

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

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.10.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2013

71 Solicitantes:

**1-CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN (C.I.T.A.)
(20.0%)**

AVDA. MONTAÑANA 930

50059 ZARAGOZA ES;

**2-AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (ARAIID)
(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, Mª 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 A1

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.

DESCRIPCION

Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno

5 La presente memoria descriptiva se refiere, como su título indica, a un 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 calidad en su 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) y/o de la mutación genética

10 SNP98545188 (CAST2).

Antecedentes de la invención

15 En la actualidad, los consumidores de carne de vacuno demandan una carne de calidad elevada y constante, Éstos consideran como los atributos más importantes su valor nutritivo, salubridad, calidad tecnológica (color, textura,...) y características sensoriales (terneza, flavor, jugosidad, color, etc.).

La terneza de la carne se define como la facilidad de morder y masticar la carne y es la inversa de la dureza.

20 La calidad de la carne es muy compleja y está influida por múltiples factores, que además, interactúan entre ellos. Entre los factores que influyen en la calidad de la carne se pueden destacar: el manejo, la raza, el genotipo, la alimentación, el manejo previo al sacrificio y el aturcido, el método de sacrificio, el método de enfriamiento y la conservación de las canales. Aunque la satisfacción de los consumidores está basada en la palatabilidad de la carne, es decir en la combinación de sabor, jugosidad y terneza, el énfasis en las investigaciones internacionales está puesto en esta última característica, porque:

- 25 1) Los consumidores consideran a la terneza como el componente más importante de la carne.
- 2) Los consumidores pueden diferenciar la terneza y están dispuestos a pagar por ella.
- 3) El coeficiente de variación de la terneza duplica al de la jugosidad y triplica al del sabor.
- 4) Hay evidencias de que las piezas comerciales son pagadas de acuerdo a su expectativa de terneza.

30 En los últimos años se está cambiando el enfoque en la investigación en calidad de la carne para analizar cómo influye la alimentación en los mecanismos biológicos y su relación con parámetros de calidad específicos, abriendo un amplio potencial para la producción futura de diversas y específicas calidades de carne. En este sentido, la comprensión de los procesos físicos y fisiológicos, a nivel proteico y genético, que tiene lugar en el músculo, tras la muerte del animal y que conlleva la transformación del músculo en carne posibilitará nuevas estrategias de selección y nuevos marcadores indicadores de terneza de la carne.

35 Con estos antecedentes se hace necesario, por tanto, el desarrollo de estrategias que además de incrementar y/o garantizar la calidad de los productos agroalimentarios de origen animal, tales como la carne, leche etc., permita a los productores mantener una posición competitiva en el mercado, merced al valor añadido de producciones diferenciadas.

45 Una de estas estrategias propuestas por la FAIP (Farm Animal Industrial Plattform – Plataforma Industrial de Granjas para Animales) 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.

50 Esto tendrá un impacto en la caracterización de caracteres complejos, que están afectados por interacciones entre distintos genes con pequeños efectos. Un ejemplo de carácter complejo sería la terneza de la carne, que depende de las características del tejido conectivo, contenido en grasa, composición de las fibras y maduración de la carne. Todos estos factores, a su vez, son fenómenos biológicos complejos.

55 En este sentido, los factores ambientales también tienen una contribución igual a la variación de la terneza en numerosas razas de vacuno de carne. Aproximadamente el 46 % de la variación de la terneza es de origen genético y el 54 % ambiental, sin tener en cuenta el efecto de la raza. Entre razas, la variación es igual o menor que dentro de una raza. Dentro de una raza, la genética controla el 30 % de la variación de la terneza, que representa la heredabilidad (efecto de genes aditivos) de esta característica. En consecuencia, el 70% restante de la variación se explica por factores ambientales y efectos de genes no aditivos. Esto significa que, entre razas o dentro de una raza, la terneza puede ser controlada por factores ambientales, como el tiempo de engorde, la energía de la dieta, el estrés, la maduración de la canal y el método de cocción, por ejemplo. Pero además, los factores genéticos que van a determinar la terneza de la carne, si pueden ser determinados, serán susceptibles de ser seleccionados mediante técnicas de biología molecular.

60 La terneza tiene dos componentes principales: el 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). Dicha tenderización se caracteriza por la proteólisis que tiene lugar

postmortem, proceso biológico implicado en la conversión de músculo a carne. La variabilidad en las características musculares en los animales sólo explica entre un tercio y un cuarto de la variabilidad encontrada en terneza. Esto sugiere que otras características musculares, sin identificar hasta ahora, contribuyen en gran medida a la variabilidad total.

La tenderización resulta del ablandamiento de la estructura miofibrilar y es un proceso complejo, de naturaleza enzimática. Los sistemas proteolíticos más estudiados son:

- Las catepsinas, descubiertas en los años 50 por De Duve y cols (1955),
- Las calpaínas, descubiertas por Guroff en 1964 y más recientemente,
- Los proteosomas descubiertos por Wilk y Orlowski (1980), especialmente el proteosoma 20S (Sentandreu y cols., 2002).

Sin embargo, todavía no está claro el papel que juega cada una de ellas. Lo que sí resulta evidente es que diversos genotipos o variantes alélicas de determinados genes están influyendo en la terneza de la carne. Dos de estos genes, son el gen de la calpaína (CAPN1) y el de la calpastatina (CAST), objeto del presente trabajo. Diversos estudios en vacuno han puesto de manifiesto la existencia de una asociación entre la terneza de la carne y diversos polimorfismos/SNPs en estos dos genes (Barendse, 2000; Page y cols., 2002, 2004, White y cols., 2005, Casas y cols., 2006, Costello y cols., 2007; Barendse y cols., 2007; Schenkel y cols., 2006; Allais y cols., 2011).

Recientemente han aparecido dos test comerciales para detectar la presencia de estas mutaciones asociadas con la terneza de la carne:

- Genestar tenderness (Bovigen LLC Harahan), incluye la mutación de la región 3'UTR del gen, encontrada por Barendse (2002) en el gen CAST
- Igenity Tender gene (Merial Limited), incluye la mutación en el intrón 6 encontrada por Schenkel y cols. (2006) en el gen CAST

Existen algunos documentos científicos publicados, relacionados con este tipo de trabajos, además de los citados con anterioridad. De ellos el más relevante es la publicación "*Rol de la Calpastatina en la variabilidad de la Terneza de la carne Bovina*" – Motter MM., Corva P y otros (Journal of Basic and Applied Genetics (2009) 20 (1): 15-24)(ISSN:BAG 1666-0390), en la que se presenta que la calpastatina es una enzima inhibidora de las calpaínas, principales enzimas proteolíticas del músculo esquelético. Está codificada por el gen denominado calpastatina (CAST), a partir del cual se pueden expresar cuatro isoformas proteicas diferentes debido a la existencia de cuatro promotores distintos. Este gen ha sido estudiado como candidato para explicar diferencias de origen genético en la terneza de la carne de vacuno. Se han descrito varios polimorfismos del tipo SNPs en distintas regiones del gen. Algunos de ellos han sido incluidos en test comerciales por su asociación significativa con la variabilidad en terneza. Recientemente, la investigación se ha focalizado en establecer qué promotores están activos en músculo esquelético y si los mismos presentan polimorfismos funcionales que se asocien con la variabilidad en terneza.

Sin embargo, este trabajo identificó ocho SNPs mediante la comparación de secuencias de ADN y ARN mensajero disponibles en el Gen-Bank, cinco de ellos se localizan en regiones codificantes del gen, pero que por su naturaleza no tendrían efecto sobre la función de la proteína, mientras que los tres restantes se localizan en el extremo 3' no traducido, concluyendo que la mutación no tiene efecto sobre la función de la proteína, y por tanto sobre la terneza de la carne.

Descripción de la invención

Para solventar la problemática existente en la actualidad en cuanto a la predicción genética de la dureza de la carne se ha ideado el procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno objeto de la presente invención, el cual comprende la detección de la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), utilizando dicha información para la selección de ejemplares más aptos para el consumo, por la baja dureza de su carne.

Para ello, se ha aislado el SNP 98535683 de la Calpastatina (CAST) (según su posición en el mapa vacuno UMD versión 3.0: <http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/gbrowse/btauUMD3/>) segregado en las razas bovinas Parda de Montaña y Pirenaica. Este SNP se encontró asociado significativamente con la dureza de la carne para el total de animales (razas Parda de Montaña + Pirenaica; $P = 0.003$) y para la raza Parda de Montaña ($P = 0.005$), mientras que para la raza Pirenaica se encontró una tendencia ($P = 0.062$).

La significación de los análisis estadísticos al considerar toda la población (Parda y Pirenaica) se incrementa y no disminuye con respecto a analizar la raza Parda de Montaña sola. Esto sugiere que en la raza Pirenaica también tiene efecto la citada mutación, pero, debido al menor número censal disponible para esta raza, sale sólo tendencia. Concretamente, el genotipo GG del SNP98535683 presenta una asociación significativa con un incremento en la dureza de la carne, que en la población global y en Parda de Montaña es superior a una desviación estándar de la media de la dureza con respecto al genotipo AA.

Esta mutación supone un cambio aminoacídico de treonina (A) por alanina (G) en el dominio L de la proteína, que interviene en la formación del canal de calcio (Ca²⁺). Este cambio aminoacídico supone un cambio importante en la hidropaticidad de la proteína. Una vez secuenciada la totalidad de la región codante y región 3' UTR del gen en animales extremos para el carácter dureza, sólo esta mutación SNP98535683 (Thr182Ala) y la SNP98535716 (Glu193Arg) mostraron cambio aminoacídico que puede afectar a la estructura de la proteína y por lo tanto a la funcionalidad de la misma. El SNP98535716 no mostró ningún tipo de significación en los estudios de asociación.

10 Las aplicaciones potenciales más destacadas de este SNP son:

- Eliminación del alelo G y genotipo GG de los animales seleccionados como reproductores. Inclusión en los diferentes catálogos de sementales del genotipo para estos genes, incrementando el valor de este semental, y realizando selección asistida por marcadores (MAS) para determinadas líneas de animales.
- 15 • Certificación de una carne o producto cárnico más tierna, al proceder de animales que no tienen el genotipo GG.

Ventajas de la invención

20 Este procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno que se presenta aporta múltiples ventajas sobre los sistemas disponibles en la actualidad siendo la más importante conseguir la certificación de una carne o producto cárnico más tierno, al proceder de animales que no tienen el genotipo GG, propiciando una mejora genética que redundará en un incremento de la rentabilidad económica de la explotación ganadera.

25 Otra ventaja de la presente invención es que propicia una selección genética del ganado vacuno buscando animales con una carne de menor dureza y por tanto más comercializable.

