cargas electrostáticas localizadas en las regiones que interactúan entre ambas proteínas. A este respecto, la hidropaticidad asociada con cada aminoácido cambia de -0,7 a 1,8 para Thr y Ala, respectivamente, en la escala de Kyte-Doolittle. Además, Thr es uno de los aminoácidos fosforilables, y la introducción de grupos fosfato negativo afecta negativamente a la estabilidad de la interacción (De Tullio *et al.*, 2009). La sustitución de Thr (rs210072660, alelo A) por Ala (rs210072660, alelo G) puede generar una unión más estable entre calpaína y calpastatina. Esta hipótesis es apoyada por Barendse *et al.* (2007b) que encontraron un cambio Pro52Leu, también localizado en el dominio L, que cambiaba la hidropaticidad en este punto de la calpastatina (de 1,6 a 3,8). Este cambio aminoacídico (Pro52Leu) también ha sido asociado con la dureza de la carne, y los autores plantean como hipótesis que el cambio en la hidropaticidad de esta región puede afectar a la unión de la calpastatina a las membranas celulares y a la calpaína.

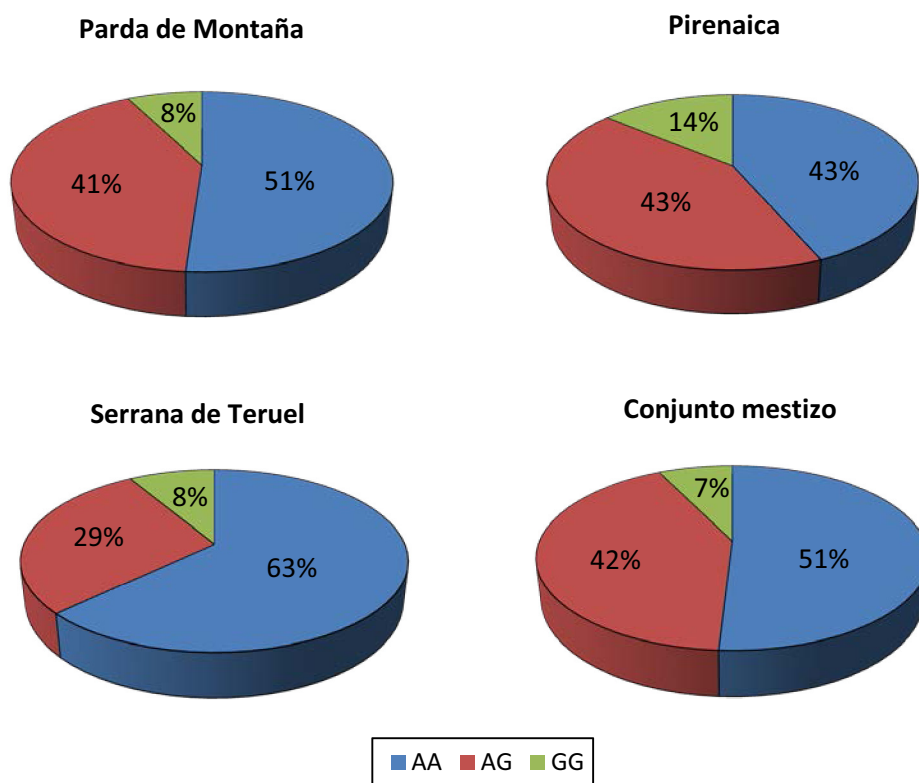
#### **1.4. Distribución de las frecuencias genotípicas. Detección rápida mediante discriminación alélica con sondas “Beacon”.**

Con el objetivo de optimizar el tiempo de genotipado y disminuir el tiempo entre la toma de muestra de sangre y el envío de resultados a empresas interesadas en el SNP *CAST\_2* (rs210072660) se puso a punto la discriminación alélica mediante sondas “Beacon”. Además, debido a la baja representación de animales homocigotos para el

alelo G, se recogieron muestras de sangre de animales en granja y matadero de las razas Parda de Montaña (n = 240), Pirenaica (n = 135), Serrana de Teruel (n = 34) y también de animales mestizos (n = 55), con el objetivo de aumentar el número de animales GG y validar el efecto del SNP *CAST\_2* en una población mayor. Con esta metodología más rápida se pretendía agilizar el genotipado de los animales tras el sacrificio y poder determinar el tiempo de maduración óptimo para cada canal.

La especificidad de la técnica se comprobó mediante la comparación de los resultados de genotipado mediante RFLPs y sondas “Beacon” de 466 animales. La especificidad de la técnica fue del 100%. En cuanto al tiempo de genotipado, en 2 h 30 minutos de media se pudo dar el resultado de 30 muestras mediante sondas “Beacon”. Sin embargo, mediante RFLPs este tiempo subió a 6 h 30 m debido al tiempo utilizado en la digestión con enzimas de restricción y corrido electroforético. La disminución del tiempo en el diagnóstico podría favorecer, tras el sacrificio en el matadero, la separación de estos animales en el mismo, siguiendo un circuito diferente de maduración.

En la Figura 14 aparecen representadas las frecuencias de los genotipos del SNP *CAST\_2* para cada una de las razas Parda de Montaña, Pirenaica, Serrana de Teruel y de animales mestizos. Los animales mestizos estaban formados en su mayoría por cruces con la raza Frisona. Todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo *CAST\_2*. Las frecuencias del genotipo GG son muy similares, entre un 7 y 8%, para las razas Parda de Montaña, Serrana de Teruel y de animales mestizos y algo superior en Pirenaica (14%). Sin embargo, la frecuencia del genotipo GA en la raza Serrana de Teruel (29%) es menor que en el resto de las poblaciones (41 – 43%).



**Figura 14.** Frecuencias genotípicas del SNP *CAST\_2* de las razas Parda de Montaña, Pirenaica, Serrana de Teruel y de animales mestizos.



## CAPÍTULO II. Estudios de asociación de los genes *CAPN1* y *CAST* con la dureza de la carne a distintos tiempos de maduración



Los resultados recogidos en el Capítulo I fueron obtenidos únicamente con animales procedentes de la estación experimental La Garcipollera perteneciente al CITA. Dicha finca incorpora animales de diferentes ganaderías del Pirineo oscense. Sin embargo, se amplió la base de datos con animales de diferentes orígenes de las razas Parda de Montaña y Pirenaica con objeto de confirmar los resultados obtenidos en dicho capítulo. Además se amplió el estudio incorporando datos de esfuerzo de la carne medido a distintos tiempos de maduración.

La varianza fenotípica y animal del esfuerzo medido en ambas razas y en los distintos periodos de maduración estudiados se presenta en la Tabla 23. Como en el caso del Capítulo I, la varianza debida al animal fue muy elevada para las dos razas y los diferentes tiempos de maduración.

**Tabla 23.** Valor fenotípico y varianzas en la raza Parda de Montaña y Pirenaica para las maduraciones estudiadas.

	Maduración corta	Maduración media	Maduración larga
<b>Parda de Montaña</b>			
valor fenotípico, N/cm <sup>2</sup>	88,4 ± 14,1	66,3 ± 19,4	57,3 ± 17,8
varianza ( $\sigma^2$ )	197,8	376	315,6
varianza animal ( $\sigma^2_a$ )	139,4	253,7	211,2
( $\sigma^2_a$ )/( $\sigma^2$ ), %	70,5	67,5	66,9
residual	1,40	0,99	0,99
<b>Pirenaica</b>			
valor fenotípico, N/cm <sup>2</sup>	-	49,6 ± 15,8	50,77 ± 16,50
varianza ( $\sigma^2$ )	-	248,8	272,4
varianza animal ( $\sigma^2_a$ )	-	89,9	144,3
( $\sigma^2_a$ )/( $\sigma^2$ ), %	-	36,1	53,0
residual	-	1,02	0,01

En este estudio se han incluido los 3 SNPs del gen *CAPN1* y los SNPs *CAST\_2* (rs210072660) y *CAST\_5* (rs109221039) del gen *CAST*. No se estudiaron los SNPs *CAST\_1* y *CAST\_4*, ya que éstos no son mutaciones que afecten a un cambio aminoacídico o que modifiquen la secuencia diana de unión de factores de

transcripción o miRNAs. Tampoco se incluyó en el estudio el SNP *CAST\_3* (rs384020496) debido a su cercanía en el genoma al SNP *CAST\_2*, y porque en los resultados del capítulo anterior no mostraron ningún indicio que nos hiciese sospechar del posible efecto del mismo sobre el fenotipo dureza de la carne en la población estudiada. Además, se ha incluido en el estudio la dureza medida en distintos tiempos de maduración ya que en estudios publicados se ha encontrado que el efecto de algunos SNPs dependen del tiempo de maduración. Debido a que en el Capítulo I se discutieron los resultados para maduraciones intermedias, en este capítulo nos centraremos en discutir especialmente los resultados para maduraciones cortas y largas, evitando redundancias.

## 1. Estudio de asociación de los polimorfismos de *CAST* y *CAPN1*

La Tabla 24 muestra el número de animales de cada genotipo y las frecuencias alélicas de los 5 SNPs analizados para cada una de las razas (Parda de Montaña y Pirenaica) y la población total estudiada. Los SNPs se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto el SNP *CAPN1\_3* (rs17872050) que muestra un déficit de animales heterocigotos, confirmando los resultados encontrados en el Capítulo I. Como puede observarse las frecuencias son muy similares a las descritas en el capítulo anterior para cada una de las razas y la población total.

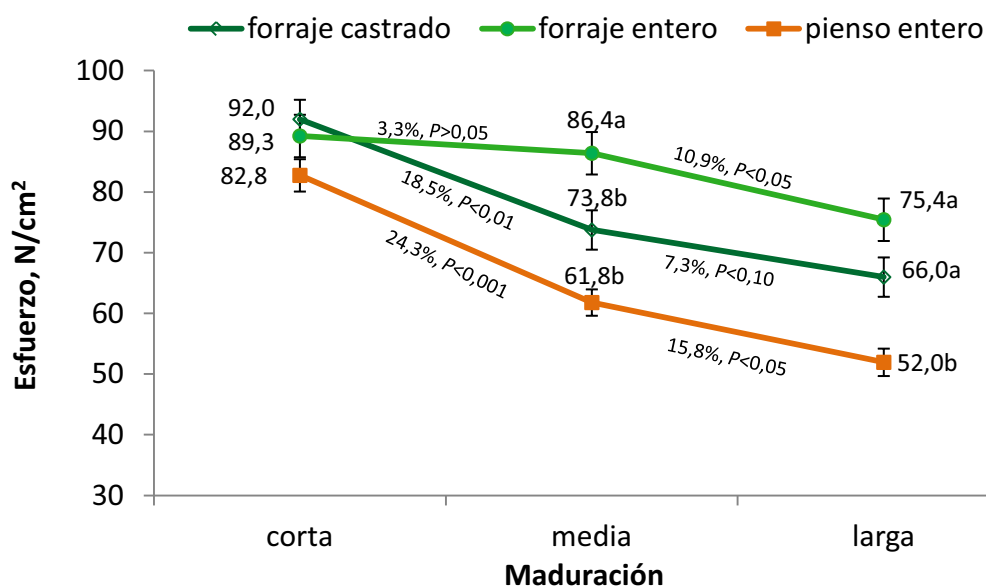
**Tabla 24.** Número de animales para cada genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos genotipados de los genes *CAST* y *CAPN1*, en las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

SNP	Genotipo	n			Alelo	Frecuencia		
		Total	PM	PI		Total	PM	PI
<i>CAPN1_1</i>	GG	250	189	61	G	0,88	0,87	0,94
	CG	62	54	8				
	CC	6	6	0				
<i>CAPN1_2</i>	GG	119	107	12	G	0,6	0,64	0,47
	AG	145	101	44				
	AA	53	37	16				
<i>CAPN1_3</i>	TT	136	110	26	T	0,63	0,63	0,64
	CT	134	94	40				
	CC	50	44	6				
<i>CAST_2</i>	AA	141	118	23	A	0,65	0,68	0,54
	GA	136	104	32				
	GG	44	27	17				
<i>CAST_5</i>	AA	189	152	37	A	0,77	0,79	0,7
	GA	116	89	27				
	GG	16	8	8				

### 1.1. Efectos ambientales

La dureza del músculo *Longissimus thoracis* se vio afectada por la interacción entre la alimentación anidada al sexo y el tiempo de maduración de la carne en la raza Parda de Montaña ( $P < 0,001$ ) (Figura 15). En la maduración corta no hubo

diferencias en el esfuerzo entre tratamientos. Al igual que otros autores, no han encontrado estas diferencias en terneros castrados (Realini *et al.*, 2004). Sin embargo, las hembras alimentadas con silo de maíz y concentrado durante 2 meses antes del sacrificio presentaron menor esfuerzo que las alimentadas durante 1 mes en la carne madurada durante 1 día. Franco *et al.* (2009) relacionaron estas diferencias con el desigual contenido en grasa intramuscular. El esfuerzo en la maduración corta fue máximo, tal y como presentan varios estudios previos (Franco *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 1993; Realini *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2014). En las primeras 24 horas *post mortem* se dan importantes cambios estructurales en las proteínas del músculo. Existe mayor dureza en estas primeras fases de la maduración porque algunas proteínas comienzan a degradarse tras el sacrificio pero otras, como la nebulina lo hacen a partir de las 48 horas (Wu *et al.*, 2014).



**Figura 15.** Evolución del esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* a lo largo de la maduración según el manejo en la raza Parda de Montaña. En cada maduración, diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

La tenderización entre la maduración corta e intermedia fue diferente según la alimentación recibida por los terneros ( $P < 0,01$ ). El esfuerzo se redujo para los cebones (machos castrados de edad menor o igual a 48 meses) alimentados con

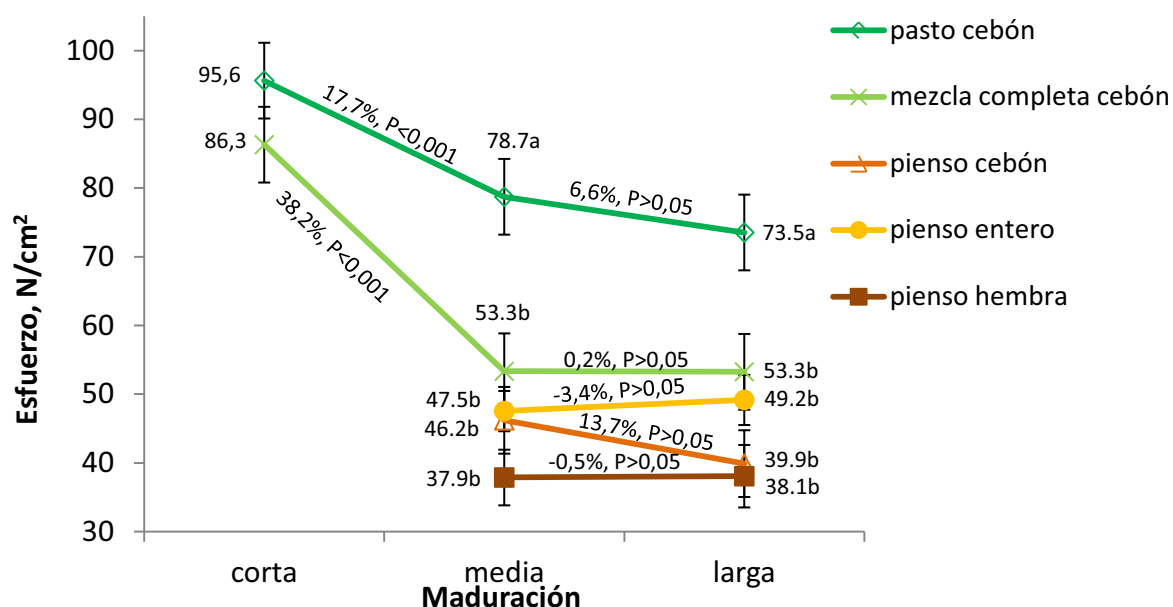
forraje y los enteros alimentados con pienso ( $P < 0,001$ ) tal y como se ha encontrado en estudios previos (Campo *et al.*, 2000; Maher *et al.*, 2005; Realini *et al.*, 2004). La tenderización hasta los 7 días causa un cambio en la composición de las fracciones proteicas del sarcoplasma, que están relacionados con la dureza. Las proteínas sarcoplasmáticas no tienen impacto sobre la estructura muscular y la dureza, pero, se dan cambios en la composición de la fracción soluble de las proteínas durante la tenderización (Bowker *et al.*, 2012). Sin embargo, el esfuerzo no varió en los terneros alimentados con forraje ( $P > 0,05$ ), probablemente debido a que la cobertura grasa de la canal fuera escasa. Una cobertura grasa protege a la carne y su escasez hace que se produzca el acortamiento de las fibras musculares durante el enfriamiento de las canales tras el sacrificio, y menor proteólisis durante el *rigor mortis* (Bowling *et al.*, 1977). En este sentido, la menor cobertura grasa pudo llevar a una mayor velocidad de enfriamiento de la canal y por lo tanto una menor tasa de reducción en la actividad de la calpastatina (Morgan *et al.*, 1993).

Como consecuencia de esta diferente tenderización, los terneros enteros alimentados con forraje presentaron mayor esfuerzo que los cebones alimentados con forraje y los terneros enteros alimentados con pienso ( $P < 0,001$ ) en la maduración intermedia. Generalmente se describe una mayor dureza de los terneros alimentados con forraje que los alimentados con pienso (Archile-Contreras *et al.*, 2010). Otros estudios no encuentran diferencias en la maduración intermedia (Costa *et al.*, 2013; Crouse *et al.*, 1985; Duckett *et al.*, 2013). También hay estudios que encuentran una mayor dureza para terneros castrados alimentados con pienso que los alimentados con forraje (Realini *et al.*, 2004). Sin embargo, en estos estudios también hay diferencias en el peso al sacrificio, que afecta a la dureza de la carne.

El esfuerzo disminuyó entre la maduración media y larga para todos los tratamientos aunque en mayor medida en los enteros alimentados con pienso ( $P < 0,001$ ), al igual que se ha encontrado en estudios previos (Claus *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 1993). Así, los terneros enteros alimentados con pienso presentaron el menor esfuerzo ( $P < 0,001$ ) mientras que los alimentados con forraje presentaron mayores

valores en la maduración larga en el presente estudio. Los terneros alimentados con forraje presentaron un 12,5% más de esfuerzo que los cebones alimentados con forraje, aunque la diferencia no fue significativa. French *et al.* (2000) no encontraron diferencias en la alimentación cuando la carne se maduró 7 y 14 días y concluyeron que cuando se sacrifican a un peso o espesor de grasa subcutánea fijo se minimizan las posibles diferencias que hubieran podido aparecer inicialmente con la dieta.

En la raza Pirenaica (Figura 16), la dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis* se vio afectada por interacción entre la alimentación anidada al sexo y la maduración ( $P = 0,03$ ). En el tiempo de maduración corto en el cual sólo había muestras de cebones alimentados en pastoreo o con mezcla completa, no hubo diferencias en el esfuerzo ( $P > 0,05$ ), al igual que ocurrió en la raza Parda de Montaña. De manera similar en otros estudios, el acabado con silo y distintas proporciones de concentrado en cebones no tuvo efecto sobre la dureza de la carne madurada 2 días (Faucitano *et al.*, 2008) o en hembras alimentadas con 40-70% heno de alfalfa: 60-30% concentrado frente a las de pastoreo en una maduración corta (Pordomingo *et al.*, 2012).



**Figura 16.** Evolución del esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* a lo largo de la maduración según el manejo en la raza Pirenaica. En cada maduración, diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



La carne de los cebones en pastoreo presentó mayor dureza que la de los alimentados con pienso ( $P = 0,01$ ) o mezcla completa ( $P = 0,02$ ) en la maduración media y larga. De acuerdo con estos resultados, Moloney *et al.* (2011) describieron, una carne más dura a 7 días *post mortem* en los animales castrados en pastoreo que los alimentados con concentrado. Otros autores, sin embargo describieron que los animales que se encuentran en pastoreo obtuvieron una carne más tierna que los alimentados con concentrado. Este efecto se detectó a 7 y 20 días de maduración en animales castrados de la raza Hereford (Del Campo *et al.*, 2008). Sin embargo, estos animales presentaron diferente peso al sacrificio, lo que puede afectar a la dureza de la carne. Tras 15 días de maduración, en terneros sacrificados con peso similar, la dureza no fue diferente entre terneros alimentados con distinto ratio forraje:concentrado 70:30 vs. 60:40 (Marino *et al.*, 2006).

En los animales alimentados con pienso, no hubo diferencias debidas al sexo en el esfuerzo medido tras maduración media o larga ( $P < 0,05$ ). Aunque sin la corrección de Bonferroni, los terneros enteros presentaron mayor esfuerzo que las hembras en la maduración media y larga ( $P = 0,02$ ). Al igual que en el presente trabajo, carne de los terneros enteros y castrados madurada 11 días no presentó diferencias en la dureza de la carne (Destefanis *et al.*, 2003).

Al contrario que ocurre en la raza Parda de Montaña en el presente estudio, la tenderización en la raza Pirenaica no es significativa entre la maduración media y larga, y el esfuerzo entre la maduración intermedia y larga se mantiene o disminuye ligeramente. Campo *et al.* (2000) encontraron diferentes pautas de maduración para la raza Parda Alpina, de la cual procede la Parda de Montaña, y la Pirenaica.

## 1.2. Efectos de los SNPs

### 1.2.1. Efectos de los SNPs del gen *CAPN1*

La dureza de la carne no se vio afectada por el SNP *CAPN1\_1* ni *CAPN1\_2* en ninguna de las maduraciones y las razas estudiadas ( $P > 0,05$ ). Como en la muestra analizada en el capítulo anterior el polimorfismo *CAPN1\_1* presenta un número

desequilibrado de genotipos en la población estudiada (Tabla 25), a pesar de haber incrementado el tamaño de la muestra.

**Tabla 25.** Efecto del SNP de la *CAPN1* sobre el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M) y la raza estudiada.

SNP	P-valor		M	Genotipo		
	SNP	SNPxM				
<b><i>CAPN1_1</i></b>				CC	CG	GG
Parda de Montaña	0,75	0,29	corta	-	-	-
			media	66,34 ± 6,92	72,11 ± 2,92	74,07 ± 1,95
			larga	64,33 ± 6,90	64,70 ± 2,95	64,93 ± 1,97
Pirenaica	0,92	0,12	media	-	45,23 ± 4,67	48,74 ± 2,69
			larga	-	49,87 ± 5,16	47,26 ± 2,88
<b><i>CAPN1_2</i></b>				AA	AG	GG
Parda de Montaña	0,60	0,53	corta	91,02 ± 3,56	87,25 ± 2,39	90,08 ± 2,50
			media	74,89 ± 2,87	74,43 ± 2,16	73,55 ± 2,20
			larga	67,10 ± 2,99	62,99 ± 2,19	64,25 ± 2,25
Pirenaica	0,11	0,51	media	54,34 ± 3,73	46,80 ± 2,71	46,76 ± 3,97
			larga	52,38 ± 4,04	46,87 ± 2,88	42,59 ± 5,05
<b><i>CAPN1_3</i></b>				CC	CT	TT
Parda de Montaña	0,88	0,45	corta	89,93 ± 3,15	86,74 ± 2,66	90,10 ± 2,35
			media	72,91 ± 2,71	75,06 ± 2,28	73,84 ± 2,11
			larga	65,05 ± 2,80	64,23 ± 2,30	65,33 ± 2,18
Pirenaica	0,06	0,40	media	42,12 ± 4,99	46,79 ± 2,59	51,76 ± 2,96
			larga	35,95 ± 5,94	46,90 ± 2,76	50,44 ± 3,33

Como se describió en el capítulo anterior, Allais *et al.* (2011) describieron una baja frecuencia de animales CC (< 1%) en la raza Charolés y Blanca de Aquitania, no encontrando asociación con el esfuerzo a 7 días de maduración, pero si en la raza Charolés a 14 días de maduración para el SNP *CAPN1\_1*. Otros autores describen un efecto de este SNP en maduraciones cortas en poblaciones de razas del tronco *Bos taurus* y sus cruces (Corva *et al.*, 2007; Johnston y Graser, 2010; Page *et al.*, 2002) y *Bos indicus* (Corva *et al.*, 2007; Johnston y Graser, 2010; Page *et al.*, 2002). Así, Corva *et al.* (2007) encontraron que los animales con el genotipo GG para los SNPs *CAPN1\_1* y *CAPN1\_2* poseen carne de mayor dureza que los animales con genotipo CC y GA,

respectivamente, en muestras maduras durante 1 día. Resultados similares para estos dos SNPs fueron encontrados por Johnston y Graser (2010) en una población formada por varias razas de zonas templadas del tronco *Bos Taurus* y en otra población de varias razas tropicales del tronco *Bos indicus*, en los músculos *Longissimus thoracis et lumborum* y *semitendinosus* madurados durante 2 días. Page *et al.* (2002) realizaron un estudio en el que se encontró que el SNP *CAPN1\_1* se asoció al esfuerzo en una población cruzada de Jersey x Limusín, en el músculo *Longissimus lumborum* madurado durante 1, 2 y 3 días. El SNP *CAPN1\_2* no se encontró asociado en maduraciones cortas, pero en una población cruzada de Piedmontese x Angus se asoció a la dureza del músculo *Longissimus thoracis* madurado durante 14 días (Page *et al.*, 2002).

Posteriormente, confirmaron la asociación de los SNPs *CAPN1\_1* y *CAPN1\_2* en carne madurada durante 14 días en dos poblaciones, una de ellas formada por animales cruzados de Simmental x Angus y otra de animales cruzados de Angus, Charolés, Gelvieh, Limusín, Hereford, Red Angus y Simmental x Angus, Hereford y Marc III (Page *et al.*, 2004). White *et al.* (2005) encontraron que los animales con el genotipo CC para el SNP *CAPN1\_1* presentan una carne menos dura que los animales con genotipos CG y GG madurada 14 días en una población cruzada de *Bos indicus* x *Bos Taurus*. En la raza Nelore en carne madurada a 7 y 21 días también se encontró un efecto aditivo sobre la dureza de la carne del SNP *CAPN1\_1* (Pinto *et al.*, 2010).

De la misma manera que ocurre en el presente estudio, en varios estudios realizados con anterioridad, tampoco se vio afectada la dureza de la carne en diferentes tiempos de maduración por el polimorfismo *CAPN1\_1* o *CAPN1\_2*. Avilés *et al.* (2013a) no encontraron diferencias en el SNP *CAPN1\_1* en cruces con las razas Retinta y Limusín, pero si en Charolés a 1, 7 y 21 días de maduración del músculo *Longissimus dorsi*. Además, no se detectó el efecto de los SNPs *CAPN1\_1* y *CAPN1\_2* en la dureza de la carne en ganado Brahman a los 7, 14, 21 días de maduración en el músculo *Longissimus* (Casas *et al.*, 2005) ni en cruces de razas checas para *CAPN1\_1*. (Kaplanová *et al.*, 2013).

Finalmente, Van Eenennaam *et al.* (2007) y Tait *et al.* (2014) tampoco encontraron efectos del SNP *CAPN1\_1* en la dureza de carne madurada 14 días en las razas Brangus, Red Angus, Hereford, Brahaman, Charolés x Angus, Angus, Red Poll, y Pinzgauer. Sin embargo, Tait *et al.* (2014) se encontraron que la diferencia de efectos en dureza entre animales homocigotos para alelos alternativos fue consistente con lo encontrado en otras razas y estudios.

En nuestro estudio, *CAPN1\_3* no afectó a la dureza en la raza Parda de Montaña pero tendió a afectar a la dureza en la raza Pirenaica ( $P = 0,06$ ). Esta tendencia se debe a que el genotipo CC es más blando que el TT en los dos tiempos de maduración ( $P = 0,02$ ). Tras corrección por Bonferroni este efecto desaparece. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios en los que se asocia este SNP a la dureza de la carne. White *et al.* (2005) fueron los primeros en describir una asociación entre este SNP (*CAPN1\_3*) y la dureza de carne madurada a 7, 14 y 21 días en poblaciones de la raza Brahaman (*Bos indicus*), razas *Bos taurus* y de animales cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus*. Esta asociación en la que se describen diferencias favorables para el genotipo CT frente al homocigoto TT ha sido confirmada posteriormente por otros autores en cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* en carne madurada a 14 días (Curi *et al.*, 2009), y en la raza Nelore en carne madurada a 7, 14 y 21 días (Pinto *et al.*, 2010).

Sin embargo, este efecto sobre la dureza de la carne encontrado en la raza Pirenaica hay que tomarlo con cautela ya que este SNP se encuentra en desequilibrio de HW y por lo tanto la distribución de genotipos de la muestra analizada podría no ser representativa de toda la población, pudiendo mostrar un sesgo en el muestreo, así como otros efectos como migración, estructuración de la población analizada, endogamia o deriva genética entre otros. En este sentido sería interesante incrementar el número de animales en la raza Pirenaica para confirmar esta asociación.

### 1.2.2. Efectos de los SNPs del gen *CAST*

En la raza Parda de Montaña, la interacción entre el SNP *CAST\_2* y la maduración fue significativa ( $P = 0,01$ ) (Tabla 26). En la maduración corta no hubo efecto del SNP pero en la maduración intermedia el genotipo GG presentó una dureza 14% ( $P = 0,01$ ) y 16,7% ( $P = 0,0004$ ) superior al genotipo AG y AA, respectivamente. Estos resultados corroboran los efectos encontrados en el Capítulo I del SNP *CAST\_2* sobre la dureza de la carne en maduraciones intermedias. De esta forma, el efecto encontrado del gen *CAST* sobre la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña se debería al SNP *CAST\_2* que se localiza en el exón 7 y causa un cambio aminoacídico Thr182Ala. Sin embargo, en la maduración larga, la dureza no difirió entre genotipos ( $P = 0,10$ ) aunque sí se observó que la carne de los animales con el genotipo GG fue más dura que la del AA ( $P = 0,04$ ) y GA ( $P = 0,07$ ) (Tabla 26). La tendencia encontrada en el efecto del SNP podría ser debido a la mayor dureza del genotipo GG en maduraciones intermedias y largas. La disminución de la dureza de la carne con un tiempo de maduración más larga hace que el efecto de este SNP sea de menor magnitud.

**Tabla 26.** Efecto del SNP del gen *CAST* sobre el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M) y la raza estudiada<sup>1</sup>.

SNP	P-valor		M	Genotipo		
	SNP	SNP×M		AA	GA	GG
<b><i>CAST_2</i></b>				AA	GA	GG
Parda de Montaña	0,05	0,01	corta	89,05 ± 2,22	88,29 ± 2,45	89,03 ± 4,16
			media	71,35 ± 2,01a	73,70 ± 2,14a	85,72 ± 3,24b
			larga	63,61 ± 2,04	64,49 ± 2,21	70,62 ± 3,31
Pirenaica	0,10	0,78	media	47,45 ± 3,79	45,72 ± 3,68	54,51 ± 4,19
			larga	47,82 ± 4,06	44,87 ± 3,80	52,06 ± 5,02
<b><i>CAST_5</i></b>				AA	GA	GG
Parda de Montaña	0,71	0,77	corta	88,15 ± 2,16	90,65 ± 2,53	85,22 ± 6,95
			media	73,07 ± 2,00	75,09 ± 2,20	76,21 ± 5,65
			larga	64,66 ± 2,01	65,09 ± 2,30	66,38 ± 5,64
Pirenaica	0,001	0,09	media	47,05 ± 3,36b	47,12 ± 3,47b	60,76 ± 4,80a
			larga	47,45 ± 3,47b	43,34 ± 3,76b	67,05 ± 6,51a

<sup>1</sup> En una maduración, letras diferentes indican diferencias al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

No se encontraron diferencias en la raza Pirenaica, aunque sí se observó que los animales con genotipo GG presentaron una dureza de la carne mayor que los genotipos AA (12,9%) y GA (16,0%) en la maduración intermedia. Sin embargo, la diferencia desapareció en la maduración larga. Es posible que la falta de significación sea debida al bajo número de animales GG presentes en la población de Pirenaica, por lo que sería interesante incrementar el número de animales de esta raza.

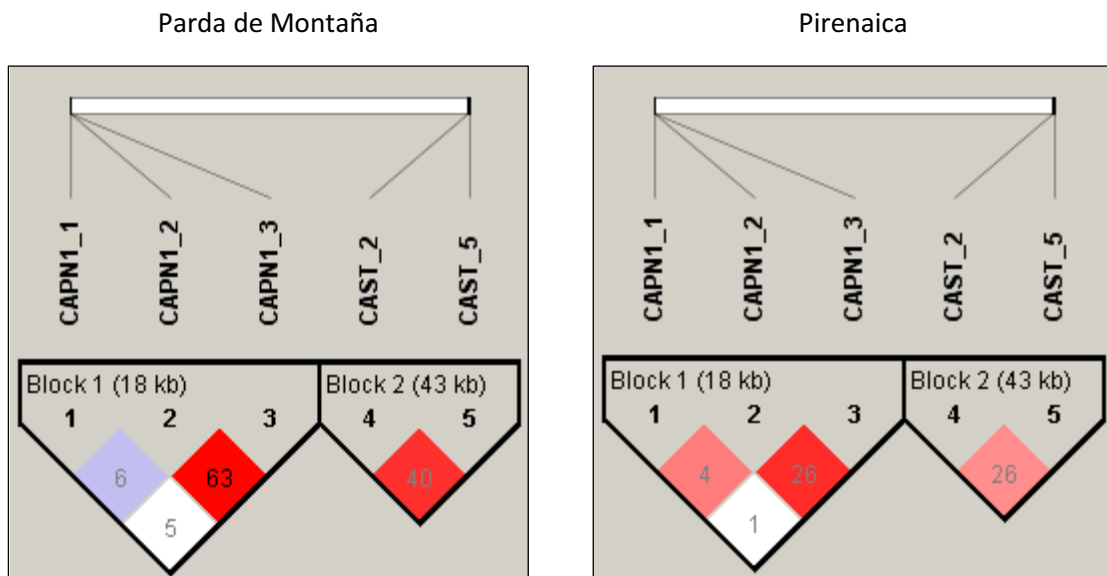
En este estudio no se encontraron diferencias entre los genotipos del SNP *CAST\_5* en la raza Parda de Montaña a ningún tiempo de maduración de la carne. No obstante, se encontraron diferencias entre los genotipos del SNP *CAST\_5*. Los genotipos AA y GA mostraron valores más bajos para el carácter dureza que el genotipo GG en la maduración intermedia y larga. No se encontraron diferencias significativas en el carácter dureza entre los genotipos AA y AG.

Como en el caso del estudio de Barendse (2002), el genotipo GG fue asociado a la carne más dura. Este efecto ha sido encontrado en multitud de estudios descritos en el Capítulo I del apartado Resultados y Discusión y en la Revisión Bibliográfica y Antecedentes de la presente memoria. En estos estudios el efecto del SNP se hace más evidente a maduración intermedia y disminuyen con el tiempo de maduración (hasta los 28 días), no encontrando diferencias significativas en tiempos cortos (Curi *et al.*, 2009; Johnston y Graser, 2010; Morris *et al.*, 2006). En nuestro estudio el efecto de este SNP se ha encontrado sólo en Pirenaica y no en Parda de Montaña, al igual que ha sido mostrado en otros estudios en los que la asociación de este SNP ha estado ligado a la raza y a la distribución de genotipos en las mismas, lo que implica que este efecto no puede hacerse extensivo a todas las razas de bovino (Allais *et al.*, 2011).

De esta forma, nuestros análisis y los estudios de diferentes polimorfismos de este gen en otras razas revelan que diferentes polimorfismos del gen presentan efectos distintos en función de la raza.

## 2. Estudio de asociación de haplotipos

Los polimorfismos *CAPN1\_1*, *CAPN1\_2* y *CAPN1\_3* y por otro lado los polimorfismos *CAST\_2* y *CAST\_5* forman los dos bloques haplotípicos utilizados para los estudios de asociación (Figura 17 y Tabla 27).

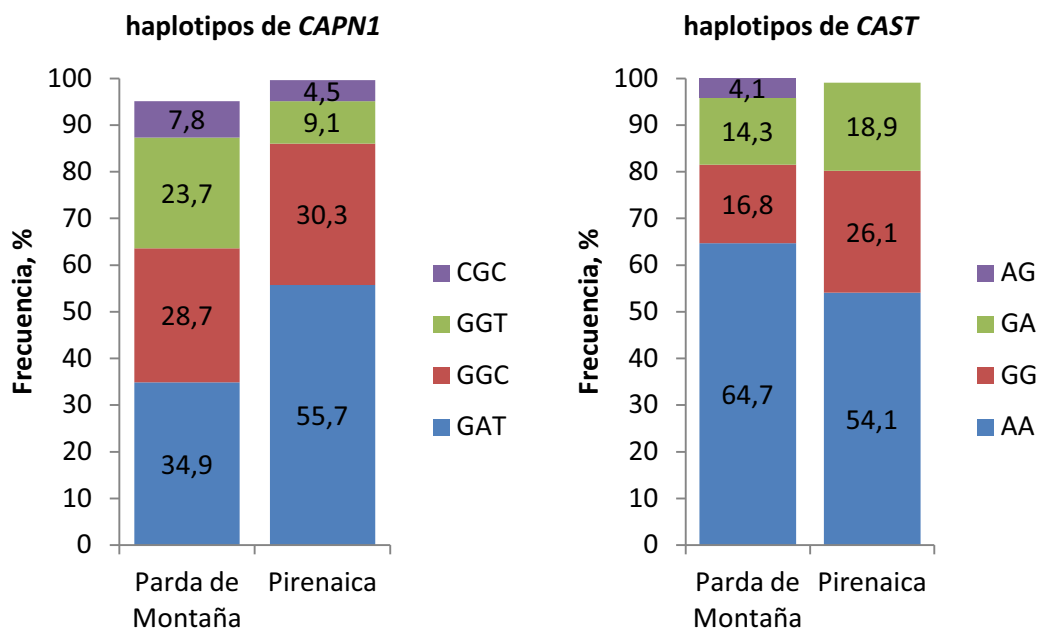


**Figura 17.** Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW. El color representa el valor de  $D'$  (desequilibrio de ligamiento) (desde  $D' = 1$  (rojo) hasta  $D' = 0$  (blanco) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP.

**Tabla 27.** Análisis de desequilibrio de ligamiento indicando los coeficientes de desequilibrio de ligamiento  $D'$  y  $r^2$  entre cada SNP, así como el valor LOD.

SNP1	SNP2	Raza	$D'$	LOD	$r^2$
<i>CAPN1_1</i>	<i>CAPN1_2</i>	Parda de Montaña	0,720	3,47	0,045
		Pirenaica	1	0,87	0,067
<i>CAPN1_1</i>	<i>CAPN1_3</i>	Parda de Montaña	0,244	0,93	0,015
		Pirenaica	0,699	0,78	0,053
<i>CAPN1_2</i>	<i>CAPN1_3</i>	Parda de Montaña	0,909	18,43	0,263
		Pirenaica	1	13,95	0,632
<i>CAST_2</i>	<i>CAST_5</i>	Parda de Montaña	0,684	15,94	0,269
		Pirenaica	0,899	9,50	0,406

Los haplotipos empleados para el estudio de asociación fueron los que presentaron una frecuencia superior al 1% en la población estudiada. En el gen *CAPN1* se estudiaron 4 haplotipos (Figura 18) siendo el mayoritario el GAT, seguidos del GGC, GGT y CGC en ambas razas. En el gen *CAST*, el genotipo mayoritario fue el AA, seguido del GG y GA en ambas razas.



**Figura 18.** Frecuencia de los haplotipos estudiados en *CAPN1*. Se muestran los haplotipos con una frecuencia superior al 4%.

