

DETECCIÓN DE SNPs EN METALOPROTEINASAS-1 MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA TETRA PRIMER ARMS-PCR

Sara Christensen^{1,2} y Peter P.Purslow²

¹CONICET. ²Dep.Tec. y Calidad de los Alimentos, FCV, UNICEN, Campus Universitario, Tandil, Bs.As.(CP.7000) sarach@vet.unicen.edu.ar.

Introducción

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son un grupo de enzimas encargadas de la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Tienen un rol muy importante como moléculas de señalización de procesos biológicos y en el desarrollo de diferentes tejidos, incluyendo el muscular, adiposo y conectivo.

Existen varios SNPs y la mayoría de la investigación sobre detección de estos en MMPs hasta la fecha se han centrado principalmente en su actividad en relación con la salud humana y la enfermedad. Las últimas evidencias demuestran el importante papel de las MMPs como reguladores de la miogénesis, fibrogenesis y adipogénesis.

Un polimorfismo es una variante genética que aparece dentro de los genes en por encima de 1% de una población y representa variaciones de secuencia natural. El SNPs puede ser causal o no, dependiendo de su ubicación. Son causales cuando la variación está en una región no codificante y afecta a la cantidad o actividad de la enzima, o afecta la identidad de la proteína si el SNP se encuentra en una región de codificación y se generan cambios en la secuencia de aminoácidos. (Christensen y col., 2016). SNPs en los genes candidatos se utilizan para determinar las posibles variaciones fenotípicas en las características de la canal y la carne y su relación con características que definen la calidad de la misma (Buchanan y col., 2002).

Muchos de los SNPs identificados en el ganado bovino se asociaron con variaciones en las características de la canal, tasa de crecimiento y la calidad de la carne (Dunner y col., 2013a). Las investigaciones de Dunner y col (2013b) identificaron en 15 razas bovinas europeas SNPs en MMP-1 y su relación con la adipogénesis y diferentes perfiles de ácidos grasos en la carne.

Existen múltiples técnicas para la detección de estos SNPs entre las que podemos mencionar PCR mediante enzimas de restricción, secuenciación, RT-PCR, espectrofotometría de masa y tetra primer ARMS-PCR. Esta última técnica, que es la que utilizamos en este trabajo, es una técnica de bajo costo con la cual se obtienen buenos resultados, la desventaja es que para ponerla a punto puede llevar su tiempo hasta una correcta puesta a punto. Con las otras técnicas mencionadas se obtienen también muy buenos resultados y en poco tiempo pero con mayores costos.

El objetivo de este trabajo es identificar SNPs en estas enzimas y comprobar si diferentes alelos en las enzimas afectan su funcionalidad y la influencia en características de calidad de la carne especialmente la terneza por el rol que tienen estas MMPs en la degradación del tejido conectivo, componentes importante que afecta la terneza. Los SNPs en MMPs probablemente difiera entre las razas y sus efectos pueden variar con la alimentación, la edad, el sexo, la época del año de la masacre de los animales.

Métodos

Se trabajó con 30 animales raza Angus. Luego de la faena de los animales se recolectó el músculo *Esternomandibularis* y se lo conservó a -80°C hasta su procesamiento. Para la obtención del ADN se pesó 40mg de muestra de carne y se prosiguió según el protocolo del kit de extracción **ADN puriprep-T Kit Highway**. Para determinar el rendimiento y la pureza del ADN obtenido se utilizó el Nanodrop.

Se identificaron dos tipos de SNPs:ss77831914 y ss77831924.

El diseño de los primers para tetra primer ARMS-PCR se realizó mediante el software <http://cedar.genetics.soton.ac.uk>. De las múltiples opciones de combinaciones de

primers que ofrece este software se evaluó la longitud, Tm y %C+G y la combinación que más se adaptaba a las condiciones ideales de primers se seleccionó. Esta técnica utiliza 2 pares de primers, 2 primers inner que amplifican el segmento polimórfico y 2 primers outer que amplifican el segmento control. Finalmente, la PCR se realizó en un único tubo que contiene 25 µl de volumen de reacción de compuestos por 22,5µl de cocktail y 2,5µl del templado. El ciclo de PCR para el SNPs ss77831914 fue: 95°C durante 1min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1min, annealing a 60°C durante 1min y extensión a 72°C durante 1min y extensión final a 72 ° C durante 10min y el ciclo para el ss77831924 fue: 95°C durante 1min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1min, annealing a 65°C durante 1min y extensión a 72°C durante 1min y extensión final a 72°C durante 10min. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 2% y tinción con SYBR Safe y se visualizaron con transiluminador UV.

Resultados

A partir del revelado en geles agarosa se observó respecto al polimorfismo ss77831914 una frecuencia alélica del alelo C:0,25 y del alelo G:0.75, y la frecuencia genotípica de este SNP fue: f(GG):0.5; f(GC):0.5 y f(CC):0.

Del ss77841924 la frecuencia alélica del alelo C:0,477 y del alelo T:0.533, y la frecuencia genotípica obtenida de este SNP: f(CC):0.03; f(CT):0.87 y f(TT):0.1.

Considerando la frecuencia alélica del ss77831914, se vio mayoritariamente presente el alelo G y la frecuencia genotípica f(GG) y f(GC) fue similar mientras que f(CC) fue nula. El alelo C fue el menos frecuente. Del ss77831924 la frecuencia de ambos alelos fue muy similar pero la frecuencia genotípica destacada en la que combina ambos alelos f(CT).

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, y luego de la medición de la terneza de las muestras cárnicas de dichos animales, se realizará una correlación de estos datos de frecuencias alélicas y genotípicas con una mayor o menor terneza de la carne.

Otro punto de comparación de estos datos será con frecuencias alélicas de animales de otras razas que se realizarán y también se considerarán otros realizados por otros autores.

Referencias

Buchanan, F.C. y col(2002). Genetics, Selection, Evolution, 34,105–116.

Christensen, S y Purslow, P(2016). Meat Science 119 138–146

Dunner, S. y col (2013a). Livestock Science, 154,34–44.

Dunner, S. y col (2013b). Animal Genetics, 44,493–501.