Otra importante ventaja es que posibilita la optimización del tiempo óptimo de maduración de la carne para garantizar una mínima terneza. Los diferentes genotipos podrían necesitar un diferente tiempo de maduración, que actualmente se realiza de igual manera para todos los animales.

Descripción de las figuras

35 Para comprender mejor el objeto de la presente invención, en el plano anexo se ha representado una realización práctica preferencial de un procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno

En dicho plano la figura -1a- muestra la zona 3'UTR que contiene los diferentes SNPs analizados informáticamente. Subrayado aparecen los posibles sitios de unión para el micro RNA. Los SNPs se indican en negrita en el siguiente orden: SNP98579573, SNP98579663, SNP98579691, SNP98579763, SNP98579842, 40 SNP98579852 y SNP98579856.

La figura -1b- muestra la predicción en la secuencia de la región 3'UTR del gen de la calpastatina de sitios de unión para microRNAs.

45 La figura -2- muestra el alineamiento aminoacídico entre la secuencia obtenida de un animal de la raza Parda de Montaña y la secuencia consenso depositada en el GenBank de la CAST (GenBank NM_174003).

La figura -3- muestra una ampliación en la que los animales 17 y 76 son animales GG (2 bandas de 178 + 60 pb; en el gel sólo se observa la banda 178 pb) y por lo tanto genotipos asociados a una mayor dureza de la carne. Los animales 1, 2, 73, 77, 81, 82, 83 y 84 son animales heterocigotos GA (3 bandas de 238, 178 y 60 pb; en el gel sólo se observan las bandas de 238 y 178 pb). Finalmente, los animales 10, 75, 78, 79, 80, 85, 86 y 87 son animales AA (1 banda de 238 pb). En la última línea se puede ver un marcador de talla de 100 pb.

55 En la anexa Lista de secuencias se incluyen la Predicción de la secuencia aminoacídica del gen CAST que contiene la mutación Ala182Thr (SNP98535683) obtenida de un animal de la raza Parda de Montaña, la secuencia nucleotídica del cDNA del gen CAST obtenida de un animal de la raza Parda de Montaña que contiene la mutación SNP98535683 (Ala182Thr) y la secuencia nucleotídica obtenida de un animal de la raza Parda de Montaña del gen CAST que contiene la mutación SNP98545188 localizada en el intrón 12.

Realización preferente de la invención

60 El procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno, objeto de la presente invención, comprende básicamente, la detección de la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), (según su posición en el mapa vacuno UMD versión 3.0: <http://www.livestockgenomics.csiro.au/cgi-bin/gbrowse/btauUMD3/>), utilizando dicha información 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) y de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), se realiza utilizando cualquiera de las metodologías actualmente conocidas y utilizadas en laboratorio para análisis de la información genética, preparadas con las oportunas cadenas de referencia o patrones para la detección de dicha mutación genética.

Una vez detectada la existencia la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), se desechan dichos ejemplares por su tendencia a tener elevada dureza en su carne, o bien se adecúa el proceso de maduración de la carne a estas características, seleccionando por otro lado aquellos ejemplares en los que es detectada la no existencia la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), por su tendencia a tener reducida dureza en su carne.

Este procedimiento es de especial uso en la selección de ejemplares en función de la calidad de la carne en las razas de ganado vacuno Pirenaica y/o Parda de Montaña.

Para llegar a este procedimiento se ha evaluado la dureza de la carne a los 7 días tras el sacrificio, en diferentes ensayos en los que se emplearon terneros enteros, castrados y hembras de raza Parda de Montaña y Pirenaica y se sometieron a diferentes manejos de alimentación. La raza, el sexo, la alimentación, la edad y peso al sacrificio y la dureza, medida por el esfuerzo, de cada uno de los manejos están descritas en la Tabla 1. Una vez sacrificados los animales en el mismo matadero comercial bajo los mismos procedimientos se mantuvieron las canales refrigeradas durante 24 horas a 4 °C. Tras este período de refrigeración se tomaron muestras del costillar de la media canal izquierda. Se extrajo el músculo *Longissimus dorsi*, del cual se cortó un filete de 3,5 cm. Dichos filetes se maduraron en nevera a 4 °C durante 6 días para completar una maduración de 7 días. Una vez cumplido el tiempo de maduración, dichos filetes se sumergieron en un baño de agua hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C. Posteriormente se enfriaron y cortaron en, al menos, 10 paralelepípedos con sección 10 x 10 mm² y se cortaron con un Instron 5543 con célula Warner-Bratzler. Se obtuvo la medida del esfuerzo (kg/cm²). Este carácter fue medido en un total de 194 animales (Tabla1).

Tabla 1. Descripción de la raza, sexo, dieta, número de animales (n), edad y peso al sacrificio, y dureza (esfuerzo, kg/cm²) de la carne a los 7 días tras el sacrificio de los animales incluidos en el presente estudio.

raza ¹	sexo ²	dieta	n	Edad, días		Peso al sacrificio, kg		Esfuerzo, kg/cm ²	
				Media	(s.d.) ³	Media	(s.d.) ³	Media	(s.d.) ³
P	M	pienso 264 días	8	362	(5.9)	511	(24.0)	6.8	(1.31)
M									
P	M	pienso 158 días	8	362	(3.6)	489	(42.6)	5.9	(1.80)
M									
P	M	pienso 269 días	7	313	(18.5)	448	(19.9)	6.6	(1.20)
M									
P	M	pienso 226 días	7	316	(23.9)	451	(37.3)	7.2	(1.39)
M									
P	M	pienso 168 días	7	314	(36.8)	444	(20.0)	6	(1.73)
M									
P	M	pienso 124 días	7	295	(15.8)	449	(9.9)	6.8	(3.10)
M									
Pi	M	pienso 225 días	6	322	(32.1)	446	(15.0)	4.8	(1.43)
Pi	M	pienso 179 días	7	332	(23.9)	453	(14.2)	5.7	(1.50)
P	M	alfalfa + 1.8 kg/d cebada 164 días	7	350	(26.4)	444	(7.4)	7.2	(1.34)
M									
P	M	alfalfa + 1.8 kg/d cebada 91 días seguida de pienso 58 días	7	335	(17.0)	458	(17.4)	7.3	(0.94)
M									
P	C	pasto + 4.1 kg/d cebada 167 días	9	590	(30.5)	557	(37.8)	8.4	(1.85)
M									
P	C	pasto + 4.1 kg/d cebada 160 días	9	599	(14.2)	534	(37.8)	6.2	(1.84)
M									
P	M	pienso 159 días	8	439	(39.0)	491	(40.3)	6.3	(1.12)
M									
P	C	pasto + 1.8 kg/d maíz 160 días	8	569	(47.5)	502	(40.2)	7.3	(2.06)
M									

P	C	pasto + 1.8 kg/d maíz 85 días seguido de pienso 55 días	8	539	(48.4)	501	(61.8) 7.7	(1.9 4)
M								
P	C	pasto + 1.8-3.6 kg/d maíz 174 días	8	609	(16.2)	503	(44.3) 7.7	(2.0 3)
M								
Pi	C	pasto + 1.8-3.6 kg/d maíz 181 días	8	614	(19.9)	488	(52.9) 8	(2.0 7)
Pi	C	pasto + 1.8 kg/d maíz 78 días seguido de pienso 100 días	8	587	(18.6)	510	(32.6) 5.4	(0.8)
P	M	pasto + pienso 174 días	8	375	(10.8)	480	(36.3) 10.1	(1.8 5)
M								
P	M	pasto + 3 kg/d pienso 174 días	8	369	(15.4)	448	(42.8) 10.3	(1.5 2)
M								
Pi	M	pienso 132 días	7	384	(8.1)	476	(26.0) 4.7	(1.0 0)
Pi	C	pienso 174 días	7	433	(20.5)	479	(38.2) 4.8	(1.2 2)
Pi	H	pienso 187 días	7	444	(13.1)	473	(42.7) 4.1	(0.5 6)
P	M	pasto + leche 102 días	8	225	(9.9)	229	(27.2) 7.9	(0.7 2)
M								
P	M	leche + pienso 164 días	7	164	(8.6)	236	(26.6) 5.2	(1.1 9)
M								
P	M	leche 164 días seguido de pienso 41 días	7	207	(13.2)	237	(17.3) 5.2	(1.3 6)
M								

¹PM: Parda de Montaña; Pi: Pirenaica. ²M: macho entero; C: macho castrado; H: hembra. ³s.d.: desviación estándar

Mediante la metodología de modelos mixtos, que permite tener en cuenta los factores sistemáticos, fijos así como efectos aleatorios, principalmente el animal del cual se ha obtenido la muestra, se ha estimado el efecto animal de la dureza de la carne a los 7 días. Los efectos tales como edad al sacrificio, peso al sacrificio, raza, sexo, lote y alimentación se incorporaron al modelo como efectos sistemáticos, fijos o covariables según su naturaleza.

La varianza fenotípica del carácter esfuerzo de la muestra de animales analizadas es de 4.322 y la varianza debida al animal es de 1.712. Por tanto la proporción de varianza fenotípica debida al animal es de un 39.62%.

Estos resultados dieron pie a sugerir la hipótesis de una existencia de diferencias a nivel genético entre animales. Se seleccionaron 20 y 10 animales de las razas Parda de Montaña y Pirenaica respectivamente, con valores extremos para el carácter terneza:

- Parda de montaña: 10 animales entre -2.9 y -1.6 en desviaciones estándar de la media, y 10 animales entre 1.9 y 3.2 en desviaciones estándar de la media.
- Pirenaica: 5 animales entre -2.2 y -0.8 en desviaciones estándar de la media, y 5 animales entre 1.2 y 1.8 en desviaciones estándar de la media.