En este estudio, no se encontró ninguna asociación entre los haplotipos del gen *CAPN1* y la dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis* en ninguna de las dos razas estudiadas, Parda de Montaña y Pirenaica (Tabla 28), confirmando los resultados anteriormente descritos en el Capítulo I, y del análisis de asociación individual de los SNPs en el presente capítulo.



**Tabla 28.** Efecto de los haplotipos más frecuentes de *CAPN1* estudiados en las dos razas en el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M). Se muestran los resultados de los haplotipos con una frecuencia superior al 4%.

Haplotipo	P-valor		M	nº copias del haplotipo		
	Hap <sup>1</sup>	Hap x M		0	1	2
<b>GAT</b>						
Parda de Montaña	0,82	0,51	corta	90,50 ± 2,45	87,37 ± 2,34	90,03 ± 3,72
			media	73,48 ± 2,16	74,52 ± 2,10	73,76 ± 3,07
			larga	65,18 ± 2,21	64,09 ± 2,14	66,44 ± 3,16
Pirenaica	0,11	0,51	media	46,76 ± 3,97	46,80 ± 2,71	54,34 ± 3,73
			larga	42,59 ± 5,05	46,87 ± 2,88	52,38 ± 4,04
<b>GGC</b>						
Parda de Montaña	0,90	0,90	corta	89,80 ± 2,22	88,15 ± 2,79	88,08 ± 3,48
			media	73,96 ± 2,00	74,78 ± 2,38	72,78 ± 3,10
			larga	65,23 ± 2,05	64,51 ± 2,42	64,50 ± 3,30
Pirenaica	0,07	0,39	media	51,28 ± 2,68	45,89 ± 2,56	45,02 ± 5,93
			larga	51,28 ± 2,94	45,30 ± 2,80	38,24 ± 6,42
<b>GGT</b>						
Parda de Montaña	0,93	0,09	corta	88,99 ± 2,06	86,11 ± 3,08	93,31 ± 4,00
			media	73,86 ± 1,92	73,56 ± 2,49	75,09 ± 3,49
			larga	64,58 ± 1,93	66,77 ± 2,54	61,92 ± 3,84
Pirenaica	0,07	0,71	media	51,28 ± 2,68	45,89 ± 2,56	45,02 ± 5,93
			larga	51,28 ± 2,94	45,30 ± 2,80	38,24 ± 6,42
<b>CGC</b>						
Parda de Montaña	0,39	0,95	corta	88,88 ± 1,89	90,85 ± 4,96	-
			media	73,93 ± 1,80	74,11 ± 3,12	58,58 ± 11,03
			larga	64,82 ± 1,83	65,30 ± 3,11	54,40 ± 11,03
Pirenaica	0,99	0,11	media	48,59 ± 2,60	45,53 ± 4,88	-
			larga	46,95 ± 2,77	50,13 ± 5,25	-

<sup>1</sup>Hap: Haplotipo.

En cuanto a los haplotipos del gen *CAST*, las interacciones entre el haplotipo AA y el AG y la maduración fueron significativas en la raza Parda de Montaña (Tabla 29). No se observaron diferencias entre el número de copias de cada haplotipo en las maduraciones corta y larga, pero sí en la maduración intermedia. En el haplotipo AA, los animales que no tienen ninguna copia poseen una carne más dura que los

animales con una o dos copias ( $P = 0,04$ ) de este haplotipo. En el caso del haplotipo AG, no se han encontrado animales con dos copias para el haplotipo, por lo que las diferencias se dan entre los animales con una copia, con carne más tierna, y los animales sin ninguna copia ( $P = 0,006$ ). El resto de haplotipos (GG y GA) no afectaron al esfuerzo.

**Tabla 29.** Efecto de los haplotipos más frecuentes de *CAST* estudiados según la raza sobre el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* en función de la maduración.

Haplotipo	P-valor		M	nº copias del haplotipo		
	Hap <sup>1</sup>	Hap x M		0	1	2
<b>AA</b>						
Parda	0,15	0,04	corta	88,58 ± 4,04	89,23 ± 2,34	88,59 ± 2,41
			media	83,89 ± 3,19a	72,55 ± 2,08b	72,78 ± 2,14b
			larga	69,57 ± 3,25	64,33 ± 2,14	64,12 ± 2,16
Pirenaica	0,08	0,81	media	54,46 ± 4,19	45,42 ± 3,63	48,04 ± 3,84
			larga	52,02 ± 5,01	44,64 ± 3,76	48,25 ± 4,09
<b>GG</b>						
Parda	0,33	0,12	corta	88,58 ± 1,82	89,05 ± 2,35	88,90 ± 6,77
			media	71,94 ± 1,98	76,87 ± 2,43	82,59 ± 6,91
			larga	64,12 ± 1,81	65,00 ± 2,26	70,72 ± 6,01
Pirenaica	0,001	0,08	media	46,74 ± 3,3b	47,57 ± 3,51b	60,74 ± 4,79a
			larga	47,21 ± 3,44b	43,66 ± 3,78b	67,01 ± 6,51a
<b>GA</b>						
Parda	0,35	0,19	corta	89,15 ± 1,95	88,45 ± 3,18	86,56 ± 7,75
			media	73,02 ± 1,83	75,71 ± 2,60	85,70 ± 5,63
			larga	64,45 ± 1,86	64,56 ± 2,69	76,18 ± 5,63
Pirenaica	0,49	0,92	media	49,47 ± 2,62	45,42 ± 3,36	46,48 ± 7,20
			larga	48,44 ± 2,83	45,36 ± 3,61	44,52 ± 7,90
<b>AG</b>						
Parda	0,11	0,006	corta	88,67 ± 1,87	89,04 ± 4,43	-
			media	75,16 ± 1,79a	63,01 ± 3,88b	-
			larga	65,16 ± 1,81	60,45 ± 4,08	-

<sup>1</sup>Hap: Haplotipo.

Estos resultados son consistentes con el efecto observado en los estudios de asociación de los SNPs *CAST\_2* y *CAST\_5* en la raza Parda de Montaña. En estos estudios, los animales que poseen el genotipo GG son animales con carnes más duras

en maduraciones intermedias, mientras que el SNP *CAST\_5* no tuvo ningún efecto. En el estudio haplotípico, los animales que tienen el alelo A del *CAST\_2* (haplotipos AA, y AG) son menos duros que los que tienen otro haplotipo en los que estaría el alelo G, asociado a la dureza. Es destacable que en estos dos haplotipos, uno tiene el alelo A y el otro G para el SNP *CAST\_5* lo que indicaría que el efecto haplotípico recogido en el análisis se debe principalmente al SNP *CAST\_2*.

En la raza Pirenaica (Tabla 29), el haplotipo GG muestra diferencias significativas según el número de copias ( $P = 0,001$ ). Los animales que presentan dos copias de este haplotipo tienen una carne más dura que los animales con una o ninguna copia en ambos tiempos de maduración.

El resto de los haplotipos no afectó al esfuerzo con excepción del haplotipo AA que tendió a afectar a la dureza, de manera que los animales 0 copias del alelo AA fueron más duros que los animales con 1 o 2 copias del misma. Los alelos G del SNP *CAST\_2* y *CAST\_5* se han mostrado asociados a un incremento de la dureza, resultando sólo este último significativo en Pirenaica. En este sentido, considerando los resultados del análisis de los SNPs el efecto encontrado en el haplotipo GG podría deberse al alelo G del SNP *CAST\_5* aunque no podría descartarse un efecto aditivo del alelo G del *CAST\_2*. Sin embargo, los efectos encontrados sobre la dureza de la carne del *CAST\_5* fueron  $47,25 \pm 3,33$ ,  $45,23 \pm 3,47$  y  $63,90 \pm 5,09$  N/cm<sup>2</sup> para los genotipos AA, AG y GG, respectivamente, siendo muy similares a los encontrados para el haplotipo GG ( $46,97 \pm 3,31$ ,  $45,62 \pm 3,50$  y  $63,87 \pm 5,08$  N/cm<sup>2</sup> para 0, 1 y 2 copias, respectivamente), y diferentes a los encontrados para el SNP *CAST\_2* ( $47,64 \pm 3,77$ ,  $45,29 \pm 3,65$  y  $53,29 \pm 4,29$  para los genotipos AA, AG y GG, respectivamente).

En el caso del SNP *CAST\_5* y debido a que el efecto del mismo consiste en modificar un sitio de unión para un miRNA, parece razonable llevar a cabo un estudio de la funcionalidad del mismo. Los estudios realizados sobre la funcionalidad de este gen se muestran en el Capítulo III.



CAPÍTULO III. Caracterización de la región 3'UTR del gen *CAST*, estudios de asociación de los polimorfismos encontrados con la dureza de la carne y del efecto funcional de los mismos



Como se ha mostrado en el capítulo anterior, se han encontrado diferencias en la dureza del músculo *Longissimus thoracis* entre los genotipos del SNP *CAST\_5* (rs109221039) en la raza Pirenaica. A pesar de que otros autores han encontrado el mismo efecto en otras razas (Barendse, 2002), no se ha comprobado el efecto funcional que puede tener este SNP sobre la dureza de la carne. Este SNP está situado en la región 3'UTR del gen. La región 3'UTR ha ganado interés debido a la importancia en la regulación de la función del gen (Hughes, 2006), especialmente por poseer sitios de unión a miRNAs que regulan la transcripción y traducción del gen. Por este motivo, nos planteamos un estudio funcional de la región 3'UTR del gen. Para ello, se llevó a cabo la secuenciación de esta región en la totalidad de animales (n = 321). Posteriormente, se realizaron estudios de asociación de los SNPs encontrados, incluyendo el SNP *CAST\_5*, que pudieran modificar la secuencia diana de unión de miRNAs en esta región y por tanto, puedan influir en la dureza de la carne. Finalmente, se llevó a cabo un estudio funcional mediante luciferasas de los haplotipos más frecuentes de esta región.

Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos con el mismo número de animales que en el Capítulo II. La varianza fenotípica y animal del esfuerzo medido en ambas razas y en los distintos periodos de maduración estudiados se presenta en la Tabla 23 de Capítulo II. Como en el anterior capítulo, se ha incluido en el estudio la dureza medida en distintos tiempos de maduración ya que en estudios publicados se ha encontrado que el efecto de algunos SNPs depende del tiempo de maduración. Se incluye el efecto del SNP *CAST\_5* a pesar de ser incluido en el capítulo anterior para dar una idea global de todos los SNPs del 3'UTR, y porque se estudiaron los haplotipos incluyendo a dicho SNP y por tanto se incluyó también en el estudio de luciferasas.





## 1. Estudio de asociación de los polimorfismos de la región 3'UTR de CAST

Como se muestra en el Capítulo I, inicialmente se habían encontrado 7 polimorfismos, entre ellos el SNP CAST\_5. Al secuenciar el fragmento de 375 bp correspondiente a la región 3'UTR de CAST, para genotipar la totalidad animales de la raza Parda de Montaña y Pirenaica (n = 321) se detectaron 4 SNPs más (Tabla 30). De los 11 SNPs, 8 habían sido previamente descritos, mientras que 3 se describieron por primera vez en el presente trabajo (CAST\_9, CAST\_13 y CAST\_15). Además, en la bibliografía se han realizado pocos estudios de asociación con la dureza de la carne en la región 3'UTR, con excepción del SNP CAST\_5 (Barendse, 2002) y CAST\_6 (Corva *et al.*, 2007).

**Tabla 30.** Polimorfismos encontrados en la región 3'UTR de CAST mediante secuenciación de un fragmento de 375 bp.

Posición UMD 3.1	Referencia SNP	Nomenclatura Tesis
g.7:98579574G>A	rs41255587	CAST_6 <sup>1</sup>
g.7:98579663A>G	rs109221039	CAST_5 <sup>1</sup>
g.7:98579691T>C	rs210861835	CAST_7 <sup>1</sup>
g.7:98579733G>C	rs384811952	CAST_8
g.7:98579763G>A	No descrito	CAST_9 <sup>1</sup>
g.7:98579792C>T	rs379698624	CAST_10
g.7:98579842G>A	rs208500290	CAST_11 <sup>1</sup>
g.7:98579852C>T	rs110607241	CAST_12 <sup>1</sup>
g.7:98579856G>A	No descrito	CAST_13 <sup>1</sup>
g.7:98579864G>C	rs109939022	CAST_14
g.7:98579865C>T	No descrito	CAST_15

<sup>1</sup> encontrados en la primera secuenciación recogida en el Capítulo I.

La Tabla 31 muestra el número de animales de cada genotipo y las frecuencias alélicas de 10 SNPs analizados para las dos razas por separado y en la población total. Los datos del CAST\_13 no se presentan de aquí en adelante porque sólo se encontró en un animal con genotipo GA de los 321 analizados. Todos los SNPs se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ). Con respecto a CAST\_8 y CAST\_10, sólo se encontraron en 4 animales en heterocigosis de la raza Parda de Montaña y ninguno en la Pirenaica (Tabla 31), por lo que se puede suponer que estos dos SNPs podrían estar ligados.

**Tabla 31.** Número de animales para cada genotipo y frecuencia alélica de los SNPs del 3'UTR de *CAST*, en la población total y en las razas Parda de Montaña (PM) y Pirenaica (PI).

SNP	Genotipo	n			Alelo	Frecuencia		
		total	PM	PI		total	PM	PI
CAST_6	AA	39	26	13	G	0,67	0,70	0,55
	AG	134	96	38				
	GG	147	127	20				
CAST_5	AA	189	152	37	A	0,77	0,79	0,70
	GA	116	89	27				
	GG	16	8	8				
CAST_7	CC	15	7	8	T	0,78	0,80	0,70
	CT	114	87	27				
	TT	192	155	37				
CAST_8	AA	0	0	0	G	0,99	0,99	0,00
	AG	4	4	0				
	GG	317	245	72				
CAST_9	AA	2	0	2	G	0,95	0,98	0,83
	AG	29	8	21				
	GG	290	241	49				
CAST_10	TT	0	0	0	C	0,99	0,99	0,00
	TC	4	4	0				
	CC	317	245	72				
CAST_11	AA	8	7	1	G	0,83	0,81	0,88
	AG	95	79	16				
	GG	218	163	55				
CAST_12	TT	15	7	8	C	0,78	0,80	0,71
	TC	113	87	26				
	CC	193	155	38				
CAST_14	CC	53	28	25	G	0,60	0,65	0,44
	CG	148	117	31				
	GG	120	104	16				
CAST_15	TT	2	0	2	C	0,95	0,98	0,83
	TC	29	8	21				
	CC	290	241	49				

## Efectos ambientales

Los efectos ambientales para el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* tras distintas maduraciones son los mismos que los descritos en el Capítulo II, puesto que se utiliza la misma población de animales y el mismo modelo estadístico para el estudio de asociación del esfuerzo con los polimorfismos encontrados.

### 1.1. Efectos de los SNPs

En la raza Parda de Montaña, los SNPs *CAST\_5*, *CAST\_6*, *CAST\_7*, *CAST\_9*, *CAST\_11*, *CAST\_12*, *CAST\_14* y *CAST\_15* no tuvieron efecto sobre el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* en ninguno de los tiempos de maduración ( $P > 0,05$ ) (Tabla 32). Tal y como se ha explicado con anterioridad, este es el primer estudio sobre el efecto de *CAST\_7*, *CAST\_9*, *CAST\_11*, *CAST\_12*, *CAST\_14* y *CAST\_15* sobre la dureza de la carne por lo cual no podemos comparar con otros resultados. Los resultados obtenidos en el *CAST\_5* no se vuelven a discutir dado que ya se han analizado en el Capítulo II. Con respecto a la ausencia de efecto del *CAST\_6*, Corva *et al.* (2007) no encontraron efecto de este SNP sobre la dureza de la carne medida en carne tras 1 día *post mortem* en animales castrados cruzados de las razas Angus, Hereford y Limusín. Es posible que la falta de asociación, en este caso, sea debida a la falta de maduración de la carne. Sin embargo, este SNP afectó a la dureza medida a los 7 días *post mortem* (Li *et al.*, 2010). Dicho estudio separó el análisis en razas nativas chinas y razas extranjeras (Limusín, Angus...) y sus cruces. Tal y como hemos observado, las distintas razas no se deberían agrupar porque el efecto de los SNPs es fuertemente dependiente de la raza.

En la raza Parda de Montaña, el esfuerzo se vio afectado por la interacción entre el tiempo de maduración y el SNP para *CAST\_8* y *CAST\_10* ( $P < 0,05$ ). Estos SNPs muestran diferencias entre el genotipo homocigoto y el genotipo heterocigoto en tiempos de maduración intermedios, siendo los animales heterocigotos un 26% menos duros que los homocigotos ( $P < 0,001$ ). En tiempos de maduración largos, se observa la misma tendencia con una diferencia de dureza del 16%, sin embargo la

diferencia no es significativa ( $P = 0,12$ ). No obstante, este efecto debe de ser tomado con cautela ya que sólo encontramos 4 animales heterocigotos para estos SNPs (Tabla 32). Estos resultados deberían de ser validados en una población con una mayor frecuencia de los alelos A y T para *CAST\_8* y *CAST\_10*, respectivamente.

En cuanto a la raza Pirenaica, los SNP *CAST\_6*, *CAST\_9*, *CAST\_11*, *CAST\_14* y *CAST\_15* no afectaron al esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* en la maduración media y larga (Tabla 33). Sin embargo, los polimorfismos *CAST\_5*, *CAST\_7* y *CAST\_12* se asociaron al esfuerzo medido en la carne ( $P < 0,001$ ). Se observó una tendencia en la interacción de estos SNPs con la maduración ( $P < 0,10$ ).

En el *CAST\_5*, el genotipo GG presentó un mayor esfuerzo que el AG y AA ( $P < 0,05$ ) en ambas maduraciones. Los genotipos AA y AG presentaron un esfuerzo similar ( $P > 0,05$ ). En el *CAST\_7* y *CAST\_12*, el genotipo CC presentó mayor esfuerzo que el CT y TT ( $P < 0,05$ ), que presentaron valores similares, en ambas maduraciones. Hay que reseñar que los genotipos GG, CC y TT, para el *CAST\_5*, *CAST\_7* y *CAST\_12* respectivamente, presentaron valores muy similares. Igualmente, los valores de las medias mínimo cuadráticas para los genotipos heterocigotos y los alternativos a los mencionados anteriormente presentaron valores muy similares. Esto se debe a que los SNPs *CAST\_5* y *CAST\_7* se encontraron completamente ligados, mientras que estos dos con el *CAST\_12* presentaron un alto desequilibrio de ligamiento (Figura 19). El posible efecto de estos SNPs sobre la modificación de posibles sitios de unión de miRNA se mostrará en el apartado 3 del presente capítulo.

**Tabla 32.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* a maduración (M) corta, media y larga para los SNPs de la región 3'UTR de *CAST* en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

SNP	P-valor			M	Genotipo		
	SNP	M	SNP×M				
CAST_6	0,37	0,001	0,89		AA	AG	GG
				corta	93,19 ± 5,07	88,74 ± 2,46	88,70 ± 2,24
				media	79,37 ± 3,51	73,64 ± 2,14	73,50 ± 2,05
				larga	67,36 ± 3,53	64,49 ± 2,22	64,83 ± 2,07
CAST_5	0,71	0,001	0,77		AA	GA	GG
				corta	88,15 ± 2,16	90,65 ± 2,53	85,22 ± 6,95
				media	73,07 ± 2,00	75,09 ± 2,20	76,21 ± 5,65
				larga	64,66 ± 2,01	65,09 ± 2,30	66,38 ± 5,64
CAST_7	0,98	0,001	0,82		CC	CT	TT
				corta	85,22 ± 7,08	90,06 ± 2,53	88,61 ± 2,16
				media	76,89 ± 6,00	73,91 ± 2,22	73,90 ± 2,00
				larga	65,66 ± 5,99	64,75 ± 2,32	64,99 ± 2,02
CAST_8	0,01	0,001	0,02		AA	AG	GG
				corta	-	-	-
				media	-	99,57 ± 8,15a	73,67 ± 1,88b
				larga	-	77,17 ± 8,14	64,96 ± 1,89
CAST_9	0,72	0,001	0,45		AA	AG	GG
				corta	-	92,87 ± 7,83	88,97 ± 1,86
				media	-	68,90 ± 5,67	74,14 ± 1,79
				larga	-	60,71 ± 6,59	65,05 ± 1,81
CAST_10	0,01	0,001	0,02		TT	TC	CC
				corta	-	-	-
				media	-	99,57 ± 8,15a	73,67 ± 1,88b
				larga	-	77,17 ± 8,14	64,96 ± 1,89
CAST_11	0,91	0,001	0,88		AA	AG	GG
				corta	85,20 ± 7,08	89,98 ± 2,61	88,73 ± 2,12
				media	76,82 ± 6,00	74,50 ± 2,28	73,54 ± 1,97
				larga	65,61 ± 5,99	65,18 ± 2,38	64,71 ± 1,99
CAST_12	0,98	0,001	0,82		CC	TC	TT
				corta	88,61 ± 2,16	90,06 ± 2,53	85,22 ± 7,08
				media	73,90 ± 2,00	73,91 ± 2,22	76,89 ± 6,00
				larga	64,99 ± 2,02	64,75 ± 2,32	65,66 ± 5,99
CAST_14	0,40	0,001	0,24		CC	CG	GG
				corta	87,29 ± 4,42	89,11 ± 2,36	89,11 ± 2,32
				media	81,33 ± 3,33	73,05 ± 2,09	73,50 ± 2,08
				larga	69,80 ± 3,40	64,25 ± 2,15	64,57 ± 2,11
CAST_15	0,65	0,001	0,35		TT	TC	CC
				corta	-	92,50 ± 7,77	88,98 ± 1,85
				media	-	67,00 ± 5,64	74,20 ± 1,79
				larga	-	61,59 ± 6,18	65,02 ± 1,80

<sup>1</sup> Diferente letra indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con corrección de Bonferroni.

**Tabla 33.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de esfuerzo (N/cm<sup>2</sup>) del músculo *Longissimus thoracis* a maduración (M) media y larga para los SNPs de la región 3'UTR de CAST en la raza Pirenaica.

SNP	P-valor			M	Genotipo			
	SNP	M	SNP×M					
CAST_6	0,08	0,94	0,34		AA	AG	GG	
				media	52,37 ± 4,12	46,42 ± 3,17	50,71 ± 3,60	
CAST_5	0,0005	0,94	0,09		AA	AG	GG	
				media	47,05 ± 3,36b	47,12 ± 3,47b	60,76 ± 4,80a	
CAST_7	0,0005	0,94	0,09		CC	CT	TT	
				media	60,76 ± 4,80a	47,12 ± 3,47b	47,05 ± 3,36b	
CAST_9	0,43	0,05	0,30		AA	AG	GG	
				media	58,46 ± 8,73	50,25 ± 3,66	47,30 ± 3,12	
CAST_11	0,22	0,33	0,84		AA	AG	GG	
				media	55,76 ± 11,50	52,01 ± 3,45	46,94 ± 2,52	
CAST_12	0,0006	0,94	0,09		CC	TC	TT	
				media	46,98 ± 3,35b	47,22 ± 3,48b	60,75 ± 4,80a	
CAST_14	0,055	0,26	0,39		CC	CG	GG	
				media	52,00 ± 3,63	45,29 ± 3,55	47,55 ± 3,98	
CAST_15	0,43	0,06	0,30		CC	TC	TT	
				media	47,30 ± 3,12	50,25 ± 3,66	58,46 ± 8,73	
					larga	47,24 ± 3,25	47,46 ± 3,97	-

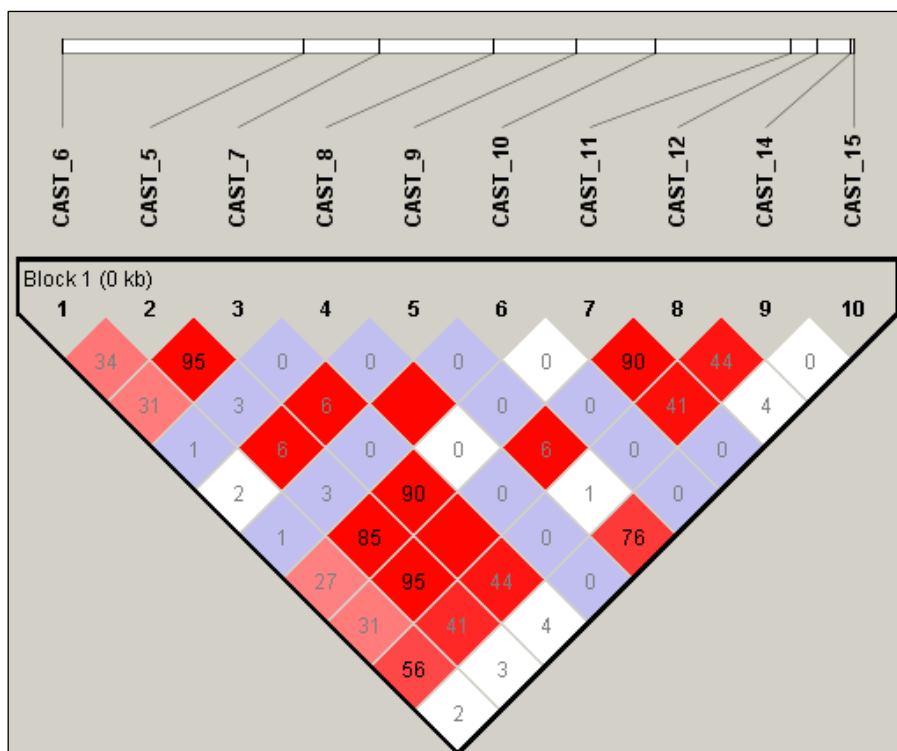
Tal y como se ha explicado anteriormente, varios SNPs de la región 3'UTR han sido estudiados por otros autores (Allais *et al.*, 2011; Barendse, 2002; Corva *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010) encontrando diferentes resultados en los estudios de asociación realizados dependiendo de la raza estudiada. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con el SNP CAST\_5, ya descrito con anterioridad por Barendse (2002), que ha sido asociada a la dureza de la carne en diferentes razas bovinas por varios autores como hemos descrito en los Capítulos I y II del apartado de resultados y discusión.

Como se ha explicado en párrafos anteriores, Corva *et al.* (2007) no encontraron asociación entre el SNP *CAST\_6*, situado a 89 pb en dirección 5' del gen del *CAST\_5*, con la dureza de la carne a 1 día de maduración en el músculo *Longissimus lumborum* en animales castrados cruzados de las razas Angus, Hereford y Limusín. Sin embargo, en carne madurada a 7 días se encontró una relación entre el polimorfismo y la dureza de la carne en razas Angus, Hereford, varias razas chinas y sus cruces. Tanto Corva *et al.* (2007) como Li *et al.* (2010), indicaron en sus estudios de desequilibrio de ligamiento que estos dos SNPs se encuentran débilmente ligados, segregando independientemente.

Allais *et al.* (2011) describieron un SNP a 1375 pb en dirección 3' del SNP *CAST\_5* y lo asociaron al carácter dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis* en la raza Charolesa a 14 días de maduración. Este SNP no se ha estudiado en el presente estudio, ya que se sitúa lejos de la región estudiada en el presente estudio. Li *et al.* (2010) describieron otros SNPs, denominados 2857, 3029 y 3088 (en relación a la secuencia depositada en el GenBank AF\_159246.1), que se encontraron fijados en las razas Parda de Montaña y Pirenaica en la presente Tesis.

## 2. Análisis de los haplotipos y estudio de asociación con el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* en distintas maduraciones

Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de la región 3'UTR en la raza Parda de Montaña se muestran en la Figura 19.

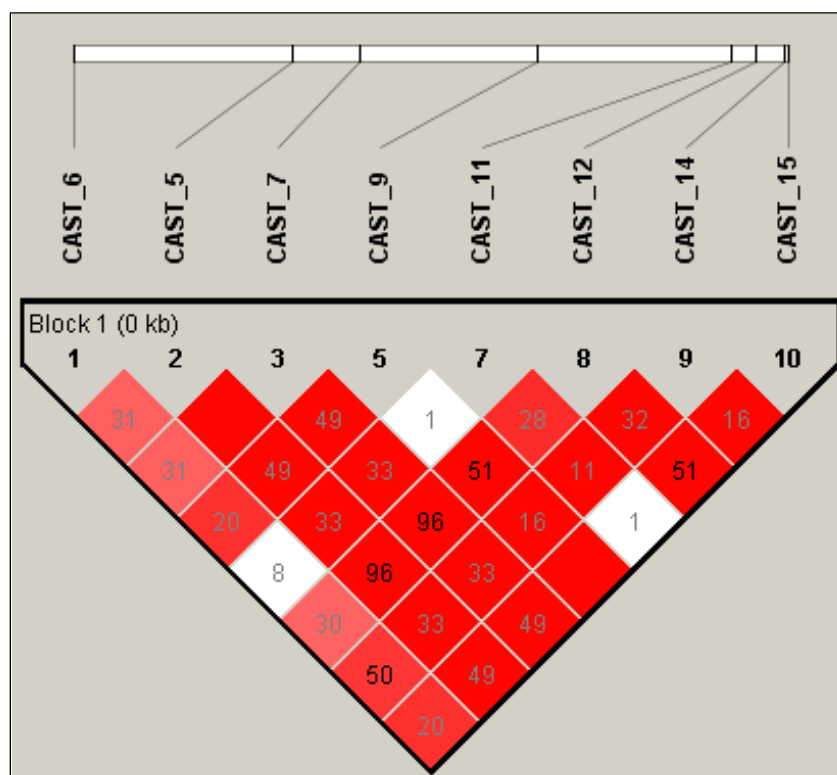


**Figura 19.** Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW en la raza Parda de Montaña. El color representa el valor de  $D'$  (desequilibrio de ligamiento) (desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco)) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP.

En dicha figura se puede ver al alto grado de desequilibrio de ligamiento que se encuentra entre  $CAST_5$  y  $CAST_7$ , así como éstos con  $CAST_{12}$ . Concretamente, el SNP  $CAST_5$  presentó una  $r^2$  de 0,95 con los SNPs  $CAST_7$  y  $CAST_{12}$ , mientras que  $CAST_{12}$  y  $CAST_7$  estuvieron completamente ligados ( $r^2= 1$ ). Los SNPs  $CAST_8$  y  $CAST_{10}$ , que resultaron asociados al esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* en Parda de Montaña, también aparecieron completamente ligados.



Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de la región 3'UTR en la raza Pirenaica se muestran en la Figura 20. Los SNPs *CAST\_8* y *CAST\_10* se encuentran fijados para raza Pirenaica y han sido eliminados para este análisis. Los SNPs *CAST\_5* y *CAST\_7* estuvieron completamente ligados ( $r^2 = 1$ ), mientras que estos dos con el *CAST\_12* se presentaron un alto desequilibrio de ligamiento ( $r^2 = 0,96$ ). Debido al alto grado de ligamiento existente entre ellos, estos SNPs estuvieron asociados al esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* con unos resultados muy similares, tal y como se ha podido ver en el apartado anterior.

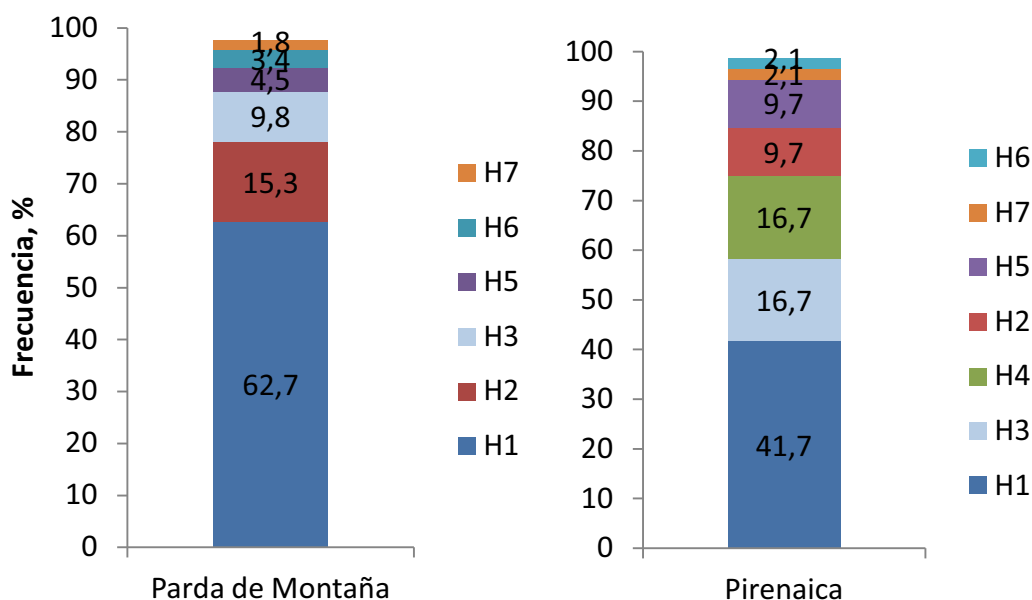


**Figura 20.** Análisis del desequilibrio de ligamiento mediante el software HAPLOVIEW en la raza Pirenaica. El color representa el valor de  $D'$  (desequilibrio de ligamiento) (desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco)) y el número indica el desequilibrio de ligamiento indicado con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre cada SNP.

De los haplotipos presentes en la población estudiada, 6 y 7 presentaron en una frecuencia superior al 1% en la raza Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente (Tabla 34 y Figura 21). La frecuencia de los haplotipos fue diferente en la raza Parda de Montaña y Pirenaica.

**Tabla 34.** Haplotipos estudiados en la región 3'UTR de *CAST* presentes en la raza Parda de Montaña y Pirenaica con una frecuencia superior al 1%.

Haplotipo	Nomenclatura Tesis
GATGGCGCGC	H1
AGCGGCATCC	H2
AATGGCGCCC	H3
AGCGACGTCT	H4
GATGGCBCCC	H5
GGCGGCATCC	H6
AATGGCGCGC	H7



**Figura 21.** Frecuencia de los haplotipos estudiados en la región 3'UTR de *CAST* en la raza Parda de Montaña y Pirenaica. Se muestran los haplotipos con una frecuencia superior al 1%.

En la raza Parda de Montaña, el haplotipo más frecuente fue el H1, con una frecuencia superior al 60%, seguido por el haplotipo H2 con una frecuencia ligeramente superior al 15% y el H3 con una frecuencia que rozó el 10%. El resto de los haplotipos en la raza presentaron frecuencias inferiores al 5%. En la raza Pirenaica, el haplotipo más frecuente fue también el H1, con una frecuencia algo superior al 40%. Los haplotipos H3 y H4 fueron los siguientes en importancia,

superando el 16%. El haplotipo H2 y H5 no alcanzaron el 10% y H6 y H7 superaron ligeramente el 2%.

En la raza Parda de Montaña, no se encontró asociación entre los haplotipos de la región 3'UTR y el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* en ninguna de las maduraciones (Tabla 35).

**Tabla 35.** Efecto de los haplotipos (H) de *CAST* estudiados en la raza Parda de Montaña en el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M).

Haplotipo <sup>1</sup>	P-valor			M	nº copias del haplotipo		
	H	M	HxM		0	1	2
H1	0,52	0,001	0,26	corta	88,17 ± 3,98	89,12 ± 2,33	88,98 ± 2,41
				media	80,06 ± 3,07	73,04 ± 2,07	73,39 ± 2,15
				larga	97,31 ± 3,13	63,92 ± 2,12	65,29 ± 2,18
H2	0,82	0,001	0,92	corta	88,76 ± 2,03	89,95 ± 2,86	86,98 ± 8,02
				media	73,50 ± 1,91	74,88 ± 2,41	77,45 ± 6,47
				larga	64,54 ± 1,93	65,89 ± 2,52	63,67 ± 6,46
H3	0,53	0,001	0,98	corta	89,04 ± 1,90	88,47 ± 3,99	-
				media	73,83 ± 1,81	74,67 ± 2,94	80,44 ± 7,19
				larga	64,81 ± 1,83	65,03 ± 3,00	72,69 ± 7,18
H5	0,78	0,001	0,09	corta	89,44 ± 1,86	82,97 ± 4,86	-
				media	73,74 ± 1,79	77,07 ± 3,72	-
				larga	64,83 ± 1,80	65,34 ± 3,86	-
H6	0,77	0,001	1,00	corta	89,12 ± 1,89	87,80 ± 4,7	-
				media	74,02 ± 1,81	72,90 ± 4,38	-
				larga	64,94 ± 1,83	63,92 ± 4,7	-
H7	0,23	0,001	0,09	corta	89,03 ± 1,86	88,36 ± 9,84	79,92 ± 11,04
				media	73,82 ± 1,79	86,61 ± 7,81	54,59 ± 11,05
				larga	65,20 ± 1,81	58,02 ± 8,59	45,15 ± 11,04

<sup>1</sup> Haplotipos con una frecuencia superior al 1%.

En el análisis individual de los SNPs, los SNPs *CAST\_8* y *CAST\_10* aparecieron asociados a la dureza de la carne. Sin embargo, el haplotipo que contenía el alelo A y T para *CAST\_8* y *CAST\_10*, respectivamente, presentó una frecuencia inferior al 1% (frecuencia haplotípica de 0,6%) y no fue incluido en los estudios de asociación haplotípica. Por este motivo, no se pudo confirmar los resultados de los estudios de asociación de los SNPs.

**Tabla 36.** Efecto de los haplotipos más frecuentes de *CAST* estudiados en la raza Pirenaica en el esfuerzo del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración.

Haplotipo <sup>1</sup>	P-valor			M	nº copias del haplotipo		
	H	M	HxM		0	1	2
H1	0,04	0,20	0,76	media	51,70 ± 3,50	44,51 ± 3,47	48,99 ± 3,99
				larga	51,48 ± 3,84	42,91 ± 3,65	49,51 ± 4,36
H2	0,63	0,50	0,72	media	47,70 ± 2,49	49,74 ± 3,79	55,55 ± 11,69
				larga	46,83 ± 2,64	50,30 ± 4,88	
H3	0,02	0,36	0,20	media	50,24 ± 2,59	43,88 ± 3,05	63,70 ± 11,50
				larga	48,88 ± 2,81	43,51 ± 3,22	77,24 ± 11,53
H4	0,50	0,06	0,35	media	47,66 ± 3,02	49,40 ± 3,62	58,18 ± 8,72
				larga	47,52 ± 3,16	46,81 ± 3,91	-
H5	0,97	0,06	0,36	media	48,03 ± 2,62	49,14 ± 3,80	-
				larga	47,92 ± 2,80	46,57 ± 3,94	-
H6	0,01	0,23	0,59	media	47,94 ± 2,75	65,28 ± 6,96	-
				larga	47,31 ± 2,90	61,53 ± 7,63	-
H7	0,82	0,37	0,14	media	48,46 ± 2,54	41,10 ± 7,09	-
				larga	47,35 ± 2,68	51,44 ± 9,30	-

<sup>1</sup> Haplotipos con una frecuencia superior al 1%.

En la raza Pirenaica, los haplotipos H1, H3 y H6 se encontraron asociados al esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* ( $P < 0,05$ ) (Tabla 36). Sin embargo, en los tres haplotipos cuando se comparan las medias según el número de

haplotipos en cada maduración, las diferencias no son significativas con la corrección de Bonferroni. Sin dicha corrección y para ambas maduraciones, los animales que presentan una copia del haplotipo H1 ( $n = 60$ ) tienen una carne más tierna que los animales con ninguna copia ( $n = 48$ ) ( $P = 0,02$ ). Los animales con 2 copias ( $n = 24$ ) presentaron valores intermedios.

