

## ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS GENES DE LA $\mu$ -CALPAÍNA, LA M-CALPAÍNA Y LA CALPASTATINA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL SISTEMA CALPAÍNA-CALPASTATINA EN LA RAZA RETINTA: PRIMEROS RESULTADOS

**Polvillo O.<sup>1</sup>, Juárez M.1, Avilés C.<sup>2</sup>, Azor P.J.<sup>2</sup>, Pajuelo P.<sup>1</sup>, Álvarez F.<sup>3</sup>, Pérez J.A.<sup>3</sup>, Fernández I.<sup>3</sup> y Molina A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Grupo Meragem. Departamento de Ciencias Agroforestales. E.U.I.T.A. Universidad de Sevilla. 41013 Sevilla.

<sup>2</sup> Grupo Meragem. Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba.

<sup>3</sup>Asociación Española de Criadores de Ganado Retinto. 28045 Madrid.

### INTRODUCCIÓN

Aunque el concepto de calidad de la carne es muy complejo, y muchas veces es un parámetro mercado-dependiente (Gibson y Wilton, 1998), existen diversos factores que le afectan, principalmente, el color, la jugosidad, el sabor y la terniza. Esta última es la característica más valorada por el consumidor (Boleman *et al.*, 1997) y depende principalmente de la degradación de las fibras musculares durante el proceso de maduración post mortem de la carne producida por el sistema de las calpaínas (m-calpaína, m-calpaína y p94 o calpaína 3) que son cisteínas proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Frisch y Rodríguez, 2002). De este sistema enzimático forma parte también un inhibidor específico denominado calpastatina que, en el caso de los bovinos, se ha demostrado con estudios sobre cuantificación de niveles post mortem de este inhibidor que afectan a la terniza (Parr *et al.*, 1999).

En esta comunicación se presentan los primeros resultados del análisis de la actividad in vitro de las enzimas calpaínas y calpastatina y su relación con los genotipos encontrados en la raza Retinta.

**Palabras clave:**  $\mu$ -calpaína, calpastatina, polimorfismo, Retinto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras se tomaron en matadero de los músculos Longissimus lumborum y trapecio justo tras el sacrificio. Fueron transportadas en N<sub>2</sub> líquido y conservadas a -80°C hasta su procesado.

Las enzimas  $\mu$ -calpaína, m-calpaína y calpastatina fueron extraídas a partir de una modificación del protocolo seguido por Uytterhaengen *et al.*, (1992). La medida de actividad de los isómeros de calpaínas y calpastatina se realizó mediante la medida del aumento de la absorbancia a 278 nm de acuerdo con el método de Dayton *et al.* (1976) ligeramente modificado.

Para la estimación de la textura instrumental de la carne, se determinó la resistencia máxima al corte con un texturómetro TA-XT2 (Stable Microsystems®, UK), mediante una célula de Warner-Brätzler.

El genotipo de los animales para los genes de la  $\mu$ -calpaína (CAPN1) y calpastatina (CAST) se realizó siguiendo técnicas estándar en laboratorio de genética molecular. Para una descripción de estas consultar la comunicación de Avilés *et al.* (2007).

El análisis estadístico se llevó a cabo con los correspondientes módulos del paquete informático Statistica v. 7.0 (Statsoft Inc.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 podemos observar las correlaciones existentes entre las actividades de las dos proteasas, el inhibidor de éstas, los resultados del texturómetro y los pesos de las canales. Así se puede comprobar la existencia de una correlación negativa entre las actividades enzimáticas y los resultados del texturómetro o lo que es lo mismo, conforme la actividad de los enzimas proteolíticos aumenta disminuyen los valores del texturómetro (la carne es más tierna), siendo esta correlación más acusada en la  $\mu$ - que en la m-calpaína. Esto puede explicarse por la mayor implicación en el enternecimiento de la carne que se le atribuye al primero de los enzimas según muchos autores (Khoomaraie *et al.*, 2006). Sin embargo también se observa una correlación negativa entre valores del texturómetro y actividad de la calpastatina. Este hecho podría deberse a un incremento en la actividad de la calpastatina como efecto paralelo al incremento en las calpaínas, al tratarse de

un sistema que debe mantener un equilibrio. Por otra parte también se comprueba una correlación negativa entre los valores del texturómetro y el peso de la canal por lo que se deduce que mayor a peso de ésta, menor terneza en la carne, al menos en el intervalo de edades y pesos utilizados para este estudio.