	CALPN			CAST			
	CALPN1	CALPN 2	CALPN3	CAST1	CAST2	CAST3	CAST4
Cebadores							
forward	ccagggcc agatggtgaa	agcgcagg gaccagtgga	gaaggccttg ggttgggatgt cggcagag	gaagtaaa gccaaag gaaca	gatgcctt gtcatccg actt	acattct ccccaca gtgcc	acattctccc cacagtgcc
reverse	cgtcgggtg tcaggtgc	tcccctgcca gtgtctgaag	aggctgg gaggggt gttctctga gtgcca	atttctct gatgggtg ctgctcact	ggactgg cagatgaa ggaaa	gacaga gtctgcgt tttgctc	gacagagtct gcgtttgctc
Tamaño PCR (pb¹)	709	787	215	408	516	375	375
Tª hibridación (°C)	62	64	74	62	62	62	62
Enzima de restricción	BtgI	PfIF1	BsaJI	Rsa I	Bse YI	TspEI	DdeI
Patrón de restricción (tamaños en pb¹)							

A		598, 182, 7			516	334, 41	247, 128
C	371, 251, 87		126, 89	408			
G	622, 87	598, 122, 60, 7		211, 197		375	375
T			215		259, 257		

En estos 30 animales se secuenciaron diferentes fragmentos de los dos genes en los que se habían descrito alelos asociados al carácter terneza en diferentes razas. En la Tabla 2 aparecen los cebadores, temperatura de hibridación y tamaño amplificado que corresponde a los fragmentos CALP1, CALP2, CALP3, CAST1, CAST2 y CAST3. En todos los casos se secuenciaron los fragmentos de ADN amplificados por los dos lados. En la Tabla 3 se pueden ver los polimorfismos encontrados así como su posible implicación biológica. La extracción de ADN se realizó mediante kits basados en columnas de sílica.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores, tamaño de PCR amplificado y temperatura de hibridación, así como la enzima de restricción utilizada y los patrones de restricción encontrados según el alelo identificado.

¹pb: pares de bases

La caracterización de los diferentes SNPs para los estudios de asociación se realizó mediante PCR-RFLPs, en los que se amplificó mediante PCR un fragmento específico que contiene el SNP, y posteriormente se digirió mediante enzimas de restricción con el objetivo de detectar mediante los diferentes patrones de restricción el genotipo para cada SNPs, tras el corrido electroforético. El SNP CAST2 fue un SNP nuevo no descrito en otros trabajos.

De este estudio se obtuvieron los siguientes resultados: en el gen de la calpaina (CALPN), sólo se encontraron dos SNPs que producían cambio aminoacídico (CALP1 y CALP2), y uno que no lo producía (CALP3). Dichos SNPs han sido descritos previamente por diversos autores.

En el gen de la Calpastaina (CAST) se encontraron 14 SNPs, de los cuáles ninguno producía cambio aminoacídico. Algunos de los SNPs encontrados habían sido previamente asociados al carácter terneza en otras razas (CAST1, CAST3 y CAST4). De los SNPs aislados de CAST destacan los que se encuentran en la región 3'UTR, algunos de los cuáles afectaban a posibles sitios de unión de un microRNA vacuno predicho informáticamente, tal y como se muestra en la Figura -1-. Los microRNAs regulan la expresión de los genes a nivel postranscripcional, impidiendo la traducción o bien favoreciendo la degradación del RNA. Recientemente se había conocido la expresión diferencial de RNA en músculo en función del genotipo encontrado en la región 3'UTR.

Por lo tanto, del total de los SNPs aislados se han genotipado 7 SNPs pertenecientes a los genes Calpaina (CALPN) y Calpastaina (CAST) en 194 animales de 2 razas diferentes: Parda de Montaña (n=143) y Pirenaica (n= 51). Los SNPs genotipados en la calpastaina fueron el CALP1 y CALP2 por el cambio aminoacídico y CALP3, porque ha sido previamente asociado con la terneza por otros autores. En cuanto a la CAST se genotiparon un SNP en cada región del gen secuenciada con excepción de la región 3'UTR que se estudiaron dos SNPs que habían sido previamente asociados con la terneza por otros autores. En la tabla 3 se puede ver la posición de la mutación dentro de cada gen.

Tabla 3. Información de los polimorfismos encontrados. En negrita aparecen la información de los SNPs genotipados, y entre paréntesis el nombre asignado a los mismos.

Gen BT	A (cromo soma)	Polimorfismo	Localiza- ción	Posición en UMD 3.0	SNP	Sustitución AA	Posible sitio de unión microRNA
CALPN	29	SNP	exón 9	1827080*	GA	Glu/Glu (silente)	
		SNP (CALP1)		1827088	GC	Gly/Ala	
		SNP (CALP2)	exón 14	1843665	AG	Ile/Val	
		SNP	intrón 14	1843792*	CT		
		SNP		1844012*	CT		
		SNP (CALP3)	intrón 19	1845653	TC		
		SNP		1845679*	GA		
CAST	7	Indel	intrón 5	98533776*	indelA		
		SNP		98533869*	TC		
		SNP (CAST1)		98533962	GC		

		indel	intrón 12	98545051-98545056*	indel AACAAAC		
		indel		98545150*	indelG		
		SNP (CAST2)		98545188*	AT		
		SNP		98545109	CT		
		SNP (CAST3)	exón 30 (3'UTR)	98579573	AG		NO ¹
		SNP (CAST4)		98579663	AG		SI ¹
		SNP		98579691	CT		SI ¹
		SNP		98579763*	GA		SI ¹
		SNP		98579842*	AG		SI ¹
		SNP		98579852*	CT		SI ¹
		SNP		98579856*	GA		SI ¹

*SNPs no descritos en la bibliografía. ¹El estudio de los posibles sitios de unión de un microRNA vacuno en la región 3'UTR del gen CAST fue predicho informáticamente.

- 5 En la Figura -1a- se muestra la zona 3'UTR que contiene los diferentes SNPs analizada informáticamente. Subrayado aparecen los posible sitio de unión para el micro RNA. Los SNPs se indican en negrita en el siguiente orden: SNP468480, SNP468508, SNP468580, SNP468659, SNP468669, y SNP468673. EN la Figura -1b- se muestra la predicción informática en la secuencia 3'UTR de sitios de unión para microRNAs.

SNP	Genotipo	Total Parda + Pirenaica	Estimador dureza (SE)	P	Parda de Montaña	Estimador dureza (SE)	P	Pirenaica	Estimador dureza (SE)	P
CALPN 1	GG	170	0.443 (0.084)	0.337	126	0.034 (0.104)	0.258	43	0.051 (0.133)	0.622
	GC	23	-0.262 (0.227)		17	-0.308 (0.283)		6	-0.132 (0.347)	
	CC	0								
CALPN 2	GG	70	0.065 (0.131)	0.470	61	0.048 (0.151)	0.909	9	0.178 (0.247)	0.190
	AG	87	-0.076 (0.117)		57	-0.046 (0.157)		29	-0.175 (0.117)	
	AA	34	0.104 (0.188)		21	-0.017 (0.258)		13	0.300 (0.331)	
CALPN 3	CC	33	0.030 (0.190)	0.725	29	0.037 (0.218)	0.935	4	-0.022 (0.417)	0.287
	CT	71	-0.038 (0.130)		43	0.010 (0.179)		27	-0.156 (0.160)	
	TT	90	0.015 (0.115)		70	-0.049 (0.141)		20	0.237 (0.186)	
CAST1	CC	93	-0.063 (0.111)	0.014	74	-0.063 (0.134)	0.054	18	-0.125 (0.190)	0.06
	CG	78	-0.122 (0.121)		52	-0.141 (0.160)		26	-0.083 (0.158)	
	GG	23	0.659 (0.222)		16	0.643 (0.288)		7	0.694 (0.305)	

								2		
CAST2	AA	21	0.789 (0.231)	0.006	14	0.836 (0.306)	0.017	7	0.694 (0.168)	0.059
	AT	71	-0.100 (0.126)		48	-0.119 (0.165)		23	-0.060 (0.168)	
	TT	102	-0.084 (0.105)		80	-0.082 (0.128)		21	-0.145 (0.177)	
CAST3	AA	12	0.265 (0.315)	0.512	7	0.124 (0.444)	0.946	5	0.461 (0.374)	0.325
	AG	95	-0.055 (0.112)		62	-0.029 (0.149)		33	-0.104 (0.145)	
	GG	88	0.030 (0.116)		74	-0.001 (0.136)		13	0.120 (0.232)	
CAST4	AA	119	-0.028 (0.098)	0.024	90	-0.007 (0.121)	0.144	28	-0.133 (0.151)	0.035
	AG	64	-0.103 (0.134)		45	0.149 (0.173)		19	0.006 (0.183)	
	GG	11	0.867 (0.323)		7	0.785 (0.438)		4	1.010 (0.399)	

Para cada SNP se realizó el siguiente análisis estadístico para estudiar la relación entre la terneza y los genotipos. Los análisis de asociación estadística se realizaron mediante el procedimiento GLM del paquete informático SPSS, utilizando el siguiente modelo:

5

$y_{ik} = \mu + r_i + g_k + (r \times g)_{ik} + \varepsilon_{ik}$, en el que:

y_{ik} = valor en desviaciones estándar de la media del efecto animal del carácter dureza de la carne a los 7 días post sacrificio

10

μ = es la media general del valor animal del carácter dureza

r_i = es el efecto de la raza (2 niveles: Parda de Montaña y Pirenaica)

g_k = es el efecto del genotipo (3 niveles)

$(r \times g)_{ik}$ = es el efecto de la interacción raza por genotipo (6 niveles)

15

ε_{ik} = es el residuo

Cuando los análisis se hicieron dentro de raza el modelo utilizado fue el siguiente:

$y_k = \mu + g_k + \varepsilon_k$

20

En la tabla 4 se pueden ver el número de individuos para cada genotipo, estimación de la dureza para cada genotipo, así como así como la significación del SNP sobre la estimación de la dureza a los 7 días. Cuando consideramos toda la población analizada no encontramos significación entre la dureza de la carne y el gen CALPN. Sin embargo encontramos tres SNPs asociados significativamente a la dureza de la carne, estando los genotipos GG, AA y GG para los SNPs CAST1, CAST2 y CAST4, respectivamente, asociados a una carne más dura.

25

Tabla 4. Número de individuos para cada genotipo, estimador animal de la dureza para cada genotipo, así como la significación del SNP sobre la estimación de la dureza a los 7 días.

30

Cuando se consideran las razas individualmente, los resultados son similares, no encontrando asociaciones significativas para el gen CALPN. Existe una pérdida de significación quizás debido al disminuir el número de muestras pero los resultados son consistentes con una implicación del gen CAST en la dureza de la carne en ambas razas. En el caso de la Parda de Montaña, sólo el CAST2 resultó significativo, mientras que en el caso de CAST1 se encontró una tendencia ($p < 0.10$). En cuanto a la raza Pirenaica, sólo el CAST4 mostró diferencias significativas mientras que el CAST1 y CAST2 mostraron tendencias ($p < 0.10$).

35

Cuando se realiza la comparación por pares de genotipos para cada SNP, se encuentran diferencias significativas entre el genotipo asociado a la dureza (GG, AA y GG para los SNPs CAST1, CAST2 y CAST4) y los genotipos heterocigoto y el otro homocigoto ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre el individuo heterocigoto y el homocigoto no asociado a la dureza.