Sin la corrección de Bonferroni, los animales que presentan una copia del H3 tienen una carne más tierna que los animales que no tienen copia ( $P = 0,03$ ) y no presentan diferencias con los animales con dos copias debida a la alta variabilidad de este haplotipo en la maduración intermedia. En la maduración larga, los animales con 2 copias presentaron mayor esfuerzo que los animales con una ( $P = 0,005$ ) o ninguna copia ( $P = 0,02$ ). Sin embargo, este efecto debe de ser tomado con cautela ya que sólo aparecieron 3 animales con dos copias para este haplotipo.

En cuanto a la comparación de medias del haplotipo H6 sin corrección de Bonferroni, los animales que no presentan ninguna copia del haplotipo H6 tienen una carne más tierna que los animales con una copia en la maduración media ( $P = 0,015$ ) y larga ( $P = 0,05$ ). En el caso de este haplotipo se encontró una baja frecuencia del mismo en la población (2%), por lo que la asociación encontrada con el esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* debería ser tomada con cautela. Sin embargo, los resultados son consistentes con los del análisis individual de los SNPs, en el que los alelos G, C y T de los SNPs *CAST\_5*, *CAST\_7* y *CAST\_12* se asociaron con carnes más duras. Debido al alto grado de ligamiento entre estos SNPs no es posible descartar ninguno de estos SNPs, ni combinaciones entre ellos como responsables del efecto encontrado.

### **3. Análisis funcional de los SNPs en la región 3'UTR del gen *CAST***

Con el objetivo de estudiar el posible efecto funcional de los SNPs y haplotipos que se han descrito en los apartados anteriores se realizó un análisis funcional de los mismos. Primero, se llevó a cabo un análisis *in silico* de los posibles sitios de unión de miRNA y posteriormente un estudio de actividad luciferasa. Para ello se eligieron los 4

haplotipos más frecuentes en Pirenaica (H1, H3, H4 y H2, ordenados según frecuencia), que a su vez eran los 3 más frecuentes en Parda de Montaña (H1, H2 y H3). Además, los haplotipos H1 y H3 se habían asociado a carnes menos duras. Por otra parte, se eligieron dos haplotipos que tuvieran el alelo alternativo, asociado a carnes más duras, para *CAST\_5*, *CAST\_7* y *CAST\_12* (H2 y H4) (Figura 22). En todos los casos se tuvo en cuenta que los haplotipos seleccionados predijesen modificaciones de los posibles sitios de unión a miRNAs.

### 3.1. Estudio *in silico* de los posibles sitios de unión de miRNA

La unión de un miRNA a la región 3'UTR de *CAST* podría causar modificaciones post-transcripcionales, que podrían influir en la dureza de la carne porque los miRNA pueden regular la expresión de los genes mediante la degradación del mRNA o represión de la traducción del transcrito. De los 10 SNPs descritos, 7 de ellos afectan a posibles sitios de unión de miRNAs (Figura 22).

Los SNPs *CAST\_5* y *CAST\_7*, que se encuentran totalmente ligados en Pirenaica, modifican el posible sitio de unión del miRNA bovino bta-miR-542-5p. Según el estudio *in silico* cuando en la secuencia aparecen los nucleótidos son G y C para los SNPs *CAST\_5* y *CAST\_7*, respectivamente, se crea un posible sitio de unión para el miRNA bta-miR-542-5p. Sin embargo, esto no ocurre cuando los nucleótidos son A y T, respectivamente. Por otro lado, los SNPs *CAST\_11*, *CAST\_12*, *CAST\_14* y *CAST\_15*, pueden verse afectados por varios miRNA dependiendo del haplotipo estudiado. Los SNPs *CAST\_6*, *CAST\_8* y *CAST\_10*, de los cuales el *CAST\_8* y *CAST\_10* se asociaron a la dureza de la carne en Parda de Montaña, no modifican sitios de unión para los miRNAs independientemente del alelo encontrado.



### 3.2. Estudio de la actividad luciferasa

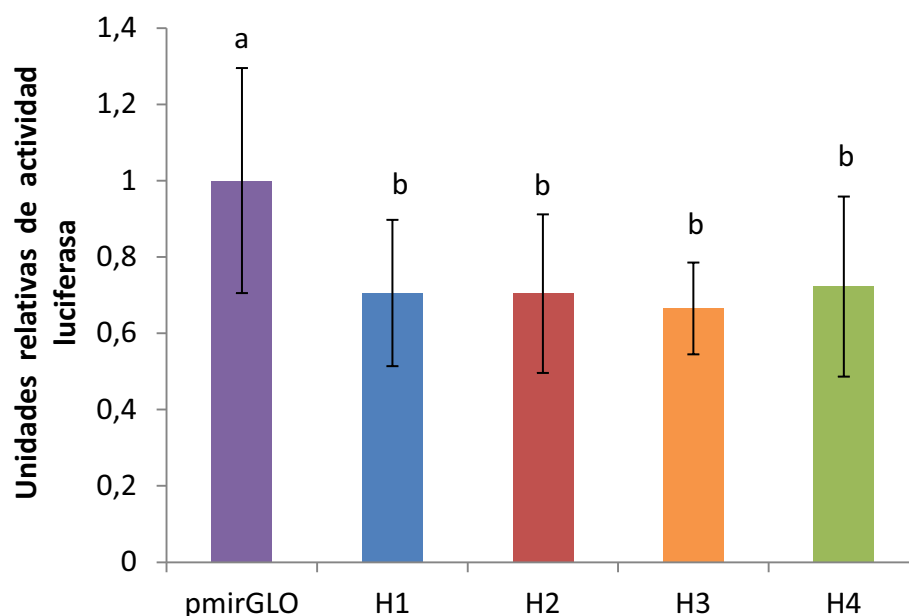
El fragmento de 750 pb amplificado para ser ligado al vector pmirGlo para el estudio de la actividad luciferasa se muestra en la Figura 23, e incluye los SNPs estudiados. Este fragmento es de mayor tamaño que el utilizado para el genotipado por secuenciación, ya que diversos estudios han indicado que en las zonas próximas al codón stop existen mayor número de secuencias diana para miRNAs, que pueden ser reguladoras de los genes.



**Figura 23.** Fragmento de DNA amplificado para llevar los estudios de la actividad luciferasa. Los nucleótidos en rojo indican el codón stop. En naranja se indican los cebadores utilizados para amplificar el fragmento clonado. En verde se indican los cebadores utilizados para genotipar mediante secuenciación los diferentes polimorfismos. Los SNPs están indicados en rojo.



El promedio de los 3 experimentos luciferasa independientes realizados para cada haplotipo y para el vector vacío pmirGlo quedan reflejados en la Figura 24. No se encontraron diferencias en la actividad luciferasa entre 4 haplotipos estudiados ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, la actividad luciferasa de los 4 haplotipos fue un 30% inferior que la actividad emitida por las células transfectadas con el vector pmirGlo vacío ( $P < 0,05$ ), lo que hace pensar que la región 3'UTR del gen *CAST* es una zona activa. Sin embargo, los SNPs no produjeron modificaciones en la actividad de esta zona.



**Figura 24.** Actividad luciferasa (URL) de los cuatro haplotipos más importantes descritos y del vector pmirGLO que no contiene la zona 3'UTR del gen que se ha incluido como control positivo. Diferentes letras indican diferencias al  $P < 0,05$ .

La zona más proximal al codón stop se aisló para la caracterización del gen *CAST* a partir del cDNA (Capítulo I) de 5 animales de la raza Parda de Montaña y 3 de la raza Pirenaica con genotipos alternativos para el SNP *CAST\_4* y valores extremos para el carácter dureza. Aunque en esta zona no se encontraron polimorfismos, en el estudio *in silico* con Microinspector se han encontrado varios posibles sitios de unión de miRNA (bta-miR-2327, bta-miR-339, bta-miR-2320, bta-miR-339b, bta-miR-2334 y bta-miR-664) que puede afectar a la actividad luciferasa de la misma manera en los 4

haplotipos y por tanto ser el efecto de la menor actividad luciferasa que se observa entre los 4 haplotipos y el vector vacío.

El tipo celular elegido para el ensayo luciferasa son las células C2C12. Estas células se diferencian a microtúbulos con un cambio de medio de cultivo de suero fetal bovino a suero de caballo. Sin embargo, la eficiencia de la transfección disminuye al aumentar el número de células diferenciadas a miotubos. Tras realizar unas pruebas preliminares (resultados no mostrados) se decidió realizar la diferenciación a la vez que la transfección. El poco tiempo de diferenciación (2 días) pudo afectar a los resultados finales de actividad luciferasa. No podemos descartar que esta zona produzca cambios en la expresión de este gen, puesto que es posible que las condiciones en las que hemos llevado a cabo nuestro estudio no hayan permitido encontrar diferencias entre los distintos haplotipos. En otros estudios se han identificado diferencias de expresión de miRNAs en el músculo *Longissimus dorsi* asociados a diferentes estados de estrés (Zhao *et al.*, 2012). Por tanto, unas condiciones diferentes a las de nuestro estudio (otro tipo celular, otro medio de cultivo, algún tipo de aditivo añadido al medio como ácidos grasos oleico o linoleico, vitaminas, etc. o condiciones de cultivo tales como pH o hipoxia) podrían provocar que se uniera algún miRNA a la región 3'UTR del gen *CAST* o incluso de algún otro gen relacionado con la dureza de la carne.

Otra posibilidad es que el SNP responsable del efecto fenotípico encontrado esté en desequilibrio de ligamiento con los SNPs aquí descritos. En este sentido y como se ha descrito anteriormente, Allais *et al.* (2011), describieron un SNP asociado al carácter dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis* en la raza Charolés a 14 días de maduración, situado a 1045 pb en dirección 3' del extremo de la zona clonada para este estudio. Este SNP no se ha estudiado, ya que se sitúa lejos de la región estudiada en el presente estudio.

Además, se han descrito tres señales de poliadenilación en la región 3'UTR (Raynaud *et al.*, 2005). Según el trabajo de Nattrass *et al.* (2014) que estudia los mecanismos que regulan la expresión del gen *CAST* en el músculo esquelético bovino,

esta señal es capaz de variar la extensión del mRNA eliminando unos 1100 pb de la secuencia del 3'UTR. Esto provocaría un acortamiento de la longitud del mRNA y una disminución del número de posibles sitios de unión de miRNA. Esto podría producir alteraciones a nivel de traducción de la proteína (Di Giammartino *et al.*, 2011). Finalmente, también han descrito otros autores que variaciones en la región 3'UTR del gen pueden afectar a la estructura y estabilidad del mRNA y hacer que mensajeros con una variante nucleotídica sea más sensible a la degradación por nucleasas (Di Paola *et al.*, 2002). En este estudio, se han encontrado haplotipos y polimorfismos asociados al esfuerzo medido en el músculo *Longissimus thoracis* aunque no se ha podido validar el efecto funcional de los SNPs asociados al fenotipo dureza de la carne.

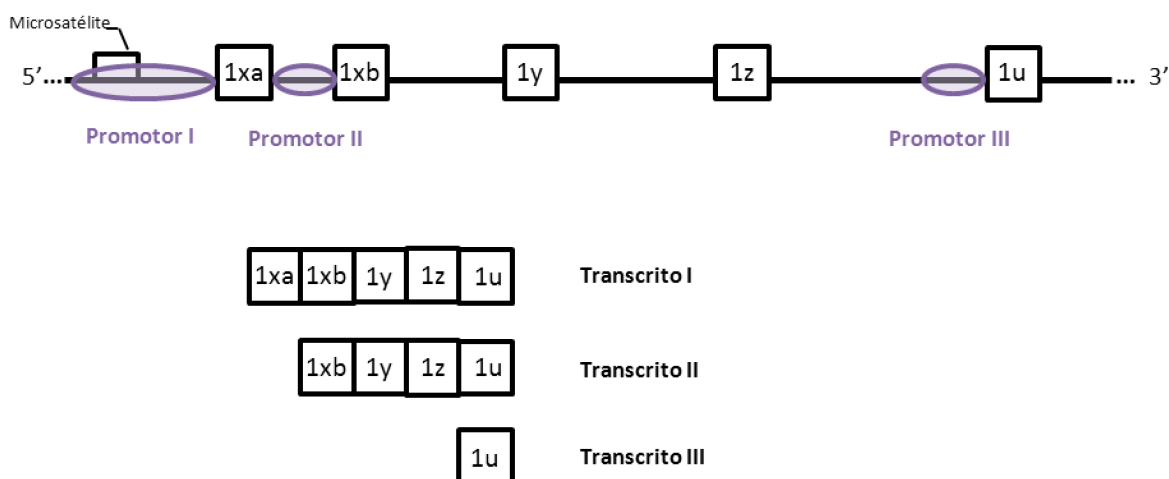


## CAPÍTULO IV. Estudio de la región promotora del gen *CAST* y estudios de asociación con la dureza de la carne



## 1. Estudio de la región promotora del gen *CAST*

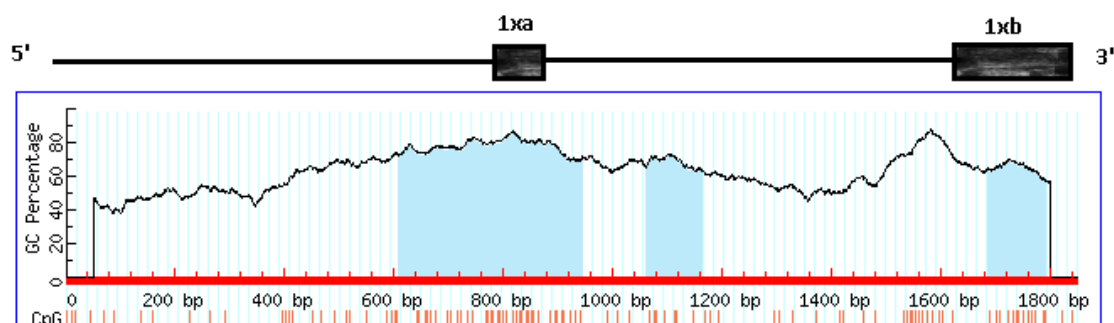
Con el objetivo de buscar polimorfismos que pudieran afectar a sitios de unión de factores de transcripción, y por lo tanto a la expresión del gen, se secuenció la región 5' proximal de los transcritos I, II y III (Raynaud et al., 2005) que se expresan en músculo esquelético, así como 678, 789 y 298 pb de la región promotora que los origina (Figura 25).



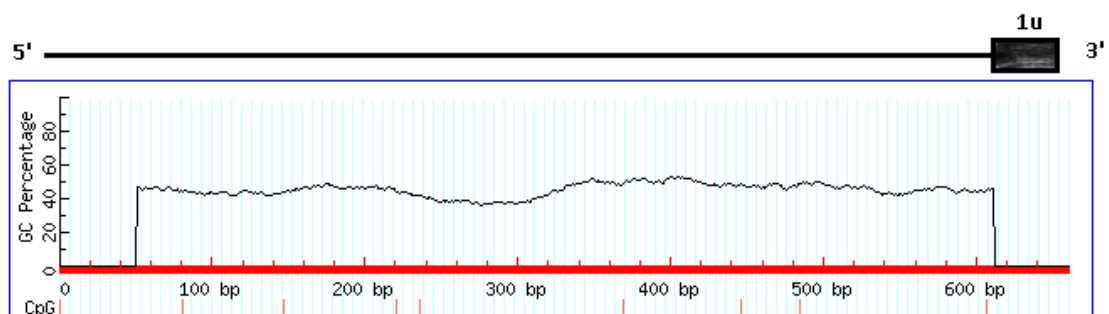
**Figura 25.** Representación esquemática de la región 5' proximal aislada de los transcritos I, II y III. Se indica en azul la región promotora aislada para cada transcrito.

Los tres promotores localizados en la región 5' proximal de los exones 1xa, 1xb y 1u carecen de caja TATA, siendo promotores ricos en islas CpG (Figuras 26 y 27). Como se puede observar en la Figuras 26 y 27 en las regiones promotoras de los transcritos I y II existen tres islas CpG, ricas en dinucleótidos susceptibles de ser metilados. Sin embargo, en la región promotora que origina el transcrito III no se predice ninguna isla CpG. Igualmente en la región que rodea a los exones 1y y 1z el programa MethPrimer tampoco predijo ninguna isla CpG. Los promotores ricos en islas CpG suelen tener múltiples iniciadores de la transcripción en la región promotora (Deaton y Bird, 2011). En este sentido, estos promotores suelen ser ricos en sitios de unión a factores de transcripción Sp1, además de estar sujetos a un control epigenético, siendo una regulación de la transcripción a los diferentes estímulos más plástica (Carninci *et al.*, 2006). Mutaciones en estos sitios de unión a

factores de transcripción podrían alterar la tasa de transcripción del gen e influir en el fenotipo dureza de la carne.



**Figura 26.** Predicción de islas CpG mediante el software MethPrimer. Predicción en las regiones promotoras de los transcritos I (1xa) y II (1xb). Las regiones sombreadas en azul indican islas CpG. Las líneas rojas indican dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados.



**Figura 27.** Predicción de islas CpG mediante el software MethPrimer. Predicción en la región promotora del transcrito III (exón 1u). Las regiones sombreadas en azul indican islas CpG. Las líneas rojas indican dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados.

En total se han aislado 36 polimorfismos, de los cuales 9 se han aislado por primera vez en este estudio. En la región promotora del transcrito I se han encontrado 10 polimorfismos (Tabla 37). En esta región se han predicho 27 sitios de unión al factor de transcripción Sp1, mediante el programa informático AliBaba 2.1. Se puede observar que los diversos polimorfismos crean o destruyen posibles sitios de unión a factores de transcripción. Por ejemplo, la mutación rs110033820 crea un sitio de unión para AP-2 en presencia del alelo C. En el promotor I se ha encontrado el



microsatélite CA descrito por Nonneman *et al.* (1999) (rs479041025), que fue genotipado en este estudio y utilizado para realizar estudios de asociación.

En el exón 1xa se han encontrado dos mutaciones, una de ellas produce un cambio aminoacídico en la posición 17 del gen produciendo un cambio de alanina por treonina. Este cambio aminoacídico produce un cambio deletéreo según su valor SIFT (0,01) y podría tener un impacto importante sobre la funcionalidad de la proteína. Esta mutación se encontró en heterocigosis únicamente en dos animales en la raza Pirenaica.

En la región promotora del transcrito II se han encontrado 12 polimorfismos y 53 sitios de unión al factor de transcripción Sp1 (Tabla 38). En la tabla 38 se puede observar que los diversos polimorfismos crean o destruyen posibles sitios de unión Sp1. Por ejemplo, la mutación rs108980000 crea dos o un sitio de unión para Sp1 dependiendo de que sea el alelo C o A. Igualmente, los diferentes polimorfismos crean o destruyen sitios de unión a factores de transcripción que podrían tener incidencia sobre la tasa de transcripción de los diferentes transcritos del gen, y afectar en última medida a la cantidad de proteína *CAST*, que podría influir sobre la dureza de la carne.

En el exón 1z, que formaría parte de los transcritos I y II, se ha encontrado tres mutaciones ya descritas que producen un cambio de aminoácido (Tabla 39). Este cambio aminoacídico produce un cambio tolerable en función de su valor SIFT (0,44, 0,08 y 0,48 para los SNPs rs109727850, rs467894979 y rs137601357, respectivamente), por lo que se espera que no tenga un impacto importante sobre la función de la proteína. El programa PolyPhen-2 también definió estos SNPs como benignos.

En la región promotora del transcrito III se han encontrado 9 polimorfismos y se han predicho 4 sitios de unión al factor de transcripción Sp1 (Tabla 40).

Debido a la alta complejidad encontrada en la región promotora en cuanto a la gran cantidad de polimorfismos que afectan a cambios aminoacídicos de la proteína y

a posibles sitios de unión de factores de transcripción, así como la posible metilación del mismo, no se llevaron a cabo estudios de asociación entre los mismos y la dureza de la carne. Sólo se estudió la asociación de los alelos encontrados en el microsatélite y la dureza de la carne. La posible influencia del resto de polimorfismos en la expresión del gen y funcionalidad del mismo, así como su posible metilación se llevarán a cabo en futuros trabajos del grupo.

**Tabla 37.** Localización, posición relativa en el genoma bovino (versión UMD3.1), tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP), variación aminoacídica y si afecta la unión de factores de transcripción (FT) o región codante (CDS) del polimorfismo en el gen de los polimorfismos localizados en la región 1xa.

Localización-posición UMD3.1.1.	Polimorfismo	Var <sup>1</sup>	dbSNP	Variación aminoacídica	Unión de factores de transcripción
<b>Promotor transcrito I</b>					
BTA7:98444372-98444380	microsatélite	(CA) <sub>n</sub>	rs460530185		
BTA7:98444558	SNP	G/A	rs381773152		G: nada A: nada
BTA7:98444674	Indel	G	En este estudio		in: Sp1 del: nada
BTA7:98444750	SNP	G/C	rs110033820		C: Sp1 G: AP-2, Sp1
BTA7:98444828	SNP	C/T	rs134789056		T: nada C: nada
BTA7:98444858	SNP	T/C	En este estudio		T: nada C: nada
BTA7:98444862	SNP	A/C	rs137764065		A: nada C: nada
BTA7:98444869	SNP	C/T	rs133635365		C: Sp1 T: Sp1
BTA7:98444920	SNP	A/G	rs136105887		A: YY1, Sp1 G: Sp1
BTA7:98444919	SNP	G/C	rs134974904		C: YY1, Sp1 G: Sp1
<b>CDs/Exón 1xa</b>					
BTA7:98444990	SNP	G/C	rs447936915	P/P	CCG/CCC
BTA7:98445027	SNP	G/A	En este estudio	A/T	GCT/ACT

<sup>1</sup> Variación.

**Tabla 38.** Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y si afecta la unión de factores de transcripción (FT) de los polimorfismos localizados en la región 1xb en el gen *CAST*.

Localización UMD3.1.1.	Polimorfismo	Variación	dbSNP	Unión de factores de transcripción
<b>Promotor transcrito II</b>				
BTA 7:98445200	SNP	G/C	rs137189823	G: Sp1 <sup>1</sup> C: Sp1
BTA 7:98445352	SNP	G/A	rs135314063	G: nada; A: nada
BTA 7:98445495	SNP	C/T	En este estudio	C: Pap1+, AP-1,c-Jun T: Oct-1
BTA 7:98445713	SNP	G/A	En este estudio	G: Sp1 <sup>1</sup> , Krox20, Sp1 <sup>1</sup> , ETF A: Sp1
BTA 7:98445715	SNP	C/A/T	rs378973252 (C/A)	G: Sp1 <sup>1</sup> , Krox20, Sp1 <sup>1</sup> , ETF, Sp1 <sup>1</sup> T: Sp1
BTA 7:98445720	SNP	C/A	rs108980000	C: Sp1 <sup>1</sup> , ETF, Sp1 <sup>1</sup> A: Sp1
BTA 7:98445722	SNP	G/A	En este estudio	C: Sp1 <sup>1</sup> , Sp1 <sup>1</sup> A: Sp1
BTA7: 98445730-98445740	indel	CGGGGGCGGGG	Motter <i>et al.</i> (2009)	In: Sp1 <sup>1</sup> , Krox20, Sp1 <sup>1</sup> , ETF, Sp1 <sup>1</sup> , WT-1, NF-muE1 del: nada
BTA 7:98445750	SNP	C/T	En este estudio	G: Sp1 <sup>1</sup> , Sp1 <sup>1</sup> , Id1 T: Sp1 <sup>1</sup> , Sp1 <sup>1</sup> , AP-2alph
BTA 7:98445751	SNP	A/G	rs386064166	A: Sp1, Id1 G:Sp1, AP-2alph
BTA 7:98445763	SNP	C/G	rs207766091	C: Sp1, USF G:Sp1, AP-2alph
<b>5'UTR</b>				
BTA 7:98445871	SNP	T/A	rs452163054	T:Sp1 G:Sp1

<sup>1</sup> El factor de transcripción Sp1 reconoce diferentes secuencias que incluyen el alelo indicado.

**Tabla 39.** Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y variación aminoacídica (AA) de los polimorfismos localizados en la región 1z en el gen *CAST*.

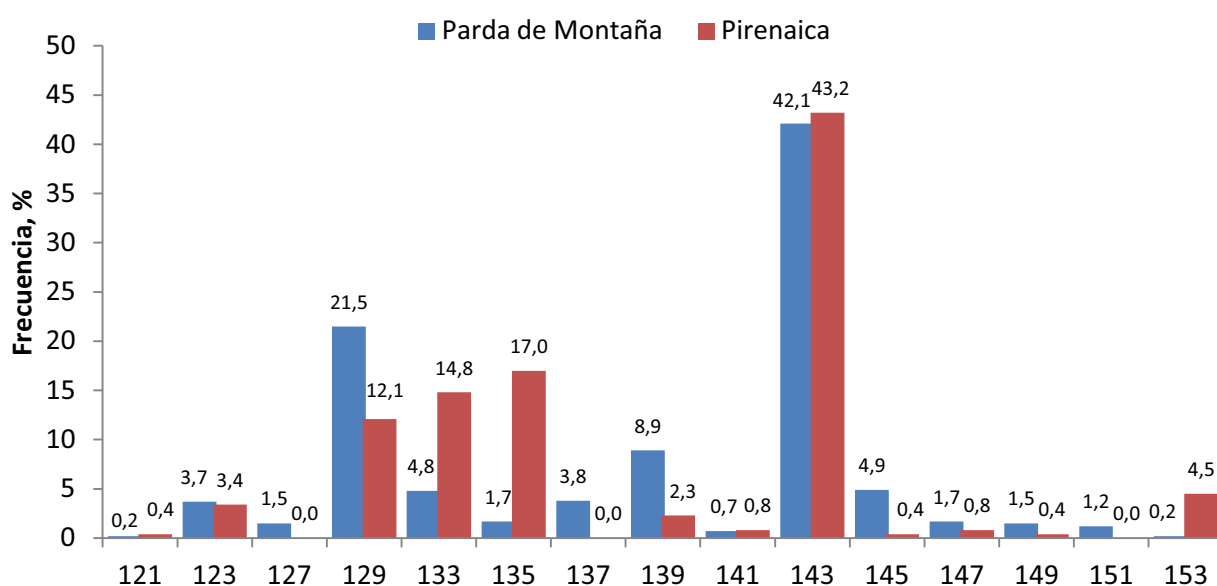
UMD3.1.1	Polimorfismo	Variación	dbSNP	Variación AA
<b>CDS/Exón 1z</b>				
BTA7: 98485261	SNP	G/A	rs109727850	D/G: GAT/GGT
BTA7: 98485262	SNP	G/T	rs467894979	D/E: GAT/GAG
BTA7: 98485273	SNP	T/C	rs137601357	L/P: CTG/CCG

**Tabla 40.** Localización, posición relativa en el genoma bovino, tipo, variación, número de acceso a la base de datos de polimorfismos/SNPs (dbSNP) y si afecta la unión de factores de transcripción de los polimorfismos localizados en la región 1u en el gen *CAST*.

UMD3.1.1	Polimorfismo	Variación	dbSNP	Unión de factores de transcripción
<b>Promotor transcrito III</b>				
BTA7:98523977	SNP	A/T	rs136869649	A: nada T: NF-E2, c-Jun, c-Fos
BTA7:98523978	SNP	C/T	rs134363702	T: nada C: c-Jun, c-Fos
BTA7:98524004	SNP	A/G	rs137613442	A: Oct-1, C/EBPalph G: Oct-1
BTA7:98524029	SNP	A/G	rs133205396	G: Sp1, MIG1, D1 A: nada
BTA7:98524070	SNP	A/G	En este estudio	A: nada G: GR
BTA7:98524139	SNP	A/G	rs134472819	G: Sp1 A: c-Fos, c-Jun, GCNH, AP-1, CRE-BP1
BTA7:98524167	SNP	T/C	rs384030144	T: nada A: MEB-1, GLO
BTA7:98524220	SNP	A/G	rs135682399	A: nada G: nada
BTA7:98524221	SNP	T/C	rs133396436	T: nada C: nada

## 2. Estudio de asociación del microsatélite rs479041025 con la dureza de la carne

El microsatélite rs479041025 situado en el promotor I presentó 15 alelos con unas frecuencias alélicas para cada raza que aparecen en la Figura 28.



**Figura 28.** Frecuencias alélicas del microsatélite del gen *CAST* para las razas Parda de montaña y Pirenaica.

Los estudios de asociación mostraron que el alelo 129 estaba asociado a la dureza de la carne en Parda de Montaña (Tabla 41), mientras que en Pirenaica se encontró una tendencia de significación en el alelo 129 y 135 (Tabla 42).

En Parda de Montaña, los animales que presentaron 1 o 2 copias del alelo 129 presentaron una carne más dura que los que no presentaban ninguna copia en la maduración intermedia de la carne. En cuanto a los diferentes tiempos de maduración, aunque todas las comparaciones fueron significativas a tiempos de maduración intermedia, tras corrección de Bonferroni sólo la comparación de 2 copias contra 0 copias resultó significativa ( $P = 0,007$ ). Igualmente, a maduraciones

largas la comparación de 0 contra 1 copia resultó significativa, aunque esta significación se perdió tras la corrección de Bonferroni. El resto de los alelos del microsatélite no estuvieron asociados con la dureza en ninguna de las dos razas, únicamente apareció una tendencia en el alelo 135 en la raza Pirenaica ( $P = 0,09$ ).

**Tabla 41.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración para los alelos más frecuentes del microsatélite de CAST en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

Alelo	P-valor		Maduración	nº de copias del alelo		
	Alelo	Alelo X M		0	1	2
129	0,02	0,006	corta	88,37 ± 2,28	90,72 ± 2,22	87,23 ± 4,46
			media	70,58 ± 2,15a	76,89 ± 2,50ab	85,22 ± 3,97b
			larga	62,45 ± 2,17	67,78 ± 2,59	69,72 ± 4,18
139	0,60	0,53	corta	89,61 ± 2,14	81,53 ± 4,39	89,71 ± 12,80
			media	74,17 ± 2,08	71,44 ± 2,33	66,56 ± 7,92
			larga	64,89 ± 2,10	62,78 ± 3,42	65,46 ± 7,92
143	0,46	0,23	corta	89,45 ± 2,59	87,53 ± 2,64	90,87 ± 3,15
			media	76,30 ± 2,38	73,61 ± 2,35	70,59 ± 2,72
			larga	66,24 ± 2,40	64,00 ± 2,40	62,32 ± 2,68

<sup>1</sup> En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

**Tabla 42.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración para los alelos más frecuentes del microsatélite de CAST en la raza Pirenaica<sup>1</sup>.

Alelo	P-valor		Maduración	nº de copias del alelo		
	Alelo	Alelo X M		0	1	2
129	0,06	0,098	media	46,79 ± 2,34	56,38 ± 3,97	52,08 ± 6,80
			larga	46,69 ± 2,55	52,94 ± 4,12	56,15 ± 9,36
133	0,70	0,47	media	49,17 ± 2,40	47,58 ± 3,42	40,11 ± 7,07
			larga	48,04 ± 2,59	47,47 ± 3,61	-
135	0,09	0,53	media	46,68 ± 3,43	53,13 ± 4,13	59,22 ± 8,69
			larga	46,39 ± 3,57	51,15 ± 4,34	-
143	0,21	0,48	media	52,47 ± 3,49	46,79 ± 3,34	44,38 ± 4,04
			larga	49,30 ± 3,97	46,56 ± 3,44	45,23 ± 4,56

<sup>1</sup> Sólo se muestran los resultados de los alelos que presentaron una frecuencia superior al 5% en cada población.

Es interesante resaltar que los efectos encontrados por el alelo 129 del microsatélite y el SNP *CAST\_2* son muy similares (Tabla 43). Esto sugiere que estos marcadores podrían estar detectando el mismo efecto, y no efectos diferentes asociados a dos marcadores diferentes. Para estudiar el efecto del SNP y del microsatélite conjuntamente sobre la dureza se llevó a cabo un análisis de asociación haplotípico entre el microsatélite, y los SNPs *CAST\_2* y *CAST\_5*.

**Tabla 43.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M) para el SNP *CAST\_2* y el alelo 129 del microsatélite de *CAST* en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

Locus	P-valor		Maduración	Genotipo		
	SNP/alelo	SNP/alelo x M		AA	GA	GG
SNP						
<i>CAST_2</i>	0,053	0,010	corta	89,05 ± 2,22	88,29 ± 2,45	89,03 ± 4,16
			media	71,35 ± 2,01a	73,70 ± 2,14a	85,72 ± 3,24b
			larga	63,61 ± 2,04	64,49 ± 2,21	70,62 ± 3,31
Microsatélite				0 copias	1 copia	2 copias
129	0,019	0,006	corta	88,37 ± 2,28	90,72 ± 2,22	87,23 ± 4,46
			media	70,58 ± 2,15a	76,89 ± 2,50ab	85,22 ± 3,97b
			larga	62,45 ± 2,17	67,78 ± 2,59	69,72 ± 4,18

<sup>1</sup> En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

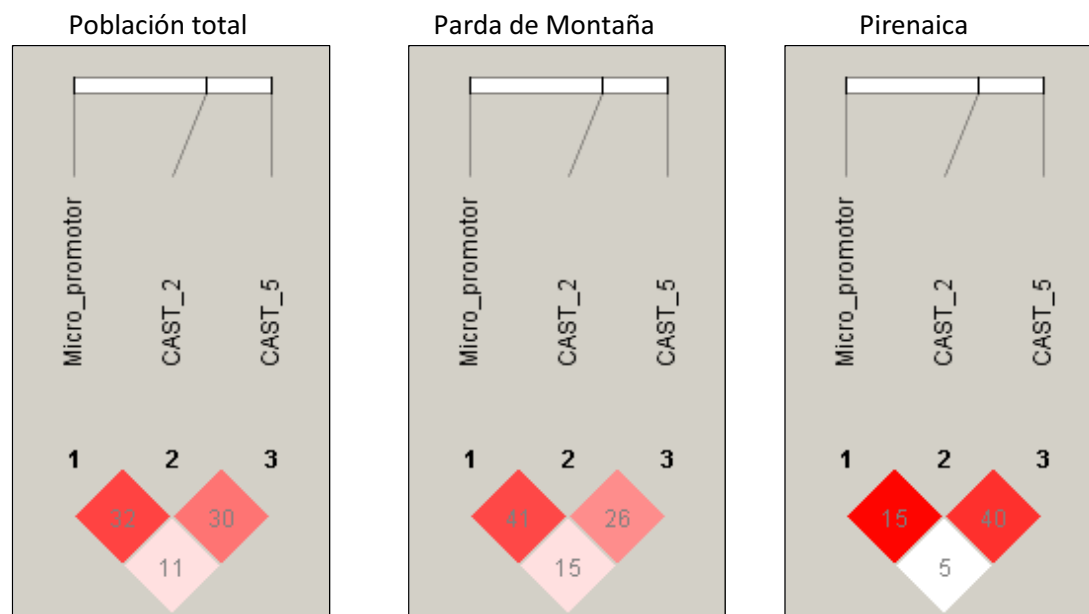
### 3. Estudio de asociación haplotípico

Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs *CAST\_2*, *CAST\_5* y el microsatélite de la población total, para la raza Parda de Montaña y raza Pirenaica por separado se muestran en la Tabla 44 y Figura 29.

Este análisis señala que el microsatélite y el SNP *CAST\_2* segregan conjuntamente con una  $r^2$  moderada. En este sentido, de los animales homocigotos para el alelo 129 del microsatélite ( $n = 50$ ), 43 fueron del genotipo GG de *CAST\_2* indicando que estos genotipos están en desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,85$ ).

**Tabla 44.** Análisis de desequilibrio de ligamiento indicando los coeficientes de desequilibrio de ligamiento  $D'$  y  $r^2$  entre cada SNP, así como el valor LOD, el intervalo de confianza y la distancia entre ambos marcadores (pb).

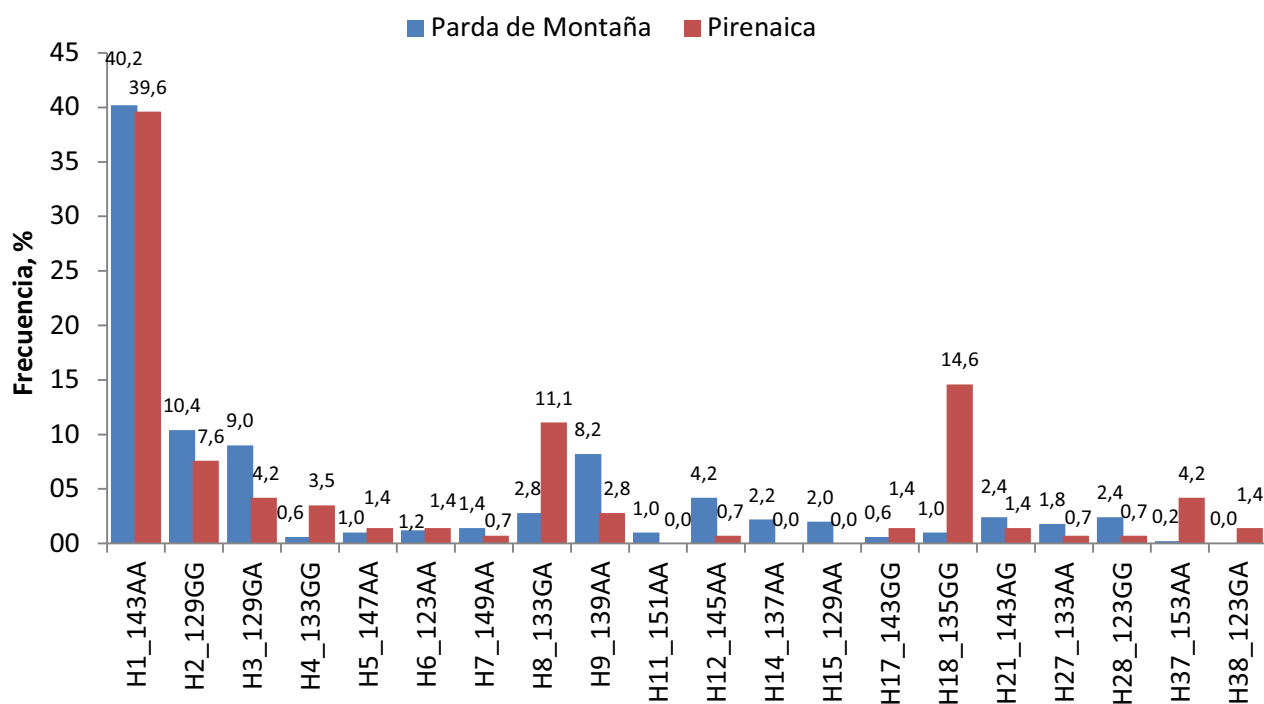
Población	Marcador 1	Marcador 2	$D'$	LOD	$r^2$	Int. Confianza	Distancia (pb)
Total							
	Micro_prom	CAST_2	0,850	28,64	0,320	0,75-0,92	91311
	Micro_prom	CAST_5	0,382	8,42	0,115	0,27-0,48	135291
	CAST_2	CAST_5	0,742	25,84	0,308	0,64-0,82	43980
Parda de Montaña							
	Micro_prom	CAST_2	0,842	28,97	0,415	0,74-0,91	91311
	Micro_prom	CAST_5	0,401	8,57	0,159	0,29-0,5	135291
	CAST_2	CAST_5	0,684	15,94	0,269	0,56-0,78	43980
Pirenaica							
	Micro_prom	CAST_2	1	3,94	0,158	0,61-1,0	91311
	Micro_prom	CAST_5	0,434	1,32	0,059	0,14-0,68	135291
	CAST_2	CAST_5	0,899	9,5	0,406	0,71-0,97	43980



**Figura 29.** Desequilibrio de ligamiento en la región. El color representa el valor de  $D'$  (desde  $D' = 1$  (rojo) hasta  $D' = 0$  (blanco)) y la numeración indica el valor de  $r^2$ .



