

Polimorfismos en el gen PPARGC1 α en bovinos para carne

Polymorphisms on the PPARGC1 α gene in beef cattle

Soria, L¹; Corva, P³; Papaleo Mazzuco, J²; Melucci, L³; Villarreal, E²; Mezzadra, C²;
Silvestro, C¹; Schor, A⁴

¹ Área Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
lsoria@fvet.uba.ar.

² Departamento de Producción Animal, Estación Experimental Balcarce, INTA, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

⁴ Laboratorio de Tecnología de Carnes, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Los recientes avances en el conocimiento del genoma bovino y el desarrollo de métodos moleculares, han permitido identificar regiones cromosómicas y genes asociados con caracteres de interés productivo. El gen PPARGC1 α (gen del coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos) está involucrado en la diferenciación del tipo de fibra muscular y el depósito de grasa parda. Por su rol fisiológico es considerado un candidato para terneza y contenido de grasa. Se identificaron dos polimorfismos (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*) en el exón 8 al comparar las secuencias de ADN de 24 toros de uso en IA y no relacionados, de cuatro razas diferentes (7 Angus, 9 Brangus, 6 Brahman y 2 Braford). Uno de los SNP (SNP 1181) es una sustitución no conservativa (AGT/AAT), la misma provocaría un cambio de aminoácidos en la posición 364 de la proteína (Serina/Asparagina). Se desarrolló un método de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorphism*) para genotipificar 73 toros (10 Angus, 47 Brangus, 10 Brahman y 6 Nelore) y 268 novillos (21 Angus y 247 Brangus machos castrados) con datos de engorde, sacrificio y calidad de carne. Los Angus no presentaron el alelo A. En 243 novillos Brangus, no se hallaron diferencias significativas entre los genotipos GG y AG en Peso Vivo, Espesor de Grasa Dorsal, Peso de Grasa de Riñonada, Porcentaje de Grasa de Riñonada, Terneza y Color. Coincidentemente con otras especies, el exón 8 del gen PPARGC1 α bovino es polimórfico. Si bien no se detectaron efectos sobre variables productivas, de acuerdo a estos resultados, estos SNP podrían ser útiles para estudios de composición racial y poblacionales, porque se hallaron diferencias de frecuencias alélicas entre *B. taurus* y *B. indicus*.

Palabras clave: Bovinos para carne, terneza, marcadores moleculares, SNP, PPARGC1 α

Introducción

La calidad de la carne está determinada principalmente por su composición química y por sus características organolépticas tales como terneza, jugosidad, color, olor y sabor. La terneza es uno de los atributos más exigido y valorado (Miller, 1992; Boleman *et al.*, 1997). Aunque muchas de las características relacionadas con calidad de carne son de herencia cuantitativa, es decir están bajo el control de muchos genes, existe evidencia que ciertos genes en particular explican una proporción importante de la variabilidad fenotípica de composición y calidad carnicera (Burrow *et al.*, 2001). Los genes “*candidatos*” son genes de los cuales se conoce su rol (fisiológico y bioquímico) en la determinación de un fenotipo y podrían estar involucrados en las diferencias detectadas en variables productivas, por lo que es importante identificar en ellos polimorfismos asociados con las variables en estudio (Rothschild y Soller, 1997).

El gen PPARGC1 α codifica el coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos, que es un cofactor que interviene en la transcripción de ciertos genes, entre ellos MEF2 (*Muscle Enhancer Factor*) que determina el tipo de fibra muscular (promueve la transición de fibras de tipo IIb, glicolíticas o blancas a tipo I y IIa, oxidativas y rojas). En células de tejido graso se lo relaciona con la formación de depósitos de grasa parda, porque co-activa a PPAR α , PPAR γ y hormonas tiroideas (Puigserver, *et al.*, 1998). Este gen ha sido propuesto como candidato para un QTL (*Quantitative Trait Loci*) del cromosoma 6 bovino asociado con composición de la leche. En el mismo se identificaron varios SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) y uno de ellos se halló significativamente asociado con contenido de grasa en la leche en Holstein (Weikard *et al.*, 2005). En cerdos un SNP del gen ha sido asociado con conversión, grasa abdominal y subcutánea (Stachowiak *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de nuevos SNP del gen PPARGC1 α sobre calidad de la carne en novillos Brangus engordados en condiciones típicas de la pampa húmeda Argentina.

Materiales y Métodos

Para la búsqueda de nuevos polimorfismos, a partir de la secuencia de ARNm de PPARGC1 α bovino (número de acceso al GenBank AY321517) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar cuatro regiones del gen (exones 3, 5 y 8 y región 3' no traducida -3'UTR-). Se utilizó ADN extraído de semen de toros de cuatro razas distintas: Angus (n=7), Brangus (n=9), Brahman (n=6) y Braford (n=2) para amplificar por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dichas regiones. Los productos obtenidos fueron purificados (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences) y enviados para su secuenciación automática. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante programas de alineamiento múltiple de secuencias (CAP3 y BioEdit) para identificar polimorfismos.