Al realizar la comparación por pares en la raza Parda de Montaña, según la Tabla 5, el genotipo AA del SNP CAST2 mostró diferencias significativas con respecto a los otros dos genotipos, AT (0.020) y TT (0.019). En la raza Pirenaica, el genotipo GG mostró diferencias significativas con respecto a los genotipos CC (0.081) y CG (0.084) en el SNP CAST1. En el SNP CAST2, el genotipo AA mostró también diferencias significativas con respecto al genotipo TT (0.063). Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre el genotipo GG y los genotipos AG (0.080) y AA (0.030), para el SNP CAST4.

Tabla 5. Comparaciones por pares de genotipos de CAST entre el estimador animal de la dureza y los distintos genotipos basadas en las medias marginales estimadas. La diferencia de medias (SE) se expresa en valor absoluto. Se ha aplicado corrección de Bonferroni.

SNP	Genotipo	SE	P	SE	P	SE	P
		TOTAL Parda+Pirenaica		Parda de Montaña		Pirenaica	
CAST1	CC vs. GC	0.059 (0.164)	1.000	0.078 (0.209)	1.000	0.041 (0.247)	1.000
	CC vs. GG	0.722 (0.248)	0.022	0.706 (0.318)	0.083	0.819 (0.359)	0.081
	GC vs. GG	0.781 (0.253)	0.015	0.758 (0.329)	0.056	0.778 (0.344)	0.084
CAST2	AA vs. AT	0.889 (0.263)	0.008	0.956 (0.348)	0.020	0.755 (0.348)	0.105
	AA vs. TT	0.873 (0.254)	0.006	0.918 (0.331)	0.019	0.839 (0.352)	0.063
	AT vs. TT	0.017 (0.164)	1.000	0.037 (0.209)	1.000	0.084 (0.243)	1.000
CAST3	AA vs. AG	0.320 (0.334)	1.000	0.153 (0.468)	1.000	0.565 (0.401)	0.494
	AG vs. GG	0.235 (0.335)	1.000	0.125 (0.464)	1.000	0.341 (0.439)	1.000
	AG vs. GG	0.085 (0.161)	1.000	0.029 (0.202)	1.000	0.225 (0.273)	1.000
CAST4	AA vs. AG	0.075 (0.166)	1.000	0.142 (0.212)	1.000	0.139 (0.237)	1.000
	AA vs. GG	0.895 (0.338)	0.028	0.792 (0.455)	0.252	1.144 (0.426)	0.030
	AG vs. GG	0.970 (0.350)	0.023	0.934 (0.471)	0.148	1.004 (0.439)	0.080

Cuando se realizan estos análisis mediante el procedimiento proc HP MIXED (HIGH PERFORMANCE MIXED) del SAS se obtuvieron resultados similares. Con este procedimiento se llevaron a cabo dos análisis (en ambos casos con los datos completos, es decir con aquellos animales que tienen completo el genotipo de todos los SNPs, 194 animales):

1) Con todos los sistemas de alimentación utilizados: 14

2) Con los sistemas de alimentación agrupados en 3 categorías: pienso, pastoreo y mezcla completa (heno+pienso).

El resultado en cuanto a la asociación de los SNPs es igual en ambos casos (Tablas 6 y 7). La variable aleatoria animal se jerarquizó a raza para estimar la varianza animal en cada una de ellas. La varianza animal es mayor (entre 1.59 y 2.48) en la raza Parda. En la Pirenaica la varianza animal en todos los casos es muy baja, incluso menor que la residual (0.12 a 0.33). Los contrastes empleando el genotipo conjunto CAST2 (A/T)-CAST4 (A/G) indican que el genotipo asociado a un mayor valor de esfuerzo (menor ternesa) es AAGG. La mayor diferencia en los contrastes del genotipo AAGG se produce con el genotipo TTAG que sería por tanto el asociado a menor esfuerzo y por tanto mayor ternesa (Tabla 6).

Los contrastes utilizando solo el genotipo de CAST2 (A/T) muestran que el genotipo AA es el asociado a mayor esfuerzo y el TT a menor valor de esfuerzo (Tabla 6).

Tabla 6. Soluciones para los efectos fijos mediante el procedimiento proc HP MIXED (HIGH PERFORMANCE MIXED) del SAS, Test de tipo III de efectos fijos y estimaciones de los efectos del genotipo, considerando sólo el SNP CAST2 y agrupando los tratamientos de alimentación en tres grupos.

Solución para efectos fijos							
Efecto raza	alim	cast2	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
raza*alim Parda	pasto		8,5991	0,8877	176	9,69	<.0001
raza*alim Parda	pienso		6,5272	0,8111	176	8,05	<.0001
raza*alim Parda	unifeed		8,2264	1,1368	176	7,24	<.0001
raza*alim Pirenaica	pasto		14,4403	2,9928	176	4,83	<.0001
raza*alim Pirenaica	pienso		10,8802	2,4489	176	4,44	<.0001
raza*alim Pirenaica	unifeed		12,5065	2,9826	176	4,19	<.0001
cast2		AA	0	.	.	.	.
cast2		AT	-1,4889	0,412	176	-3,61	0,0004
cast2		TT	-1,4198	0,3924	176	-3,62	0,0004
edasac*raza Pard	a		-0,00695	0,002949	176	-2,36	0,0196
edasac*raza Piren	aica		-0,00268	0,003929	176	-0,68	0,4954
pesosac*raza Pard	a		0,008836	0,003087	176	2,86	0,0047
pesosac*raza Piren	aica		-0,00788	0,004955	176	-1,59	0,1138

Test de tipo III de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
raza*alim	5	176	5,83	<.0001
cast2	2	176	7,34	0,0009
edasac*raza	2	176	3,02	0,0512
pesosac*raza	2	176	5,4	0,0053

Estimaciones					
Etiqueta Es	timador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
AA-TT	1,4889	0,412	176	3,61	0,0004
AA-AT	1,4198	0,3924	176	3,62	0,0004
AT-TT	-0,06908	0,2666	176	-0,26	0,7959

5

Tabla 7. Test de tipo III de efectos fijos y estimaciones de los efectos del genotipo mediante el procedimiento proc HP MIXED (HIGH PERFORMANCE MIXED) del SAS, considerando los SNPs CAST2 y CAST4 y agrupando los tratamientos de alimentación en tres grupos.

Test de tipo III de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
raza*alim	5	171	7,55	<.0001
cast2*cast4	7	171	4,11	0,0003
edasac*raza	2	171	4,62	0,0111
pesosac*raza	2	171	4,85	0,009

10

Estimaciones					
Etiqueta Es	timador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t
AAGG-TTAG	3,4014	0,7059	171	4,82	<.0001
AAGG-ATGG	3,3725	1,051	171	3,21	0,0016
AAGG-ATAA	2,5360	0,6482	171	3,91	0,0001

AAGG-ATAG	2,1902	0,6207	171	3,53	0,0005
AAGG-TTAA	2,1245	0,5831	171	3,64	0,0004
AAAA-TTAG	2,0376	1,0285	171	1,98	0,0492
AAAG-AAGG	-1,6587	0,7438	171	-2,23	0,0271
AAAG-TTAG	1,7427	0,6746	171	2,58	0,0106
ATAG-TTAG	1,2112	0,5316	171	2,28	0,0239
TTAA-TTAG	1,2769	0,4822	171	2,65	0,0089
AAAG-ATGG	1,7138	1,0369	171	1,65	0,1002
ATAA-TTAG	0,8653	0,5521	171	1,57	0,1189
AAAA-ATGG	2,0087	1,3178	171	1,52	0,1293
AAAG-ATAA	0,8773	0,6085	171	1,44	0,1512
ATGG-TTAA	-1,248	0,9282	171	-1,34	0,1806
ATAG-ATGG	1,1823	0,9515	171	1,24	0,2158
AAAA-AAGG	-1,3638	1,1178	171	-1,22	0,2241
AAAA-ATAA	1,1722	0,9812	171	1,19	0,2339
ATAA-TTAA	-0,4115	0,3741	171	-1,1	0,2728
AAAG-ATAG	0,5315	0,6026	171	0,88	0,379
ATAA-ATGG	0,8364	0,9712	171	0,86	0,3903
AAAA-ATAG	0,8264	0,9787	171	0,84	0,3996
ATAA-ATAG	-0,3458	0,4109	171	-0,84	0,4012
AAAG-TTAA	0,4658	0,5622	171	0,83	0,4085
AAAA-TTAA	0,7607	0,9553	171	0,8	0,427
AAAA-AAAG	0,2949	1,0834	171	0,27	0,7858
ATAG-TTAA	-0,06573	0,3194	171	-0,21	0,8372
ATGG-TTAG	0,02891	1,004	171	0,03	0,9771

Resumiendo, podemos decir que hemos encontrado una mayor significación en el SNP CAST2, localizado en el intrón 12 del gen, seguido por el SNP CAST4, localizado en la región 3'UTR del gen. El SNP CAST2 que está situado en el intrón y no codifica para proteína, no sería el responsable del efecto sobre la terneza. De esta forma sería un SNP no estudiado en esta primera aproximación, o el SNP CAST4, que modifica un sitio de unión a un posible microRNA o que puede alterar la estabilidad del RNA, los que tendrían efecto sobre el carácter. Además, la falta de significación del SNP CAST4 en la raza Parda de Montaña y la mayor significación del CAST2 en los análisis globales hace pensar, que este SNP no es el responsable de la mayor parte del efecto encontrado sobre el carácter, y que posiblemente existirá otro/s SNPs que puedan influir sobre el carácter en las razas estudiadas.

Por este motivo se procedió a la búsqueda de otros SNPs que tuvieran un efecto importante sobre la proteína. Para ello se secuenció el RNA del transcrito 2 del gen (GenBank acc. nº NM_174003), que incluye toda la región codante y 715 pb de la región 3'UTR del gen. Los cebadores, condiciones y tamaños amplificados aparecen en la tabla 8, y se diseñaron de forma que amplificasen fragmentos solapados informáticamente.