En el estudio de haplotipos se encontraron un total de 39 y 21 haplotipos en las razas Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente, cuyas frecuencias se muestran en la Figura 30.



**Figura 30.** Frecuencias haplotípicas de los SNPs *CAST\_2*, *CAST\_5* y el microsatélite del gen *CAST*. Se indican los haplotipos que presentan una frecuencia superior al 1% en alguna de las dos razas.

Los estudios de asociación mostraron un efecto del haplotipo *H2\_129GG* y de la interacción del mismo con el tiempo de maduración sobre la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña (Tabla 45). La carne de los animales con 2 copias del haplotipo *H2\_129GG* fueron más duros que los que tenían 0 ó 1 copia en la maduración intermedia. El efecto no fue significativo para la maduración corta y la larga.

**Tabla 45.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte (N/cm<sup>2</sup>) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico (H) compuesto por los SNPs *CAST\_2*, *CAST\_5* y el microsatélite gen *CAST* en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

Haplotipo	n	P-valor		Maduración	nº de copias del alelo indicado		
		H	H x M		0	1	2
<i>H1_143AA</i>	200	0,88	0,66	corta	85,15 ± 2,99	85,85 ± 2,95	88,56 ± 3,99
				media	74,67 ± 2,80	72,64 ± 2,74	72,69 ± 3,21
				larga	65,96 ± 2,84	65,05 ± 2,77	65,71 ± 3,28
<i>H2_129GG</i>	52	0,023	0,01	corta	85,42 ± 2,01	86,36 ± 2,80	94,20 ± 7,64
				media	70,30 ± 2,39b	78,74 ± 3,10b	92,77 ± 9,62a
				larga	63,89 ± 2,14	66,71 ± 2,86	80,00 ± 8,28
<i>H3_129GA</i>	45	0,18	0,104	corta	86,54 ± 2,66	86,42 ± 4,18	84,39 ± 9,90
				media	72,33 ± 2,65	79,20 ± 3,55	84,40 ± 7,98
				larga	64,81 ± 2,66	69,02 ± 3,64	81,69 ± 7,98
<i>H9_139AA</i>	41	0,60	0,449	corta	86,58 ± 2,53	80,58 ± 4,79	-
				media	73,42 ± 2,53	72,17 ± 3,78	73,27 ± 9,26
				larga	65,55 ± 2,54	65,20 ± 3,88	72,32 ± 9,25

<sup>1</sup> Sólo se muestran los resultados de los alelos que presentaron una frecuencia superior al 5% en cada población. En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

En la raza Pirenaica, se encontró un efecto en la interacción de los haplotipos *H1\_143AA* y *H2\_129GG* con el tiempo de maduración (Tabla 46). Los animales que tenían 1 copia del haplotipo *H1* presentaron una carne más blanda al corte que los que tenían 0 copias, mientras que los animales con 1 copia del haplotipo *H2* fueron más duros que los que tenían 0 a un tiempo de maduración intermedio. En el estudio haplotípico del Capítulo II también se encontró un efecto del haplotipo *GG* sobre la dureza de la carne en Pirenaica. Sin embargo, las estimas de los efectos encontrados sobre la dureza de la carne son diferentes.

**Tabla 46.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico (H) compuesto por los SNPs *CAST\_2*, *CAST\_5* y el microsatélite gen *CAST* en la raza Pirenaica<sup>1</sup>.

Haplotipo	n	P-valor		Maduración	Copias del alelo indicado		
		H	HxM		0	1	2
<i>H1_143AA</i>	57	0,90	0,017	media	52,50 ± 3,50a	46,15 ± 3,32b	45,50 ± 4,30a,b
				larga	49,86 ± 4,21	46,01 ± 3,53	45,89 ± 4,95
<i>H2_129GG</i>	11	0,77	0,007	media	46,75 ± 2,03b	58,43 ± 3,91a	56,39 ± 10,71a,b
				larga	46,10 ± 2,26	57,11 ± 4,41	-
<i>H8_133GA</i>	16	0,77	0,70	media	48,68 ± 2,45	46,82 ± 3,56	42,39 ± 11,42
				larga	47,43 ± 2,74	47,95 ± 3,97	-
<i>H18_135GG</i>	21	0,32	0,41	media	46,99 ± 3,23	52,67 ± 4,01	58,81 ± 8,46
				larga	46,99 ± 3,46	50,23 ± 4,43	-

<sup>1</sup> Sólo se muestran los resultados de los alelos que presentaron una frecuencia superior al 5% en cada población. En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

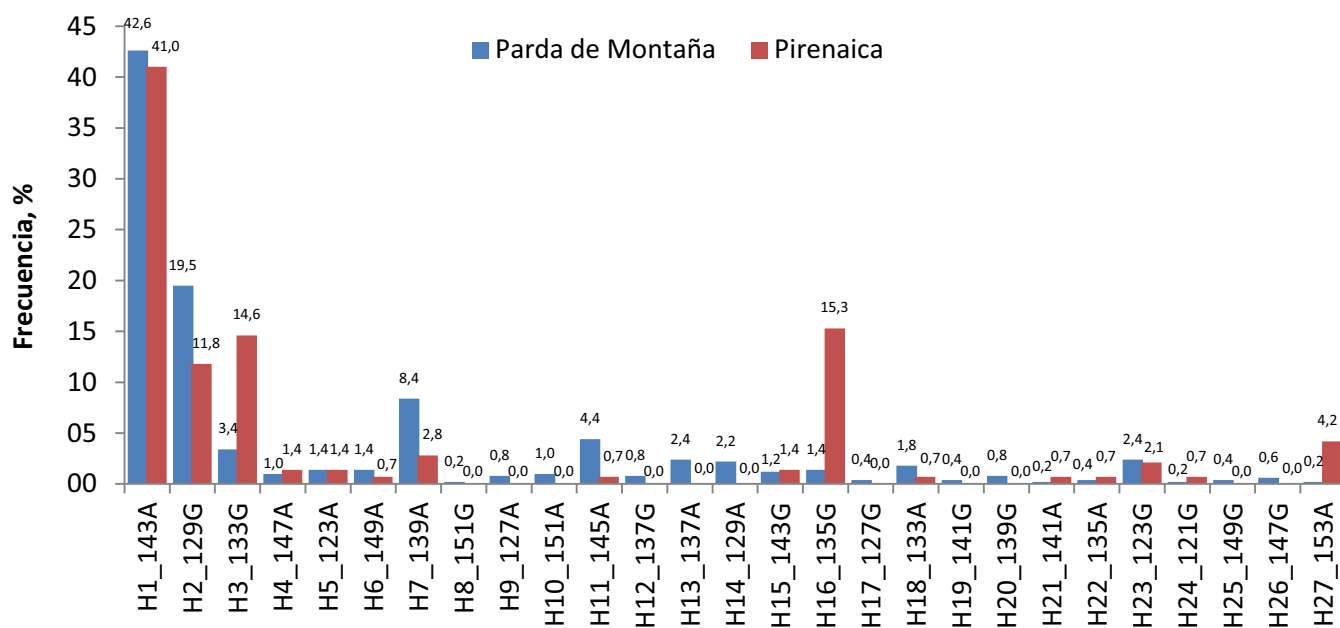
En el caso del haplotipo H2 también se observaron diferencias significativas a un tiempo de maduración largo. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron cuando se llevó a cabo la corrección de Bonferroni, aunque la comparación de 0 contra 1 copias del *H2\_129GG* con un tiempo de maduración intermedio estuvo cerca de la significación ( $P = 0,064$ ). Como era de esperar, el haplotipo compuesto por los alelos 129 del microsatélite y el alelo G de los SNPs *CAST\_2* y *CAST\_5* fueron asociados a una carne más dura. El haplotipo *H3\_129GA* no apareció asociado a la dureza de la carne lo que nos hace pensar que el efecto que estamos detectando podría estar ligado al SNP *CAST\_2*.

Los haplotipos *H15\_129AA* y *H16\_129AG* no se asociaron a la dureza de la carne, aunque esto puede ser debido al bajo número de estos haplotipos identificados en los animales ( $n = 10$  y  $n = 1$  para *H15* y *H16*, respectivamente, en Parda de Montaña. En Pirenaica no aparecieron estos haplotipos).

Para intentar separar el efecto del alelo 129 del microsatélite del alelo G del SNP *CAST\_2* se infirieron las fases haplotípicas para el bloque compuesto por SNP *CAST\_2*

y el microsatélite del gen *CAST*. En total se encontraron 27 y 16 haplotipos en las razas Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente (Figura 31).

Los estudios de asociación mostraron un efecto del haplotipo *H2\_129G* y de la interacción del mismo con el tiempo de maduración sobre la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña (Tabla 47). Como en el caso anterior de los haplotipos compuesto por el microsatélite y los dos SNPs, la carne de los animales con una o dos copias del haplotipo H2 fue más dura que los que tenían 0 copias en la maduración intermedia, en las tres comparaciones posibles, aunque sólo resultó significativa tras corrección de Bonferroni la comparación de 0 contra 2 copias. En tiempos de maduración largas, resultaron significativas las comparaciones de 0 contra 1 o 2 copias, aunque estas diferencias desaparecieron tras la corrección de Bonferroni.



**Figura 31.** Frecuencias haplotípicas del SNP *CAST\_2*, y el microsatélite gen *CAST*.

**Tabla 47.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* en los tres tiempos de maduración (M) para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico compuesto por los SNPs *CAST\_2*, el microsatélite gen *CAST* en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

Haplotipo	n	P-valor		M	Copias del alelo		
		H	H x M		0	1	2
<i>H1_143A</i>	212	0,58	0,099	corta	85,87 ± 2,59	84,68 ± 2,53	89,39 ± 2,95
				media	75,97 ± 2,98	73,06 ± 2,85	70,89 ± 3,25
				larga	66,71 ± 2,66	64,96 ± 2,57	65,20 ± 2,90
<i>H2_129G</i>	97	0,006	0,001	corta	85,89 ± 2,29	86,57 ± 2,77	87,21 ± 4,19
				media	69,67 ± 2,60b	76,95 ± 2,98ab	85,98 ± 4,67a
				larga	63,04 ± 2,36	68,75 ± 2,73	71,82 ± 4,21
<i>H7_139A</i>	47	0,32	0,24	corta	86,92 ± 2,61	78,87 ± 4,55	-
				media	73,58 ± 2,61	71,17 ± 3,73	73,21 ± 9,25
				larga	65,65 ± 2,62	64,74 ± 3,81	72,32 ± 9,24

<sup>1</sup> Sólo se muestran los resultados de los alelos que presentaron una frecuencia superior al 5% en cada población. En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

En la raza Pirenaica, se encontró un efecto en la interacción del haplotipo *H1\_143A* con el tiempo de maduración (Tabla 48). Los animales que tenían 0 copias del haplotipo *H1* presentaron una carne más dura que los que tenían 2 copias en un tiempo de maduración intermedio, aunque esta significación desapareció tras corrección de Bonferroni.

No ha sido posible diferenciar los efectos de los alelos 129 del microsatélite y G del SNP *CAST\_2*, debido al alto desequilibrio de ligamiento encontrado entre los mismos ( $D' = 0,85$ ), y al bajo número de haplotipos con combinaciones diferentes a la 129G y que tuviesen el alelo G o el 129.

En la Tabla 49 se pueden ver los resultados comparativos de los resultados de dureza para el SNP *CAST\_2*, el alelo 129 del microsatélite y el haplotipo *H2\_129G* compuesto por el microsatélite y *CAST\_2*. Se puede observar que la mayor significación se obtiene para el haplotipo *H2\_129G* presentando las medias mínimo cuadráticas resultados similares.

**Tabla 48.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* en los tres tiempos de maduración (M) para los alelos más frecuentes del bloque haplotípico compuesto por los SNPs CAST\_2, el microsatélite gen CAST en la raza Pirenaica<sup>1</sup>.

Haplotipo	n	P-valor		M	nº de copias del alelo		
		H	H x M		0	1	2
H1_143A	59	0,96	0,02	media	52,45 ± 3,47	46,52 ± 3,34	44,72 ± 4,08
				larga	49,86 ± 4,20	46,30 ± 3,53	45,39 ± 4,85
H2_129G	17	0,25	0,42	media	46,82 ± 2,33	56,44 ± 3,90	52,06 ± 6,64
				larga	46,67 ± 2,66	53,18 ± 4,17	58,52 ± 10,33
H3_133G	21	0,36	0,88	media	49,23 ± 2,36	47,28 ± 3,46	40,10 ± 6,95
				larga	48,17 ± 2,66	47,15 ± 3,76	-
H16_135G	22	0,25	0,42	media	46,87 ± 3,36	52,97 ± 4,07	59,24 ± 8,48
				larga	46,79 ± 3,59	50,83 ± 4,39	-

<sup>1</sup> Sólo se muestran los resultados de los alelos que presentaron una frecuencia superior al 5% en cada población.

**Tabla 49.** Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los datos de fuerza de corte ( $N/cm^2$ ) del músculo *Longissimus thoracis* según la maduración (M) para el SNP CAST\_2, el alelo 129 del microsatélite y el haplotipo H2\_129G compuesto por el microsatélite y CAST\_2 en la raza Parda de Montaña<sup>1</sup>.

Locus	P-valor		M	Genotipo		
	SNP/A/H	SNP/A/H x M		AA	GA	GG
SNP						
CAST_2	0,053	0,010	corta	89,05 ± 2,22	88,29 ± 2,45	89,03 ± 4,16
			media	71,35 ± 2,01a	73,70 ± 2,14a	85,72 ± 3,24b
			larga	63,61 ± 2,04	64,49 ± 2,21	70,62 ± 3,31
Microsatélite				0 copias	1 copia	2 copias
129	0,019	0,006	corta	88,37 ± 2,28	90,72 ± 2,22	87,23 ± 4,46
			media	70,58 ± 2,15a	76,89 ± 2,50ab	85,22 ± 3,97b
			larga	62,45 ± 2,17	67,78 ± 2,59	69,72 ± 4,18
Haplotipo				0 copias	1 copia	2 copias
H2_129G	0,0058	0,001	corta	85,89 ± 2,29	86,57 ± 2,77	87,21 ± 4,19
			media	69,67 ± 2,60a	76,95 ± 2,98ab	85,98 ± 4,67b
			larga	63,04 ± 2,36	68,75 ± 2,73	71,82 ± 4,21

<sup>1</sup> En una fila, medias con distinta letra difieren al  $P < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

Se pueden plantear dos hipótesis: 1) que sólo haya un marcador asociado al efecto de la dureza de la carne encontrado, y que debido al alto desequilibrio de ligamiento entre el microsatélite y el alelo 129 se esté detectando el mismo efecto con *CAST\_2* que con el microsatélite. 2) que haya dos marcadores asociados a diferentes efectos sobre la dureza de la carne en el gen *CAST*, uno en la región promotora (microsatélite) y otro en el exón 7 (*CAST\_2*). Debido a que las medias mínimo cuadráticas son similares y no se observa un efecto aditivo cuando consideramos conjuntamente el SNP y el microsatélite en el análisis haplotípico, se puede pensar que la explicación más plausible es la 1.

Como se explicó en el Capítulo I, el polimorfismo rs210072660 (*CAST\_2*) se localiza en el exón 7 del gen *CAST* y causa un cambio en la secuencia aminoacídica en la posición 182 (NM\_174003: p.Thr182Ala), que puede afectar a la unión de la calpastatina a las membranas celulares y a la calpaína. El microsatélite está localizado en la región promotora, en el promotor I, y se ha descrito que microsatélites localizados en el promotor pueden modificar la estructura secundaria del DNA y participan en la regulación de la expresión génica (Kouzine y Levens, 2007; Sawaya *et al.*, 2012), estando estos microsatélites asociados generalmente a islas CpG, como es el caso del promotor del gen *CAST* (Lawson y Zhang, 2008). Sin embargo, una diferencia de dos nucleótidos (129 contra 131 o 127 pb) no parece suficiente para justificar el efecto del alelo 129 sobre la dureza de la carne.

Otra posibilidad es que el causante del efecto observado sea la existencia de determinados alelos o haplotipos de la región promotora del gen afectando a diferentes factores de transcripción, y que estos alelos estén en desequilibrio de ligamiento con el microsatélite y el SNP *CAST\_2*. Natrass *et al.* (2014) concluyeron que el mecanismo que afecta a una carne más dura, que está mediado por los SNPs de *CAPN1* y *CAST*, podría ser consecuencia de una alteración en la cantidad total del mRNA y por lo tanto, de la cantidad de estas enzimas en el músculo. En el exón 1xa se ha encontrado un SNP que produce cambio aminoacídico A17T que es predicho como deletéreo. Esta mutación se encontró en dos animales en heterocigosis en la raza

Pirenaica cuyo, diplotipo para el haplotipo del microsatélite y *CAST\_2* fue 129/135\_G/G y 135/139\_G/A. Tres animales secuenciados con el diplotipo 129/129\_G/G presentaron para este SNP el alelo salvaje en homocigosis no ligado a efectos deletéreos. Por lo tanto, no parece que el efecto detectado sea debido a esta sustitución aminoacídica. De igual forma, los genotipos encontrados para los 3 SNPs del exón 1z, que formaría parte de los transcritos I y II, no son exclusivos del diplotipo 129/129\_G/G. En cuanto a los SNPs que pueden afectar a sitios de unión de factores de transcripción (10, 12 y 9 para los promotores I, II y III, respectivamente) no ha sido posible inferir los haplotipos más probables al tener únicamente secuenciados 35 animales pertenecientes a 14 diplotipos diferentes para el haplotipo compuesto por el microsatélite y el SNP *CAST\_2*. En los tres animales secuenciados con el diplotipo 129/129\_G/G no se encontraron alelos exclusivos del mismo aunque no es descartable la existencia de algún haplotipo específico del mismo. De esta forma, con los datos que se tienen en estos momentos no se puede descartar el posible efecto de SNPs en la región promotora del gen que estén afectando a la dureza de la carne. La posible influencia de estos polimorfismos en la expresión del gen y funcionalidad del mismo, así como su posible metilación se llevarán a cabo en futuros trabajos del grupo.



CAPÍTULO V. Estudios de asociación del contenido de grasa intramuscular con los genes  *sintasa de los ácidos grasos (FASN), proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1), estearoil-CoA desaturasa (SCD), leptina (LEP), tiroglobulina (TG), receptor huérfano asociado al RAR- $\gamma$  (RORC), calpaína (CAPN1) y calpastatina (CAST)*



En este capítulo se estudió la posible asociación del contenido de la grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis* con varios SNPs de genes candidatos que habían sido asociados al contenido de grasa intramuscular en estudios publicados por otros equipos. En concreto, se estudiaron los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis (*Sintasa de los ácidos grasos (FASN)*, *proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)*, *acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)*, *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, *leptina (LEP)*, *tiroglobulina (TG)*, *receptor huérfano asociado al RAR- $\gamma$  (RORC)*) y la dureza de la carne (*calpaína (CAPN1)* y *calpastatina (CAST)*). En los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis se estudió el SNP que mayoritariamente se había encontrado relacionado con el contenido de grasa intramuscular en otros estudios. En el gen *calpaína* se estudiaron 3 SNPs ya que con los tres se han encontrado asociaciones con el contenido en grasa intramuscular en otras razas. Por último, se estudiaron en el gen *CAST* todos los SNPs que se habían genotipado para estudiar la dureza de la carne aunque en la bibliografía no se han relacionado con el contenido en grasa intramuscular en vacuno para descartar un posible efecto. En el capítulo únicamente se presentan los resultados de los SNPs *CAST\_2* y *CAST\_5*, asociados a la dureza de la carne en la presente Tesis.

En primer lugar se estudió la proporción de varianza fenotípica del carácter contenido de grasa intramuscular debida al animal en cada una de las razas estudiadas. El valor fenotípico del contenido de grasa intramuscular fue  $1,99\% \pm 1,27$  para la Parda de Montaña y  $1,89\% \pm 1,07$  para la raza Pirenaica. La varianza fenotípica y la varianza animal fue algo superior en la raza Parda de Montaña ( $\sigma_f^2 = 1,62$ ;  $\sigma_a^2 = 0,54$ ) que en Pirenaica ( $\sigma_f^2 = 1,14$ ;  $\sigma_a^2 = 0,36$ ), siendo la varianza residual 0,50. Así, la varianza debida al animal fue de un 33,4 y 31,8% para Parda de Montaña y Pirenaica, respectivamente. Como en el caso del carácter esfuerzo, esta variabilidad atribuible al animal fue alta, y podría deberse a factores genéticos, y en concreto a genes con efecto sobre el contenido de grasa intramuscular ya descritos por otros autores.



### 1. Estudios de asociación de polimorfismos de los genes *FASN*, *FABP4*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC*, *CAPN1* y *CAST* con el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis*.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs seleccionados<sup>1</sup> de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis (*FASN*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC*) se muestran en la Tabla 50. En la tabla no aparece el SNP *FABP4* (rs41729173) del gen *FABP4* porque en nuestra población aparece fijado para el alelo C en ambas razas.

**Tabla 50.** Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis *FASN*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC* en la población total y para las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

SNP	Genotipo	n			Alelo	Frecuencia		
		Total	Parda	Pirenaica		Total	Parda	Pirenaica
<i>FASN</i>	GG	233	192	41	G	0,85	0,88	0,74
	AG	72	49	23				
	AA	11	4	7				
<i>DGAT1</i>	GC/GC	261	232	29	GC	0,90	0,97	0,64
	AA/GC	47	14	33				
	AA/AA	9		9				
<i>SCD</i>	CC	159	128	31	C	0,70	0,73	0,62
	TC	115	89	26				
	TT	34	20	14				
<i>LEP</i>	TT	110	91	19	T	0,59	0,61	0,52
	CT	152	116	36				
	CC	55	39	16				
<i>TG</i>	CC	213	165	48	C	0,82	0,82	0,82
	TC	91	71	20				
	TT	13	10	3				
<i>RORC</i>	TT	195	167	28	T	0,77	0,81	0,63
	GT	98	65	33				
	GG	24	14	10				

<sup>1</sup> La localización de los SNP en el genoma bovino está detallada en la Tabla 7 (*TG*, *RORC*, *LEP*, *FASN* y *SCD*) y 9 (*DGAT1*) del apartado de Material y Métodos.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs seleccionados<sup>2</sup> de los genes relacionados con la dureza de la carne *CAPN1* y *CAST* para cada una de las razas y la población total se muestran en la Tabla 51. Todos los SNPs estudiados en esta población se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

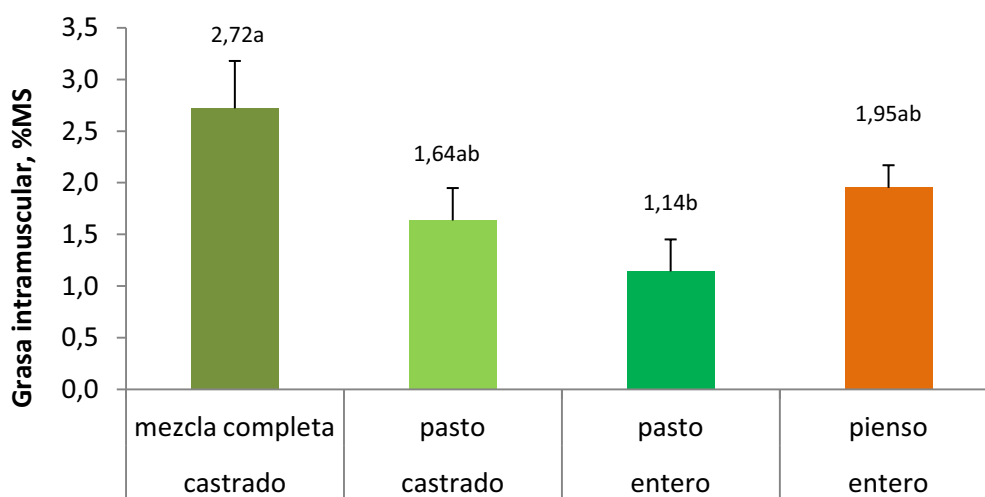
**Tabla 51.** Número de animales por genotipo y frecuencia alélica de los polimorfismos de los genes *CAPN1* y *CAST* en las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

SNP	Genotipo	n			Alelo	Frecuencia		
		Total	Parda	Pirenaica		Total	Parda	Pirenaica
<i>CAPN1_1</i>	GG	247	186	61	G	0,88	0,87	0,94
	CG	62	54	8				
	CC	6	6					
<i>CAPN1_2</i>	GG	119	107	12	G	0,61	0,64	0,61
	AG	142	98	44				
	AA	52	37	15				
<i>CAPN1_3</i>	TT	133	108	25	T	0,63	0,63	0,69
	CT	133	93	40				
	CC	50	44	6				
<i>CAST_2</i>	AA	140	117	23	A	0,65	0,68	0,71
	GA	133	102	31				
	GG	44	27	17				
<i>CAST_5</i>	AA	187	150	37	A	0,77	0,79	0,79
	GA	114	88	26				
	GG	16	8	8				

<sup>2</sup> La localización de los SNP en el genoma bovino está detallada en la Tabla 7 del apartado de Material y Métodos.

### 1.1. Efectos ambientales

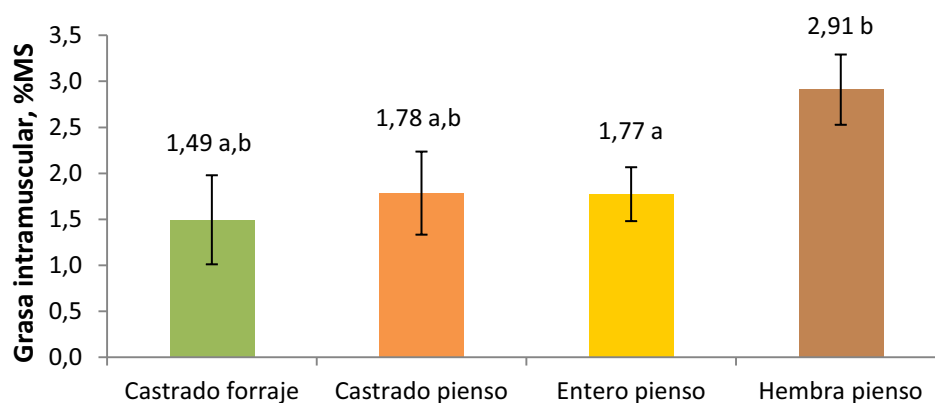
En ambas razas, el contenido de grasa intramuscular se vio afectado por la alimentación según el sexo del animal ( $P < 0,05$ ). En la raza Parda de Montaña, los cebones alimentados con una mezcla completa presentaron la mayor cantidad de grasa intramuscular, mientras que los terneros enteros alimentados con pienso la menor ( $P = 0,03$ ), presentando contenidos intermedios los cebones y terneros acabados en pastoreo (Figura 32). Los terneros enteros en pastoreo tendieron a presentar un menor contenido en grasa intramuscular que los terneros enteros alimentados con pienso ( $P = 0,06$  con corrección de Bonferroni). Los terneros alimentados con forraje suelen presentar menor contenido de grasa intramuscular o veteado que los alimentados con pienso (Muir *et al.*, 1998; Van Elswyk y McNeill, 2014) porque el pienso proporciona mayor energía neta y glucosa para la síntesis de grasa que los forrajes (Hocquette, 2010). La alimentación recibida puede producir diferencias en el contenido en grasa intramuscular, sin embargo si los animales son sacrificados con pesos similares, como en este estudio, es posible que esas diferencias no puedan ser detectadas (French *et al.*, 2000; Steen *et al.*, 2003)



**Figura 32.** Contenido en grasa intramuscular según la alimentación y el sexo en la raza Parda de Montaña. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con corrección de Bonferroni.

Los terneros castrados presentaron una mayor cantidad de grasa intramuscular numérica que los enteros en pasto, las diferencias no fueron significativas. Estudios previos sugieren que los terneros enteros presentan menor cantidad de grasa intramuscular que los castrados (Destefanis *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2013; Padre *et al.*, 2006). Sin embargo, las diferencias dependen de la edad a la castración y de la edad de sacrificio de los terneros (Marti *et al.*, 2013).

En la raza Pirenaica, las hembras alimentadas con pienso presentaron mayor contenido en grasa intramuscular que los machos enteros alimentados con pienso ( $P = 0,04$  con corrección de Bonferroni) (Figura 33). Como se ha demostrado en otros estudios, la carne de los machos tiene un contenido de grasa menor que la carne de las hembras (Daza *et al.*, 2014; Fiems *et al.*, 2003; Sharaf Eldin *et al.*, 2013). Al igual que en la raza Parda de Montaña, los terneros enteros y castrados presentaron similar contenido en grasa intramuscular y no se han encontrado diferencias en la cantidad de grasa intramuscular depositada entre los terneros alimentados con forraje o pienso.



**Figura 33.** Contenido en grasa intramuscular según la alimentación y el sexo en la raza Pirenaica. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Sin embargo, habría que tener en cuenta que la deposición de grasa intramuscular de estas dos razas puede ser demasiado baja para mostrar diferencias significativas debidas a la castración o la dieta, que sí son evidentes en razas que engrasan más. Además el peso y edad al sacrificio de los animales recogidos en este



estudio es inferior al encontrado generalmente en los estudios realizados en EE. UU. o países del norte de Europa.

### 1.2. Efecto de los SNPs de los genes *FASN*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC*, *CAPN1* y *CAST*.

El contenido de grasa intramuscular (GIM) no se asoció con ninguno de los SNPs estudiados de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y adipogénesis *FASN*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG* y *RORC* en ninguna de las dos razas estudiadas (Tabla 52). De manera similar, el contenido de grasa intramuscular tampoco se asoció con ninguno de los SNPs estudiados de los genes *CAPN1* y *CAST* en ninguna de las dos razas, con excepción del SNP *CAPN1\_3* en la raza Parda de Montaña ( $P < 0,05$ ). Esta falta de asociación, puede deberse a la poca cantidad de grasa intramuscular que presentan en general ambas razas, siendo la raza Pirenaica de madurez tardía (Piedrafita *et al.*, 2003), presentando un engrasamiento bajo-intermedio (Albertí *et al.*, 2008), y la Parda de Montaña de madurez intermedia (Piedrafita *et al.*, 2003). Además, el engrasamiento es escaso debido a una edad temprana de sacrificio en la que los animales presentan poco grado de infiltración grasa. Dada la similar respuesta en ambas razas, la discusión se ha realizado de manera conjunta en ambas razas.

La mayoría de trabajos que estudiaron la relación entre SNPs de *FASN* y el contenido de grasa intramuscular se han realizado en razas japonesas como la Wagyu y coreanas como la Hanwoo, dada la importancia económica que tiene la deposición de grasa intramuscular en estos mercados. Al igual que en la presente Tesis, no encontraron relación entre el contenido de grasa intramuscular y dos SNPs de *FASN* en ganado Hanwoo (Kim *et al.*, 2017), Wagyu con un elevado contenido en grasa intramuscular (GIM = 36%, Matsuhashi *et al.*, 2011), y en toros Fleckvieh (Bartoň *et al.*, 2016). Algunos de dichos estudios no presentan el contenido de grasa intramuscular promedio ni su variabilidad.

**Tabla 52.** Efecto de los SNPs de los genes *FASN*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC*, *CAPN1* y *CAST* sobre el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis* en la raza Parda de Montaña y Pirenaica<sup>1</sup>.

SNP	P-valor (SNP)	Parda de Montaña		P-valor	Pirenaica		
<i>FASN</i>	0,78	AA	AG	GG	AA	AG	GG
		1,90 ± 0,56	1,92 ± 0,27	2,03 ± 0,22	0,77	1,72 ± 0,46	1,95 ± 0,35
<i>DGAT1</i>	0,95	CC	TC	TT	CC	TC	TT
			2,04 ± 0,35	2,02 ± 0,22	0,93	1,88 ± 0,42	1,85 ± 0,31
<i>SCD1</i>	0,97	CC	TC	TT	CC	TC	TT
		2,01 ± 0,22	2,05 ± 0,25	2,05 ± 0,32	0,19	1,63 ± 0,29	2,12 ± 0,31
<i>LEP</i>	0,57	CC	CT	TT	CC	CT	TT
		1,90 ± 0,27	2,10 ± 0,24	2,01 ± 0,24	0,89	1,92 ± 0,37	1,78 ± 0,31
<i>TG</i>	0,50	CC	TC	TT	CC	TC	TT
		2,04 ± 0,23	1,91 ± 0,24	2,26 ± 0,38	0,26	1,67 ± 0,27	2,10 ± 0,31
<i>RORC</i>	0,23	GG	GT	TT	GG	GT	TT
		1,80 ± 0,35	1,87 ± 0,25	2,10 ± 0,23	0,96	1,79 ± 0,42	1,80 ± 0,31
<i>CAPN1_1</i>	0,07	CC	CG	GG	CC	CG	GG
		3,01 ± 0,48	2,06 ± 0,26	2,01 ± 0,22	0,80	1,72 ± 0,43	1,82 ± 0,26
<i>CAPN1_2</i>	0,08	AA	AG	GG	AA	AG	GG
		2,37 ± 0,27	1,98 ± 0,24	1,93 ± 0,24	0,90	1,93 ± 0,37	1,79 ± 0,31
<i>CAPN1_3</i>	0,03	CC	CT	TT	CC	CT	TT
		1,88 ± 0,26ab	1,82 ± 0,24b	2,2 ± 0,23a	0,51	1,66 ± 0,48	1,94 ± 0,29
<i>CAST_2</i>	0,98	AA	GA	GG	AA	GA	GG
		2,01 ± 0,24	2,03 ± 0,24	2,05 ± 0,29	0,46	2,03 ± 0,34	1,76 ± 0,32
<i>CAST_5</i>	0,52	AA	GA	GG	AA	GA	GG
		2,08 ± 0,23	1,92 ± 0,24	2,01 ± 0,41	0,63	1,90 ± 0,31	1,70 ± 0,32

<sup>1</sup>En una fila y raza, una letra diferente indica diferencias al P<0,05

Por contra, se encontró efecto de SNPs de *FASN* con el contenido de grasa intramuscular en varias razas de *Bos taurus*, *Bos indicus* y cruces, (GIM: 3,1 – 2%, Mazzuco *et al.*, 2016; GIM: 4,7%, Barendse, 2011), o el veteado en razas japonesas y coreanas, con un promedio del 5,3 – 5,4 sobre una escala de 1 a 9 (Lee *et al.*, 2014a; Oh *et al.*, 2012). Jeong *et al.* (2012) también encontraron una correlación positiva entre la abundancia de mRNA de *FASN* y el contenido de grasa intramuscular (GIM: 13,3%) en la raza Wagyu. En algunos de los estudios no presentan el contenido de grasa intramuscular, lo que complica dilucidar si existe una cantidad mínima necesaria de este depósito para poder encontrar efecto de los SNPs de *FASN*.

Al igual que en este estudio, no encontraron asociación del SNP de *DGAT1* y el contenido de grasa intramuscular en el *Longissimus thoracis* en animales cruzados de varias razas comerciales (Charolés, Hereford, Limusín, Simmental, Friesian y Holstein–Friesian) (GIM: 2,4 - 3,9%, Pannier *et al.*, 2010b), en animales de las razas Nelore, Angus x Nelore, Rubia Gallega x Nelore, Canchim y cruces de Brangus y Braunvieh (no hay dato de GIM, Curi *et al.*, 2011), y en animales cruzados de las razas Retinta, Charolés y Limusín (GIM: 1,7%, Avilés *et al.*, 2013b) o toros Fleckvieh (sin dato de GIM, Bartoň *et al.*, 2016). Sin embargo, en toros Angus se encontró relación entre el SNP de *DGAT1* y el contenido de grasa intramuscular tanto en el músculo *Longissimus dorsi* (GIM (AA): 18,1% y GIM (GC): 12,9%) como en el *Semitendinosus* (GIM (AA): 12,1 y GIM (GC): 9,0%; Anton *et al.*, 2011). De manera similar, Thaller *et al.* (2003) encontraron efecto del SNP de *DGAT1* sobre este depósito en el músculo *Semitendinosus* en la raza Holstein (GIM: 2,65%) y Charolés (GIM: 1,8%), y en el músculo *Longissimus dorsi* en la raza Charolés (GIM: 3,2%) pero no la raza Holstein (GIM: 5,8%). Otros estudios en los que se incluyen animales de distintas razas encuentran efecto de varios SNPs de *DGAT1* (GIM: 2,7 - 3%, Li *et al.*, 2013; GIM: 7%, Wu *et al.*, 2012; veteado: 1,12 – 2,16 (escala 1 - 5) Yuan *et al.*, 2013). Dichos estudios incluyen el efecto de la raza en el modelo pero no analizan por separado las distintas razas. Por otro lado, en el presente estudio el bajo número de animales con el genotipo AA/AA pudo afectar a la falta de asociación detectada, tal y como mostraron Avilés *et al.* (2013b) en otras poblaciones españolas.

La ausencia de efecto del polimorfismo del gen *SCD* ya se ha mostrado en animales cruzados de las razas Retinta, Charolés y Limusín (Avilés *et al.*, 2013b), animales cruzados de Angus, Charolés, Hereford (Li *et al.*, 2013), Brangus (GIM: 2,5%, Baeza *et al.*, 2013), o Limusín y Angus en el músculo *Semimembranosus* (GIM: 1%, Ward *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores encontraron el efecto del SNP del gen *SCD* en animales cruzados de razas irlandesas en el músculo *Longissimus thoracis* (GIM; 2,7%, Reardon *et al.*, 2010), o en raza Simmental China (Wu *et al.*, 2012). También se ha encontrado relación entre el SNP de *SCD* y el veteado (5,4 en escala 1 - 9) en la raza Hanwoo (Oh *et al.*, 2011).

Confirmando la ausencia de asociación entre el SNP de *LEP* y el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus thoracis*, en otros estudios tampoco se encontró asociación en varias poblaciones animales de cruces comerciales (GIM: 1,7%, Avilés *et al.*, 2013b; GIM: 2,3%, Pannier *et al.*, 2009; GIM: 4%, Schenkel *et al.*, 2005). Tampoco se encontró efecto del SNP estudiado rs29004488 del gen *LEP* en el músculo *Longissimus thoracis* en animales Simmental (GIM: 4,7% , Orrú *et al.*, 2011). Sin embargo, existió efecto del SNP de *LEP* en varias razas de *Bos taurus*, *Bos indicus* y cruces (GIM: 3,1 - 2%, Mazzucco *et al.*, 2016) y en toros Angus en el músculo *Semitendinosus* (GIM: 8 - 12%), aunque no se encontró efecto en el *Longissimus dorsi* (GIM: 14,4 - 15,5%, Anton *et al.*, 2011).

Al igual que en los resultados obtenidos en la presente Tesis, tampoco se encontró asociación entre el contenido de grasa intramuscular y el SNP del gen *TG* en poblaciones con animales cruzados (GIM: 1,8 - 2,4%, Pannier *et al.*, 2010b), de origen europeo o asiático (Zhang *et al.*, 2015), o Simmental (GIM: 2 - 11%, Rincker *et al.*, 2006). Como en el caso de la *DGAT1*, el desequilibrio en el porcentaje de animales con diferentes genotipos del gen *TG* también puede haber influido en esta falta de asociación, ya que el genotipo TT se encuentra en una baja proporción en las poblaciones estudiadas. En este sentido, el genotipo TT se ha asociado a un mayor veteado o deposición de grasa intramuscular de la carne (Anton *et al.*, 2011; Barendse *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2011; Thaller *et al.*, 2003) estando

en muy baja proporción en las poblaciones analizadas (Casas *et al.*, 2007). Sin embargo, es posible que dicho efecto se de en unas razas y no en otras, dado que tanto Barendse *et al.* (2004) como Thaller *et al.* (2003) mostraron que el efecto del SNP de *TG* sobre el contenido de grasa o veteado era dependiente de la raza. Además, parece que la duración del cebo también afecta al efecto del SNP de *TG* sobre el contenido de la grasa intramuscular (Rincker *et al.*, 2006).