Se diseñó un método de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorphism*) con el primer *forward* mutado para crear un sitio de corte para la enzima *BtsI* para analizar un SNP (alelos A y G) identificado en el exón 8 (SNP 1181). Los primers fueron seleccionados a partir de la secuencia AY321517 (*Forward*: TCAGCAAGACCTCTGTGCTCAGCA y *Reverse*: TGCTCACCTCCGCGGTCTCT). Los genotipos se visualizaron en geles de agarosa al 3,5% teñidos con Bromuro de Etidio.

Se determinaron genotipos de toros Angus (n=10), Brangus (n=47), Brahman (n=10) y Nelore (n=6), todos no relacionados y de uso en IA. A partir de ADN extraído de sangre, se genotificaron novillos con datos de engorde, sacrificio y calidad de carne. Fueron 247 novillos Brangus de nueve rodeos comerciales (aportados a través de la Asociación Argentina de Brangus) y 21 novillos Angus procedentes de 2 orígenes diferentes. Todos engordados sobre pasturas polifíticas y sacrificados cuando alcanzaban un espesor de grasa dorsal de 6 mm. El período de engorde, el registro de medidas de crecimiento, la fecha y los protocolos de sacrificio y calidad de carne están descriptos en Miquel *et al* (2007) y Corva *et al* (2007).

La información de los 243 novillos Brangus fue analizada en un modelo que incluyó origen y genotipo mediante el procedimiento GLM del programa SAS (1998). Se analizaron las variables: Peso Vivo (PV, kg), Espesor de Grasa Dorsal (EGD, mm), Peso de Grasa de Riñoñada (PGR, g), Porcentaje de Grasa de Riñoñada (%GR) Terneza (Resistencia al Corte -RC, kg- determinada por cizalla de Warner Bratzler) y color (parámetros L* y b* de la escala de Hunter).

Resultados y Discusión

Se identificaron dos SNP nuevos en el exón 8 del gen PPARGC1 α por comparación de secuencias obtenidas de toros de razas distintas. Uno de los SNP corresponde a la posición 1181 de la secuencia AY321516 (SNP 1181) y es una sustitución de Guanina por Arginina en la segunda posición del codón (AGT/AAT) que corresponde al aminoácido 364 de la proteína. Dicha sustitución provocaría el cambio de Serina por Asparagina. El otro corresponde a la posición 1299 (SNP 1299) de dicha secuencia (CCA/CCT) y es una sustitución conservativa (no modifica el aminoácido).

En la Figura 1 (A y B) se presenta el resultado del alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas y se marcan con letra mayúscula los SNP identificados.

La comparación de secuencias muestra que Angus y Brahman poseen alelos diferentes en cada uno de los SNP identificados.

El Cuadro 1 resume la distribución de genotipos del SNP 1181 por raza y categoría, obtenidos por la técnica de PCR-RFLP desarrollada. No se identificó el alelo A en la raza Angus. Como no existe información disponible sobre este polimorfismo en la literatura, no es posible establecer si dicho alelo es propio de razas cebuínas o el resultado corresponde a un error de muestreo.

Los resultados del análisis de varianza se resumen en el Cuadro 2. Los genotipos GG y AG del SNP 1181 de los novillos Brangus, no presentan diferencias significativas en Peso Vivo (PV), Espesor de Grasa Dorsal (EGD), Peso de Grasa de Riñoñada (PGR), Porcentaje de Grasa de Riñoñada (%GR), Terneza (RC) y Color. En el análisis no se incluyó el genotipo AA porque sólo 4 animales presentaron este genotipo.

El SNP 1181 provocaría un cambio en el aminoácido 364 (Serina/Asparagina) relativamente conservativo, ya que ambos son aminoácidos son hidrofílicos. Esta sustitución no alteraría la estructura secundaria ni la conformación 3D predicha de la proteína, esto explicaría los resultados de la comparación de los genotipos en las variables analizadas.

El tipo de fibra tiene efecto sobre la terneza de la carne, la carne con mayor proporción de fibras oxidativas o de tipo I (rojas) es más tierna (Henckel *et al.*, 1997; Maltin *et al.*, 1997). Los parámetros L* y b* fueron considerados indicativos de tipo de fibra; sin embargo, se justificaría un análisis más sensible de tipificación histoquímica de las fibras.