Tabla 8. Secuencia de los cebadores, tamaño de PCR amplificado y temperatura de hibridación (tª), de los fragmentos utilizados para aislar el RNA completo del gen CAST

Fragmentos CAST	Cebadores Ta	maño (pb)	tª (°C)
1	Forward: CAGAAGCCAAGGCTATTCCA Reverse: TGGCATCCTTTTCCACTTTC	855	53
2	Forward: GATGCCTTGTCATCCGACTT Reverse: AGGCTTCAACAGCATCGTCT	616	55
3	Forward: AGCCCCTGAGTGAATCAGAA Reverse: TGGAAGCAGGCTTCTTGCT	969	53
4	Forward: GTCCTCCTCGATGCTCTGTC Reverse: TCAGCTTTTGGCTTGGAAGT	602	55
5	Forward: GGAAAGCAAAGGATTCCACA Reverse: TGAGGCATCGTTTCCAAAT	426	55

6

Forward: ACATTCTCCCCACAGTGCC
Reverse: GACAGAGTCTGCGTTTTGCTC

375

62

En total se secuenciaron 2822 pb de cDNA, en 8 animales de los que se disponía RNA. La elección de estos animales fue en función de su genotipo para los SNPs CAST2 y CAST4, y del estimador de su dureza, y de que se dispusiese de muestra de RNA: 1 AAGG (Pirenaica), 1 AAAG (Parda), 1 ATGG (Parda), 1 AAAA (Parda), 2 ATAG (Parda y Pirenaica), 2 TTAA(1 Parda y 1 Pirenaica)

Para ello, se extrajo el RNA de músculo utilizando el reactivo TRI-REAGENT. El 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. El tejido se disgregó y se homogenizó utilizando el homogenizador *OMNITIP*. Después de extracción de mRNA, se determinó la cantidad y la calidad del mismo, mediante la cuantificación de la densidad óptica a 260 y 280 nm en un nanoespectrofotómetro (*Implegene*).

La síntesis de cDNA se llevo a cabo utilizando el kit SuperScript III First- Strand SuperMix (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente a la RT-PCR se hizo un tratamiento con DNasa. Se prepararon tubos por duplicado y se utilizaron controles positivos y negativos de la transcriptasa reversa con el fin de detectar posibles contaminaciones. Este cDNA fue el que se utilizó para la secuenciación.

Se han encontrado 23 SNPs de los cuales 16 estaban situados en zona codante (Tabla 9). De estos 16 SNPs, 14 fueron silentes, ya que cambiaron el tercer nucleótido del triplete que codifica para un aminoácido. Igualmente, se encontraron los SNPs aislados en la zona 3'UTR descrita con anterioridad. 2 SNPs situados en el exón 7 producen un cambio aminoacídico de Ala182Thr (SNP98535683) y Glu193Arg (SNP98535716) (El cambio aminoacídico se indica en relación a la secuencia proteica depositada en el GenBank NM_174003) (Figura 2).

Tabla 9. Información de los polimorfismos encontrados tras la secuenciación del cDNA.

Gen BT	A cromosoma	Polimorfismo	Localización	Posición en UMD 3.0	SNP	Sustitución AA
CAST	7	SNP	exón 6	98534197	TC	Silente
		SNP	exón 7	98535683	AG	Ala/Thr
		SNP	exón 7	98535716	GA	Glu/Arg
		SNP	exón 8	98539771	CT	Silente
		SNP	exón 9	98541469	CT	Silente
		SNP	exón 9	98541475	GA	Silente
		SNP	exón 17	98552479	TC	Silente
		SNP	exón 18	98552563	TC	Silente
		SNP	exón 18	98552569	TC	Silente
		SNP	exón 18	98552572	TC	Silente
		SNP	exón 18	98552575	GA	Silente
		SNP	exón 18	98552605	TC	Silente
		SNP	exón 18	98552614	TC	Silente
		SNP	exón 21	98563530	AG	Silente
		SNP	exón 24	98565117	AG	Silente
		SNP	exón 24	98565154	GC	Silente
		SNP (CAST3)	exón 30	98579573	AG	3'UTR
		SNP (CAST4)	exón 30	98579663	AG	3'UTR
		SNP	exón 30	98579691	CT	3'UTR
		SNP	exón 30	98579763*	GA	3'UTR
		SNP	exón 30	98579842*	AG	3'UTR
		SNP	exón 30	98579852*	CT	3'UTR
		SNP	exón 30	98579856*	GA	3'UTR

En la Figura -2- se muestra el alineamiento aminoacídico entre la secuencia obtenida de un animal de la raza Parda de Montaña y la secuencia consenso depositada en el GenBank de la CAST (GenBank NM_174003).

Estas sustituciones aminoacídicas no se habían descrito hasta el momento segregando en ninguna raza bovina. Sin embargo, el SNP98535683 había sido identificado mediante análisis bioinformático a través del alineamiento de las secuencias de DNA y RNA descritas en las bases de datos del GenBank (Mottet et al., 2009). Sin embargo, los autores de dicha publicación asumen que éste SNP no tendría efecto sobre la funcionalidad de la proteína y por lo tanto sobre la dureza de la carne. El punto isoeléctrico de la proteína fue de 5.606 y 5.539 de para la proteína AK (Parda) y TE (consenso) respectivamente (pI medio). Los estudios de hidropaticidad mostraron un pequeño cambio en la representación gráfica de la misma (Kyte-Doolittle Plot). A nivel individual, la hidropaticidad asociada con cada posible cambio aminoacídico fue de -0,7 a 1.8 para la sustitución Thr182Ala, y de -3.5 a -4.5 para Glu193Arg. La calpastatina presenta un dominio denominado L, relacionado con la formación del canal de calcio (Ca2+) en la región amino terminal, y 4 dominios que se repiten (I, II, III, IV), que son los que

tienen actividad de inhibición de la calpaina. Los polimorfismos encontrados afectan al dominio L de la proteína, en el cual ya se conocía una substitución aminoacídica (Pro53Leu) que asociaron al carácter terneza. El dominio L no tiene acción directa sobre las calpainas, pero determina la localización de la enzima en la célula. Según estudios realizados en músculo cardíaco de cerdo, dicho dominio actúa reprimiendo parcialmente la entrada de Ca^{2+} a la célula.

Debido al posible efecto de estas sustituciones aminoacídicas en la actividad de la proteína, se diseñaron nuevos cebadores a partir del genoma vacuno vs UMD3.0, que nos permitiera genotipar dichos SNPs. El SNP 98535683 (Thr182Ala en relación a la secuencia proteica depositada en el GenBank NM_174003) se genotipo mediante PCR-RFLPs. Se diseñaron cebadores específicos que amplificaban una región de 238 pb que contiene la mutación: TGCATCATGTCCAGCAGA y CACGTGTGCTCACCTTGTCAGCTGGTA. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μl conteniendo 7 pmol de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 2.2mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 1 U Taq polimerasa (Certam-Biotoools). Se realizaron 35 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 s, de hibridación a 55°C durante 45 s, y de extensión a 72°C durante 45 s. La digestión se realizó mediante la digestión del fragmento amplificado mediante la enzima de restricción HhaI. Los fragmentos de restricción obtenidos tras incubación a 37°C toda la noche con la enzima HhaI fueron de 238 pb para el alelo A y de 178 y 60 pb para el alelo G, tal y como se recoge en la Figura -3-.

En dicha Figura -3- los animales 17 y 76 son animales GG (2 bandas de 178 + 60 pb; en el gel sólo se observa la banda 178 pb) y por lo tanto genotipos asociados a una mayor dureza de la carne. Los animales 1,2, 73, 77, 81, 82, 83 y 84 son animales heterocigotos GA (3 bandas de 238, 178 y 60 pb; en el gel sólo se observan las bandas de 238 y 178 pb). Finalmente, los animales 10, 75, 78, 79, 80, 85, 86 y 87 son animales homocigotos para el alelo A (1 banda de 238 pb). En la última línea se puede ver un marcador de talla de 100 pb (Biotoools)

Debido a la no existencia de una enzima de restricción que permitiese genotipar el SNP98535716 (Glu193Arg), se realizó su genotipado mediante discriminación alélicas utilizando sondas taqman y un termociclador a tiempo real. Los cebadores y sondas específicas utilizados fueron diseñados a partir de la aplicación de Applied biosystems "TaqMan SNP genotyping assays", y fueron los siguientes: GATCTCCGGTGGTGGAAAGAG y ACGTGTGCTCACCTTGTCAC, mientras que las sondas específicas para cada uno de los dos alelos fueron VIC-ATCTGCCGAACCAGC y FAM- ATCTGCCAAACCAGC. La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando 7.5 μl de TaqMan 2 $\times$ universal master mix, 0.25 μl de los cebadores/sondas (36 μM y 8 μM , respectivamente), 6.25 μl de agua ultrapura libre de RNasas and DNasas, y 1 μl DNA (50 ng) en un volumen final de 15 μl .

Los análisis de asociación estadística se realizaron informáticamente utilizando el siguiente modelo:

$$y_{ik} = \mu + r_i + g_k + (r \times g)_{ik} + \varepsilon_{ik}, \text{ en el que:}$$

y_{ik} = valor en desviaciones estándar de la media del efecto animal del carácter dureza de la carne a los 7 días post sacrificio

μ = es la media general del valor animal del carácter dureza

r_i = es el efecto de la raza (2 niveles: Parda de Montaña y Pirenaica)

g_k = es el efecto del genotipo (3 niveles: GG, AG, y AA)

$(r \times g)_{ik}$ = es el efecto de la interacción raza por genotipo (6 niveles)

ε_{ik} = es el residuo

Cuando los análisis se hicieron dentro de raza el modelo utilizado fue el siguiente:

$$y_k = \mu + g_k + \varepsilon_k$$

Los resultados mostraron unas frecuencias alélicas que vienen resumidas en la tabla 10, y que permitieron llevar a cabo los análisis de asociación. Los dos SNPs se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 10. Frecuencias alélicas del alelo menos frecuente para los SNPs 98535683 y 98535716 localizados en el exón 7 del gen CAST.

	SNP 98535683 (Thr182Ala)	SNP98535716 (Glu193Arg)
	p(G)	p(A)
Total	0.33	0.14
Parda	0.32	0.14
Pirenaica	0.40	0.14

En la tabla 11 se puede ver la frecuencia, el número de individuos para cada genotipo, estimación de la dureza para cada genotipo, así como así como la significación del SNP sobre la estimación de la dureza a los 7 días. Los análisis estadísticos no mostraron ningún efecto significativo de la raza ni de la interacción de esta con el genotipo en el análisis global de los datos. El SNP 98535683 (Thr182Ala) resultó altamente significativo para el

total de animales (0.003) y para la raza Parda de Montaña (0.005), mientras que para la raza Pirenaica se encontró una tendencia (0.062). Aunque en Pirenaica sólo se ha encontrado una tendencia, la significación de los análisis estadísticos al considerar toda la población (Parda y Pirenaica), se incrementa y no disminuye con respecto a analizar la raza Parda de Montaña sola. Estos resultados sugieren que en la raza Pirenaica también tiene efecto la citada mutación, pero debido al pequeño número censal sale sólo tendencia.

Tabla 11. Número de individuos para cada genotipo, estimador animal de la dureza para los SNPs 98535683 y 98535716 localizados en el exón 7 del gen CAST, así como la significación del SNP sobre la estimación de la dureza SE a los 7 días.