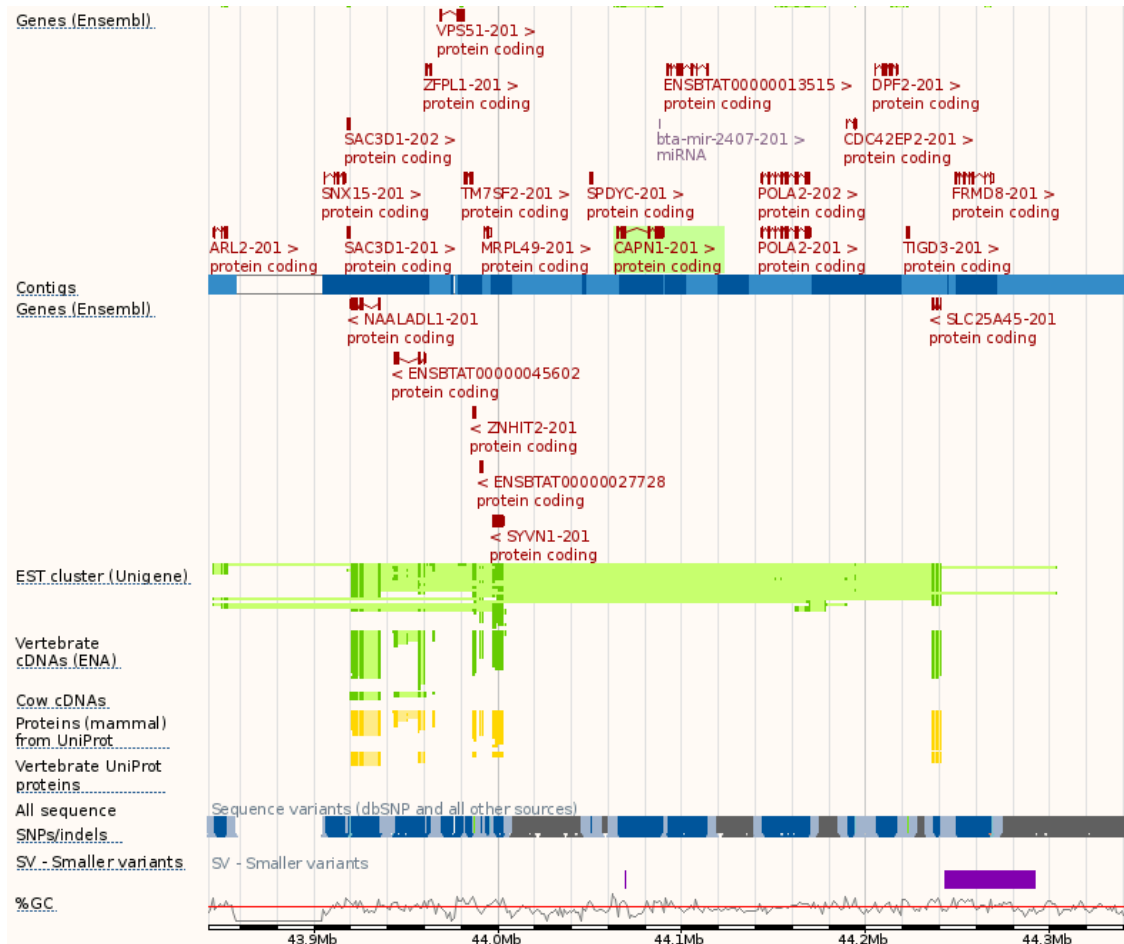
Del mismo modo, aunque el alelo T del gen *RORC* se ha asociado a un incremento del veteado de la carne (Avilés *et al.*, 2013b; Barendse *et al.*, 2010; Barendse *et al.*, 2007a) no encontramos asociación en nuestras poblaciones, posiblemente debido al bajo número de animales TT. En este sentido los animales TT presentaron un mayor contenido de grasa intramuscular en Parda de Montaña. Barendse *et al.* (2010) sí encontraron asociaciones con el veteado de la carne en Brahman, Angus y en la población total (que incluía además animales de la raza Hereford), únicamente encontraron esta asociación con el contenido de grasa intramuscular en la raza Angus, no en la Hereford ni Brahman, y también considerando las tres razas conjuntamente.

Tal y como se ha nombrado anteriormente, sólo el gen *CAPN1* resultó asociado en la población de Parda de Montaña en la presente Tesis. En este estudio, los animales de la raza Parda de Montaña con el genotipo CT del SNP *CAPN1\_3* (n = 93) presentan un menor contenido de grasa intramuscular que los que tienen el genotipo TT (n = 108) ( $P = 0,03$ ). De manera similar, en la raza Charolesa este marcador se asoció al contenido de grasa intramuscular (GIM: 2,63%, Muñoz Mejía *et al.*, 2012). Sin embargo, no se encontró esta asociación en la raza Nellore y en varios cruces de esta raza (GIM: 1,5%, Curi *et al.*, 2010) .

En la presente Tesis, los SNPs *CAPN1\_1* ( $P = 0,06$ ) y *CAPN\_2* ( $P = 0,08$ ) tendieron a afectar al contenido de grasa intramuscular en los animales de la raza Parda de Montaña. En el SNP *CAPN1\_1*, el genotipo CC (n = 6) presenta un contenido en grasa intramuscular superior en 30-33% que los animales con el genotipo CT ( $P = 0,09$ ) y TT ( $P = 0,06$ ). Este resultado debe tomarse con cautela para el SNP *CAPN1\_1* debido al

bajo número de animales con el genotipo CC. Barendse (2011) señaló el gen *CAPN1* como un posible gen que podía ser asociado al contenido de grasa intramuscular. El polimorfismo *CAPN1\_1*, no fue asociado al contenido de grasa intramuscular en razas Mejicanas (Bonilla *et al.*, 2010), pero sí se encontró una asociación con el contenido de grasa intramuscular y veteado en las razas Angus, Charolés, Hereford, Limusín y Simmental (Li *et al.*, 2013). Casas *et al.* (2005) no encontraron efecto del SNP *CAPN1\_1* sobre el veteado (324, en una escala de 200 a 499) en la raza Brahman. En el SNP *CAPN1\_2*, los animales con genotipo AA (n = 37) presentaron un contenido en grasa intramuscular un 19% más que los animales con el genotipo AG ( $P = 0,16$ ) y GG ( $P = 0,08$ ). Lee *et al.* (2014b) estudió los SNPs *CAPN1\_1*, *CAPN1\_2* y otros 2 polimorfismos más del mismo gen en la raza Hanwoo no encontrando asociación (GIM; 6,9%). Finalmente, Cheong *et al.* (2008b) asociaron el veteado de la carne con un SNP en la región 3'UTR del gen *CAPN1* en razas coreanas.

Aunque esta asociación también podría ser espuria, la existencia de asociaciones del gen *CAPN1* con el contenido de grasa intramuscular o veteado de la carne en otras razas nos hace pensar que existe algún mecanismo mediante el cual el gen influye en el contenido de grasa intramuscular o bien este SNP podría estar en desequilibrio de ligamiento con el gen responsable del efecto sobre el contenido de grasa intramuscular. No obstante, en la región genómica donde se localiza el gen no existen genes con una función relacionada sobre el contenido de grasa intramuscular que nos pueda sugerir la posible implicación de algún gen ligado a *CAPN1* (Figura 34). Tampoco están claros los mecanismos por los que el gen *CAPN1* podría influir en el contenido de grasa intramuscular.



**Figura 34.** Localización del gen *CAPN1* en el genoma bovino versión UMD3.1.

Con respecto al efecto del gen *CAST* sobre el contenido en grasa intramuscular, en esta Tesis no se ha encontrado ningún efecto de los SNPs evaluados, confirmando los estudios previos en bovino. Li *et al.* (2013) no encontraron asociación entre el polimorfismo NM\_174003.2: c.155C>T descrito por Barendse *et al.* (2007b) y el veteado de la carne en la raza Angus, Charolés, Hereford, Limusín y Simmental en el músculo *Longissimus thoracis*. Tampoco se ha encontrado asociación de este mismo SNP con el contenido de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus lumborum et thoracis* en una población de animales cruzados (Flekvieh, Charolés, Simmental, Galoway y Rubia de Aquitania) (Kaplanová *et al.*, 2013), ni en el músculo *Longissimus dorsi* con el SNP *CAST\_1* (Curi *et al.*, 2010) ni con el SNP *CAST\_5* (Curi *et al.*, 2009) en

animales de las razas Nelore, Angus x Nelore, Rubia Gallega x Nelore, Canchim y cruces de Brangus y Braunvieh.

Los resultados encontrados en el presente trabajo hacen necesario el incremento del número de animales en las poblaciones de estudio para validar los resultados encontrados (Barendse *et al.*, 2010), e incrementar el número de genotipos en baja frecuencia ya que en muchos de los SNPs analizados algunos genotipos se encontraban en muy baja proporción.



## Discusión general



Los consumidores son cada vez más conscientes de la importancia de la calidad de los alimentos que compran y de su relación con la salud, exigiendo un producto sano y de calidad constante. La satisfacción de los consumidores de carne de vacuno está basada en la palatabilidad, es decir, en la combinación de sabor, jugosidad y ternura. Los consumidores confieren a la ternura de la carne un papel primordial en la calidad de dicha carne. Por lo tanto, debido a la importancia concedida por los consumidores y a su elevada variabilidad se decidió proceder a su estudio en dos razas autóctonas de Aragón, Parda de Montaña y Pirenaica. Por otro lado, la grasa intramuscular contribuye entre un 10 y un 15% a la variación de la palatabilidad (Dikeman, 1987), la cual puede verse comprometida si el contenido de grasa es menor al 3%, pero mejora cuando los niveles de grasa intramuscular aumentan del 3% al 6% (Savell y Cross, 1988). Se ha sugerido que el contenido de grasa intramuscular tiene un efecto indirecto en la dureza de la carne, reduciéndola, debido a que el depósito de grasa entre las fibras musculares desorganiza la estructura intramuscular del tejido conectivo (Jeremiah *et al.*, 2003). En estudios previos se encontró correlación genética entre la dureza de la carne y la grasa intramuscular en la raza Angus ( $r = -0,47$ ; Mateescu *et al.*, 2014). Por lo tanto, se decidió incluir en la Tesis doctoral el estudio de la grasa intramuscular. En el caso de la presente Tesis, la correlación entre la dureza de la carne y el contenido de la grasa intramuscular fue muy bajo ( $r = -0,18$ ;  $P = 0,0016$ ). Así mismo, en otros estudios no se detectó una relación clara entre la dureza y el contenido de grasa intramuscular (Razminowicz *et al.*, 2006). Parece ser que este proceso podría darse sólo en músculos con un alto grado de engrasamiento (Nishimura *et al.*, 1999). En este sentido, es remarcable que las razas estudiadas en esta Tesis presentan poca cantidad de grasa intramuscular, siendo la raza Pirenaica de madurez tardía con un engrasamiento bajo-intermedio (Albertí *et al.*, 2008), y la Parda de Montaña de madurez intermedia (Piedrafita *et al.*, 2003). Por otra parte, los animales fueron sacrificados a una edad temprana en la que presentan poco grado de infiltración grasa.

Los análisis estadísticos realizados en la presente Tesis doctoral se han realizado para las dos razas por separado. Diversos estudios que encuentran efecto de

polimorfismos de los genes *CAPN1* y *CAST* sobre la dureza de la carne analizan conjuntamente animales de varias razas sin tener en cuenta el efecto de la raza. De esta manera, se aumenta el número de animales de la población para aumentar la probabilidad de encontrar diferencias significativas. Sin embargo, este efecto racial puede modificar la respuesta de los genes estudiados sobre los fenotipos en cuestión, dependiendo de la arquitectura de genes que influyen sobre el carácter en cada raza. Pueden existir, además, efectos epistáticos entre genes. Por otra parte, se ha confirmado, en este y en otros estudios, que la asociación de cada SNP a la dureza de la carne está ligada a la raza, lo que implica que este efecto debe evaluarse en cada una de las razas por separado (Allais *et al.*, 2011). El número de animales necesario para encontrar diferencias significativas en estos estudios es elevado (Barendse *et al.*, 2010) por lo que se recomienda realizar estudios de potencia de análisis para estimar el número de animales necesario para cada experiencia. Sin embargo, para ello sería necesario conocer *a priori* las frecuencias alélicas de los polimorfismos de la población a estudiar y la variabilidad del carácter, y en nuestro estudio no se disponía de estos datos antes de comenzar la presente Tesis. Sería recomendable seguir ampliando la base de datos creada hasta el momento pero resultaba inabordable la ampliación en el marco de la presente Tesis.

La dureza de la carne se ha visto afectada por el sexo, la alimentación y el tiempo de maduración de la carne. Sin embargo, por estar desequilibrados los datos en estos factores ha resultado complicado obtener resultados concluyentes, por lo que hubiera sido más recomendable partir de una base de datos más homogénea en estos factores.

Es destacable que no se hayan encontrado efectos de ningún polimorfismo del gen *CAPN1* sobre la dureza de la carne contradiciendo diversos estudios en otras razas (Curi *et al.*, 2009; Dunner *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2010; White *et al.*, 2005). Sin embargo, sí se encontró una tendencia en el SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) en la raza Pirenaica ( $P = 0,06$ ), aunque dicha población no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sería recomendable seguir ampliando la base de datos para tener mayor número de animales de los genotipos menos

frecuentes y poder confirmar que no existe efecto en las razas Parda de Montaña y Pirenaica.

En la presente Tesis doctoral se ha estudiado de manera detallada el gen *CAST*. Se ha confirmado en carne con maduración intermedia el efecto de SNPs previamente descritos en otras razas como son el rs110955059 (*CAST\_1*) (Schenkel *et al.*, 2006) en la raza Parda de Montaña y el rs109221039 (*CAST\_5*) (Barendse, 2002) en la raza Pirenaica. En la presente Tesis se ha asociado por primera vez el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) a la dureza de la carne en la raza Parda de Montaña (Calvo *et al.*, 2012; Calvo *et al.*, 2014). En la raza Pirenaica no se ha podido confirmar dicho efecto probablemente por el desequilibrio de genotipos y menor número de animales. El SNP rs110955059 (*CAST\_1*) no parece ser la mutación causal del efecto detectado en Parda de Montaña ya que está localizada en región intrónica, indicando que el polimorfismo SNP rs210072660 (*CAST\_2*) sería la mutación causal del efecto encontrado en esta raza. En este sentido, ambos SNPs presentan una correlación genética alta (0,756) indicando un alto desequilibrio de ligamiento. Además, el efecto del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) ha sido confirmado en animales Nellore x Angus en carne madurada durante 7 días (Enriquez-Valencia *et al.*, 2017). Sería interesante estudiar el efecto de este SNP sobre la dureza de la carne en otras razas. Además, sería recomendable ampliar la base de datos de las muestras maduras a mayor tiempo, para poder confirmar o descartar el efecto del SNP sobre la dureza de la carne a maduraciones largas. De esta forma, se podría adaptar el manejo de la carne tras el sacrificio, alargando o acortando las maduraciones para poder garantizar que la carne comercializada tiene una ternera elevada y constante y poder fidelizar al consumidor. En este sentido, en esta Tesis se ha puesto a punto una prueba rápida mediante discriminación alélica por qPCR para disminuir el tiempo en el diagnóstico y poder separar canales de animales en el matadero tras el sacrificio, siguiendo un circuito diferente de maduración. Es destacable, la posible utilización de este marcador en otras razas para llevar a cabo selección asistida por marcadores, ya que el genotipo GG se ha encontrado en todos los grupos raciales analizados, aunque

habría que validar el efecto de este polimorfismo en estas razas previo a su uso en los diferentes esquemas de selección.

El efecto de este SNP sobre la dureza de la carne debe de ser validado mediante pruebas funcionales como podría ser el estudio de la actividad inhibidora de la proteólisis en músculo de animales con los genotipos alternativos en la posición Thr182Ala de la calpastatina (CAST).

Los resultados obtenidos sobre la asociación entre el SNP rs210072660 (CAST\_2) y la dureza de la carne ha sido patentada en el “Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno” (Calvo *et al.*, 2012). Es destacable que esta patente está siendo explotada por la Asociación de criadores de raza bovina Parda de Montaña (ARAPARDA) para la mejora del carácter dureza en el programa de selección de la raza Parda de Montaña junto con otros caracteres.

En nuestro estudio, también resultó significativo el SNP rs109221039 (CAST\_5) (Barendse, 2002) en la raza Pirenaica. Hasta el momento, no se habían realizado estudios sobre el efecto funcional de este polimorfismo a pesar del elevado número de trabajos que habían asociado este SNP a la dureza de la carne. Estudios *in silico* mostraron que este polimorfismo y otros localizados en la región 3'UTR del gen CAST pueden afectar a sitios de unión de microRNAs. Por este motivo, se extendió el análisis de asociación a una región más amplia de la región 3'UTR, encontrando los SNPs rs109221039 (CAST\_5), rs210861835 (CAST\_7) y rs110607241 (CAST\_12) asociados a la dureza de la carne en la raza Pirenaica pero no en la Parda de Montaña. Se llevaron a cabo pruebas funcionales de la región 3'UTR del gen donde se localizan estos polimorfismos. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la actividad luciferasa entre los diferentes haplotipos estudiados, aunque sí se demostró la funcionalidad de la zona estudiada. Es posible que las condiciones en las que se ha realizado el estudio de la actividad luciferasa de los diferentes haplotipos (tipo de cultivo celular, medio de cultivo, momento en el que se realiza la diferenciación celular, aditivos en el medio de cultivo, etc.) no sean las adecuadas para que se modifique la funcionalidad del gen. También podría influir en la falta de efecto encontrado la existencia de tres señales de poliadenilación en la

región 3'UTR, que podrían producir un acortamiento en la longitud del mRNA, una disminución de los posibles sitios de unión de miRNAs (Nattrass *et al.*, 2014) y alguna alteración en la traducción de la proteína (Di Giammartino *et al.*, 2011). Finalmente, también podría ser que el SNP responsable del efecto fenotípico encontrado esté en desequilibrio de ligamiento con los SNPs aquí descritos. En este sentido, Allais *et al.* (2011), describieron un SNP asociado al carácter dureza de la carne del músculo *Longissimus thoracis*, situado a 1045 pb en dirección 3' del extremo de la zona clonada para este estudio. Este SNP no se ha estudiado en el presente trabajo.

Finalmente, se estudió la región promotora del gen *CAST*, encontrando 36 polimorfismos, 9 de los cuales se han aislado por primera vez en este estudio. Sin embargo, ha sido inabordable estudiar su asociación con la dureza de la carne en el marco de la Tesis doctoral. Por lo tanto, son recomendables estudios futuros en esta región, mediante el genotipado de los polimorfismos encontrados y el estudio de asociación con el carácter dureza de la carne. Se llevó a cabo un estudio de asociación entre un microsatélite localizado en el promotor y la dureza de la carne, se encontró el alelo 129 del microsatélite rs479041025 asociado a la dureza de la carne. Los resultados fueron similares a los encontrados para el SNP rs210072660 (*CAST\_2*), siendo 43 animales homocigotos para los alelos G y 129 (n = 50). Estos resultados sugieren que ambos marcadores podrían estar detectando el mismo efecto. No se ha podido separar el efecto del alelo 129 del microsatélite del alelo G del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) mediante los estudios haplotípicos, ya que presentan un alto desequilibrio de ligamiento entre ambos ( $D' = 0,85$ ). De esta manera, no podemos descartar que el efecto detectado sea debido a alguno de los polimorfismos encontrados en el promotor y no al SNP rs210072660 (*CAST\_2*). Todo ello, nos lleva a plantearnos futuros estudios en los que se podrían evaluar la posible relación entre los polimorfismos encontrados, tanto en el promotor, exón 7 como en la región 3'UTR del gen *CAST*, con la expresión del gen y la funcionalidad de estas regiones. Debido a que las regiones promotoras de los transcritos I y II del gen son ricas en islas CpG no podemos descartar el efecto de la posible metilación de la región promotora. También, podría ser interesante el estudio de los posibles transcritos del gen *CAST*

debido a la posible poliadenilación alternativa de la región 3'UTR o la posible unión de miRNAs a la región 3'UTR ampliando la región estudiada.

A pesar de no encontrar efecto de los polimorfismos estudiados del gen *CAPN1* en la dureza de la carne sí que se ha observado que el SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) afecta al contenido de grasa intramuscular. Aunque no se conoce cómo puede influir este gen en el contenido de grasa intramuscular, la existencia de asociaciones del gen *CAPN1* con el contenido de grasa intramuscular o veteado de la carne en otras razas nos hace pensar que existe algún mecanismo mediante el cual el gen influye en el contenido de grasa intramuscular o bien este SNP podría estar en desequilibrio de ligamiento con el gen responsable del efecto sobre el contenido de grasa intramuscular. Sin embargo, no se ha encontrado asociación del contenido de grasa intramuscular con ninguno de los polimorfismos estudiados de los genes *FASN*, *FABP4*, *DGAT1*, *SCD*, *LEP*, *TG*, *RORC* y *CAST*. Esto puede ser debido a que las razas estudiadas en la presente Tesis doctoral, Parda de Montaña y Pirenaica, son razas con poco engrasamiento (Piedrafita *et al.*, 2003) o por la baja frecuencia de algunos de los genotipos de alguno de los polimorfismos. Sería, por lo tanto, interesante buscar otros SNPs de otros genes y aumentar la población a estudiar para intentar encontrar asociaciones con el contenido de grasa intramuscular.



## Conclusiones



1. La dureza de la carne se ha visto afectada por el sexo, la alimentación y el tiempo de maduración de la carne en los animales de las razas Parda de Montaña y Pirenaica.
2. El esfuerzo disminuyó entre la maduración corta y media, y media y larga para todos los tratamientos, excepto en los terneros alimentados con forraje entre la maduración corta y media en los animales de la raza Parda de Montaña. Este efecto sólo se observó entre las maduraciones corta y media en la raza Pirenaica, desapareciendo entre las maduraciones media y larga. En general, los animales alimentados con forraje o en pastoreo presentaron carnes más duras.
3. No se han encontrado efectos sobre la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* en ninguno de los tres polimorfismos estudiados en el gen *CAPN1* en las razas Parda de Montaña y Pirenaica, aunque sí se encontró una tendencia para el SNP rs17872000 (*CAPN1\_3*) en la raza Pirenaica. Este efecto fue similar al encontrado en la bibliografía, en el que el genotipo CT presentó una carne más blanda que el genotipo TT.
4. En el gen *CAST* se confirmó el efecto descrito por Schenkel *et al.* (2006) en el SNP rs110955059 (*CAST\_1*), mostrando el genotipo GG una carne más dura que los otros genotipos a un tiempo de maduración intermedio en la raza Parda de Montaña.
5. El SNP rs210072660 (*CAST\_2*) del gen *CAST* se ha asociado, por primera vez, a la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* en la raza Parda de Montaña. En la maduración intermedia el genotipo GG presentó una dureza superior a los genotipos AG y AA. Los estudios de asociación haplotípica confirmaron estos resultados. Esta variante génica se localiza en el exón 7 y causa una sustitución no conservativa en la secuencia aminoacídica (NM\_174003: p.Thr182Ala) en el dominio L de la proteína, que podría afectar a la estabilidad del complejo calpaína-calpastatina influyendo en la concentración celular de calpaína libre. En la raza Pirenaica no se ha podido

## Conclusiones

confirmar dicho efecto probablemente por el desequilibrio de genotipos y menor número de animales.

6. El SNP rs109221039 (*CAST\_5*) del gen *CAST* descrito por Barendse (2002) se ha asociado a la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* en la raza Pirenaica en maduraciones medias y largas. Los genotipos AA y GA mostraron valores menores para el carácter dureza que el genotipo GG.
7. El estudio de un fragmento de la región 3'UTR del gen *CAST* (de 375 pb) reveló la presencia de 11 SNPs, 8 de los cuales pueden modificar posibles sitios de unión de miRNAs. Los polimorfismos rs109221039 (*CAST\_5*), rs210861835 (*CAST\_7*) y rs110607241 (*CAST\_12*) de la región 3'UTR del gen *CAST*, que presentan un alto desequilibrio de ligamiento, se asociaron a la dureza de la carne en el músculo *Longissimus thoracis* en la raza Pirenaica.
8. El estudio de la funcionalidad de esta región 3'UTR del gen *CAST* mediante la actividad luciferasa no mostró diferencias entre los 4 haplotipos estudiados, sin embargo, la actividad de los 4 haplotipos fue un 30% inferior que la emitida por las células transfectadas con el vector pmirGlo vacío, lo que hace pensar que la región 3'UTR del gen *CAST* es una zona activa.
9. Se aislaron 36 polimorfismos a partir de la secuenciación de las regiones promotoras y región 5' proximal de los transcritos I, II y III del gen *CAST*, algunos de los cuales podían afectar a la unión de factores de transcripción según el análisis *in silico* realizado.
10. Los estudios de asociación del microsatélite (CA) rs479041025 localizado en el promotor I del gen *CAST*, y que presentó 15 alelos, mostraron que el alelo 129 estaba asociado a la dureza de la carne en Parda de Montaña a tiempos de maduración intermedia, resultando significativa la comparación de 2 copias frente a 0 copias del alelo 129. El microsatélite y el SNP rs210072660 (*CAST\_2*) presentaron un alto desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,85$ ), observándose efectos muy similares en cuanto a la dureza de la carne por el alelo 129 del microsatélite y el SNP rs210072660 (*CAST\_2*). No se ha podido

separar el efecto del alelo 129 del microsatélite del alelo G del SNP rs210072660 (*CAST\_2*) mediante los estudios haplotípicos, sugiriendo que estos marcadores podrían estar detectando el mismo efecto. De esta forma, no se puede descartar el posible efecto de SNPs en la región promotora del gen que estén afectando a la dureza de la carne o que el efecto detectado por el alelo 129 del microsatélite sea debido al SNP rs210072660 (*CAST\_2*).

11. El contenido de grasa intramuscular de la carne se ha visto afectada por el sexo y la alimentación en los animales de las razas Parda de Montaña y Pirenaica. En general los animales en pastoreo o alimentados con forraje presentaron menor contenido de grasa intramuscular.
12. Los animales con genotipo CT del SNP rs17872050 (*CAPN1\_3*) del gen *CAPN1* presentaron un menor contenido de grasa intramuscular que los animales que tienen el genotipo TT en los animales de la raza Parda de Montaña. El efecto por el cual el gen *CAPN1* influye en el contenido de grasa intramuscular no está claro.
13. Los SNPs estudiados de los genes *sintasa de los ácidos grasos (FASN)*, *proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4)*, *acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1)*, *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, *leptina (LEP)*, *tiroglobulina (TG)*, *receptor huérfano asociado a RAR-γ (RORC)*, *calpaína (CAPN1; SNPs rs17872000 (CAPN1\_1) y rs17871051 (CAPN1\_2))* y *calpastatina (CAST)* no presentaron asociación con el contenido de la grasa intramuscular. Esto puede ser debido a que las razas estudiadas en la presente Tesis doctoral, Parda de Montaña y Pirenaica, son razas con poco engrasamiento y sacrificadas a edades tempranas o por la baja frecuencia de algunos de los genotipos de alguno de los polimorfismos.



## Referencias bibliográficas





- Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Misumi, S., Nade, T., Nakajima, H., Shoji, N., Kobayashi, M. y Kobayashi, E. 2009. Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochemical genetics* 47: 397-411.
- Ailhaud, G., Grimaldi, P. y Négre, R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual review of nutrition* 12: 207-233.
- Albertí, P., Panea, B., Sañudo, C., Olleta, J. L., Ripoll, G., Ertbjerg, P., Christensen, M., Gigli, S., Failla, S., Concetti, S., Hocquette, J. F., Jailler, R., Rudel, S., Renand, G., Nute, G. R., Richardson, R. I. y Williams, J. L. 2008. Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livestock Science* 114: 19-30.
- Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C. y Renand, G. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science* 89: 1-11.
- Allen, R. E. y Goll, D. E. 2003. Cellular and developmental biology of skeletal muscle as related to muscle growth. In: C. G. Scanes (ed.) *Biology of Growth of Domestic Animals*, Iowa: Wiley - Blackwell .
- Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F. y Therkildsen, M. 2005. Feeding and meat quality - A future approach. *Meat Science* 70: 543-554.
- Anton, I., Kovács, K., Holló, G., Farkas, V., Lehel, L., Hajda, Z. y Zsolnai, a. 2011. Effect of leptin, DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat of Angus cattle in Hungary. *Livestock Science* 135: 300-303.
- Archile-Contreras, A., Mandell, I. y Purslow, P. 2010. Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. *Meat Science* 86: 491-497.
- Avilés, C., Juárez, M., Peña, F., Domenech, V., Clemente, I. y Molina, A. 2013a. Association of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 and CAST genes with beef tenderness from Spanish commercial feedlots. *Czech Journal of Animal Science* 58: 479-487.
- Avilés, C., Peña, F., Polvillo, O., Barahona, M., Campo, M. M., Sañudo, C., Juárez, M., Horcada, a., Alcalde, M. J. y Molina, a. 2015. Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively-fed beef. *Meat Science* 107: 33-38.
- Avilés, C., Polvillo, O., Peña, F., Juárez, M., Martínez, a. L. y Molina, a. 2013b. Associations between DGAT1, FABP4, LEP, RORC, and SCD1 gene polymorphisms and fat deposition in Spanish commercial beef. *Journal of Animal Science* 91: 4571-4577.
- Baeza, M., Corva, P., Soria, L., Pavan, E., Rincon, G. y Medrano, J. 2013. Genetic variants in a lipid regulatory pathway as potential tools for improving the nutritional quality of grass-fed beef. *Animal Genetics* 44: 121-129.
- Barendse, W. 1999. Assessing Lipid Metabolism. International Patent Application WO9923248 US6383751(PCT/ AU98/00882).
- Barendse, W. 2002. DNA markers for meat tenderness No. WO 02/064820 A1.

## Referencias Bibliográficas

- Barendse, W. 2011. Haplotype analysis improved evidence for candidate genes for intramuscular fat percentage from a genome wide association study of cattle. *PLoS ONE* 6: e29601.
- Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., Armitage, S., Baud, S. y Donaldson, N. 2004. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 669-674.
- Barendse, W., Bunch, R. J. y Harrison, B. E. 2010. The effect of variation at the retinoic acid receptor-related orphan receptor C gene on intramuscular fat percent and marbling score in Australian cattle. *Journal of Animal Science* 88: 47-51.
- Barendse, W., Bunch, R. J., Kijas, J. W. y Thomas, M. B. 2007a. The effect of genetic variation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor C gene on fatness in cattle. *Genetics* 175: 843-853.
- Barendse, W., Harrison, B. E., Hawken, R. J., Ferguson, D. M., Thompson, J. M., Thomas, M. B. y Bunch, R. J. 2007b. Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics* 176: 2601-2610.
- Barnier, V. M. H. 1995. Determinants and predictors of beef tenderness., University of Utrecht, The Netherlands.
- Bartoň, L., Bureš, D., Kott, T. y Řehák, D. 2016. Associations of polymorphisms in bovine DGAT1, FABP4, FASN, and PPARGC1A genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science* 114: 18-23.
- Bauchart, D., Gruffat, D. y Durand, D. 1996. Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 55: 39-47.
- Bennett, L., Hammond, A., Williams, M., Kunkle, W., Johnson, D., Preston, R. y Miller, M. 1995. Performance, carcass yield, and carcass quality characteristics of steers finished on rhizoma peanut (*Arachis glabrata*)-tropical grass pasture or concentrate. *Journal of Animal Science* 73: 1881-1887.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. y Hocquette, J.-F. 2007a. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5229-5237.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. y Hocquette, J. F. 2007b. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5229-5237.
- Bernués, A., Olaizola, A. y Corcoran, K. 2003. Extrinsic attributes of red meat as indicators of quality in Europe: an application for market segmentation. *Food quality and preference* 14: 265-276.
- Bjarnadóttir, S. a. G. n., Hollung, K., Færgestad, E. M. y Veiseth-Kent, E. 2010. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7408-7414.
- Bjarnadóttir, S. G., Hollung, K., Høy, M. y Veiseth-Kent, E. 2011. Proteome changes in the insoluble protein fraction of bovine Longissimus dorsi muscle as a result of low-voltage electrical stimulation. *Meat Science* 89: 143-149.

- Blanco, M., Casasús, I., Ripoll, G., Panea, B., Albertí, P. y Joy, M. 2010. Lucerne grazing compared with concentrate-feeding slightly modifies carcass and meat quality of young bulls. *Meat Science* 84: 545-552.
- Blanco, M., Jurie, C., Micol, D., Agabriel, J., Picard, B. y Garcia-Launay, F. 2013. Impact of animal and management factors on collagen characteristics in beef: a meta-analysis approach. *Animal* 7: 1208-1218.
- Boccard, R., Dumont, B. y Schmitt, O. 1995. Note sur les relations entre la dureté de la viande et les principales caractéristiques du tissu conjonctif. *Viandes et produits carnés* 16: 175-180.
- Boccard, R., Naude, R., Cronje, D., Smit, M. C., Venter, H. y Rossouw, E. J. 1979. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Science* 3: 261-280.
- Boleman, S., Boleman, S., Miller, R., Taylor, J., Cross, H., Wheeler, T., Koohmaraie, M., Shackelford, S., Miller, M. y West, R. 1997. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal Of Animal Science* 75: 1521-1524.
- Bonilla, C., Rubio, M., Sifuentes, A., Parra-Bracamonte, G. M., Arellano, V., Méndez, M., Berruecos, J. y Ortiz, R. 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genetics and Molecular Research* 9: 2395-2405.
- Bowker, B. C., Fahrenholz, T. M., Sarnoski, P. J. y Solomon, M. B. 2012. Alterations in the sarcoplasmic protein fraction of beef muscle with postmortem aging and hydrodynamic pressure processing. *Journal of Food Science* 77: C594-C602.
- Bowling, R., Smith, G., Carpenter, Z., Dutson, T. y Oliver, W. 1977. Comparison of forage-finished and grain-finished beef carcasses. *Journal of Animal Science* 45: 209-215.
- Brandstetter, A. M., Picard, B. y Geay, Y. 1998. Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle: II. Effect of castration and feeding level. *Livestock Production Science* 53: 25-36.
- Bratcher, C., Johnson, D., Littell, R. y Gwartney, B. 2005. The effects of quality grade, aging, and location within muscle on Warner-Bratzler shear force in beef muscles of locomotion. *Meat Science* 70: 279-284.
- Braun, T. y Gautel, M. 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 12: 349-361.
- Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D. C. y Schmutz, S. M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics selection evolution* 34: 105-116.
- Bureš, D. y Bartoň, L. 2012. Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech Journal of Animal Science* 57: 34-43.
- Burrell, D., Moser, G., Hetzel, J., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Sugimoto, Y. y Mengersen, K. 2004. Meta analysis confirms associations of the TG5 thyroglobulin polymorphism with marbling in beef cattle. In: 29th International conference on animal genetics ISAG, Tokyo

## Referencias Bibliográficas

- Calvo, J. H., Blanco, M., Iguacel, L. P., Serrano, M. M., Joy, M., Pérez, L., Casasús, M. I., Ripoll, G., Alberti, P. y Sarto, P. 2012. Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno No. P201231520, España.
- Calvo, J. H., Iguacel, L. P., Kirinus, J. K., Serrano, M., Ripoll, G., Casasús, I., Joy, M., Pérez-Velasco, L., Sarto, P., Alberti, P. y Blanco, M. 2014. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Science* 96: 775-782.
- Campo, M., Santolaria, P., Sañudo, C., Lepetit, J., Olleta, J., Panea, B. y Alberti, P. 2000. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science* 55: 371-378.
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engström, P. G. y Frith, M. C. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature genetics* 38: 626-635.
- Casas, E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivo Latinoamericano de Produccion Animal* 14: 24-31.
- Casas, E., White, S., Shackelford, S., Wheeler, T., Koohmaraie, M., Bennett, G. y Smith, T. 2007. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science* 85: 2807-2814.
- Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Brenneman, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L. y Chase, C. C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of animal science* 83: 13-19.
- Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Johnson, D. D. y Smith, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84: 520-525.
- Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C. B., Lusi, A. J., Erickson, S. K. y Farese, R. V. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13018-13023.
- Claus, H., Dikeman, M., Murray, L., Brooks, J., Shook, J., Hilton, G., Lawrence, T., Mehaffey, J., Johnson, B. y Allen, D. 2010. Effects of supplementing feedlot steers and heifers with zilpaterol hydrochloride on Warner–Bratzler shear force interrelationships of steer and heifer longissimus lumborum and heifer triceps brachii and gluteus medius muscles aged for 7, 14 and 21d. *Meat Science* 85: 347-355.
- Cong, M., Thompson, V. F., Goll, D. E. y Antin, P. B. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* 273: 660-666.