En cuanto a los enzimas, la actividad de la  $\mu$ -calpaína presenta unos valores muy bajos frente a la de la otra calpaína y frente al peso a la canal por lo que se deduce una escasa relación entre ambas calpaínas, y una escasa influencia del peso vivo sobre la actividad de esta enzima.

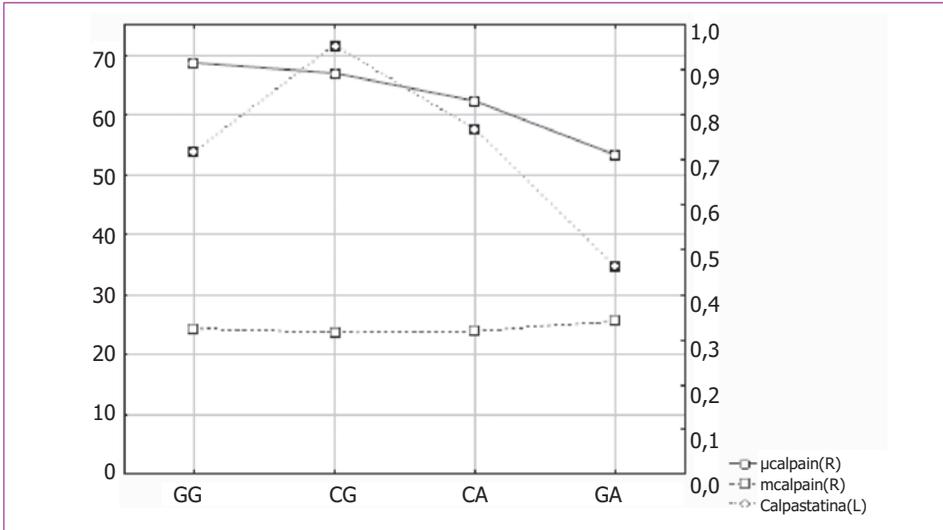
Un resultado que hay que tomar con cierta precaución es la correlación baja pero positiva de las actividades de las dos calpaínas y la calpastatina dada su función antagónica. Esto también apoyaría las tesis de los autores que afirman que ya que la m-calpaína se activa más rápidamente después del sacrificio, antes de la caída de pH incluso, es esta enzima la de mayor importancia en el proceso de la maduración.

**Tabla 1. Correlación entre la actividad de las enzimas analizadas, la terneza de la carne y el peso de la canal.**

	<i>Texturómetro</i>	<i>Actividad <math>\mu</math>-calpaína</i>	<i>Actividad m-calpaína</i>	<i>actividad calpastatina</i>	<i>Peso Canal</i>
Texturómetro	1,000	-0,231	-0,196	-0,389	-0,192
Actividad $\mu$ -calpaína	-0,231	1,000	-0,086	0,063	0,003
Actividad m-calpaína	-0,196	-0,086	1,000	0,171	0,329
Actividad calpastatina	-0,389	0,063	0,171	1,000	0,164
Peso Canal	-0,192	0,003	0,329	0,164	1,000