SNP	Geno	tipo	Total	Dureza	P	Parda	Dureza	P	Pirenaica	Dureza	P
			Parda + Pirenaica	(SE)		de Montaña	(SE)			(SE)	
SNP	AA		83	-0.139		65	-0.176		17	-0.067	
98535683				(0.115)			(0.140)			(0.196)	
Thr182Ala	AG		92	-0.057		65	-0.031		27	-0.122	
				(0.110)			(0.140)			(0.155)	
	GG		20	0.865	0.003	13	0.957	0.005	7	0.694	0.062
				(0.235)			(0.314)			(0.305)	
SNP	AA		4	0.343		3	0.497		1	-0.118	
98535716				(0.547)			(0.678)			(0.855)	
Glu193Arg	AG		46	-0.075		33	-0.106		12	0.008	
				(0.163)			(0.204)			(0.247)	
	GG		145	0.021	0.820	107	0.015	0.792	38	0.012	0.989
				(0.091)			(0.114)			(0.139)	

El SNP98535716 (Glu193Arg) no mostró ningún tipo de asociación. Estos resultados están en concordancia con el efecto sobre la hidropaticidad de la proteína que se incrementaría en el caso de la proteína con el aminoácido Ala (alelo G del SNP98535683) y que podría afectar a la funcionalidad del dominio L de la proteína en la formación del canal de Ca²⁺. Además, la mayor significación estadística encontrada con SNP 98535683 (Thr182Ala), con respecto a los otros SNPs (CAST1, CAST2, CAST3, y CAST4) encontrados tanto para la población total como para la Parda de Montaña, nos hace pensar en que este es el SNP responsable de la mayor dureza de la carne.

Al realizar la comparación por pares, según la Tabla 12, el genotipo GG presenta diferencias significativas de 1.004 y 0.923 en desviaciones estándar de la media de la dureza con respecto a los genotipos AA (P=0.004) y AG (P=0.004), respectivamente. En cuanto a la raza Parda de Montaña, el genotipo GG presenta diferencias significativas de 1.133 y 0.988 en desviaciones estándar de la media de la dureza con respecto a los genotipos AA (P=0.004) y AG (P=0.014), respectivamente. Finalmente, en la raza Pirenaica, el genotipo GG presenta una tendencia con respecto al AG (P=0.063). En esta raza, las diferencias entre el genotipo GG y el AA y AG fueron 0.761 y 0.816 en desviaciones estándar de la media de la dureza.

Tabla 12. Comparaciones por pares de genotipos para los SNPs 98535683 y 98535716 localizados en el exón 7 del gen CAST entre estimador animal de la dureza y los distintos genotipos basadas en las medias marginales estimadas. La diferencia de medias se expresa en valor absoluto. Se ha aplicado corrección de Bonferroni.

SNP	Ge	notipo	Diferencia de	P	Diferencia de	P	Diferencia de	P
			medias (SE)		medias (SE)		medias (SE)	
			TOTAL		Parda de		Pirenaica	
			Parda+		Montaña			
			Pirenaica					
SNP	AA vs. AG		0.081 (0.159)	1.000	0.145 (0.198)	1.000	0.055 (0.250)	1.000
98535683	AA vs. GG		1.004 (0.262)	0.004	1.133 (0.344)	0.004	0.761 (0.362)	0.123
Thr182Ala	AG vs. GG		0.923 (0.260)	0.004	0.988 (0.344)	0.014	0.816 (0.342)	0.063

SNP	AA vs. AG	0.419 (0.570)	1.000	0.603 (0.708)	1.000	0.126 (0.890)	1.000
98535716	AA vs. GG	0.322 (0.554)	1.000	0.482 (0.688)	1.000	1.130 (0.866)	1.000
Glu193Arg	AG vs. GG	0.097 (0.187)	1.000	0.121 (0.234)	1.000	0.004 (0.238)	1.000

Debido a la posible implicación de los SNPs 98535683 (Thr182Ala) y 98579663 (el denominado CAST4 y localizado en la región 3'UTR), se llevaron a cabo análisis estadísticos incluyendo en el modelo los dos SNPs. El modelo utilizado mediante el procedimiento GLM del paquete informático SPSS, fue el siguiente:

$y_{ijk} = \mu + r_i + g_k + s_j + (r \times g)_{ik} + (r \times s)_{ij} + (g \times s)_{kj} + (r \times g \times s)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$, en el que:

y_{ijk} = valor en desviaciones estándar de la media del efecto animal del carácter dureza de la carne a los 7 días post sacrificio

μ = es la media general del valor animal del carácter dureza

r_i = es el efecto de la raza (2 niveles: Parda de Montaña y Pirenaica)

g_k = es el efecto del genotipo del SNP 98535683 (Thr182Ala) (3 niveles: GG, AG, y AA)

s_j = es el efecto del genotipo del SNP 98579663 (3'UTR) (3 niveles: GG, AG, y AA)

$(r \times g)_{ik}$ = es el efecto de la interacción raza por genotipo del SNP 98535683 (6 niveles)

$(r \times s)_{ij}$ = es el efecto de la interacción raza por genotipo del SNP 98579663 (6 niveles)

$(g \times s)_{kj}$ = es el efecto de la interacción de los dos SNPs (9 niveles)

$(r \times g \times s)_{ijk}$ = es el efecto de la interacción raza por genotipos de los dos SNPs (18 niveles)

ε_{ijk} = es el residuo

Cuando analizamos por separado cada raza, el modelo utilizado fue el siguiente:

$y_{kj} = \mu + g_k + s_j + (g \times s)_{kj} + \varepsilon_{kj}$, en el que:

y_{kj} = valor en desviaciones estándar de la media del efecto animal del carácter dureza de la carne a los 7 días post sacrificio

μ = es la media general del valor animal del carácter dureza

g_k = es el efecto del genotipo del SNP 98535683 (Thr182Ala) (3 niveles: GG, AG, y AA)

s_j = es el efecto del genotipo del SNP 98579663 (3'UTR) (3 niveles: GG, AG, y AA)

$(g \times s)_{kj}$ = es el efecto de la interacción de los dos SNPs (9 niveles)

ε_{kj} = es el residuo

Los análisis estadísticos sólo mostraron efecto significativo para el SNP 98535683 (Thr182Ala) ($P = 0.031$), no encontrando ninguna significación para el CAST4 y cualquiera de las interacciones analizadas. Al llevar a cabo la comparación por pares para el SNP98535683 (Thr182Ala) el genotipo GG presenta diferencias significativas de 1.109 y 0.927 en desviaciones estándar de la media de la dureza con respecto a los genotipos AA ($P = 0.019$) y AG ($P = 0.034$), respectivamente.

En cuanto a la raza Parda de Montaña, sólo el SNP 98535683 (Thr182Ala) ($P = 0.009$) mostró diferencias significativas, presentando el genotipo GG diferencias significativas con 1.316 y 1.341 en desviaciones estándar de la media de la dureza con respecto a los genotipos AA ($P = 0.004$) y AG ($P = 0.010$), respectivamente. Finalmente, en la raza Pirenaica, al utilizar este modelo desaparecieron las diferencias significativas, posiblemente debido al pequeño número de muestras para el genotipo GG.

Como conclusión, el genotipo GG del SNP98535683 presenta una asociación significativa con un incremento en la dureza de la carne, que en la población global y en Parda de Montaña es superior a una desviación estándar de la media de la dureza con respecto al genotipo AA. Esta mutación supone un cambio aminoacídico de treonina (A) por alanina (G) en el dominio L de la proteína, que interviene en la formación del canal de Ca^{2+} . Este cambio aminoacídico supone un cambio importante en la hidropaticidad de la proteína.

Una vez secuenciada la totalidad de la región codante del gen en animales extremos para el carácter dureza, sólo esta mutación SNP98535683 (Thr182Ala) y la SNP98535716 (Glu193Arg) mostraron cambio aminoacídico que puede afectar a la estructura de la proteína y por lo tanto a la funcionalidad de la misma. El SNP98535716 no mostró ningún tipo de significación en los estudios de asociación.

REIVINDICACIONES

- 1 – 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 calidad en su carne, caracterizado porque comprende la detección de la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), utilizando dicha información para la selección de ejemplares más aptos para el consumo, por la baja dureza de su carne.
- 2 – Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno, según la anterior reivindicación, caracterizado porque la detección de la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), se realiza utilizando cualquiera de las metodologías actualmente conocidas y utilizadas en laboratorio para análisis de la información genética, preparadas con las oportunas cadenas de referencia o patrones para la detección de dicha mutación genética.
- 3 - Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno, según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque, una vez detectada la existencia la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) y/o de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), se adaptará el manejo y la maduración de la carne dichos ejemplares por su tendencia a tener elevada dureza en su carne.
- 4 - Procedimiento de predicción de dureza de la carne en ganado vacuno, según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque, una vez detectada la no existencia la mutación genética SNP98535683 (Thr182Ala) de la Calpastatina (CAST) ni de la mutación genética SNP98545188 (CAST2), se seleccionan dichos ejemplares para la explotación por su tendencia a tener reducida dureza en su carne.
- 6 - Uso del procedimiento expresado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la selección de ejemplares en función de la calidad de la carne en las razas bovinas Pirenaica y/o Parda de Montaña.


```

EAKAIPGSKQLEGPHSPNKKRHKKQAVKTEPEKKPQSSKPSVVHEKKTQEVKPKHEHTEPK
CAST+ 5 EAKAIPGSKQLEGPHSPNKKRHKKQAVKTEPEKKPQSSKPSVVHEKKTQEVKPKHEHTEPK 64

PARDA 183 SLPKHSSDTGSKHAPKEKAVSksseqppsekstkpktksqDKIsagggsavpaaaaaasa 362
          SLPKHSSDTGSKHAPKEKAVSKSSEQPPSEKSTKPKTKSQDKISGGGKS VPAAAAAASA
CAST+ 65 SLPKHSSDTGSKHAPKEKAVSKSSEQPPSEKSTKPKTKSQDKISGGGKSTVPAAAAAASA 124

PARDA 363 kpadKNKENKLLTSAPVPAESKPSKPSGKSDMDTALDDLIDTLGEPEEMKEDNTTYTGPEV 542
          +PADKNKENKLLTSAPVPAESKPSKPSGKSDMDTALDDLIDTLGEPEEMKEDNTTYTGPEV
CAST+ 125 EPADKNKENKLLTSAPVPAESKPSKPSGKSDMDTALDDLIDTLGEPEEMKEDNTTYTGPEV 184

PARDA 543 SDPMSSTYIEELGKRESTLPPKYKELLNKEEGIAGPP 653
          SDPMSSTYIEELGKRESTLPPKYKELLNKEEGIAGPP
CAST+ 185 SDPMSSTYIEELGKRESTLPPKYKELLNKEEGIAGPP 221