- Corva, P., Soria, L., Schor, A., Villarreal, E., Cenci, M. P., Motter, M., Mezzadra, C., Melucci, L., Miquel, C. y Paván, E. 2007. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 30: 1064-1069.
- Corva, P. M., Fernandez Macedo, G., Soria, L., Papaleo Mazzucco, J., Motter, M., Villarreal, E. L., Schor, A., Mezzadra, C. A., Melucci, L. M. y Miquel, M. C. 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genetics and Molecular Research* 8: 105-116.
- Costa, A. S., Costa, P., Bessa, R. J., Lemos, J. P., Simões, J. A., Santos-Silva, J., Fontes, C. M. y Prates, J. A. 2013. Carcass fat partitioning and meat quality of Alentejana and Barrosã young bulls fed high or low maize silage diets. *Meat Science* 93: 405-412.
- Coux, O., Tanaka, K. y Goldberg, A. L. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* 65: 801-847.
- Crouse, J. D., Cundiff, L. V., Koch, R. M., Koohmaraie, M. y Seideman, S. C. 1989. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. *Journal of Animal Science* 67: 2661-2668.
- Crouse, J. D., Ferrell, C. L. y Cundiff, L. V. 1985. Effects of sex condition, genotype and diet on bovine growth and carcass characteristics. *Journal Of Animal Science* 60: 1219-1227.
- Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Arrigoni, M. D. B., Silveira, A. C. y de Oliveira, H. N. 2011. Associations between LEP, DGAT1 and FABP4 gene polymorphisms and carcass and meat traits in Nelore and crossbred beef cattle. *Livestock Science* 135: 244-250.
- Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Giusti, J., Silveira, A. C., Martins, C. L. y de Oliveira, H. N. 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*-*Bos indicus* cross beef cattle. *Meat Science* 86: 915-920.
- Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Mason, M. C., Arrigoni, M. D. B., Silveira, A. C. y de Oliveira, H. N. 2009. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal genetics* 40: 456-462.
- Chacón, A. 2004. La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana* 15: 225-243.
- Cheong, H. S., Yoon, D.-H., Park, B. L., Kim, L. H., Bae, J. S., Namgoong, S., Lee, H. W., Han, C. S., Kim, J. O. y Cheong, I.-C. 2008a. A single nucleotide polymorphism in CAPN1 associated with marbling score in Korean cattle. *BMC genetics* 9: 1.
- Cheong, H. S., Yoon, D.-H., Park, B. L., Kim, L. H., Bae, J. S., Namgoong, S., Lee, H. W., Han, C. S., Kim, J. O., Cheong, I.-C. y Shin, H. D. 2008b. A single nucleotide polymorphism in CAPN1 associated with marbling score in Korean cattle. *BMC genetics* 9: 33-33.
- Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., Sañudo, C., Richardson, R. I., Nute, G. R., Olleta, J. L., Panea, B., Albertí, P., Juárez, M., Hocquette, J. F. y Williams, J. L. 2011. Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and

## Referencias Bibliográficas

- cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Science* 87: 61-65.
- Chrystall, B. B. y Devine, C. E. 1985. Electrical Stimulation: its early development in New Zealand *Advances in Meat Research*. p 73-119. Springer, Netherlands.
- Chung, H. y Davis, M. 2012. Effects of genetic variants for the calpastatin gene on calpastatin activity and meat tenderness in Hanwoo (Korean cattle). *Meat Science* 90: 711-714.
- Chung, H. Y., Davis, M. E. y Hines, H. C. 1999. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. *Animal Genetics* 30: 80.
- Darimont, C., Gaillard, D., Ailhaud, G. y Negrel, R. 1993. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Molecular and cellular endocrinology* 98: 67-73.
- Dayton, W. R. y White, M. E. 2008. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *Journal of Animal Science* 86: E217-E225.
- Daza, A., Rey, A. I., Lopez-Carrasco, C. y Lopez-Bote, C. J. 2014. Effect of gender on growth performance, carcass characteristics and meat and fat quality of calves of Avileña-Negra Ibérica breed fattened under free-range conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12: 683-693.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* 60: 604-617.
- De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Aversa, M., Antolini, R., Pontremoli, S. y Melloni, E. 2009. Involvement of exon 6-mediated calpastatin intracellular movements in the modulation of calpain activation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790: 182-187.
- De Tullio, R., Passalacqua, M., Aversa, M., Salamino, F., Melloni, E. y Pontremoli, S. 1999. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochemical Journal* 343: 467-472.
- Deaton, A. M. y Bird, A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* 25: 1010-1022.
- Del Campo, M., Brito, G., de Lima, J. S., Martins, D. V., Sañudo, C., San Julián, R., Hernández, P. y Montossi, F. 2008. Effects of feeding strategies including different proportion of pasture and concentrate, on carcass and meat quality traits in Uruguayan steers. *Meat Science* 80: 753-760.
- Departamento de Desarrollo rural y Sostenibilidad, G. d. A. 2015. Estimación de micromagnitudes del Sector agrario aragones 2015. [http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/GENERICAS/PUBLICACIONES/MACROECONOMIA\\_AGROGANADERA/MACROMAGNITUDES\\_2015.pdf](http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/GENERICAS/PUBLICACIONES/MACROECONOMIA_AGROGANADERA/MACROMAGNITUDES_2015.pdf).
- Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M. y Lazzaroni, C. 2003. Effect of castration on meat quality in Piemontese cattle. *Meat Science* 64: 215-218.
- Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M. T. y Dal Molin, M. T. 2008. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner–Bratzler shear force. *Meat Science* 78: 153-156.

- Di Giammartino, D. C., Nishida, K. y Manley, J. L. 2011. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Molecular cell* 43: 853-866.
- Di Paola, R., Frittitta, L., Miscio, G., Bozzali, M., Baratta, R., Centra, M., Spampinato, D., Santagati, M. G., Ercolino, T. y Cisternino, C. 2002. A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *The American Journal of Human Genetics* 70: 806-812.
- Dikeman, M. E. 1987. Fat reduction in animals and the effect on palatability and consumer acceptance of meat products. In: 40th Annual Reciprocal Meat Conference, Chicago, USA. p 93-103.
- Duckett, S., Neel, J., Lewis, R. M., Fontenot, J. y Clapham, W. 2013. Effects of forage species or concentrate finishing on animal performance, carcass and meat quality. *Journal of Animal Science* 91: 1454-1467.
- Duckett, S., Neel, J., Sonon, R., Fontenot, J., Clapham, W. y Scaglia, G. 2007. Effects of winter stocker growth rate and finishing system on: II. Ninth–tenth–eleventh-rib composition, muscle color, and palatability. *Journal of Animal Science* 85: 2691-2698.
- Dunner, S., Sevane, N., García, D., Cortés, O., Valentini, a., Williams, J. L., Mangin, B., Cañón, J. y Levéziel, H. 2013. Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. *Livestock Science* 154: 34-44.
- Ekerljung, M. 2012. Candidate gene effects on beef quality, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Enriquez-Valencia, C. E., Pereira, G. L., Malheiros, J. M., de Vasconcelos Silva, J. A. I., Albuquerque, L. G., de Oliveira, H. N., Chardulo, L. A. L. y Curi, R. A. 2017. Effect of the g. 98535683A> G SNP in the CAST gene on meat traits of Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. *Meat Science* 123: 64-66.
- Evans, R. M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)* 240: 889-895.
- Faucitano, L., Chouinard, P., Fortin, J., Mandell, I., Lafreniere, C., Girard, C. y Berthiaume, R. 2008. Comparison of alternative beef production systems based on forage finishing or grain-forage diets with or without growth promotants: 2. Meat quality, fatty acid composition, and overall palatability. *Journal of Animal Science* 86: 1678-1689.
- Feldkamp, T. J., Schroeder, T. C. y Lusk, J. L. 2005. Determining consumer valuation of differentiated beef steak quality attributes. *Journal of Muscle Foods* 16: 1-15.
- Field, R. A. 1971. Effect of castration on meat quality and quantity. *Journal of Animal Science* 32: 849-858.
- Fiems, L., De Campeneere, S., Van Caelenbergh, W., De Boever, J. y Vanacker, J. 2003. Carcass and meat quality in double-musled Belgian Blue bulls and cows. *Meat Science* 63: 345-352.
- Franco, D., Bispo, E., González, L., Vázquez, J. A. y Moreno, T. 2009. Effect of finishing and ageing time on quality attributes of loin from the meat of Holstein–Friesian cull cows. *Meat Science* 83: 484-491.

## Referencias Bibliográficas

- French, P., O'Riordan, E., Monahan, F., Caffrey, P., Vidal, M., Mooney, M., Troy, D. y Moloney, A. 2000. Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Science* 56: 173-180.
- Fritsche, S. y Steinhart, H. 1998. Differences in natural steroid hormone patterns of beef from bulls and steers. *Journal of Animal Science* 76: 1621-1625.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F. y Culioli, J. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development* 41: 1-26.
- Gerrard, D., Jones, S., Aberle, E., Lemenager, R., Diekman, M. y Judge, M. 1987. Collagen stability, testosterone secretion and meat tenderness in growing bulls and steers. *Journal Of Animal Science* 65: 1236-1242.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. y Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiological Reviews* 83: 731-801.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G. y Ouali, A. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. *Canadian Journal of Animal Science* 78: 503-512.
- Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S. y Mori, M. 2004. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide-and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 11: 390-402.
- Goutefongea, R. y Dumont, J. P. 1990. Developments in low-fat meat and meat products. In: J. D. Fishery A. V. Wood (eds.). p 398-436.
- Gruber, S. L., Tatum, J. D., Engle, T. E., Chapman, P. L., Enns, R. M., Belk, K. E. y Smith, G. C. 2011. Effects of genetic markers and implant strategy on longissimus and gluteus muscle tenderness of calf-fed steers and heifers. *Journal of Animal Science* 89: 1401-1411.
- Guroff, G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 239: 149-155.
- Harper, G. y Pethick, D. 2004. How might marbling begin? *Animal Production Science* 44: 653-662.
- Hedrick, H., Paterson, J., Matches, A., Thomas, J., Morrow, R., Stringer, W. y Lipsey, R. 1983. Carcass and palatability characteristics of beef produced on pasture, corn silage and corn grain. *Journal of Animal Science* 57: 791-801.
- Hiner, R. L. y Hankins, O. G. 1950. The tenderness of beef in relation to different muscles and age in the animal. *Journal of Animal Science* 9: 347-373.
- Hocquette, J., Ortigues-Marty, I., Damon, M., Herpin, P. y Geay, Y. 2000. Energy metabolism in skeletal muscle of meat-producing animals. *Productions Animales* 13: 185-200.
- Hocquette, J. F., Gondret, F., Baéza, E., Médale, F., Jurie, C. y Pethick, D. W. 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* 4: 303-303.
- Hocquette, J. F., I, C.-M., A, L. y Picard, B. 2005. Current genomics in cattle and application to beef quality. In: *Indicators of milk and beef quality*. p 65-79.



- Hocquette, J. F., Lehnert, S., Barendse, W., Cassar-Malek, I. y Picard, B. 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1: 159-159.
- Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science* 49: 447-457.
- Honikel, K. O. 2004. Conversion of muscle to meat.
- Hou, G.-Y., Yuan, Z.-R., Zhou, H.-L., Zhang, L.-P., Li, J.-Y., Gao, X., Wang, D.-J., Gao, H.-J. y Xu, S.-Z. 2011. Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Molecular Biology Reports* 38: 4705-4708.
- Hughes, T. A. 2006. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends in Genetics* 22: 119-122.
- Hui, Y. H. 2012. Handbook of meat and meat processing. CRC Press.
- Hwang, I. y Thompson, J. 2001. The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle. *Meat Science* 58: 167-174.
- IAEST. 2015. Efectivos de ganado bovino. España y CC.AA. [http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Institutos/InstitutoAragonesEstadistica/AreasTematicas/08\\_Agricultura\\_Industria\\_Construccion/ci.01\\_Agricultura\\_ganaderia\\_selvicultura\\_pesca.detalleDepartamento?channelSelected=0](http://www.aragon.es/DepartamentosOrganismosPublicos/Institutos/InstitutoAragonesEstadistica/AreasTematicas/08_Agricultura_Industria_Construccion/ci.01_Agricultura_ganaderia_selvicultura_pesca.detalleDepartamento?channelSelected=0).
- Jeleníková, J., Pipek, P. y Staruch, L. 2008. The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Science* 80: 870-874.
- Jeong, J., Kwon, E., Im, S., Seo, K. y Baik, M. 2012. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. *Journal of Animal Science* 90: 2044-2053.
- Jeremiah, L. E., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L. y Gibson, L. L. 2003. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups. *Meat science* 65: 1013-1019.
- Johnston, D. J. y Graser, H. U. 2010. Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *Journal of Animal Science* 88: 1917-1935.
- Juárez, M., Aldai, N., López-Campos, Ó., Dugan, M. E. R., Uttaro, B. y Aalhus, J. L. 2012a. Beef texture and juiciness Handbook of meat and meat processing. p 177-206.
- Juárez, M., Basarab, J., Baron, V., Valera, M., Larsen, I. y Aalhus, J. 2012b. Quantifying the relative contribution of ante-and post-mortem factors to the variability in beef texture. *Animal* 6: 1878-1887.
- Jurie, C., Cassar-Malek, I., Bonnet, M., Leroux, C., Bauchart, D., Boulesteix, P., Pethick, D. W. y Hocquette, J. F. 2007. Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. *Journal of animal science* 85: 2660-2669.

## Referencias Bibliográficas

- Juszczuk-Kubiak, E., Flisikowski, K., Wicińska, K., Połoszynowicz, J. y Rosochacki, S. 2009. Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat Science* 82: 278-283.
- Kaplanová, K., Dufek, A., Dračková, E., Simeonovová, J., Šubrt, J., Vrtková, I. y Dvořák, J. 2013. The association of CAPN1, CAST, SCD, and FASN polymorphisms with beef quality traits in commercial crossbred cattle in the Czech Republic. *Czech J Anim Sci* 58: 489-496.
- Kaps, M. y Lamberson, W. 2009. *Biostatistics for animal science. An introductory text*, CABI, Wallingford, UK.
- Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J. y Parr, T. 2010. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Science* 84: 248-256.
- Killefer, J. y Koohmaraie, M. 1994. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. *Journal Of Animal Science* 72: 606-614.
- Kim, H. J., Sharma, A., Lee, S. H., Lee, D. H., Lim, D. J., Cho, Y. M., Yang, B. S. y Lee, S. H. 2017. Genetic association of PLAG1, SCD, CYP7B1 and FASN SNPs and their effects on carcass weight, intramuscular fat and fatty acid composition in Hanwoo steers (Korean cattle). *Animal Genetics* 48: 251 - 252.
- Kiss, R., Bozoky, Z., Kovács, D., Róna, G., Friedrich, P., Dvortsák, P., Weisemann, R., Tompa, P. y Perczel, A. 2008. Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain. *FEBS letters* 582: 2149-2154.
- Koch, R. M., Cundiff, L. V. y Gregory, K. E. 1982. Heritabilities and genetic, environmental and phenotypic correlations of carcass traits in a population of diverse biological types and their implications in selection programs. *Journal of Animal Science* 55: 1319-1329.
- Koohmaraie, M. 1992a. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*. 74: 239-245.
- Koohmaraie, M. 1992b. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. 45th Reciprocal Meat Conference Proceedings No. 45. p 63-71.
- Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science* 43: S193-S201.
- Koohmaraie, M. y Geesink, G. H. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74: 34-43.
- Koohmaraie, M., Shackelford, S. D. y Wheeler, T. L. 2000. Las bases biológicas de la terneza de la carne. *Rev. Soc. Rural de Jesús María* 118: 1-3.
- Koohmaraie, M., Wheeler, T. L. y Shackelford, S. D. 1995. Beef tenderness: Regulation and prediction. *USDA-ARS U. S. Meat Animal Research Center* 9: 1-25.
- Kouzine, F. y Levens, D. 2007. Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Frontiers in Bioscience* 12: 4409.
- Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. y Williams, J. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics* 34: 371-374.

- Lamare, M., Taylor, R. G., Farout, L., Briand, Y. y Briand, M. 2002. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle. *Meat Science* 61: 199-204.
- Latimori, N., Kloster, A., García, P., Carduza, F., Grigioni, G. y Pensel, N. 2008. Diet and genotype effects on the quality index of beef produced in the Argentine Pampeana region. *Meat Science* 79: 463-469.
- Lawson, M. J. y Zhang, L. 2008. Housekeeping and tissue-specific genes differ in simple sequence repeats in the 5'-UTR region. *Gene* 407: 54-62.
- Lee, H. y Moore, W. 1959. Isolation and fermentation characteristics of strains of *Butyrivibrio* from ruminal ingesta. *Journal of bacteriology* 77: 741.
- Lee, J., Jin, M., Lee, Y., Ha, J., Yeo, J. y Oh, D. 2014a. Gene-gene interactions of fatty acid synthase (FASN) using multifactor-dimensionality reduction method in Korean cattle. *Molecular Biology Reports* 41: 2021-2027.
- Lee, S. H., Kim, S. C., Chai, H. H., Cho, S. H., Kim, H. C., Lim, D., Choi, B. H., Dang, C. G., Sharma, A., Gondro, C., Yang, B. S. y Hong, S. K. 2014b. Mutations in calpastatin and  $\mu$ -calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): Molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/ $\mu$ -calpain complex. *Meat Science* 96: 1501-1508.
- Lepetit, J. y Culioli, J. 1994. Mechanical properties of meat. *Meat Science* 36: 203-237.
- Li, J., Zhang, L.-P., Gan, Q.-F., Li, J.-Y., Gao, H.-J., Yuan, Z.-R., Gao, X., Chen, J.-B. y Xu, S.-Z. 2010. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in chinese commercial cattle herds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23: 1405 - 1411.
- Li, X., Ekerljung, M., Lundström, K. y Lundén, A. 2013. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science* 94: 153-158.
- Lonergan, S. M., Ernst, C. W., Bishop, M. D., Calkins, C. R. y Koohmaraie, M. 1999. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *Journal of Animal Science* 73: 3608-3612.
- Lusk, J. L., Fox, J. A., Schroeder, T. C., Mintert, J. y Koohmaraie, M. 2001. In-store valuation of steak tenderness. *American Journal of Agricultural Economics* 83: 539-550.
- MAGRAMA. 2015. Caracterización del Sector Vacuno de carne 2015. [http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectorvacunodecarne2015\\_tcm7-267233.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectorvacunodecarne2015_tcm7-267233.pdf).
- Maher, S. C., Mullen, A. M., Buckley, D. J., Kerry, J. P. y Moloney, A. P. 2005. The influence of biochemical differences on the variation in tenderness of *M. longissimus dorsi* of Belgian Blue steers managed homogenously pre and post-slaughter. *Meat Science* 69: 215-224.
- Maki, M., Bagci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T. y Hatanaka, M. 1989. Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of

## Referencias Bibliográficas

- the human calpastatin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 18866-18869.
- Maki, M., Takano, E., Mori, H., Sato, A., Murachi, T. y Hatanaka, M. 1988. Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 10254-10261.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. y Delday, M. 2003. determinants of meat quality: tenderness. In: *Proceedings of the Nutrition Society* p337-347.
- Mandell, I. B., Gullett, E. A., Wilton, J. W., Kemp, R. A. y Allen, O. B. 1997. Effects of gender and breed on carcass traits, chemical composition, and palatability attributes in Hereford and Simmental bulls and steers. *Livestock Production Science* 49: 235-248.
- Marino, R., Albenzio, M., della Malva, a., Santillo, a., Loizzo, P. y Sevi, a. 2013. Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. *Meat Science* 95: 281-287.
- Marino, R., Albenzio, M., Girolami, A., Muscio, A., Sevi, A. y Braghieri, A. 2006. Effect of forage to concentrate ratio on growth performance, and on carcass and meat quality of Podolian young bulls. *Meat Science* 72: 415-424.
- Marshall, D. M. 1999. Genetics of meat quality. In: R.F. FriesyA. Ruvinsky (eds.) *Genetics of Cattle*. p 605–636. CABI Publishing, New York.
- Marti, S., Realini, C., Bach, A., Pérez-Juan, M. y Devant, M. 2013. Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. *Journal Of Animal Science* 91: 1129-1140.
- Mateescu, R. G., Garrick, D. J., Garmyn, a. J., VanOverbeke, D. L., Mafi, G. G. y Reecy, J. M. 2014. Genetic parameters for sensory traits in longissimus muscle and their associations with tenderness, marbling score, and intramuscular fat in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 93: 21-27.
- Matsuhashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., Sakaguchi, S. y Kobayashi, E. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science* 89: 12-22.
- Mazzucco, J. P., Goszczynski, D., Ripoli, M., Melucci, L., Pardo, A., Colatto, E., Rogberg-Muñoz, A., Mezzadra, C., Depetris, G. y Giovambattista, G. 2016. Growth, carcass and meat quality traits in beef from Angus, Hereford and cross-breed grazing steers, and their association with SNPs in genes related to fat deposition metabolism. *Meat Science* 114: 121-129.
- Mberema, C. H. H., Lietz, G., Kyriazakis, I. y Sparagano, O. A. 2016. The effects of gender and muscle type on the mRNA levels of the calpain proteolytic system and beef tenderness during post-mortem aging. *Livestock Science* 185: 123-130.
- McClure, M. C., Ramey, H. R., Rolf, M. M., McKay, S. D., Decker, J. E., Chapple, R. H., Kim, J. W., Taxis, T. M., Weaber, R. L., Schnabel, R. D. y Taylor, J. F. 2012. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing

- Warner-Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. *Animal Genetics* 43: 662-673.
- McCormick, R. J. 2009. Collagen. In: M. DuyR. J. McCormick (eds.) *Applied muscle biology and meat science*. p 129-148.
- McKee, T. y McKee, J. R. 2003. *Bioquímica*. 3ª ed. McGraw Hill Interamericana.
- Melloni, E., Aversa, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F. y Pontremoli, S. 2006. Association of calpastatin with inactive calpain: A novel mechanism to control the activation of the protease? *Journal of Biological Chemistry* 281: 24945-24954.
- Michal, J. J., Zhang, Z. W., Gaskins, C. T. y Jiang, Z. 2006. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Animal Genetics* 37: 400-402.
- Miller, B. 1992. Understanding consumers. *Beef today* 8: 40.
- Miller, M. F., Carr, M. F., Ramsey, C. B., Crockett, K. L. y Hoover, L. C. 2001. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science* 79: 3062-3068.
- Mitchell, G. E., Reed, A. W. y Rogers, S. A. 1991. Influence of feeding regimen on the sensory qualities and fatty acid contents of beef steaks. *Journal of Food Science* 56: 1102-1103.
- Modzelewska-Kapituła, M. y Nogalski, Z. 2014. Effect of gender on collagen profile and tenderness of infraspinatus and semimembranosus muscles of Polish Holstein-Friesian x Limousine crossbred cattle. *Livestock Science* 167: 417-424.
- Moloney, A., Mooney, M., Troy, D. y Keane, M. 2011. Finishing cattle at pasture at 30months of age or indoors at 25months of age: Effects on selected carcass and meat quality characteristics. *Livestock Science* 141: 17-23.
- Monteiro, A. C. G., Navas, D. R. y Lemos, J. P. C. 2014. Effects of castration and time-on-feed on Mertolenga breed beef quality. *Animal* 8: 675-682.
- Morgan, J., Wheeler, T., Koochmarai, M., Savell, J. y Crouse, J. 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. *Journal of Animal Science* 71: 1471-1476.
- Morris, C., Cullen, N., Hickey, S., Dobbie, P., Veenvliet, B., Manley, T., Pitchford, W., Kruk, Z., Bottema, C. y Wilson, T. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics* 37: 411-414.
- Motter, M. M., Corva, P., Krause, M., Perez Cenci, M. y Soria, L. 2009. Rol de la calpastatina en la variabilidad de la terneza de la carne bovina. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics* 20: 15-24.
- Muir, P. D., Deaker, J. M. y Bown, M. D. 1998. Effects of forage- and grain-based feeding systems on beef quality: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 41: 623-635.
- Muñoz Mejía, C. Y., Parra Bracamonte, G. M., Sifuentes Rincón, A. M., Martínez González, J. C., López Bustamante, L. A., Vera, W. A. y de la Rosa Reyna, X. F. 2012. Genomic and phenotypic beef quality indicators of Charolais cattle in México. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25: 210-219.

## Referencias Bibliográficas

- Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. 1990. *Bioquímica de Harper*.
- Nattrass, G. S., Cafe, L. M., McIntyre, B. L., Gardner, G. E., McGilchrist, P., Robinson, D. L., Wang, Y. H., Pethick, D. W. y Greenwood, P. L. 2014. A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 92: 443-455.
- Neumar, R. W., Xu, Y. A., Gada, H., Guttman, R. P. y Siman, R. 2003. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278: 14162-14167.
- Nishimura, T. y Goll, D. E. 1991. Binding of calpain fragments to calpastatin. *Journal of Biological Chemistry* 266: 11842-11850.
- Nishimura, T., Hattori, A. y Takahashi, K. 1999. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *Journal of animal science* 77: 93-104.
- Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D. H. y Moore, S. S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of animal science* 83: 20-28.
- Nonneman, D., Kappes, S. M. y Koohmaraie, M. 1999. Rapid communication: a polymorphic microsatellite in the promoter region of the bovine calpastatin gene. *Journal of animal science* 77: 3114-3115.
- Odeh, F. M. T. 2003. Quantitative inheritance of calpastatin activity as an assessment measure for meat tenderness in Brahman steers, Louisiana State University
- Oh, D., Lee, Y., La, B., Yeo, J., Chung, E., Kim, Y. y Lee, C. 2012. Fatty acid composition of beef is associated with exonic nucleotide variants of the gene encoding FASN. *Molecular Biology Reports* 39: 4083-4090.
- Oh, D. Y., Lee, Y. S. y Yeo, J. S. 2011. Identification of the SNP (single nucleotide polymorphism) of the stearoyl-CoA desaturase (SCD) associated with unsaturated fatty acid in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24: 757-765.
- Oliván, C., Mocha, M., Martínez, M. J., Montes, A., García, P., Martínez, A., Osoro, K. 2001a. Efecto de la raza y la castración sobre la calidad físico-química y sensorial de la carne de terneros asturianos sometidos a cebo intensivo. In: IX Jornadas Sobre Producción Animal. AIDA., Zaragoza. p 538-540.
- Oliván, M., Martínez-Cerezo, S., De La Roza, B., Osoro, K., Albertí, P., Mocha, M., Martínez, M. J., Panea, B., Olleta, J. L. y Sañudo, C. 2003. Aplicación del análisis instrumental y la espectroscopía en el infrarrojo cercano para identificar la raza de origen de la carne. *Información Técnica Económica Agraria (ITEA)* 24: 67-69.
- Oliván, M., Osoro K, Mocha, M., García, P., Martínez, M.J., Martínez, A., Aldai, N., Guerrero, L. 2002. Effect of breed, castration and finishing period on the sensory quality of beef from extensive systems. In: 48th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). Roma, Italia. p 720-721.
- Oliván, M., Osoro, K., Guerrero, L. . 2001b. Characteristics of beef affecting consumer acceptance. In: 4th Pangborn Sensory Science Symposium, Dijon, Francia. p 148.

- Orrù, L., Cifuni, G. F., Piasentier, E., Corazzin, M., Bovolenta, S. y Moioli, B. 2011. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Science* 87: 344-348.
- Osoro, K., Olivan, M. y Castro, P. 2001. Efecto de la raza, la castración y el acabado en los crecimientos, características de la canal y calidad sensorial de la carne de añojos cebados en pastoreo. *ITEA*: 535 - 537.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. y Sentandreu, M. A. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74: 44-58.
- Padre, R. d. G., Aricetti, J. A., Moreira, F. B., Mizubuti, I. Y., do Prado, I. N., Visentainer, J. V., de Souza, N. E. y Matsushita, M. 2006. Fatty acid profile, and chemical composition of Longissimus muscle of bovine steers and bulls finished in pasture system. *Meat Science* 74: 242-248.
- Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W. y Smith, T. P. L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80: 3077-3085.
- Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W., Dikeman, M. E. y Smith, T. P. L. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82: 3474-3481.
- Pannier, L., Hamill, R. M., Mullen, A. M. y Sweeney, T. 2010a. Functional genomic approaches to understand the biological pathways underpinning intramuscular fat in beef. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* 5: 11.
- Pannier, L., Mullen, a. M., Hamill, R. M., Stapleton, P. C. y Sweeney, T. 2010b. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat Science* 85: 515-518.
- Pannier, L., Sweeney, T., Hamill, R. M., Ipek, F., Stapleton, P. C. y Mullen, a. M. 2009. Lack of an association between single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene and intramuscular fat in *Bos taurus* cattle. *Meat Science* 81: 731-737.
- Pethick, D., Dunshea, F., Forbes, J. y France, J. 1993. Fat metabolism and turnover Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. p 291 - 311. CAB International, Wallingford, UK.
- Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. y Chambon, P. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330: 444-450.
- Pfizer, J., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W. y Schaschke, N. 2008. Inhibition of human  $\mu$ -calpain by conformationally constrained calpastatin peptides. *Biological Chemistry* 389: 83-90.

## Referencias Bibliográficas

- Picard, B., Lebret, B., Cassar-Malek, I., Liaubet, L., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Hocquette, J. y Renand, G. 2015. Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science* 109: 18-26.
- Piedrafita, J., Quintanilla, R., Sañudo, C., Olleta, J. L., Campo, M. a. M., Panea, B., Renand, G., Turin, F., Jabet, S. y Osoro, K. 2003. Carcass quality of 10 beef cattle breeds of the Southwest of Europe in their typical production systems. *Livestock Production Science* 82: 1-13.
- Pinto, L. F., Ferraz, J. B., Meirelles, F. V., Eler, J. P., Rezende, F. M., Carvalho, M. E., Almeida, H. B. y Silva, R. C. 2010. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genetics and molecular research: GMR* 9: 1431-1442.
- Pordomingo, A. J., Grigioni, G., Carduza, F. y Lagreca, G. V. 2012. Effect of feeding treatment during the backgrounding phase of beef production from pasture on: I. Animal performance, carcass and meat quality. *Meat Science* 90: 939-946.
- Prado, I. N., Campo, M. M., Muela, E., Valero, M. V., Catalan, O., Olleta, J. L. y Sanudo, C. 2014. Effects of castration age, dietary protein level and lysine/methionine ratio on animal performance, carcass and meat quality of Friesian steers intensively reared. *Animal* 8: 1561-1568.
- Pringle, T., Williams, S., Lamb, B., Johnson, D. y West, R. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. *Journal of Animal Science* 75: 2955-2961.
- Pulford, D., Vazquez, S. F., Frost, D., Fraser-Smith, E., Dobbie, P. y Rosenvold, K. 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Science* 79: 623-630.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J. y Sham, P. C. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* 81: 559-575.
- Purchas, R. y Aungsupakorn, R. 1993. Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Science* 34: 163-178.
- Purchas, R., Burnham, D. y Morris, S. 2002. Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. *Journal of Animal Science* 80: 3211-3221.
- Purslow, P. P. 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science* 70: 435-447.
- Raynaud, P., Gillard, M., Parr, T., Bardsley, R., Amarger, V. y Levéziel, H. 2005. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440: 46-53.
- Razminowicz, R. H., Kreuzer, M. y Scheeder, M. 2006. Quality of retail beef from two grass-based production systems in comparison with conventional beef. *Meat Science* 73: 351-361.



- Reagan, J. O., Carpenter, Z. L. y Smith, G. C. 1976. Age-related traits affecting the tenderness of the bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* 43: 1198-1205.
- Realini, C., Duckett, S., Brito, G., Dalla Rizza, M. y De Mattos, D. 2004. Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science* 66: 567-577.
- Reardon, W., Mullen, a. M., Sweeney, T. y Hamill, R. M. 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science* 86: 270-275.
- Renand, G., Larzul, C., Bihan-Duval, L. y Le Roy, P. 2003. Genetic improvement of meat quality in the different livestock species: present situation and prospects. *Productions Animales (France)*.
- Riley, R. R., Smith, G. C., Cross, H. R., Savell, J. W., Long, C. R. y Cartwright, T. C. 1986. Chronological age and breed-type effects on carcass characteristics and palatability of bull beef. *Meat Science* 17: 187-198.
- Rincker, C. B., Pyatt, N. A., Berger, L. L. y Faulkner, D. B. 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *Journal of Animal Science* 84: 686-693.
- Ríos-Utrera, A. y Van Vleck, D. L. 2004. Heritability estimates for carcass traits of cattle: a review. *Genetics and Molecular Research* 3 380-394.
- Robert, N., Briand, M., Taylor, R. y Briand, Y. 1999. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science* 51: 149-153.
- Roncalés, P. 1998. Calidad y seguridad en el consumo de carne. Reflexiones sobre los aspectos positivos y negativos del consumo de carne. *Eurocarne*: 17-27.
- Ross, M. H. y Pawlina, W. 2007. *Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*.
- Roy, R., Ordovas, L., Zaragoza, P., Romero, A., Moreno, C., Altarriba, J. y Rodellar, C. 2006. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Animal Genetics* 37: 215-218.
- Rubio Lozano, M. S., Alfaro-Zavala, S., Sifuentes-Rincón, A. M., Parra-Bracamonte, G. M., Braña Varela, D., Méndez Medina, R. D., Pérez Linares, C., Ríos Rincón, F., Sánchez Escalante, A., Torrescano Urrutia, G. y Figueroa Saavedra, F. 2016. Genetic and genomic sources of variation of meat tenderness in commercial beef cattle. *Journal of Food Quality* 39: 150-156.
- Sañudo, C., Albertí, P., Campo, M. M., Olleta, J. L. y Panea, B. 1998. Calidad instrumental de la carne de bovino de siete razas españolas. *Archivos de Zootecnia* 48: 399-399.
- Savell, J. W. y Cross, H. R. 1988. The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb *Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. p 345-345. National Academies Press (US), Washington (DC).
- Sawaya, S. M., Bagshaw, A. T., Buschiazzi, E. y Gemmill, N. J. 2012. Promoter microsatellites as modulators of human gene expression *Tandem Repeat*

## Referencias Bibliográficas

- Polymorphisms: Genetic Plasticity, Neural Diversity and Disease. p 41-54. Landes Bioscience and Springer Science, New York.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H. y Wilton, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science* 84: 291-299.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Ye, X., Moore, S. S., Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Mandell, I. B., Wilton, J. W. y Williams, J. L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of animal science* 83: 2009-2020.
- Seideman, S. C., Cross, H. R., Oltjen, R. R. y Schanbacher, B. D. 1982. Utilization of the intact male for red meat production: A review. *Journal of Animal Science* 55: 826-840.
- Sentandreu, M. a., Coulis, G. y Ouali, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology* 13: 398-419.
- Shackelford, S. D. y Koohmaraie, M. 1995. Effects of slaughter age on meat tenderness and USDA carcass maturity scores of beef females. *Journal of Animal Science* 73: 3304-3309.
- Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Cundiff, L. V., Gregory, K. E., Rohrer, G. a. y Savell, J. W. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *Journal of animal science* 72: 857-863.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Meade, M. K., Reagan, J. O., Byrnes, B. L. y Koohmaraie, M. 2001. Consumer impressions of Tender Select beef. *Journal of Animal Science* 79: 2605-2614.
- Sharaf Eldin, I. M. A., Babiker, S. A., Elkhidir, O. A. y El-Bukhary, H. A. A. 2013. Characteristics of beef from intensively fed western Baggara bulls and heifers: quality attributes and chemical composition. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 27: 45-48.
- Shin, S. C., Heo, J. P. y Chung, E. R. 2012. Genetic variants of the FABP4 gene are associated with marbling scores and meat quality grades in Hanwoo (Korean cattle). *Molecular Biology Reports* 39: 5323-5330.
- Shorthose, W. y Harris, P. 1990. Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles. *Journal of Food Science* 55: 1-8.
- Sierra, V., Fernández-Suárez, V., Castro, P., Osoro, K., Vega-Naredo, I., García-Macía, M., Rodríguez-Colunga, P., Coto-Montes, A. y Oliván, M. 2012. Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderising meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2727-2740.
- Silva, J. A., Patarata, L. y Martins, C. 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Science* 52: 453-459.
- Smas, C. M. y Sul, H. S. 1995. Control of adipocyte differentiation. *The Biochemical journal* 309: 697-710.

- Soria, L. a., Corva, P. M., Huguet, M. J., Miño, S. y Miquel, M. C. 2010. Bovine  $\mu$ -calpain (CAPN1) gene polymorphisms in brangus and brahman bulls. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics* 21: 61-69.
- Steen, R., Lavery, N., Kilpatrick, D. y Porter, M. 2003. Effects of pasture and high-concentrate diets on the performance of beef cattle, carcass composition at equal growth rates, and the fatty acid composition of beef. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 46: 69-81.
- Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame, M. C., Parr, T. y Martin, S. G. 2011. The calpain system and cancer. *Nature reviews. Cancer* 11: 364-374.
- Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H. y Nakagawa, K. 2000. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. p 588–592.
- Suzuki, K. 1990. The structure of calpains and the calpain gene. In: R. L. Mellgren y T. Murachi (eds.) *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*. p 25–35. CRC press, Florida.
- Tait, R. G., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., King, D. a., Casas, E., Thallman, R. M., Smith, T. P. L. y Bennett, G. L. 2014.  $\mu$ -Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. *Journal of Animal Science* 92: 456-466.
- Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A. y Tsuji, S. 2004. Genotype of stearyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome* 15: 142-148.
- Taylor, R. G., Tassy, C., Briand, M., Robert, N., Briand, Y. y Ouali, A. 1995. Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Reports* 21: 71-73.
- Thaller, G., Kühn, C., Winter, a., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zühlke, H. y Fries, R. 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* 34: 354-357.
- Tian, J., Zhao, Z., Zhang, L., Zhang, Q., Yu, Z., Li, J. y Yang, R. 2013. Association of the leptin gene E2-169T>C and E3-299T>A mutations with carcass and meat quality traits of the Chinese Simmental-cross steers. *Gene* 518: 443-448.
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. y Friedrich, P. 2001. Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 1333-1339.
- Torrescano, G., Sanchez-Escalante, A., Gimenez, B., Roncales, P. y Beltrán, J. A. 2003. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science* 64: 85-91.
- Tuma, H. J., Henrickson, R. L., Stephens, D. F. y Moore, R. 1962. Influence of marbling and animal age on factors associated with beef quality. *Journal of Animal Science* 21: 848-851.
- Uemori, T., Shimojo, T., Asada, K., Asano, T., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M., Murachi, T., Hanzawana, H. y Arata, Y. 1990. Characterization of a

## Referencias Bibliográficas

- functional domain of human calpastatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166.
- Underwood, K., Means, W. y Du, M. 2008. Caspase 3 is not likely involved in the postmortem tenderization of beef muscle. *Journal Of Animal Science* 86: 960-966.
- Van Eenennaam, a. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. a., Franke, D. E. y Thomas, M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science* 85: 891-900.
- Van Elswyk, M. E. y McNeill, S. H. 2014. Impact of grass/forage feeding versus grain finishing on beef nutrients and sensory quality: The US experience. *Meat Science* 96: 535-540.
- Varela, A., Oliete, B., Moreno, T., Portela, C., Monserrat, L., Carballo, J. y Sánchez, L. 2004. Effect of pasture finishing on the meat characteristics and intramuscular fatty acid profile of steers of the Rubia Gallega breed. *Meat Science* 67: 515-522.
- Veerkamp, J. H. y Maatman, R. G. 1995. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Progress in lipid research* 34: 17-52.
- Velik, M., Steinwider, A. y Frickh, J. 2008. Effect of ration, sex, and breed on carcass performance and meat quality of cattle from suckler cow systems. In: 17 International Science Symposium on Nutrition of Domestic Animals, Slovenia
- Verbeke, W., Van Wezemael, L., de Barcellos, M. D., Kügler, J. O., Hocquette, J. F., Ueland, Ø. y Grunert, K. G. 2010. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee. Insights from a qualitative study in four EU countries. *Appetite* 54: 289-296.
- Vernon, R., Barber, M. y Travers, M. 1999. Symposium on 'Lipogenesis in farm animals' Present and future studies on lipogenesis in animals and human subjects. . *Proc. Nutr. Soc.* 58: 541- 549.
- Wang, Y.-H., Byrne, K. A., Reverter, A., Harper, G. S., Taniguchi, M., McWilliam, S. M., Mannen, H., Oyama, K. y Lehnert, S. A. 2005. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 16: 201-210.
- Ward, R. E., Woodward, B., Otter, N. y Doran, O. 2010. Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle. *Livestock Science* 127: 22-29.
- Webb, E. y O'Neill, H. 2008. The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science* 80: 28-36.
- Węglarz, A. 2010. Quality of beef from semi-intensively fattened heifers and bulls. *Animal Science Papers and Reports* 28: 207-218.
- Wendt, A., Thompson, V. F. y Goll, D. E. 2004. Interaction of calpastatin with calpain: A review. *Biological Chemistry* 385: 465-472.
- Wheeler, T., Cundiff, L., Koch, R. y Crouse, J. 1996. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): carcass traits and longissimus palatability. *Journal Of Animal Science* 74: 1023-1035.