A

	. : . : . : . : . : . : . :	180
1-Angus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	160
2-Angus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	154
3-Angus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	160
4-Brangus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	146
5-Brangus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	146
6-Brangus	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	146
7-Brahman	caagacctctgtgctcaccaAtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	155
8-Brahman	caagacctctgtgctcaccaAtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	154
9-Braford	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	147
AY321517	caagacctctgtgctcaccaGtggacacgaggaaggaaggccaacggcccagtcctccg	1120

B

	. : . : . : . : . : . : . :	300
1-Angus	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	280
2-Angus	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	274
3-Angus	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	280
4-Brangus	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	266
5-Brangus	tacatcacaggagctccaNgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	266
6-Brangus	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	266
7-Brahman	tacatcacaggagctccaCgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	275
8-Brahman	tacatcacaggagctccaCgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	274
9-Braford	tacatcacaggagctccaCgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	267
AY321517	tacatcacaggagctccaTgactccagacaactagaaaaataaagatgccccctcctccaa	1270

Figura 1. Alineamiento múltiple de las secuencias del exón 8 de PPARGC1 α . A: SNP 1181 (A/G) y B: SNP 1299 (T/C), la secuencia 5 posee N porque corresponde a un animal heterocigota (CT)

Cuadro 1. Distribución de animales por categoría y genotipo del SNP 1181 de PPARGC1 α

Categoría	Raza	n	AA	AG	GG
Toros	Angus	10	0	0	10
	Brahman	10	3	6	1
	Nelore	6	0	1	5
	Brangus	47	1	13	33
Novillos	Angus	21	0	0	21
	Brangus	247	4	50	193

Cuadro 2. Medias y errores estándar de cada carácter analizado según genotipo del SNP 1181 de PPARGC1 α para los novillos Brangus (n=243).

Genotipo	GG	AG
n	193	50
PV (kg)	449 \pm 3	450 \pm 6
EGD (mm)	6,62 \pm 0,12	6,45 \pm 0,22
PGR (g)	3,09 \pm 0,08	2,98 \pm 0,16
%GR	1,21 \pm 0,29	1,15 \pm 0,05
RC 1d (kg)	7,10 \pm 0,08	6,97 \pm 0,15
Color (parámetro L*)	37,70 \pm 2,12	37,72 \pm 2,25
Color (parámetro b*)	20,74 \pm 2,53	21,31 \pm 1,85

PV: Peso Vivo, EGD: Espesor de Grasa Dorsal, PGR: Peso de Grasa de Riñonada, %GR: Porcentaje de Grasa de Riñonada, RC 1d: Resistencia al Corte después de 1 día de maduración.

Conclusiones

El gen PPARGC1 α presentó polimorfismos en el exón 8, los alelos de dichos SNP presentaron diferencias en sus frecuencias en ambas poblaciones o muestras de bovinos (B. *Taurus* y B. *Indicus*) analizadas. Si bien no se han detectado efectos de estos polimorfismos en variables productivas, los mismos podrían ser útiles para análisis de composición racial y estudios poblacionales.

Literatura Citada

- Boleman SJ, Boleman SL, Miller RK, Taylor JF, Cross HR, Wheeler TL, Koohmaraie M, Shackelford SD, Miller MF, West RL, Johnson DD and JW Savell. 1997. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *J. Anim. Sci.* 75:1521.
- Burrow HM, Moore SS, Johnston DJ, Barendse W and BM Bindon. 2001. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 41: 893.
- Corva, P; Soria, L; Papaleo Mazzuco, J; Villarreal, E; A; Melucci, L; Mezzadra, C; Schor, A, Motter, M. 2007. Evaluación de marcadores moleculares asociados a diferencias en terneza de la carne de novillos Brangus. XX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Resumen enviado.
- Henckel PN, Oksberg E, Erlandsen P, Barton-Gade P and Bejerholm C. 1997. Histo- and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Sci.* 47: 311-321.
- Maltin CA, Warkup CC, Matthews KR, Grant CM Porter AD y Delday MI. 1997. Pig muscle characteristics as a source of variation en eating quality. *Meat Science* 47 (3-4): 237-248
- Miller B. 1992. Understanding consumers. *Beef today* 8:40.
- Miquel, M; Villarreal, E; Mezzadra, C; Melucci, L; Soria L; Corva, P; Schor, A . 2007. Caracteres de crecimiento y de la canal de novillos en engorde en pastoreo que discriminan genotipos del marcador CAPN1 316. XX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Resumen enviado.
- Rothschild MF and M Soller. 1997. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe.* 8:13.
- SAS 1998. Version 6. SAS Institute Inc., Cary, NC
- Stachowiak M, Szydlowski M, Cieslak J, Switonsky. 2006. SNPs in the porcine PPARGC1A gene: Interbreed differences and their phenotypic effects. *Cellular & Molecular Biology letters.* (<http://www.embl.org.pl>) DOI:10.2478/s11658-006-0066-7.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M and Spiegelman BM. 1998. A cold inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptative thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
- Weikard R, Kühn C, Goldammer T, Freyer G and Scwerin M. 2005. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization an association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol. Genomics* 21:1-13.