```

Fig. 2

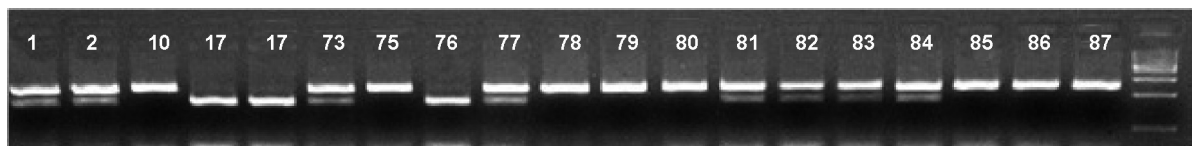


Fig. 3

LISTA DE SECUENCIAS

SEQUENCE LISTING

5 <110> Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de
Aragon (CITA)
Agencia aragonesa para la investigación y desarrollo
(ARAID)

10 Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y
Alimentaria (INIA)
Asociacion de criadores de raza bovina parda de montaña
(ARAPARDA)

15 Asociacion aragonesa de criadores de ganado vacuno
pirenaico (ASAPI)

<120> Procedimiento de prediccion de dureza de la carne en ganado
vacuno

20 <130> Procedimiento de prediccion de dureza de la carne en ganado
vacuno

<160> 3

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 786
<212> PRT

30 <213> Ganado vacuno - Razas Pirenaica y Parda de Montaña

<400> 1

Met Ala Phe Ala Ser Trp Trp Tyr Lys Thr His Val Ser Arg Lys Thr
35 1 5 10 15

Ser Gly Ser Pro Ser Lys Ser Gly Glu Lys Lys Gly Ser Asp Glu Lys
20 25 30

40 Lys Ala Thr Ser Leu Gly Ser Ser Gln Leu Ser Arg Thr Gln Ala Gly
35 40 45

45 Glu Lys Ala Pro Val Pro Lys Val Thr Thr Ser Ser Ala Ser Ala Ser
50 55 60

50 Lys Ser Ser Ser Met Asn Pro Thr Glu Ala Lys Ala Ile Pro Gly Ser
65 70 75 80

Lys Gln Leu Glu Gly Pro His Ser Pro Asn Lys Lys Arg His Lys Lys
55 85 90 95

Gln Ala Val Lys Thr Glu Pro Glu Lys Lys Pro Gln Ser Ser Lys Pro
100 105 110

60 Ser Val Val His Glu Lys Lys Thr Gln Glu Val Lys Pro Lys Glu His
115 120 125

Thr Glu Pro Lys Ser Leu Pro Lys His Ser Ser Asp Thr Gly Ser Lys
 130 135 140
 5
 His Ala Pro Lys Glu Lys Ala Val Ser Lys Ser Ser Glu Gln Pro Pro
 145 150 155 160
 10 Ser Glu Lys Ser Thr Ile Pro Lys Thr Asn Ser Gln Asp Lys Ile Ser
 165 170 175
 Gly Gly Gly Lys Ser Ala Val Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala
 15 180 185 190
 Lys Pro Ala Asp Lys Asn Lys Glu Asn Lys Leu Leu Thr Ser Ala Val
 195 200 205
 20 Pro Ala Glu Ser Lys Pro Ser Lys Pro Ser Gly Lys Ser Asp Met Asp
 210 215 220
 25 Thr Ala Leu Asp Asp Leu Ile Asp Thr Leu Gly Glu Pro Glu Glu Met
 225 230 235 240
 30 Lys Glu Asp Asn Thr Thr Tyr Thr Gly Pro Glu Val Ser Asp Pro Met
 245 250 255
 Ser Ser Thr Tyr Ile Glu Glu Leu Gly Lys Arg Glu Ser Thr Leu Pro
 35 260 265 270
 Pro Lys Tyr Lys Glu Leu Leu Asn Lys Glu Glu Gly Ile Ala Gly Pro
 275 280 285
 40 Pro Pro Asp Ser Leu Lys Pro Leu Gly Pro Asn Asp Ala Ile Asp Ala
 290 295 300
 45 Leu Ser Ser Asp Phe Thr Cys Ser Ser Pro Thr Ala Asp Ala Lys Lys
 305 310 315 320
 50 Thr Glu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Glu Ala Leu Lys Ala Gln Ser Ala
 325 330 335
 Gly Val Ile Arg Ser Ala Ala Pro Pro Gln Glu Lys Lys Arg Lys Val
 55 340 345 350
 Glu Lys Asp Ala Met Thr Glu His Ala Leu Glu Ala Leu Ser Ala Ser
 355 360 365
 60 Leu Gly Thr Arg Lys Pro Glu Pro Glu Leu Asp Pro Ser Ser Ile Lys
 370 375 380
 65

Glu Val Asp Glu Ala Lys Ala Lys Glu Glu Lys Val Lys Lys Cys Gly
 385 390 395 400
 5 Glu Asp Glu Glu Thr Val Pro Ser Glu Tyr Arg Leu Lys Pro Ala Thr
 405 410 415
 10 Asp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Leu Pro Glu Ala Glu Glu Lys Pro Lys
 420 425 430
 15 Pro Leu Ser Glu Ser Glu Leu Ile Asp Glu Leu Ser Glu Asp Phe Asp
 435 440 445
 20 Gln Ser Lys Cys Lys Glu Lys Gln Ser Lys Pro Thr Glu Lys Thr Glu
 450 455 460
 25 Ala Ser Pro Ala Ala Ala Pro Val Pro Val Ala Glu Asp Val Pro Arg
 465 470 475 480
 30 Thr Ser Met Cys Ser Val Gln Ser Ala Pro Pro Thr Ala Ala Pro Ala
 485 490 495
 35 Lys Gly Met Val Pro Asp Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Gly Ser Leu
 500 505 510
 40 Gly Lys Lys Glu Ala Asp Pro Glu Asp Gly Lys Pro Val Glu Asp Lys
 515 520 525
 45 Val Lys Glu Lys Ala Lys Glu Glu Asp Arg Glu Lys Leu Gly Glu Lys
 530 535 540
 50 Glu Glu Thr Ile Pro Pro Asp Tyr Arg Leu Glu Glu Ala Lys Asp Lys
 545 550 555 560
 55 Asp Gly Lys Pro Leu Leu Pro Lys Glu Val Lys Glu Pro Leu Pro Pro
 565 570 575
 60 Leu Ser Glu Asp Val Leu Leu Asp Ala Leu Ser Lys Asp Phe Thr Val
 580 585 590
 65 Pro Ser Asp Thr Ser Ser Pro Gln Phe Glu Asp Ala Lys Leu Ser Ala
 595 600 605
 70 Val Val Ser Glu Val Val Ser Gln Thr Pro Ala Pro Thr Thr Gln Ala
 610 615 620
 75 Ala Gly Pro Pro Pro Ser Thr Ala Gln Arg Asp Asn Lys Glu Leu Asp
 625 630 635 640
 80 Asp Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asp Ser Leu Gly Gln Arg Gln Pro Asp

ES 2 396 080 A1

	645	650	655	
5	Pro Asp Glu Asn Lys	Pro Val Glu Asp Lys	Val Lys Glu Lys Ala Lys	
	660	665	670	
10	Ala Glu His Arg Asp Lys	Leu Gly Glu Arg Asp Asp Thr Ile Pro Pro		
	675	680	685	
15	Lys Tyr Gln His Leu Leu Asp Asp Asn Lys	Glu Gly Thr Pro Gly Lys		
	690	695	700	
20	Pro Lys Ala Ser Glu Lys	Pro Lys Ala Ser Glu Lys	Pro Ala Gly Ala	
	705	710	715	720
25	Gln Asp Pro Ile Asp Ala Leu Ser Gly Asp Phe Asp Ser Cys Pro Ser			
	725	730	735	
30	Thr Thr Glu Thr Ser Thr Asp Thr Pro Lys Asp Lys Asp Lys Lys Pro			
	740	745	750	
35	Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Arg Asn Gly Gly Lys Ala Lys Asp Ser			
	755	760	765	
40	Thr Lys Ala Lys Glu Glu Thr Ser Lys Pro Lys Ala Asp Gly Lys Ser			
	770	775	780	
45	Thr Ser			
	785			
50	<210> 2			
	<211> 2861			
	<212> DNA			
	<213> Ganado vacuno - Razas Pirenaica y Parda de Montaña			
55	<400> 2			
	cagaagccaa ggctattcca ggcagcaaac agctggaagg accgcattct cctaacaaga	60		
	aaagacacaa aaaacagggt gtaaaaacag aacctgagaa gaagccacaa tcatctaagc	120		
60	catctgtggt tcatgagaaa aaaaccaag aagtaaagcc aaaggaacac acagagccaa	180		
	aaagcctacc caagcactca tcagatacag gaagcaagca tgctcctaag gaaaaagccg	240		
	tttccaaatc aagcgagcag ccaccatcag agaatcaac aaaaccaaag accaagtcac	300		
65	aggacaagat ctccggtggt ggaaagagcg ctgttctgc tgctgctgct gcagcatctg	360		
	ccaaaccagc tgacaagaat aaagaaaata aattgttaac atcggccgta ccagctgaat	420		
	ccaaaccaag taaaccatct ggaaagtcag acatggacac tgctctggat gacttaatag	480		
	acacttagg agaacctgaa gagatgaaag aagataacac aacatatact ggaccggaag	540		
	tgctggatcc aatgagtctt acctacatag aggaactggg taaaagagaa tccacacttc	600		