- Wheeler, T. L., Cundiff, L. V., Koch, R. M. y Crouse, J. D. 1995. Characterization of biological types of cattle (cycle IV): carcass traits and longissimus palatability. *Journal of Animal Science* 74: 1023-1035.
- White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Johnson, D. D., Keele, J. W. y Smith, T. P. L. 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *American Society of Animal Science* 83: 2001-2008.
- Wilk, S. y Orłowski, M. 1980. Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase: Isolation and Specificity of the Bovine Pituitary Enzyme. *Journal of Neurochemistry* 35: 1172-1182.
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F. a. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G. y Fries, R. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9300-9305.
- Wu, G., Farouk, M. M., Clerens, S. y Rosenvold, K. 2014. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Science* 98: 637-645.
- Wu, X., Yang, Z., Shi, X., Li, J., Ji, D., Mao, Y., Chang, L. y Gao, H. 2012. Association of SCD1 and DGAT1 SNPs with the intramuscular fat traits in Chinese Simmental cattle and their distribution in eight Chinese cattle breeds. *Molecular Biology Reports* 39: 1065-1071.
- Yaffe, D. y Saxel, O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727.
- Yang, H. Q., Ma, H., Takano, E., Hatanaka, M. y Maki, M. 1994. Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *Journal of Biological Chemistry* 269: 18977-18984.
- Yuan, Z., Li, J., Li, J., Gao, X., Gao, H. y Xu, S. 2013. Effects of DGAT1 gene on meat and carcass fatness quality in Chinese commercial cattle. *Molecular Biology Reports* 40: 1947-1954.
- Zembayashi, M. 1994. Effects of nutritional planes and breeds on intramuscular-lipid deposition in *M. longissimus dorsi* of steers. *Meat Science*: 367-374.
- Zhang, L., Ma, B., Wu, J., Fei, C., Yang, L. y Wan, H. 2010. Cloning and characterization of the yak gene coding for calpastatin and in silico analysis of its putative product. *Acta Biochimica Polonica* 57: 35-41.
- Zhang, L. P., Gan, Q. F., Hou, G. Y., Gao, H. J., Li, J. Y. y Xu, S. Z. 2015. Investigation of TG gene variants and their effects on growth, carcass composition, and meat quality traits in Chinese steers. *Genetics and Molecular Research* 14: 5320-5326.
- Zhang, S., Knight, T. J., Reecy, J. M. y Beitz, D. C. 2008. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Animal Genetics* 39: 62-70.

## *Referencias Bibliográficas*

- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zhao, C., Tian, F., Yu, Y., Liu, G., Zan, L., Updike, M. S. y Song, J. 2012. miRNA-dysregulation associated with tenderness variation induced by acute stress in angus cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 3: 12-12.

**Anexos**





1. Artículo en revista Indexada: J. H. Calvo\*, L. P. Iguácel\*, J. K. Kirinus\*, M. Serrano, G. Ripoll, I. Casasús, M. Joy, L. Pérez-Velasco, P. Sarto, P. Albertí, M. Blanco. 2013. A new single nucleotide polymorphism in *calpastatin* (CAST) gene associated with meat tenderness. *Meat Science*. 96: 775–782.
2. Patente: Calvo, J. H., Blanco, M., Iguácel, L. P., Serrano, M., Joy, M., Perez, L., Casasús, I., Ripoll, G., Albertí, P., Sarto, P. 2012. Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno. Número: 201231520. CITA, INIA, ARAID, ARAPARDA, ASAPI
3. Comunicación a congresos:
  - 3.1. L. P. Iguácel, J. H. Calvo, J. K. Kirinus, M. Serrano, G. Ripoll, I. Casasús, M. Joy, L. Pérez-Velasco, P. Sarto, P. Albertí, M. Blanco. Nuevo SNP de la *calpastatina* (CAST) asociado con la ternera de la carne de bovino. XV Jornadas Sobre Producción Animal AIDA. Tomo II, 547-549. Zaragoza 14-15 Mayo, 2013.
  - 3.2. L. P. Iguácel, J. H. Calvo, J. K. Kirinus, M. Serrano, G. Ripoll, I. Casasús, M. Joy, L. Pérez-Velasco, P. Sarto, P. Albertí, M. Blanco. New SNP in calpastatin gene associated with meat tenderness and frequency in different cattle breeds. 64th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Nantes, Agosto 2013.
  - 3.3. L. P. Iguácel, A. Bolado-Carrancio, I. Casasús, M. Serrano, J. C. Rodríguez-Rey, M. Blanco, J. H. Calvo. Characterization of 3' untranslated region (3' UTR) of CAST gene and its putative functional effect in beef tenderness. 34th International Society for Animal Genetics (ISAG) Conference. Xian, Julio 2014.
  - 3.4. L. P. Iguácel, A. Bolado-Carrancio, G. Ripoll P. Sarto D. Villalba, M. Serrano, J. C. Rodríguez-Rey, M. Blanco I. Casasús, J. H. Calvo. Association and functional impact of SNPs in 3'UTR CAST gene with tenderness in cattle. 66th European Federation of Animal Science Annual meeting. Varsovia, Polonia. Agosto, 2015.
  - 3.5. L. P. Iguácel, J. H. Calvo, P. Sarto, G. Ripoll, D. villalba, I. Casasús, M. Serrano; M. Blanco. SNPs in candidate genes for intramuscular fat in Parda de Montaña and Pirenaica beef cattle breeds. 66th European Federation of Animal Science Annual meeting. Varsovia, Polonia. Agosto, 2015.





## A new single nucleotide polymorphism in the *calpastatin* (*CAST*) gene associated with beef tenderness



J.H. Calvo<sup>a,b,\*</sup>, L.P. Iguácel<sup>a,1</sup>, J.K. Kirinus<sup>d,1</sup>, M. Serrano<sup>c</sup>, G. Ripoll<sup>a</sup>, I. Casasús<sup>a</sup>, M. Joy<sup>a</sup>, L. Pérez-Velasco<sup>a</sup>, P. Sarto<sup>a</sup>, P. Albertí<sup>a</sup>, M. Blanco<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Tecnología en Producción Animal, CITA, 59059 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> ARAID, 50004 Zaragoza, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 February 2013

Received in revised form 27 September 2013

Accepted 3 October 2013

Available online 9 October 2013

#### Keywords:

Tenderness

Cattle

*CAST*

*CAPN1*

SNP

### ABSTRACT

First we looked for putative causative mutations in the *CAST* and *CAPN1* genes associated with meat tenderness and found a total of 31 and 7 polymorphisms, respectively, in the Parda de Montaña and Pirenaica breeds. Tenderness was not affected by mutations in *CAPN1*. However, three SNPs located at intron 5 (BT7: g.98533962C>G on UMD 3.0), exon 7 (g.98535683A>G) and intron 12 (g.98545188T>A) of the *CAST* gene were significantly associated with meat tenderness at 7 days post-mortem in the Parda de Montaña breed. The haplotypes  $h_2$  and  $h_5$  showed significant associations with meat toughness being consistent with the SNP association results, which showed that the g.98535683A>G SNP in *CAST* might be the causative mutation of the effect found in this study. This mutation changes the amino acid sequence at position p.Thr182Ala (NM\_174003). This amino acid substitution could affect the interacting regions between the calpastatin L-domain and calpain, and then could generate a more stable union between calpain and calpastatin.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Meat tenderness is consistently rated by consumers as the single most important component of meat quality (Miller, Huffman, Gilbert, Hamman, & Ramsey, 1995; Ouali et al., 2006). It depends not only on production factors such as breed, genotype, age, diet, growth pattern or slaughter weight, but also on technological factors such as slaughtering conditions, ageing time and cooking process (Geay, Bauchart, Hocquette, & Culioli, 2001; Maltin, Balcerzak, Tilley, & Delday, 2003). The ability to predict meat tenderness is one of the major issues facing the beef industry because meat tenderisation during the post-mortem period is highly variable between carcasses, and consumers demand a consistent product (Miller et al., 1995). Post-mortem proteolysis of key myofibrillar proteins by endogenous enzymes within the muscle fibre is the largest contributing factor to meat tenderisation (Koohmaraie, 1996). In the calpain proteolytic family,  $\mu$ -calpain (*CAPN1*) is responsible for the breakdown of myofibrillar proteins, while calpastatin (*CAST*) inhibits  $\mu$ - and  $m$ -calpain (*CAPN2*) activity and, therefore, regulates post-mortem proteolysis.

The incorporation of molecular information into breeding programmes has been recommended to increase their efficiency (Dekkers, 2004; Meuwissen & Goddard, 1996). Koohmaraie et al. (1995) proposed the exploitation of calpastatin polymorphisms to predict beef tenderness because different single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CAST* gene, and also *CAPN1* gene have been associated with meat tenderness (Allais et al., 2011; Barendse et al., 2007; Casas et al., 2006; Costello et al., 2007; Page et al., 2002; Page et al., 2004; Schenkel et al., 2006). Recently, some of these SNPs have been included as commercial genetic markers by some livestock industries (Johnston & Graser, 2010). However, to ensure their correct use in breeding programmes, it is essential that effects of the SNPs are evaluated in different populations.

The aim of this study was to look for putative causative mutations in the *CAST* and *CAPN1* genes and to test the association of these mutations with meat tenderness in the Parda de Montaña and Pirenaica breeds.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animal samples

This study was carried out on 196 animals of two Spanish beef breeds: Parda de Montaña ( $n = 144$ ), and Pirenaica ( $n = 52$ ). Animal samples were obtained from cattle of different experiments conducted at the Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

\* Corresponding author at: Unidad de Tecnología en Producción Animal, CITA-Aragón, Av. de Montañana, 930, 50059 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 976716471; fax: +34 976 716 335.

E-mail address: [jhcalvo@aragon.es](mailto:jhcalvo@aragon.es) (J.H. Calvo).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

(CITA) Research Station between 2003 and 2010 (Table 1). Cattle were slaughtered in an EU-licensed commercial abattoir (MercaZaragoza, Zaragoza, Spain) according to the European legislation (directive 86/609/EEC) on animal protection and supervised by the Animal Welfare Committee of the institution. Immediately after slaughter, a muscle biopsy of the *M. Longissimus thoracis* at the 10th rib was obtained and placed in RNAlater (QIAGEN, Madrid, Spain) using a sterile 6 mm punch biopsy (Stiefel Laboratories, Madrid, Spain) for RNA extraction. The samples were cut into 0.5 cm thick slices and completely submerged in a collection tube containing 5 ml of RNAlater. Additionally, another sample was taken for DNA extraction using the same 6mm punch biopsy.

## 2.2. Instrumental texture analysis

After 24 h of chilling at 4 °C, the 10th rib of each left half carcass was removed and transported to the CITA Research Station. The *M. Longissimus thoracis* was excised, vacuum-packaged and stored at 4 °C for 7 days to determine the instrumental texture. Steaks were prepared with a minimum thickness of 3.5 cm. One steak per animal was heated in a water bath (75 °C) to an internal temperature of 70 °C. After cooling, at least ten probes per steak (approximate 10 × 10 mm<sup>2</sup> cross section) were cut with the fibre direction parallel to the long dimension, which was required to be at least 30 mm (Honikel, 1998). The dimensions of each probe were measured with a digital calliper (Mitutoyo, Illinois, USA). The samples were sheared perpendicular to the long axis of the core using an Instron (Model 5543, Instron Limited, Barcelona, Spain) with a Warner–Bratzler blade and a cross-head speed of 150 mm/min. The maximum stress values for each animal (maximum load per unit of cross section, kg/cm<sup>2</sup>) were calculated by averaging the results of those 10 probes per steak. Twenty animals of the Parda de Montaña and 10 of the Pirenaica breed with extreme values for tenderness estimates obtained from the Linear Mixed Model (see “statistical analysis: polymorphisms search” in the Materials and methods section) were selected to search for polymorphisms in the *CAPN1* and *CAST*.

## 2.3. Search for polymorphisms

Genomic DNA was extracted from the muscle samples of 30 animals with extreme tenderness estimated values using the SpeedTools DNA Extraction kit (Biotools, Madrid, Spain). Three fragments of the *CAPN1* gene (exon 9, exon 14/intron 14 and intron 17) and 3 of the *CAST* gene (intron 5, intron 12 and exon 30/3'UTR) that contain different SNPs associated with meat tenderness in different beef cattle breeds (for *CAPN1*: Page et al., 2002; White et al., 2005; for *CAST*: Schenkel et al., 2006; Barendse, 2002), were amplified by PCR and sequenced. The primers for the *CAPN1* fragments were designed based on primers described by Soria, Corva, Huguet, Miño, and Miquel (2010), whereas primers for the *CAST* fragments were designed based on primers

described by Schenkel et al. (2006) for intron 5, Juszczyk-Kubiak et al. (2009) for intron 12 and Li et al. (2010) for exon 30. The markers' locations, positions, primers and annealing temperature are detailed in Table 2. PCR was carried out in a final PCR volume of 25 µl containing 5 pmol of each primer, 200 nM dNTPs, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl, 0.1% TritonX-100 and 1 U Taq polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Cycling conditions were the same as those described by Soria et al. (2010), Schenkel et al. (2006), Juszczyk-Kubiak et al. (2009) and Li et al. (2010).

Total RNA was extracted from the *M. Longissimus thoracis* samples from 5 Parda de Montaña and 3 Pirenaica animals with alternative genotypes for *CAST\_4* (3 AA, 3 AT and 2 TT) and extreme tenderness estimated values with TRI@REAGENT (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of the extracted RNA were determined by nanophotometric analysis (Implen, Madrid, Spain). To exclude possible amplification of contaminating genomic DNA, samples were treated with DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Single-stranded cDNA was synthesised from 1 µg RNA with the SuperScript® III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. *CAST* transcript variant 2 (GenBank acc. number NM\_174003) was amplified and sequenced. The primers were designed using PRIMER 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Supplementary Table S1). PCR amplification was carried out in a final PCR volume of 25 µl, using the same conditions as described above. Cycling conditions were as follows: an initial denaturation step of 94 °C for 3 min, 35 cycles of [94 °C for 45 s, annealing temperature for 45 s, and 72 °C for 30 and 45 s for fragments 5–6 and 1–2–3–4, respectively] and a final extension step of 72 °C for 10 min. The annealing temperatures for each fragment are indicated in Supplementary Table S1. All PCR amplifications from genomic DNA and cDNA were carried out in the MyCycler thermal cycler machine (BioRad, Madrid, Spain). PCR products were tested for their quality on 1.5% agarose gels stained with SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The PCR products from genomic DNA and cDNA were purified using the Macherey-Nagel-Extract II purification kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer's instructions and sequenced using an ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Sequencing reactions were performed in a total volume of 5 µl with 1 µl of BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain), 500 nM forward primers and 3–5 ng of PCR purified product. Homology searches and sequence alignments were performed with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) software. The Kyte–Doolittle hydrophathy algorithm (Kyte & Doolittle, 1982) was used, and the results were plotted. Antisense matches to individual miRNAs in the 3'UTR sequences of the isolated bovine *CAST* gene were determined using MicroInspector (<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>) (Rusinov, Baev, Minkov, & Tabler, 2005).

**Table 1**

Experimental animal design, number of animals, slaughter weight, age and meat maximum stress<sup>a</sup> of the studies used in this work.

Breed	Gender	Diet	n	Slaughter weight, kg		Slaughter age, d		Maximum stress	
				Mean	Std. dev.	Mean	Std. dev.	Mean	Std. dev.
Parda de Montaña	Steer	Pasture + concentrate	33	528	42.7	594	28.9	7.3	2.01
		Total mixed ration (60% forage: 40% concentrate)	8	501	40.3	539	39.0	7.7	1.12
	Bull	Milk + concentrate <sup>b</sup>	7	236	27.2	164	9.9	5.2	0.72
		Pasture + supplement	24	457	36.6	371	34.4	9.3	2.00
		Milk + pasture <sup>b</sup>	8	229	17.3	225	13.2	7.9	1.36
		Concentrate	64	443	81.9	328	63.7	6.5	1.80
Pirenaica	Steer	Pasture + concentrate	8	488	52.9	614	19.9	8	2.07
		Concentrate <sup>b</sup>	8	479	26.0	433	8.1	4.8	1.00
	Bull	Total mixed ration (60% forage: 40% concentrate)	8	510	32.6	587	18.6	5.4	0.80
		Concentrate <sup>b</sup>	20	460	28.2	350	35.2	5.1	1.23
		Heifer	8	473	42.7	444	13.1	4.1	0.56

<sup>a</sup> Maximum stress (kg/cm<sup>2</sup>) after 7 days of ageing was registered using Warner–Bratzler shear force device to evaluate instrumental tenderness.

<sup>b</sup> Animals used for cDNA characterisation.

**Table 2**

Information on the SNP genotyped for *CAPN1* and *CAST* genes. Primer sequence, amplification size (AS), annealing temperature (Tann), restriction enzyme (Re) and PCR–RFLP pattern for each allele for each SNPs.

Gene	Name (alias)	Location	Reference	Position on UMD 3.0	Primers	AS, bp	Tann, °C	Re	PCR–RFLP (size in bp)
<i>CAPN1</i>	<i>CAPN1_1</i> (316)	Exon 9	Page et al. (2002)	BTA29: g.1827088G>A	F: CCAGGGCCAGATGGTGAA R: CGTCGGGTGTCAGGTTGC	709	62	<i>BtgI</i>	C: 371, 251, 87 G: 622, 87
	<i>CAPN1_2</i> (530)	Exon 14	Page et al. (2002)	BTA29: g.1843665G>A	F: AGCCGAGGACCCAGTGA R: TCCCTGCCAGTTGTCTGAAG	787	64	<i>PfI</i> F1	G: 598, 122, 60, 7 A: 598, 182, 7
	<i>CAPN1_3</i> (4751)	Intron 17	White et al. (2005)	BTA29: g.1845653T>C	F: GAAGGGCTGGGTTGGGATGTCGGCAGAG R: AGGCTGGGAGGGGTGTCTCTGAGTGCCA	215	74	<i>Bsa</i> II	C: 126, 89 T: 215
<i>CAST</i>	<i>CAST_1</i>	Intron 5	Schenkel et al. (2006)	BTA7: g.98533962C>G	F: GAAGTAAAGCCAAAGGAACA R: ATTTCTCTGATGGTGGCTGCTCACT	408	62	<i>Rsa</i> I	G: 211, 197 C: 408
	<i>CAST_2</i>	Exon 7	In this work	BTA7: g.98535683A>G	F: TGCATCATGCCAGCAGA R: CACGTGTGCTCACCTTGTCAGCTGGTA	238	55	<i>Hha</i> I	A: 238 G: 178, 60
	<i>CAST_3</i> <sup>a</sup>	Exon 7	In this work	BTA7: g.98535716G>A	F: GATCTCCGGTGGTGGAAAGAG R: ACGTGTGCTCACCTTGTCA Probe 1: ATCTGCCGAACCAGC Probe 2: ATCTGCCAAACCAGC	82	60		
<i>CAST_4</i>	Intron 12	In this work	BTA7: g.98545188T>A	F: GATGCCTTGTATCCGACTT R: GGACTGGCAGATGAAGGAAA	516	62	<i>Bse</i> YI	A: 516 T: 259, 257	
<i>CAST_5</i> (2959)	Exon 30/3'UTR	Barendse (2002)	BTA7: g.98579663A>G	F: ACATTCTCCCCACAGTGCC R: GACAGAGTCTCGCTTTGCTC	375	62	<i>Dde</i> I	A: 247, 128 G: 375	

<sup>a</sup> Genotyped using TaqMan SNP genotyping assay.

2.4. SNP genotyping

Among all of the SNPs found, 3 and 5 SNPs in *CAPN1* and *CAST* genes, respectively, were genotyped in the full population (Tables 3 and 4). Genomic DNA was extracted from the 196 animals of our study using the SpeedTools DNA Extraction kit (Biotools, Madrid, Spain). The 3 SNPs located in *CAPN1* and *CAST\_1*, 2, 4 and 5 were genotyped by PCR–RFLPs, with the primers and conditions described in the ‘Search for polymorphisms’ section and in Table 2. The PCR fragments used for the search for polymorphisms were exactly the same fragments as those used for the RFLP experiment. The gene sequence used for *CAST\_2* primer design was obtained from the cattle genome alignment of UMD vs. 3 (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/gbrowse/btauUMD3/>). *CAPN1\_1*, *CAPN1\_2*, *CAPN1\_3*, *CAST\_1*, *CAST\_2*, *CAST\_4* and *CAST\_5* were detected with *BtgI*, *PfI*F1, *Bsa*II, *Rsa* I, *Hha*I, *Bse*YI and *Dde*I restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), respectively. For each SNP, 10 µl of the PCR product was digested with the corresponding enzyme for 4 h at 37 °C (*BtgI*, *PfI*F1, *Rsa* I, *Hha*I, *Bse*YI

and *Dde*I) and 4 h at 60 °C (*Bsa*II), in a total volume of 15 µl. The PCR–RFLP bands were visualised on 3% agarose gels stained with SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The *CAST\_3* polymorphism was genotyped using custom TaqMan SNP genotyping assays designed by Applied Biosystems with an ABI Prism 7500 platform (Applied Biosystems, Madrid, Spain) using the manufacturer’s protocol. Real-time PCR was performed using 7.5 µl of TaqMan 2× universal master mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain), 0.25 µl of primer-probe (36 µM and 8 µM for primers and probe, respectively), 6.25 µl of RNase- and DNase-free water (Applied Biosystems, Madrid, Spain), and 1 µl of sample DNA (50 ng) in a total volume of 15 µl per single tube reaction.

2.5. Statistical analyses

2.5.1. Search for polymorphisms

Thirty animals from both breeds that had extreme tenderness estimate values were selected from the 196 available. The effect of the animal on meat tenderness (maximum stress, kg/cm<sup>2</sup>) was estimated by fitting a Linear Mixed Model using the High Performance Mixed procedure (HPMIXED) in SAS (Version 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included gender (G), breed (B), diet composition (D) and the interaction of breed × diet composition (B × D) as fixed effects; the slaughter weight (SW) and slaughter age (SA) were included as covariates; and the animal (A) from which records were collected and a residual (e) were included as random effects. Heterogeneous animal variance was considered for the breed level (A ~ N(0, σ<sup>2</sup><sub>AB</sub>)) and homogeneous variance for the residual (e ~ N(0, σ<sup>2</sup>)). The equation of the model was as follows:

$$y = u + G + B + D + (B \times D) + b(SW) + b(SA) + A + e.$$

2.5.2. SNP association studies

The associations between the 8 selected polymorphisms in the *CAPN1* and *CAST* genes with tenderness were performed by fitting a Linear Mixed Model using the High Performance Mixed procedure (HPMIXED) in SAS. The model included the interaction of breed × genotype of the SNPs (B × S), the gender within breed (G(B)) and the interaction diet × breed (D × B) as fixed effects; the slaughter weight within breed (SW(B)) were included as a covariate; and the animal (A) and the residual (e) were included as random effects.

**Table 3**

Polymorphisms found in *CAPN1* and *CAST* genes from genomic DNA.

Gene	BTA	Polymorphisms	Location	Position on UMD 3.0
<i>CAPN1</i>	29	SNP	Exon 9	g.1827080G>A
		SNP ( <i>CAPN1_1</i> )		g.1827088G>C
		SNP ( <i>CAPN1_2</i> )	Exon 14	g.1843665A>G
		SNP	Intron 14	g.1843792C>T
		SNP		g.1844012C>T
<i>CAST</i>	7	SNP ( <i>CAPN1_3</i> )	Intron 17	g.1845653T>C
		SNP		g.1845679G>A
		Indel	Intron 5	g.98533776delA
		SNP		g.98533869T>C
		SNP ( <i>CAST_1</i> )		g.98533962G>C
		Indel	Intron 12	g.98545051–98545056delAACAAAC
		Indel		g.98545150delG
		SNP ( <i>CAST_4</i> )		g.98545188A>T
		SNP		g.98545109C>T
		SNP	Exon 30 (3'UTR)	g.98579573A>G
		SNP ( <i>CAST_5</i> )		g.98579663A>G
		SNP		g.98579691C>T
		SNP		g.98579763G>A
SNP		g.98579842A>G		
SNP		g.98579852C>T		
SNP		g.98579856G>A		

**Table 4**  
Polymorphisms found in *CAST* gene from cDNA.

Gene	BTA	Polymorphisms	Location	Position on UMD 3.0
CAST	7	SNP	Exon 6	g.98534197T>C
		SNP ( <i>CAST_2</i> )	Exon 7	g.98535683A>G
		SNP ( <i>CAST_3</i> )	Exon 7	g.98535716G>A
		SNP	Exon 8	g.98539771C>T
		SNP	Exon 9	g.98541469C>T
		SNP	Exon 9	g.98541475G>A
		SNP	Exon 17	g.98552479T>C
		SNP	Exon 18	g.98552563T>C
		SNP	Exon 18	g.98552569T>C
		SNP	Exon 18	g.98552572T>C
		SNP	Exon 18	g.98552575G>A
		SNP	Exon 18	g.98552605T>C
		SNP	Exon 18	g.98552614T>C
		SNP	Exon 21	g.98563530A>G
		SNP	Exon 24	g.98565117A>G
		SNP	Exon 24	g.98565154G>C
		SNP	Exon 30	g.98579573A>G
		SNP ( <i>CAST_5</i> )	Exon 30	g.98579663A>G
		SNP	Exon 30	g.98579691T>C
		SNP	Exon 30	g.98579763G>A
		SNP	Exon 30	g.98579842A>G
		SNP	Exon 30	g.98579852T>C
		SNP	Exon 30	g.98579856G>A

Heterogeneous animal variance was considered for the breed level ( $A \sim N(0, \sigma_{AB}^2)$ ) and homogeneous variance for the residual ( $e \sim N(0, \sigma^2)$ ). The equation of the model was as follows:

$$y = u + (B \times S) + G(B) + (B \times D) + b(SW(B)) + A + e.$$

To test differences between genotypes for each breed the least square means (LSMs) for each pair-wise comparison were estimated. A Bonferroni correction was applied to take into account the multiple tests. All SNPs were independently analysed with the same statistical model.

### 2.5.3. Haplotype association studies

PLINK software (Purcell et al., 2007) was used to estimate linkage disequilibrium (LD) among all pairs of the 3 and 5 SNPs of the *CAPN1* and *CAST* genes measured as  $r^2$ , the squared correlation based on genotypic allele counts. The Hardy–Weinberg equilibrium exact test values and observed and expected heterozygosities for each SNP were also calculated using PLINK. Significant SNP associations were followed up with haplotype analyses. SNPs were phased in PLINK using the expectation–maximisation (E–M) algorithm to assign individual haplotypes. Associations between the haplotypes and meat tenderness were performed using a Linear Mixed Model using the High Performance Mixed procedure (HPMIXED) in SAS. The model fitted was similar to that used for the SNP association studies, but including the breed (B) nested to the haplotype (H) effect (H(B)). Haplotypes for each individual were codified including 0, 1 or 2 to indicate the number of copies of each haplotype. The equation of the model was as follows:

$$y = u + H(B) + G(B) + (B \times D) + b(SW(B)) + A + e.$$

Only haplotypes with a frequency greater or equal than 1% were considered. To test differences between haplotypes, the least square means (LSMs) for each pair-wise comparison were estimated. A Bonferroni correction was applied to take into account the multiple tests.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polymorphisms description

The phenotypic mean values for maximum stress were  $7.22 \pm 2.09$  and  $5.40 \pm 1.69$  for the Parda de Montaña and Pirenaica breeds, respectively. Phenotypic and animal variances for meat tenderness were higher in the Parda de Montaña ( $\sigma_f^2 = 4.37$ ;  $\sigma_a^2 = 2.26$ ) than the Pirenaica breed ( $\sigma_f^2 = 2.85$ ;  $\sigma_a^2 = 0.52$ ). The residual variance was 0.83. The six fragments of *CAPN1* and *CAST* genes that contained different SNPs associated with meat tenderness in different beef cattle breeds revealed a total of 7 and 14 polymorphisms in genomic DNA, respectively (Table 3). For *CAPN1*, three SNPs were located in coding regions. Two of them were the SNPs g.1827088G>C (*CAPN1\_1*) and g.1843665G>A (*CAPN1\_2*) that were previously described by Page et al. (2002) as 316 and 530, respectively, while the third SNP was a synonymous substitution located in exon 9 (BTA29: g.1827080G>A). Both SNPs, *CAPN1\_1* and *CAPN1\_2*, and the SNP g.1845653T>C (*CAPN1\_3*), described by White et al. (2005) as 4751, were genotyped because of their association with meat tenderness in other studies. Page et al. (2004) showed an association between genotypes at the *CAPN1\_1* and *CAPN1\_2* SNPs and shear force in a *Bos taurus* crossbred population. In the *B. taurus* crossbred population, these effects were weaker, while Johnston and Graser (2010) also found weaker effects in a population of pooled temperate breeds and in a population of pooled tropical breeds. White et al. (2005) also showed that the G allele of the *CAPN1\_1* marker was associated with a higher shear force in a *Bos indicus* × *B. taurus* crossbred population. These authors also found an association between *CAPN1\_3* and tenderness in a multisire American Brahman population. Similarly, Allais et al. (2011) showed that *CAPN1\_1* A allele segregated at a low frequency in the Charolais breed (9%), as was found in our study. These authors found an association between this marker and tenderness in this breed and in Limousine cattle, showing that the G allele had a negative effect on meat tenderness.

For the *CAST* gene, none of the polymorphisms found were located in the coding region. Seven polymorphisms were located in the 3'UTR region and three of them modify putative target sites of two bovine miRNA (bta-miR-542-5p and bta-miR-488, respectively). The SNP g.98579663A>G (on BTA7 of the bovine genome assembly UMD 3.0) (*CAST\_5*) modified the putative target site for bta-miR-542-5p, as was described previously by Barendse (2002). This SNP has been associated with meat tenderness in several studies (Casas et al., 2006; Van Eenennaam et al., 2007; Johnston & Graser, 2010; Allais et al., 2011), that found the G allele to be associated with less tender meat. The g.98545188T>A polymorphism (*CAST\_4*) had not been previously described and was chosen for association analysis because of its location in the middle of the gene in intron 12. The SNP g.98533962C>G (*CAST\_1*) had been previously described by Schenkel et al. (2006) and was associated with meat tenderness, with the C allele being associated with more tender meat.

To identify possible causative mutations that alter the amino acid sequence in calpastatin, the cDNA of 8 animals were sequenced. From the sequencing of 2822 bp of cDNA, 23 SNPs were found (Table 4). Among these SNPs, the *CAST\_2* and *CAST\_3* SNPs (BTA7: g.98535683A>G and BTA7: g.98535716G>A of the bovine genome assembly UMD 3.0, respectively) were located at exon 7 and changed the amino acid sequence at positions p.Thr182Ala (*CAST\_2*) and p.Glu193Lys (*CAST\_3*) (GenBank NM\_174003). The g.98535683A>G SNP (p.Thr182Ala) was previously identified using the alignment of *CAST* sequences deposited in GenBank, but it was not characterised (Motter, Corva, Krause, Perez Cenci, & Soria, 2009). In the latter study, the authors concluded that the g.98535683A>G SNP (p.Thr182Ala) would not have any effect on *CAST* protein function, which contradicts the results of the present study (Motter et al., 2009).

### 3.2. Association analyses

Table 5 shows the genotype and allele frequencies found for each of the 8 selected SNPs in the total population and in each breed. The genotype frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium for all SNPs, except for the SNP g.1845653T>C (*CAPN1\_3*), which showed a deficit of heterozygous animals.

The association studies showed that tenderness was affected by gender in the Parda de Montaña breed and by diet between breeds (Table 6). In the Parda de Montaña breed, beef from steers was more tender than that from bulls ( $-2.12 \pm 0.53$  kg/cm<sup>2</sup>). The differences in tenderness between bulls and steers could be due to the fact that castration affects muscle fibre diversification (Brandstetter, Picard, & Geay, 1998). In the Pirenaica breed, however, beef from steers, bulls and heifers had similar tenderness values. The different effects of castration on tenderness between breeds were already reported by Mandell, Gullett, Wilton, Kemp, and Allen (1997). These authors suggested that the difference in the maturity of the bulls between breeds could be responsible for their different responses to castration. In fact, the Pirenaica breed is late-maturing, whereas the Parda de Montaña breed can be classified as intermediate-maturing (Piedrafito et al., 2003). Therefore tenderness differences between bulls and steers at the same age would be more evident in the Parda de Montaña breed, as animals were closer to maturity when full potential gender differences are expressed. There is a great controversy over the effect of the diet on meat tenderness. In this work (Table 6), we have observed that in the Parda breed, diets based on grain and milk plus grain produced more tender meat (from  $-2.83 \pm 0.44$  to  $-3.18 \pm 0.84$  kg/cm<sup>2</sup>) than that obtained under total mixed ration and pasture plus supplement. In Pirenaica, total mixed ration and grain showed higher values of meat tenderness than those of pasture plus supplement ( $-2.38 \pm 0.60$  and  $-3.36 \pm 0.59$ , respectively). Diet can affect tenderness through the type of feed or the plane of nutrition (Muir, Deaker, & Bown, 1998). According to the abovementioned review, the type of feed did not affect tenderness when the cattle had similar slaughter weights. In our study, tenderness had been corrected for slaughter weight, and therefore the observed differences were not related to this trait. In a review of Andersen (Andersen, Oksbjerg, Young, & Therkildsen, 2005), the authors stated that when there is a decreased rate of protein degradation, possibly related to the plane of nutrition, there might be an increased muscle growth but decreased tenderness. Additionally, other authors reported that diets could induce differences in intramuscular fat content (Blanco et al., 2010), which could result in different tenderness (French et al., 2000). Accordingly, in our study, the diets with higher energy concentration resulted in more tender beef, all treatments considered.

Tenderness was not affected by the *CAPN1\_1* ( $p = 0.391$ ), *CAPN1\_2* ( $p = 0.289$ ) and *CAPN1\_3* ( $p = 0.898$ ) genotypes in both breeds. This lack of association could be due to the low sample number of animals and the unbalanced number of genotypes in the studied population for *CAPN1\_1*. However, after the Bonferroni correction, the *CAST\_1* ( $p = 0.019$ ), *CAST\_2* ( $p = 0.008$ ), and *CAST\_4* ( $p = 0.011$ ) showed differences in meat tenderness between genotypes in the Parda de Montaña breed. No significant differences between genotypes were found in the Pirenaica breed (Table 7). In our study, no associations were found for the *CAST\_5* SNP. This SNP was firstly described by Barendse (2002) and has been associated with meat tenderness in several studies (Casas et al., 2006; Van Eenennaam et al., 2007; Johnston & Graser, 2010; Allais et al., 2011). Casas et al. (2006) found that the GG and GA genotypes produced less tender meat when compared with animals with the AA genotype. This significant additive effect of the G allele of *CAST\_5* has also been found in the Blonde d'Aquitaine breed, and in the CRC1 population of pooled temperate breeds and the CRC1 population of pooled tropical breeds, Charolais, Hereford, and Brahman animals. In our study, we also found a severe under-representation of animals that were homozygous for the

**Table 5**

Numbers of animals for each genotype and allelic frequencies for *CAPN1* and *CAST* genes and breeds.

SNP	Genotype	Allele	Total	Parda de Montaña	Pirenaica
			n	n	n
<i>CAPN1_1</i>	GG		170	126	43
	GA		23	17	6
	AA		0	0	0
		G	0.94	0.94	0.94
<i>CAPN1_2</i>	GG		70	61	9
	AG		87	57	29
	AA		34	21	13
		G	0.59	0.64	0.46
<i>CAPN1_3</i>	CC		33	29	4
	CT		71	43	27
	TT		90	70	20
		T	0.65	0.64	0.66
<i>CAST_1</i>	CC		93	74	18
	CG		78	52	26
	GG		23	16	7
		C	0.68	0.70	0.61
<i>CAST_2</i>	AA		83	66	17
	AG		93	65	28
	GG		20	13	7
		A	0.66	0.68	0.60
<i>CAST_3</i>	AA		4	3	1
	AG		46	33	13
	GG		146	108	38
		G	0.86	0.86	0.86
<i>CAST_4</i>	TT		102	81	21
	AT		72	48	24
	AA		21	14	A7
		T	0.71	0.73	0.63
<i>CAST_5</i>	AA		120	91	29
	AG		64	45	19
	GG		11	7	4
		A	0.77	0.79	0.74

unfavourable allele (GG;  $n = 11$ ), as was found in other previously published studies.

Table 7 shows the type III test for the fixed effect genotype  $\times$  breed and the least square means for the genotype  $\times$  breed pair-wise comparisons of the 5 *CAST* polymorphisms studied. For *CAST\_1*, the meat from animals carrying the CG genotype was 1.64 kg/cm<sup>2</sup> more tender than that from animals carrying the GG genotype. No significant differences were found when comparing CC vs. CG and CC vs. GG genotypes. For the *CAST\_2* polymorphism, the AA and AG genotypes showed higher tenderness values ( $-1.77$  kg/cm<sup>2</sup> and  $-1.80$  kg/cm<sup>2</sup>, respectively) than that of the GG genotype. No significant difference in tenderness was observed between AA and AG genotypes. Finally, for *CAST\_4* the AA genotype showed lower tenderness values than those of the AT (1.76 kg/cm<sup>2</sup>) and TT (1.58 kg/cm<sup>2</sup>) genotypes, but no significant differences in tenderness were found between the AT and TT genotypes. In our study, the genotypes GG, GG and AA for the *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4* SNPs, respectively, showed higher shear force than the other genotypes and a negative effect on meat tenderness. Similar difference estimates between genotypes were found for the three SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4*. The heterozygous genotypes, GC, GA and TA, did not show either significant differences with the CC, AA and TT genotypes for *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4*, respectively, or intermediate tenderness as was previously published as an additional effect of the *CAST* gene (Casas et al., 2006; Schenkel et al., 2006; Allais et al., 2011; Chung & Davis, 2012).

The effect observed in the current study for the *CAST\_1* G allele was higher than that found by Chung and Davis (2012) and Schenkel et al. (2006), where the effect was 0.15 and 0.17 kg/cm<sup>2</sup>, respectively. Schenkel et al. (2006) associated the *CAST\_1* SNP with shear force across days of post-mortem ageing ( $p = 0.005$ ); the CC genotype yielded beef that was more tender than the GG genotype ( $-0.32$  kg  $\pm$  0.13), and the

**Table 6**Least square means and standard error for gender (breed) and diet × breed effects in data of *M. Longissimus thoracis* shear force at 7 days of post-mortem ageing.

Effect	Breed	Level 1	Level 2	Estimate	Standard error	Adj <i>p</i> -value
Gender (breed)	Parda	Steer	Bull	−2.12	0.529	0.0018**
	Pirenaica	Steer	Bull	−0.27	0.508	1.0000
	Pirenaica	Steer	Cow	0.71	0.591	1.0000
	Pirenaica	Bull	Cow	0.98	0.505	0.5786
Diet × breed	Parda	Milk + pasture	Total mixed ration	−1.01	1.153	1.0000
	Parda	Milk + pasture	Grain	2.18	0.871	0.4063
	Parda	Milk + pasture	Milk + grain	2.70	0.986	0.2151
	Parda	Milk + pasture	Pasture + supplement	−0.65	0.940	1.0000
	Parda	Total mixed ration	Grain	3.18	0.848	0.0092**
	Parda	Total mixed ration	Milk + grain	3.71	1.205	0.0814
	Parda	Total mixed ration	Pasture + supplement	0.36	0.727	1.0000
	Parda	Grain	Milk + grain	0.52	0.939	1.0000
	Parda	Grain	Pasture + supplement	−2.83	0.441	0.0001***
	Parda	Milk + grain	Pasture + supplement	−3.35	1.003	0.0363*
	Pirenaica	Total mixed ration	Grain	0.98	0.610	1.0000
	Pirenaica	Total mixed ration	Pasture + supplement	−2.38	0.600	0.0044**
	Pirenaica	Grain	Pasture + supplement	−3.36	0.593	0.0001***

Bonferroni correction was applied.

\* *p* < 0.05.\*\* *p* < 0.01.\*\*\* *p* < 0.0001.

CG genotype had intermediate tenderness at 7 days post-mortem. Chung and Davis (2012) showed similar association results but found that the CC genotype yielded a meat more tender than the GG genotype (−1.056 kg) at 14 days post-mortem in the Hanwoo breed. In the current study, pair-wise differences between homozygous genotypes for *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4* were between 1.33 and 1.77 kg/cm<sup>2</sup> above the mean of maximum stress for the Parda de Montaña breed. Moreover, in those studies, the heterozygous genotype had intermediate tenderness, which did not occur in our study. These findings, together with the knowledge that *CAST\_1* and *CAST\_4* polymorphisms were not the causative mutations, indicate that *CAST\_2* polymorphisms could be the causative mutation of the effect found in this study.