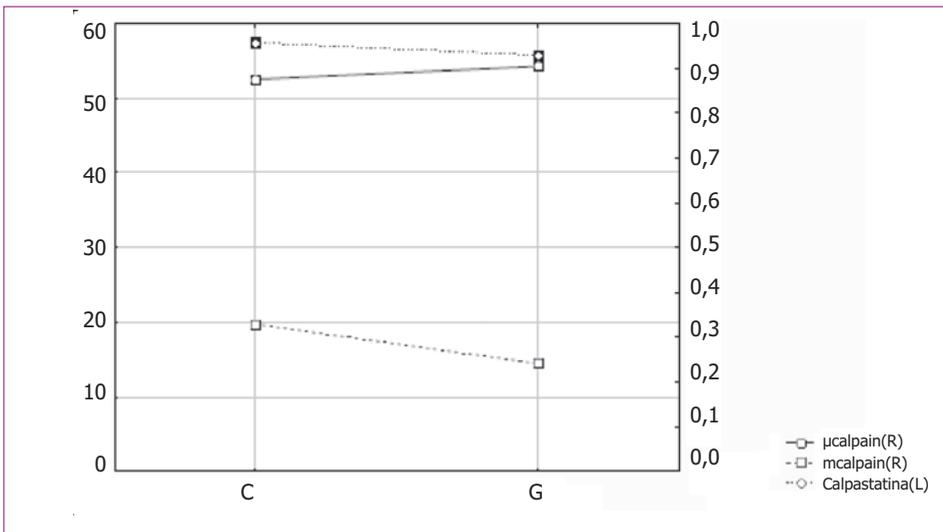
En cuanto a la relación entre la actividad de estas enzimas y el genotipo para los genes CAPN1 y CAST, se muestra en la figura 1, como el haplotipo CG del gen de la  $\mu$ -calpaína tuvo una actividad de 0,89 para la  $\mu$ -calpaína, 0,32 para la m-calpaína y 71,61% de inhibición por parte de la calpastatina. Según Schenkel *et al.* (2006) el alelo más favorable para el sitio 282 del gen CAST sería el C.

**Figura 1. Actividad enzimática de calpaína y calpastatina para haplotipos encontrados en las posiciones 5709 y 4558 en el gen CAPN1.**



La figura 2 muestra las actividades para cada alelo en la posición polimórfica del gen CAST. En este caso el alelo C tuvo una actividad de 0,87 para la  $\mu$ -calpaína, 0,33 para la m-calpaína y 57,34% de inhibición por parte de la calpastatina.

**Figura 2. Actividad enzimática de calpaína y calpastatina para SNP encontrado en la posición 282 del gen CAST.**



Se debe seguir investigando con un mayor número de animales de raza Retinta para confirmar el efecto de los haplotipos sobre el sistema enzimático y sus relaciones con la terneza, valorada tanto con el texturómetro como con un panel de análisis sensorial.

## CONCLUSIONES

Como era de esperar, la mayor actividad de la enzima  $\mu$ -calpaína se relacionó con una mayor terneza de la carne medida en texturómetro. Así mismo, también estuvo relacionado con el haplotipo CG del gen CAPN1. Por lo tanto, los primeros resultados obtenidos en la raza Retinta parecen indicar que una selección orientada a la mejora de la terneza mediante la utilización de marcadores moleculares (selección asistida por marcadores) sería viable, aunque se debe seguir investigando para asegurar que los resultados encontrados se mantienen en otras condiciones a las que han sido sometidos los animales utilizados en esta experiencia.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado parcialmente por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación a través de un estudio técnico sobre "Detección de la variabilidad de determinados genes y su relación con parámetros de calidad de la carne en las razas bovinas autóctonas maternas españolas".

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Miller, M. F., West, R. L., Johnson, D. D., and Savell, J. W. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *J. Anim. Sci.* 75: 1521-1524.
- Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M., Reville, W.J. (1976). A Ca<sup>2+</sup> activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochem.* 15, 2150-2158.
- Frisch, M. P. y Rodríguez, M. M. (2002). Terneza: una característica a tener en cuenta. *Revista del Plan Agropecuario* / 21.
- Gibson, J. P. and Wilton, J. W. (1998). Defining multiple-trait objectives for sustainable genetic improvement. *J. Anim. Sci.* 76: 2303-2307.
- 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. 52nd Meat Science and Technology Conference (ICoMST). Dublin.

Parr, T., Sensky, P. L., Scothern, G. P., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., Wood, J. D. and Warkup, C. (1999). Immunochemical study of the calpain system in porcine longissimus muscle with high and low shear force values. *Journal of Animal Science* 77 (suppl.1), 164.

Uytterhaegen, L., Claeys, E., & Demeyer, D. (1994). Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness and myofibrillar degradation and solubility. *Journal of Animal Science*, 72, 1209–1223.

Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H. and Wilton, J. W. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:291-299.