ES 2 396 080 A1

ctccaaaata taaggaaactt ctgaataaag aagaagggat cgcagggcct cctccagact 660
ccttgaacc cctggggccc aatgatgcca tcgatgcctt gtcacccgac ttcacctgca 720
5 gttcccctac agctgatgca aagaaaactg agaaagagaa atctacagaa gaggctttaa 780
aagctcagtc agctggggtg atcagaagtg ctgctccacc ccaagagaaa aaaaggaaag 840
10 tggaaaagga tgccatgact gagcacgccc tggaggccct gtcagcctcc ctgggcaccc 900
ggaagccgga gccggagctc gaccccagct ccattaagga ggtcgatgag gcaaaagcca 960
aagaagagaa agtaaagaaa tgtgtgaag atgaggaaac agtcccatcg gagtacagat 1020
15 taaaaccggc cacagataaa gatggaaaac cactcttgcc agaggctgaa gaaagacca 1080
agcccctgag tgaatcagaa ctattgatg aactctcaga agatttgac cagtctaagt 1140
gtaaagaaaa acaatctaag ccaactgaaa aaacagaggc atccccggcc gctgcccctg 1200
20 taccogtggc agaggacgtg cctcagaggt ccatgtgttc tgtgcagtgc gctccgcca 1260
cagcagctcc agtgaagggc atggtgccag acgatgctgt tgaagccttg gctggaagcc 1320
25 tgggcaaaaa ggaagcagat ccagaagacg gaaagcctgt ggaggataaa gtcaaggaaa 1380
aagccaaaga agaggatcgt gagaaacttg gtgaaaaaga agaaacgatt cctcctgatt 1440
acagattaga agaagccaag gataaagacg gaaaaccact gctgcaaaa gaggtcaagg 1500
30 aaccactccc acccttgagt gaagacgtcc tcctcgatgc tctgtccaag gacttactg 1560
tcccctcaga cacatcatcg cctcaatttg aagatgctaa actttcagct gtcgtctctg 1620
35 aagtgtttc ccaaacccca gctccaacca ccagggcagc cgggtccacc cccagcactg 1680
cgcagcgtga caacaaagaa ctgacgatg ccttgatca actttctgac agtctcgggc 1740
aaagacagcc tgatccagat gagaataaac ccgtagagga taaagtcaag gaaaaagcca 1800
40 aagctgaaca cagagacaag ctgggagaaa gagatgacac catccacct aaataccaac 1860
atcttttga tgacaacaag gagggcacac ccggaagcc aaaggcatca gagaagcca 1920
45 aggcacatcaga gaaacctgca ggtgcccagg acccattga tgcccttca ggggacttg 1980
acagctgtcc ctgactaca gaaacctga cagacacacc aaaggacaaa gacaagaagc 2040
ctgctccag tgccgaagca ctaggaatg gcgggaaagc aaaggattcc acaaaggcaa 2100
50 aggaggaaaac ttcaagcca aaagctgatg gaaaaagtac aagttaaagt tcacactatt 2160
tggtatctgc atataaaatc ttcagcgggt agatggtgac ttctgaagaa gaaaaggctt 2220
55 tgataacaga aacaatttct ggttggttg gagacagtgg tatttgctga gtctttgac 2280
ctcctaaaca ttgtctgta tctttcctg aaaagaaact gaattgtct ggttcacctg 2340
tgttattcta ctgagtattg ataaacttta aatttttaa aattgccttc agtgggaga 2400
60 gaaaggaact ttatatttct aagagataca ttgatagtt tctaaagca gcacacaaaa 2460
aaggaaaaac cttgcaaac tttgcacat tctcccaca gtgcctgtaa atctcattag 2520
65 tattttcaat ttgacttat tttgtgtt agcatttga aaacgatgcc tcacgtgttc 2580

ttcagtgttc tgatttctca tgaccccttt cctcttagac ttgtggactg tgtttgatgt 2640
 ttcttgggt tgttggat aagtcagtca taaaatactg tgcatgggc acatgtctcc 2700
 5 tcttgagctg ctaatcgtag agaccctgga cagaccagga agcgccgcac cccctttca 2760
 ggttgaactt ctcttgcca gaggttagga ctccgcacc ttgtccgcaa agaccacccg 2820
 10 ggacttgact caagtcagaa gagcaaaacg cagactctgt c 2861

 <210> 3
 <211> 519
 15 <212> DNA
 <213> Ganado vacuno - Razas Pirenaica y Parda de Montaña

 <400> 3
 20 gatgcctgt catccgactt cacctgcagt tcccctacag ctgatgcaa gaaaactgag 60
 aaagaggat ggttttaaat gcccttaggg aagctgtta gaaactacct cccacttaa 120
 gacaacaact ttttttaaa acttcattt tcacttact gcgtctcat tgcgtgttc 180
 25 gggctttct tagttggggc aagcgaggcc tgttcttag ttgcgatgtg taggcttctg 240
 cagggggctt ctctgttgc tgggccgggg ctctagggtc acaggctca gttgtgtgg 300
 ctgaggggt ctagagcaca ggctcagtg tcttggcgca tgggcatgt tactccaatg 360
 30 catgtgggt ctccctggc caggagcga acctgtgtcc cctgcattgc aaggcggcct 420
 ctaaccgtt ggccaccagg gaagcccaa gatgccaagg cttttactt ctggttcta 480
 35 ccgttggtt catatgttc ctcatctgc cagtcagac 519



- ②① N.º solicitud: 201231520
②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.10.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
A23L1/31 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MOTTER et al. 'Rol de la calpastatina en la variabilidad de la ternera de la carne bovina'. Journal of Basic & Applied Genetics. 2009, Vol. 20(1), páginas 15-24, especialmente páginas 19-20.	1-5
A	JUSZCZUK-KUBIAK et al. 'The effect of polymorphisms in the intron 12 of CAST gene on meat quality of young bulls'. Animal Science Papers and Reports. 2009, Vol. 27(4), páginas 281-292, todo el documento.	1-5
A	WO 2008034186 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG ET AL.). 27/03/2008, especialmente resumen; páginas 6-7; página 9, líneas 13-37; página 10, líneas 1-32; página 13, líneas 1-7; reivindicaciones 1, 4, 8, 11-12.	1-5
A	ALLAIS et al. 'Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds'. Journal of Animal Science. 2011, Vol. 89, páginas 1-11, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.01.2013

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, EBI, dbSNP, Google scholar.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-5	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-5	SI
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MOTTER et al. Journal of Basic & Applied Genetics. 2009, Vol. 20(1), páginas 15-24.	2009
D02	JUSZCZUK-KUBIAK et al. Animal Science Papers and Reports. 2009, Vol. 27(4), páginas 281-292.	2009
D03	WO 2008034186 A1	2008
D04	ALLAIS et al. Journal of Animal Science. 2011, Vol. 89, páginas 1-11.	2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un procedimiento de predicción de la dureza de la carne de ganado vacuno basado en la detección de dos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de la calpastatina: SNP98535683 (Thr182Ala) y/o SNP98545188. Los datos obtenidos se emplean para adaptar los procedimientos de manejo y maduración de la carne a los distintos ejemplares en función de su genotipo, y también para llevar a cabo una selección para la explotación de aquellos ejemplares con tendencia a presentar una carne menos dura.

El documento D01 divulga un estudio de SNPs en el gen de la calpastatina bovina y la asociación de dichos SNPs con la variabilidad en la terneza de la carne. El estudio es aplicable a la selección de ejemplares con carne de menor dureza directamente por su genotipo (ver páginas 19-20).

El documento D02 tiene por objeto el análisis de la asociación de tres SNPs del intrón 12 del gen de la calpastatina bovina con distintas características de la carne, entre ellas la terneza (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere a procedimientos de predicción de la terneza de la carne de animales, en particular de ganado bovino, basados en la determinación de marcadores genéticos. Los marcadores genéticos analizados comprenden diversos SNPs del gen de la calpastatina de *Bos taurus*. Los datos obtenidos pueden ser utilizados para la selección de ejemplares con carne más tierna y también para la determinación de los tiempos óptimos para alcanzar una máxima terneza de la carne (ver resumen; páginas 6-7; página 9, líneas 13-37; página 10, líneas 1-32; página 13, líneas 1-7; reivindicaciones 1, 4, 8, 11-12).

El documento D04 divulga un estudio de la asociación de tres SNPs del gen de la calpastatina con la terneza de la carne de tres razas de ganado vacuno (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).**1.1.-Reivindicaciones 1-4**

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Dicho documento tiene por objeto el análisis de SNPs de la calpastatina bovina y la relación de los mismos con la terneza de la carne. Entre los marcadores analizados se incluye el SNP 673, localizado en el exón 7, que corresponde al SNP98535683. Sin embargo, los autores de D01 no anticipan un procedimiento de predicción de la dureza de la carne basado en la detección de SNP98535683. Por otra parte, D01 no contempla el análisis de SNP98545188, el otro polimorfismo definido en la reivindicación 1. En este sentido, D02 sí se refiere a SNPs del intrón 12 de la calpastatina bovina, pero ninguno de ellos corresponde a SNP98545188.

De acuerdo con lo anterior, dado que no se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que anticipe el objeto de la reivindicación 1, se considera que dicha reivindicación y sus reivindicaciones dependientes 2-4 cumplen con el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/1986.

1.2.-Reivindicación 5

La reivindicación independiente 5 tiene por objeto un uso del procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-4. Por lo tanto, siendo dicho procedimiento nuevo, la reivindicación 5 cumpliría también el requisito de novedad del art. 6.1 de la LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).

Reivindicaciones 1-5

Como ya se ha indicado en el apartado correspondiente a la evaluación de la novedad, D01 es el documento más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1, por cuanto incluye la identificación del SNP 673 correspondiente a SNP98535683. Sin embargo, D01 difiere del objeto de la reivindicación 1 en que no comprende un procedimiento de predicción de la dureza de la carne basado en la determinación del SNP98535683. Por el contrario, en D01 se indica que SNP 673 no poseería efecto alguno sobre la función de la calpastatina, de lo que se entiende que los autores de D01 no considerarían "a priori" SNP 673 como un marcador útil para la predicción de la dureza de la carne. Así pues, lo divulgado en D01 desviaría a un experto en la materia del empleo de SNP98535683 como marcador genético en un procedimiento de predicción de la dureza de la carne.

En relación con la otra mutación definida en la reivindicación 1, el documento D02 se refiere a polimorfismos del intrón 12 no coincidentes con SNP98545188. Además, de lo divulgado en D02 tampoco puede inferirse que entre los SNPs de D02 y SNP98545188 pudiera existir ligamiento de forma que el empleo de este último para la predicción de la dureza de la carne pudiera resultar predecible para un experto en la materia a la vista de D02. Por otra parte, de acuerdo con la descripción aportada por los solicitantes, la asociación de SNP98545188 con la dureza de la carne no es obvia sino que ha sido determinada empíricamente a partir de una investigación llevada a cabo por los inventores.

Por su parte, los documentos D03 y D04 divulgan también la asociación, en mayor o menor medida, de otros SNPs de la calpastatina distintos de los de la presente solicitud con la dureza de la carne de bovino. D03 incluye además el empleo de los datos obtenidos del análisis de los polimorfismos para la selección de ejemplares o para la determinación del tiempo óptimo para obtener una máxima ternieza. Sin embargo, ninguno de los polimorfismos estudiados puede vincularse de forma predecible para un experto en la materia con SNP98535683 (Thr182Ala) ó SNP98545188.

En conclusión, ninguno de los documentos D01-04, tomados por separado o combinados, permitiría a un experto en la materia llegar de forma evidente al procedimiento de la invención objeto de las reivindicaciones 1-4, ni obviamente tampoco al uso de dicho procedimiento objeto de la reivindicación 5. Por lo tanto las reivindicaciones 1-5 cumplen con el requisito de actividad inventiva del art. 8.1, LP 11/1986.