Results from LD analyses are shown in Supplementary Table S2. It is outstanding that the analysis of LD revealed the existence of only one block of SNPs segregating jointly, constituted by the SNPs *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4* (*r*<sup>2</sup> from 0.71 to 0.88). The LD between *CAPN1* and *CAST* SNP pairs had values lower than 0.028, ranking from 0.00006 to 0.02800 (Supplementary Table S2). The joint genotype GG–GG–AA for *CAST\_1*–*CAST\_2*–*CAST\_4* SNPs was found in 19 of the 20 animals with the GG genotype for *CAST\_2*, indicating that these SNPs were in strong LD. Moreover, the effect detected for meat tenderness was the same in all three SNPs. The statistically significant SNP associations were complemented by *CAST*-specific haplotype analyses, presented in

Table 8. The haplotype analysis identified 7 and 19 haplotypes for the *CAPN1* and *CAST* genes, respectively. Five haplotypes had a frequency of more than 1% accounting for 98.97% of the total haplotypes identified for *CAPN1*. No significant associations were found for the *CAPN1* haplotypes and meat tenderness. For the *CAST* gene, 8 haplotypes had a frequency of more than 1% accounting for 94.38% of the total haplotypes. The haplotypes *h*<sub>2</sub> and *h*<sub>5</sub> showed significant associations with meat toughness. Homozygous *h*<sub>2</sub>/*h*<sub>2</sub> animals yielded beef that was less tender than that of animals with one copy (2.27 kg/cm<sup>2</sup>) or no *h*<sub>2</sub> copies (3.17 kg/cm<sup>2</sup>) (Table 8). Heterozygous animals for this haplotype had meat of greater toughness than animals with no copies (0.90 kg/cm<sup>2</sup>) but with a *p*-value of 0.07. For this haplotype, the G, G and A alleles for the *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4* SNPs, respectively, were associated with meat toughness in the SNP association analysis. Animals with one copy of the haplotype *h*<sub>5</sub> (*n* = 11) had meat of greater toughness than animals with no copies (1.96 kg/cm<sup>2</sup>). No homozygous *h*<sub>5</sub>/*h*<sub>5</sub> animals were found. This haplotype contained the C, G and T alleles for the *CAST\_1*, *CAST\_2* and *CAST\_4* SNPs, respectively, and only the *CAST\_2* polymorphisms included an allele associated with meat toughness in the SNP association analysis. These results are consistent with the results found for the SNP associations showing that the *CAST\_2* polymorphisms might be the causative mutation of the effect found in this study.

**Table 7**Type III test of the fixed effect genotype × breed and least square means and standard error for genotype × breed pair-wise comparisons of the *CAST* polymorphisms in data of *M. Longissimus thoracis* shear force at 7 days of post-mortem ageing.

SNP	F-value	Pr > F	Parda de Montaña			Pirenaica		
			Genotype			Genotype		
<i>CAST_1</i>	3.20	0.019**	CC vs. CG	CC vs. GG	CG vs. GG	CC vs. CG	CC vs. GG	CG vs. GG
			0.31 ± 0.349	−1.33 ± 0.512	−1.64 ± 0.538*	−0.02 ± 0.366	−0.98 ± 0.562	−0.96 ± 0.555
<i>CAST_2</i>	3.78	0.008***	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
			0.03 ± 0.332	−1.77 ± 0.542**	−1.80 ± 0.555**	0.11 ± 0.372	−0.90 ± 0.574	−1.01 ± 0.546
<i>CAST_3</i>	0.42	0.795	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
			0.12 ± 1.351	−0.37 ± 1.321	−0.49 ± 0.383	0.02 ± 1.376	0.08 ± 1.334	0.06 ± 0.443
<i>CAST_4</i>	3.55	0.011**	AA vs. AT	AA vs. TT	AT vs. TT	AA vs. AT	AA vs. TT	AT vs. TT
			1.76 ± 0.558*	1.58 ± 0.524*	−0.17 ± 0.351	0.89 ± 0.574	1.02 ± 0.547	0.13 ± 0.376
<i>CAST_5</i>	1.97	0.110	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
			0.28 ± 0.340	−1.27 ± 0.718	−1.55 ± 0.748	−0.06 ± 0.360	−1.27 ± 0.681	−1.20 ± 0.680

Bonferroni correction was applied.

\* *p* < 0.05.\*\* *p* < 0.02.\*\*\* *p* < 0.01.



**Table 8**

Type III test of the fixed effect haplotype (breed) and least square means and standard errors for haplotype (breed) pair-wise comparisons of the CAST haplotypes in data of *M. Longissimus thoracis* shear force at 7 days of post-mortem ageing.

Haplotype number	Haplotype	Frequency (%)	F	Pr > F	Parda de Montaña			Pirenaica		
					0 vs 1 <sup>a</sup>	1 vs 2 <sup>b</sup>	0 vs 2 <sup>c</sup>	0 vs 1	1 vs 2	0 vs 2
1	CAGTA	61.0	1.29	0.275	0.327 ± 0.569	−0.859 ± 0.412	−0.531 ± 0.704	0.444 ± 0.942	−0.180 ± 0.555	0.264 ± 1.249
2	GGGAG	13.8	2.58	0.039	−0.904 ± 0.497	−2.274 ± 1.037*	−3.178 ± 1.107**	−0.286 ± 0.623	−1.212 ± 1.092	−1.498 ± 1.346
3	GGAAA	7.7	0.2	0.897	−0.362 ± 0.525	− <sup>d</sup>	−	0.211 ± 0.653	0.229 ± 1.727	0.441 ± 1.840
4	GGGAA	3.8	1.23	0.301	−1.250 ± 0.654	0.371 ± 1.958	−0.878 ± 1.937	−0.039 ± 0.788	−	−
5	CGGTA	2.8	8.86	0.003	−1.969 ± 0.661*	−	−	−	−	−
6	GGAAG	2.8	0.04	0.963	−0.107 ± 0.689	−	−	−0.333 ± 1.502	−	−
7	CAGTG	1.5	0.93	0.395	1.178 ± 0.865	−	−	0.153 ± 1.448	−	−
8	CAATG	1.0	1.03	0.359	1.516 ± 1.080	−	−	0.510 ± 1.672	−	−

Bonferroni correction was applied.

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

<sup>a</sup> 0 vs 1: 0 copy of the haplotype versus 1 copy of the haplotype.

<sup>b</sup> 1 vs 2: 1 copy of the haplotype versus 2 copies of the haplotype.

<sup>c</sup> 0 vs 2: 0 copy of the haplotype versus 2 copies of the haplotype.

<sup>d</sup> −: This pair-wise comparison could not be analysed because there were not animals with one or two copies.

The proportion of the phenotypic variance explained by the g.98535683A>G SNP (CAST\_2) was estimated by fitting a Linear Mixed Model using the High Performance Mixed procedure (HPMIXED) previously described in the 'statistical analysis: polymorphisms search' in the **Materials and methods** section, but also including the g.98535683A>G genotype as random effect. Phenotypic, animal and g.98535683A>G variances for meat tenderness in the Parda de Montaña were 4.373, 1.908 and 0.805, respectively, while for Pirenaica were 2.854, 0.260 and 0.144. Then, the proportion of the phenotypic variance explained by the g.98535683A>G SNP was 18.41 and 5.06% for the Parda de Montaña and Pirenaica breeds, respectively.

The g.98535683A>G (CAST\_2) polymorphism was located at exon 7 and caused a change in the amino acid sequence at position 182 (NM\_174003: p.Thr182Ala); the GG genotype was found to yield beef that was less tender than the AG (−1.80 kg/cm<sup>2</sup>) and the AA (−1.77 kg/cm<sup>2</sup>) genotypes (Table 7). Thr182Ala is a non-conservative substitution located at exon 7 in a well-conserved area between mammalian species of the L domain. The function of the L domain is not clear, but it can interact with the DII-domain of calpain in its inactive calcium-free form through the amino acid sequence encoded by exons 4–7 (De Tullio et al., 2009; Melloni et al., 2006). At nanomolar concentrations of Ca<sup>2+</sup>, typical of resting cells, calpain remains inactive, but a Ca<sup>2+</sup> influx activates calpain, and the level of proteolysis or tenderisation in meat depends on the concentration of inactive calpain. The association of the still-inactive calpain with cytosolic calpastatin can regulate this concentration. This interaction is highly specific but the stability of the complex calpain–calpastatin depends on the electrostatic charges localised in the interacting regions. In this respect, the hydrophathy associated with each amino acid change ranges from −0.7 to 1.8 for Thr and Ala, respectively, on the Kyte–Doolittle scale. Furthermore, Thr is one of the phosphorylatable amino acids, and the introduction of negative phosphate groups negatively affects the stability of this interaction (De Tullio et al., 2009). The substitution of Thr (g.98535683A) for Ala (g.98535683G) could generate a more stable union between calpain and calpastatin. This is also supported by Barendse et al. (2007) who found a Pro52Leu change in the L domain that changed the hydrophathy plot of calpastatin (from 1.6 to 3.8). This amino acid change was also associated with meat tenderness, and the authors hypothesised that the change in the hydrophathy of this region could affect the strength of the binding of calpastatin to cell membranes and to calpain.

In conclusion, the CAST\_2 polymorphism was the SNP with the most significant association to meat tenderness tested in this study and with the highest genotype effects, and the GG genotype was found to yield less tender beef than the other genotypes. These results lead to the hypothesis that the CAST\_2 mutation of the CAST gene might be

responsible for the variation in meat tenderness at 7 days post-mortem observed in animals from the Parda de Montaña breed.

To confirm the effects of this new polymorphism found in the current experiment, it will be necessary to increase the number of animals analysed and to test the effect of the CAST p.Thr182Ala genotypes on the calpastatin activity by zymography or co-immunoprecipitation. The identified polymorphism may be useful for the industry as a genetic marker to identify tough meat and design adequate handling procedures for these carcasses.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.003>.

## Acknowledgements

L. P. Iguacel was supported by doctoral grant from the Aragón Government and J. K. Kirinus from "Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE-CAPEs processo número 5145-11-2)". This study was partially financed by INIA research projects (INIA-RZP-2009-005, RZP-2010-002, RTA-2010-057) and the Research Group Funds of the Aragón Government (A11 and A49).

## References

- 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). Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*, 89(1), 1–11.
- Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F., & Therkildsen, M. (2005). Feeding and meat quality – A future approach. *Meat Science*, 70(3 SPEC. ISS), 543–554.
- Barendse W. J. (2002). DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Barendse, W., Harrison, B. E., Hawken, R. J., Ferguson, D. M., Thompson, J. M., Thomas, M. B., & Bunch, R. J. (2007). Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics*, 176(4), 2601–2610.
- Blanco, M., Casasús, I., Ripoll, G., Panea, B., Albertí, P., & Joy, M. (2010). Lucerne grazing compared with concentrate-feeding slightly modifies carcass and meat quality of young bulls. *Meat Science*, 84, 545–552.
- Brandstetter, A. M., Picard, B., & Geay, Y. (1998). Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle II. Effect of castration and feeding level. *Livestock Production Science*, 53, 25–36.
- 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). Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84(3), 520–525.
- Chung, H., & Davis, M. (2012). Effects of genetic variants for the calpastatin gene on calpastatin activity and meat tenderness in Hanwoo (Korean cattle). *Meat Science*, 90(3), 711–714.
- Costello, S., O'Doherty, E., Troy, D. J., Ernst, C. W., Kim, K. S., Stapleton, P., Sweeney, T., & Mullen, A. M. (2007). Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat Science*, 75(4), 551–557.
- De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Averna, M., Antolini, R., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2009). Involvement of exon 6-mediated calpastatin

- intracellular movements in the modulation of calpain activation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(3), 182–187.
- Dekkers, J. C. (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of animal science*, 82(E-Suppl), E313–E328.
- French, P., O'Riordan, E. G., Monahan, F. J., Caffrey, P. J., Vidal, M., Mooney, M. T., Troy, D. J., & Moloney, A. P. (2000). Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Science*, 56, 173–180.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F., & Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*, 41(1), 1–26.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447–457.
- Johnston, D. J., & Graser, H. U. (2010). Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *Journal of Animal Science*, 88(6), 1917–1935.
- Juszczuk-Kubiak, E., Słoniewski, K., Oprzadek, J., Wicińska, K., Połozynowicz, J., & Rosochacki, S. (2009). The effect of polymorphisms in the intron 12 of CAST gene on meat quality of young bulls. *Animal Science Papers and Reports*, 27(4), 281–292.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43(1), S193–S201.
- Koohmaraie, M., Killefer, J., Bishop, M.D., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Arbona, J. R. (1995). Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. In A. Ouali, D. I. Demeyer, & F. J. M. Smulders (Eds.), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* (pp. 395–495).
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
- Li, J., Zhang, L. P., Gan, Q. F., Li, J. Y., Gao, H. J., Yuan, Z. R., Gao, X., Chen, J. B., & Xu, S. Z. (2010). Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in Chinese commercial cattle herds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(11), 1405–1411.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: Tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 337–347.
- Mandell, I. B., Gullett, E. A., Wilton, J. W., Kemp, R. A., & Allen, O. B. (1997). Effects of gender and breed on carcass traits, chemical composition, and palatability attributes in Hereford and Simmental bulls and steers. *Livestock Production Science*, 49(3), 235–248.
- Melloni, E., Aversa, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F., & Pontremoli, S. (2006). Association of calpastatin with inactive calpain: A novel mechanism to control the activation of the protease? *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24945–24954.
- Meuwissen, T. H. E., & Goddard, M. E. (1996). The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genetics Selection Evolution*, 28(2), 161–176.
- Miller, M. F., Huffman, K. L., Gilbert, S. Y., Hamman, L. L., & Ramsey, C. B. (1995). Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2308–2314.
- Motter, M. M., Corva, P., Krause, M., Perez Cenci, M., & Soria, L. (2009). Role of calpastatin in the variability of beef tenderness. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 20(1), 15–24.
- Muir, P. D., Deaker, J. M., & Bown, M.D. (1998). Effects of forage- and grain-based feeding systems on beef quality: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 41(4), 623–635.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Sentandreu, M.A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1), 44–58.
- Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Crawford, A.M., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W., & Smith, T. P. L. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, 80(12), 3077–3085.
- Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W., Dikeman, M. E., & Smith, T. P. L. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science*, 82(12), 3474–3481.
- Piedrafitá, J., Quintanilla, R., Sañudo, C., Olleta, J. L., Campo, M. M., Panea, B., Renand, G., Turin, F., Jabet, S., Osoro, K., Oliván, M. C., Noval, G., García, P., García, M.D., Oliver, M.A., Gispert, M., Serra, X., Espejo, M., García, S., López, M., & Izquierdo, M. (2003). Carcass quality of 10 beef cattle breeds of the Southwest of Europe in their typical production systems. *Livestock Production Science*, 82(1), 1–13.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559–575.
- Rusinov, V., Baev, V., Minkov, I. N., & Tabler, M. (2005). MicroInspector: A web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 33(Suppl. 2), W696–W700.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H., & Wilton, J. W. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84(2), 291–299.
- Soria, L. A., Corva, P.M., Hugueta, M. J., Miño, S., & Miquel, M. C. (2010). Bovine  $\mu$ -calpain (CAPN1) gene polymorphisms in Brangus and Brahman bulls. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 21(1), 61–69.
- Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E., & Thomas, M. G. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 85(4), 891–900.
- White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase, C. C., Jr., Johnson, D.D., Keele, J. W., & Smith, T. P. L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, 83(9), 2001–2008.

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 396 080**

21) Número de solicitud: 201231520

51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A23L 1/31** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22) Fecha de presentación:

**01.10.2012**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**19.02.2013**

Fecha de la concesión:

**17.12.2013**

45) Fecha de publicación de la concesión:

**26.12.2013**

73) Titular/es:

**1-CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN (C.I.T.A.)**

**(20.0%)**

**AVDA. MONTAÑANA 930**

**50059 ZARAGOZA (Zaragoza) ES;**

**2-AGENCIA ARAGONESA PARA LA  
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (ARAID)**

**(20.0%);**

**3-INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y  
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)**

**(20.0%);**

**4-ASOCIACIÓN DE CRIADORES DE RAZA  
BOVINA PARDA DE MONTAÑA (ARAPARDA)**

**(20.0%) y**

**5-ASOCIACIÓN ARAGONESA DE CRIADORES DE  
GANADO VACUNO PIRENAICO (ASAPI) (20.0%)**

72) Inventor/es:

**CALVO LACOSTA, Jorge Hugo ;**

**BLANCO ALIBÉS, Mireia;**

**IGUACEL QUINTANA, Laura;**

**SERRANO NOREÑA, M<sup>ª</sup> Magdalena ;**

**JOY TORRÉNS, Margalida;**

**PÉREZ VELASCO, Laura;**

**CASASUS PUEYO, María Isabel ;**

**RIPOLL GARCÍA, Guillermo;**

**ALBERTI LASALLE, Pere y**

**SARTO AURED, Pilar**

74) Agente/Representante:

**AZAGRA SAEZ, María Pilar**

54) Título: **PROCEDIMIENTO DE PREDICCIÓN DE DUREZA DE LA CARNE EN GANADO VACUNO**

**ES 2 396 080 B1**

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 080**

21 Número de solicitud: 201231520

57 Resumen:

Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno del tipo de los utilizados en explotaciones ganaderas bovinas para la mejora de la productividad mediante la selección de ejemplares con mejor ternera de la carne, caracterizado porque utiliza para la selección de ejemplares más aptos para el consumo, por la baja dureza de su carne, la detección de la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST).

La invención que se presenta aporta la principal ventaja de conseguir la certificación de una carne o producto cárnico más tierna, al proceder de animales que no tienen el genotipo GG, propiciando una mejora genética que permite adaptar la maduración de la carne a los distintos genotipos, posibilitando una reducción en la variabilidad en la ternera, redundando en un incremento de la rentabilidad económica de la explotación ganadera gracias a una mejor adecuación a los intereses del consumidor.

ES 2 396 080 B1

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

L. P. Iguácel<sup>1</sup>, J. H. Calvo<sup>1,2</sup>, J. K. Kirinus<sup>3</sup>, M. Serrano<sup>4</sup>, G. Ripoll<sup>1</sup>, I. Casasús<sup>1</sup>, M. Joy<sup>1</sup>, L. Pérez-Velasco<sup>1</sup>, P. Sarto<sup>1</sup>, P. Albertí<sup>1</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> CITA Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. [lpiguacel@aragon.es](mailto:lpiguacel@aragon.es) <sup>2</sup> ARAID <sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil <sup>4</sup> 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 (Koochmarai et al., 1995; Chung y Davis, 2012). En 1995, Koochmarai 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 4°C, 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 70°C). 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<sup>2</sup>). 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,  $\sigma^2AR$ )) y el residuo (e ~ N(0,  $\sigma^2e$ )). La ecuación del modelo fue la siguiente:

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

donde y es el esfuerzo (kg/cm<sup>2</sup>) (terneza),  $\mu$  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 (Mottet 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 Tullio et al. (2009) demostraron que este dominio puede interactuar 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 Sanduiche 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<sup>2</sup>).**

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<sup>2</sup>).**

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  $\mu$ - 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.





# New SNP in *CAST* gene associated with meat tenderness and frequency in different cattle breeds

L. P. Iguácel<sup>1</sup>, J.H. Calvo<sup>1,2</sup>, J. K. Kirinus<sup>4</sup>, M. Serrano<sup>3</sup>, G. Ripoll<sup>1</sup>, **I. Casasús<sup>1</sup>**,  
M. Joy<sup>1</sup>, L. Pérez-Velasco<sup>1</sup>, P. Sarto<sup>1</sup>, P. Albertí<sup>1</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> CITA, Zaragoza, Spain. <sup>2</sup> ARAID, Zaragoza, Spain. <sup>3</sup> INIA, Madrid, Spain. <sup>4</sup> Univ. Federal de Santa Maria, Brazil.

**Presenting author:** icasasus@aragon.es

**Corresponding author:** lpiguacel@aragon.es



Session 25  
Poster 32



## Introduction

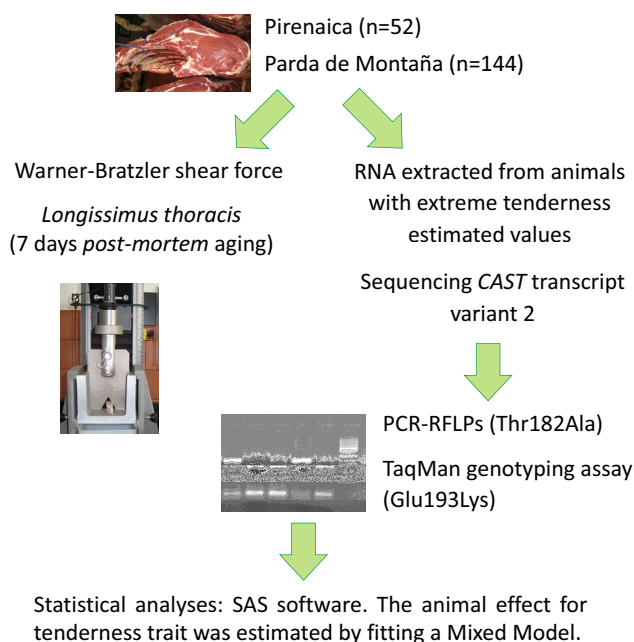
In the calpain – calpastatin system, calpain (CAPN1) is responsible for the breakdown of myofibrillar proteins while calpastatin (CAST) inhibits calpain activity and, therefore, regulates *post-mortem* proteolysis. Different SNPs in *CAPN1* and *CAST* genes have been associated with tenderness before, but not in Parda de Montaña and Pirenaica local cattle breeds.

## Objective

Evaluate the genetic effects of the new SNP found on beef tenderness and study the genotype frequencies of this mutation in several cattle breeds.

## Material and Methods

### 1. Genetic effect of a new SNP



### 2. Genotype frequency of a new SNP

- Parda de Montaña (n= 442)
- Holstein-Friesian (n= 150)
- Pirenaica (association study) (n= 52)
- Crossbreed (n=46)



## Results

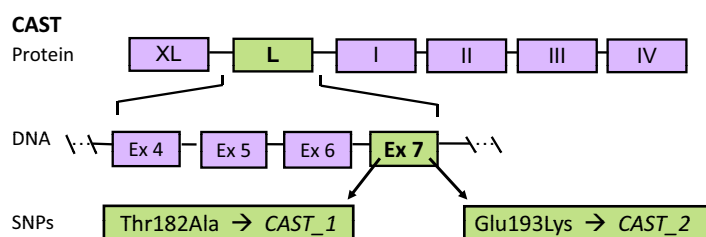
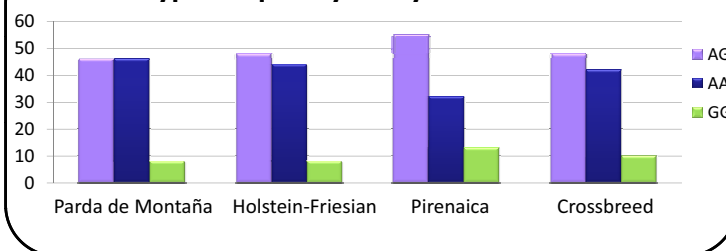


Table 1. Type III test of the fixed effect genotype x breed and LSM for genotype x breed pair-wise comparisons.

SNP	F-value	Pr>F	Parda de Montaña		
			Genotype		
			AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
CAST_1	3.78	0.008***	0.03 ± 0.332	-1.77 ± 0.542**	-1.80 ± 0.555**
CAST_2	0.42	0.795	0.12 ± 1.351	-0.37 ± 1.321	-0.49 ± 0.383

\*\*\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.02$ . Bonferroni correction was applied.

### Genotype frequency study



## Discussion and Conclusions

- ✓ For the SNP *CAST\_1*, AA and AG genotypes showed more tender meat (-1.77 kg/cm<sup>2</sup> and -1.80 kg/cm<sup>2</sup>, respectively) than GG.
- ✓ *CAST\_1* might be responsible for the variation in meat tenderness at 7 days *post-mortem* observed in animals from different breeds.
- ✓ No significant differences between genotypes were found in the Pirenaica breed, due to the small number of animals genotyped.
- ✓ L domain interacts with CAPN1, this interaction depends on the electrostatic charges in this regions. The substitution of Thr for Ala could generate a more stable union between CAPN1 and CAST.



# Characterization of 3' untranslated region (3' UTR) of *CAST* gene and its putative functional effect in beef tenderness

L. P. Iguácel<sup>1</sup>, A. Bolado-Carrancio<sup>2</sup>, I. Casasús<sup>1</sup>, M. Serrano<sup>3</sup>, J.C. Rodríguez-Rey<sup>2</sup>, M. Blanco<sup>1</sup>, J.H. Calvo<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> CITA, Zaragoza, Spain. <sup>2</sup> UC-IFIMAV, Santander, Spain. <sup>3</sup> INIA, Madrid, Spain. <sup>4</sup> ARAID, Zaragoza, Spain.



lpiгуacel@cita-aragon.es



## Introduction

The system calpain-calpastatin regulates post-mortem proteolysis and affects beef tenderness. Some SNPs in *CAST* gene located in 3'UTR have been associated with meat tenderness. However, the functional effect of these polymorphisms has not been studied.

MicroRNA (miRNA) regulate gene expression by binding to target mRNA at their UTR to degrade or to repress the translation of the transcript. miRNA could bind to the 3'UTR of *CAST* gene and could cause post-transcriptional modifications and then influence meat tenderness phenotype.

## Objective

The aim of this study was to search for polymorphisms with functional consequences in the 3' UTR analyzed region of *CAST* gene.

## Material and Methods

### 1. DNA samples



Pirenaica (n= 55)



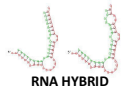
Parda de Montaña (n= 180)

### 2. Sequencing 3'UTR of *CAST* gene

### 3. Selection of main haplotypes

### 4. *In silico* analysis:

Search of putative target site for miRNA



### 5. Cloning:

Primer design and PCR of 3'UTR analyzed region of *CAST* gene



Ligation pGEM®-T Easy vector and pmirGLO vector



Transformation

*E. coli* DH-5α competent bacteria



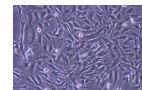
Bacterial culture

and Plasmid DNA Extraction (MINI and MIDiprep)

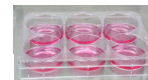


### 6. Transfection

JetPEI® transfection reagent



C2C12 cell culture



7. Dual-Luciferase® assay  
48h post-transfection

## Results

Sequencing: 8 SNPs (majority as multiSNP combinations)

- 6 SNPs modify putative target sites of three bovine miRNA (2 for bta-miR-542-5p and 1 for bta-miR-488).
- 4 main haplotypes had different minimum free energy for the different miRNAs, except for one of the bta-miR-542-5p

### Main Haplotypes of the 3' UTR of *CAST* gene

2870 2959\*2987 3059 3138 3148 3160 3161

	2870	2959*	2987	3059	3138	3148	3160	3161
H1	A	G	C	A	G	T	C	T
H2	A	G	C	G	A	T	C	C
H3	G	A	T	G	G	C	G	C
H4	G	A	T	G	G	C	C	C

\*Described by Barendse (2002)

The nucleotide positions of the SNPs are indicated according to NM\_174003.2.

### Luciferase activity means

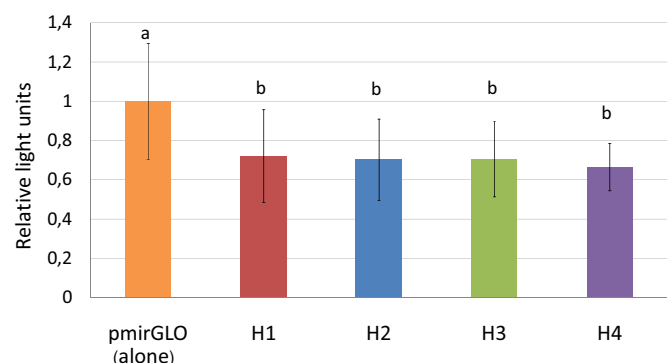


Fig.1 Transfection efficiency was normalized using *Renilla* signal. The pmirGLO vector was include as positive control. Different letter indicate significant difference (P<0.001).

## Conclusions

Despite there were no differences between haplotypes in the activity of the luciferase, their signal was ~30% lower than cell transfected with empty pmirGLO vector (alone). Thus, **the 3'UTR of *CAST* gene is an active zone**. Perhaps, different miRNA binding activities among haplotypes could be find in other conditions such as other types of cell cultures, growth mediums or using some medium additives (oleic acid, linoleic acid, vitamins, etc.).

**Acknowledgments:** L. P. Iguácel was supported by doctoral grant from the Aragon Government. This study was partially financed by INIA research projects (INIA-RZP-2009-005, RZP-2010-002, RTA-2010-057) and the Research Group Funds of the Aragón Government (A11 and A49).



# Association and functional impact of SNPs in 3'UTR CAST gene with tenderness in Parda de Montaña cattle



L. P. Iguácel<sup>a,\*</sup>, A. Bolado-Carrancio<sup>b</sup>, G. Ripoll<sup>a</sup>, P. Sarto<sup>a</sup>, D. Villalba<sup>c</sup>, M. Serrano<sup>d</sup>, J.C. Rodríguez-Rey<sup>b</sup>, M. Blanco<sup>a</sup>, I. Casasús<sup>a</sup>, J.H. Calvo<sup>a, e</sup>



<sup>a</sup> CITA, Zaragoza, Spain. <sup>b</sup> U. de Cantabria, Santander, Spain. <sup>c</sup> U. de Lleida, Lleida, Spain. <sup>d</sup> INIA, Madrid, Spain. <sup>e</sup> ARAID, Zaragoza, Spain.

\*lpiuacel@cita-aragon.es

## Introduction

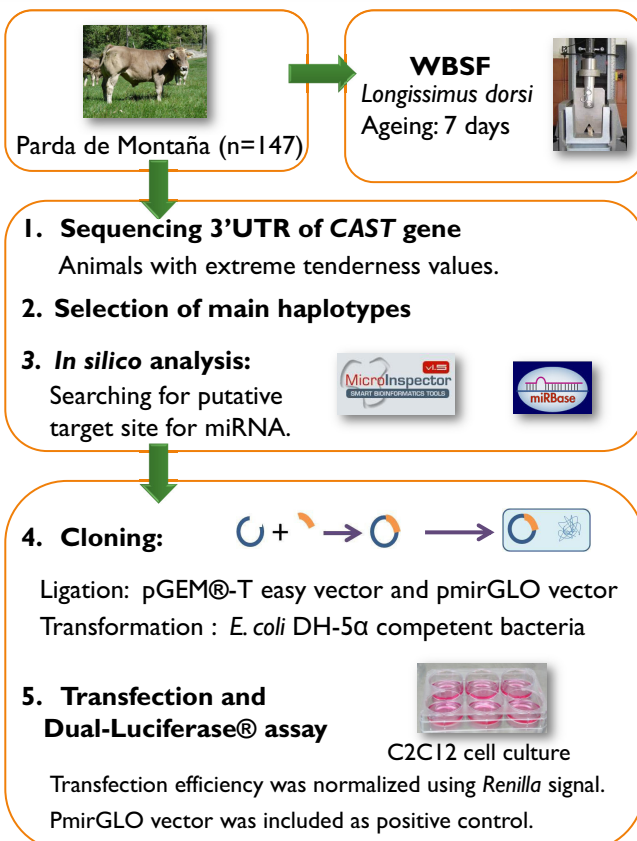
The system calpain (CAPN1) – calpastatin (CAST) regulates *post-mortem* proteolysis and affects meat tenderization. Different SNPs in the *CAST* gene have been associated with meat tenderness. The SNPs located in 3'UTR could modify the putative target site for miRNAs. However, the functional effect of these SNPs in 3'UTR has not been studied.

MiRNA can regulate gene expression by binding target mRNA at their UTR possibly causing post-transcriptional modifications, then influencing meat tenderness.

## Objetives

- ✓ Search for SNPs in the 3'UTR of *CAST* in Parda de Montaña cattle. Study the association of these SNPs and their haplotypes with meat tenderness.
- ✓ Study the functional consequences of these haplotypes using luciferase assay.

## Material and Methods



## Results

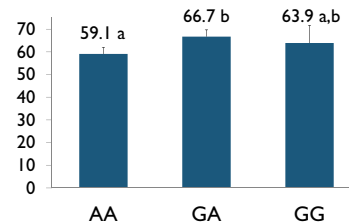
### 8 SNPs and 4 main haplotypes (H) and their association with tenderness

H	SNPs*							
	C_2870	C_2959	C_2987	C_3069	C_3138	C_3148	C_3160	C_3161
H1	A	G	C	A	G	T	C	T
H2	A	G	C	G	A	T	C	C
H3	G	A	T	G	G	C	G	C
H4	A	A	T	G	G	C	C	C

\*The nucleotide position is indicated according to NM\_174003.2.

**Haplotypes: No association**

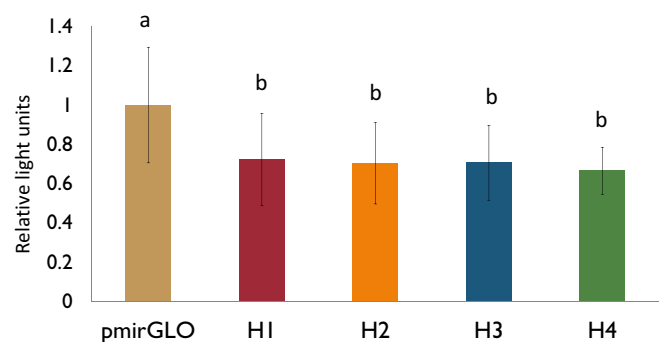
### C\_2959 (SNP g.98579663A>G)



Different letters indicate differences at P < 0.05.

**In silico analysis:**  
The SNP C\_2959 modified one putative target site for bta-miR-542-5p.

### Luciferase activity of the main haplotypes



Different letters indicate differences at P < 0.001.

## Conclusions

SNP g.98579663A>G is segregating in Parda de Montaña cattle, having A allele more tender meat than G allele.

The functionality of this haplotypes has not been demonstrated in the luciferase activity with the current conditions.

The results revealed that the 3'UTR of *CAST* gene is an active zone.



# SNPs in candidate genes for intramuscular fat in Parda de Montaña and Pirenaica beef breeds



Iguácel<sup>1\*</sup>, L.P., Calvo<sup>1,2</sup>, J. H., Sarto<sup>1</sup>, P., Ripoll, G., Villalba, D<sup>3</sup>, Casasús<sup>1</sup>, I., Serrano<sup>4</sup>, M., Blanco<sup>1</sup> †, M.

<sup>1</sup>CITA, Zaragoza, Spain. <sup>2</sup>ARAID, Zaragoza, Spain. <sup>3</sup>U.de Lleida, Lleida, Spain. <sup>4</sup>INIA, Madrid, Spain.

\*Presenting author: liguacel@cita-aragon.es † Corresponding author: mblanco@aragon.es



Consumers are concerned about the content of intramuscular fat (IMF) in meat, however, a minimum is required because it influences sensory quality traits, such as tenderness, taste and flavour.

IMF content is affected by several genes with differences among breeds. Due to its interest, there is a search for genetic markers associated to IMF deposition for the different breeds.

## Objective

Evaluate the association between IMF and 9 SNPs located in *Thyroglobulin (TG)*, *Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)*, *leptin (LEP)*, *RAR-Related Orphan Receptor C (RORC)*, *Fatty Acid Synthase (FASN)*, *Calpastatin (CAST)* and *Calpain (CAPN1)* genes in Parda de Montaña and Pirenaica beef cattle breeds.

## Material and methods

### Longissimus dorsi muscle



Parda de Montaña (n=225)

Pirenaica (n=68)

✓ IMF content (%):  
Ankom procedure

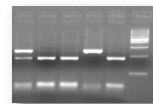


✓ SNP genotyping:  
PCR-RFLPs

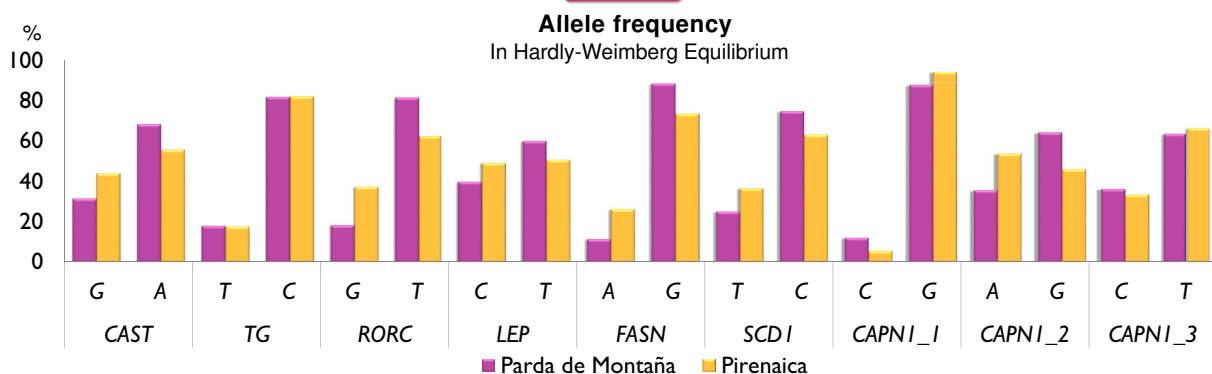
- *TG* (BTA 14: g.9509309 C>T)\*
- *SCD1* (BTA 26: g.21144730 C>T)
- *LEP* (BTA 4: g. 93261931 T>C)
- *RORC* (BTA 3: g.19010079 T>G)
- *FASN* (BTA 19: g.51402032 G>A)

- *CAST* (BTA 7: g. 98535683 A>G)
- *CAPN1\_1* (BTA 29: g.1827088 G>C)
- *CAPN1\_2* (BTA 29: g.1843665 G>A)
- *CAPN1\_3* (BTA 29: g.1845653 T>C)

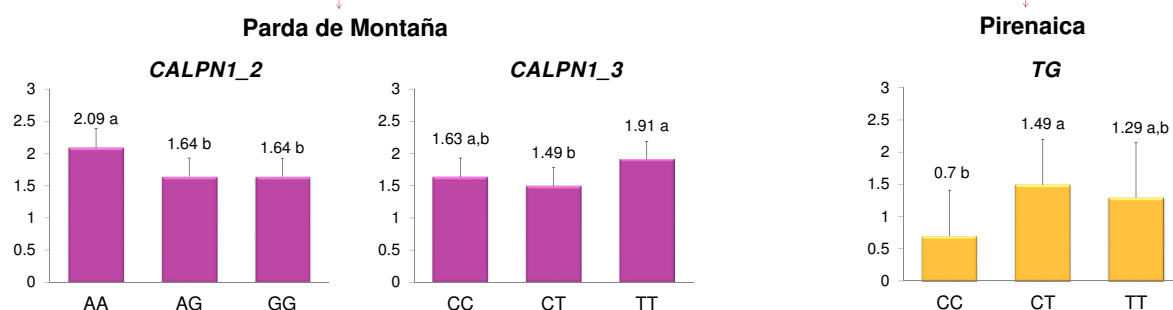
\* Position on UMD 3.0



## Results



### Association between IMF and genes



Different letters indicate differences at P < 0.05.

## Conclusions

The lack of consistent effects of the selected candidate genes on IMF content between breeds could indicate that the association between these markers and IMF content might be influenced by different genomic background of the different breeds. Thus, different markers should be used to predict IMF content in both breeds.

**Acknowledgments:** L. P. Iguácel was supported by doctoral grant from the Aragon Government. This study was partially financed by INIA (research projects RZP-2009-005, RZP-2010-002, RTA-2010-057) and the Aragón Government (Research Group Funds of A11 and A49 and projects).





