



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2024; 15:1-9. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2024.16>

Artículo Original. Recibido: 23/01/2024. Aceptado:20/09/2024. Publicado: 10/08/2024. Clave: e2024-13.

<https://www.youtube.com/watch?v=hXFQ4VvupXk>



Frecuencia genotípica de la mutación C313Y del gen *GDF8* en ganado Piemontese en México

Genotypic frequency of the C313Y mutation in the *GDF8* gene in Piedmontese cattle in Mexico

Michel-Regalado Néstor*¹ [ID](#), Ayala-Valdovinos Miguel**¹ [ID](#), Galindo-García Jorge¹ [ID](#), Duifhuis-Rivera Theodor¹ [ID](#), Barreto-Alcalá Rubén¹ [ID](#), Lemus-Flores Clemente² [ID](#)

¹Universidad de Guadalajara. Departamento de Producción Animal, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zapopan, México. ²Universidad Autónoma de Nayarit. Laboratorio de Genética Molecular. Xalisco, Nayarit, México. *Autor responsable: Michel-Regalado Néstor. **Autor de correspondencia: Ayala-Valdovinos Miguel, Departamento de Producción Animal, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, A.P 218, Zapopan 1, C.P. 45101, Zapopan, Jalisco, México. E-mail: nestor.michel@academicos.udg.mx, manayala@cucba.udg.mx, jorge.galindo@academicos.udg.mx, theodor.duifhuis@academicos.udg.mx, ruben.barreto1676@alumnos.udg.mx, clemus@uan.edu.mx

RESUMEN

La miostatina es una molécula encargada de regular negativamente el crecimiento muscular; en el gen *GDF8* se han identificado polimorfismos que generan variantes menos funcionales que promueven hiperplasia muscular. En la raza de ganado Piemontese la mutación es ocasionada por una transición de guanina por adenina en la posición 938 del exón 3 del gen, lo que genera una sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en la posición 313 de la proteína traducida (C313Y). El objetivo del presente estudio fue estimar la frecuencia genotípica y génica de la mutación C313Y del gen *GDF8* en ganado Piemontese de México mediante la técnica de PCR-RFLP. Para este estudio se genotificaron 166 bovinos raza Piemontese pertenecientes a unidades de producción ubicadas en el estado de Jalisco. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.976 y 0.024 para los genotipos homocigótico mutante y heterocigótico, respectivamente. No se encontraron individuos con el genotipo homocigótico silvestre. La frecuencia génica del alelo mutante fue 0.988, lo cual confirma la alta frecuencia de la mutación en los ejemplares de esta raza. Este es el primer reporte donde se describe de manera preliminar la frecuencia de la mutación C313Y en poblaciones de ganado Piemontese en México.

Palabras clave: miostatina, PCR-RFLP, doble musculatura.

ABSTRACT

Myostatin is a molecule responsible for negatively regulating muscle growth. Polymorphisms have been identified in the *GDF8* gene that generate less functional variants that promote muscle hyperplasia. In the Piedmontese cattle breed, the mutation is caused by a guanine to adenine transition at position 938 of exon 3 of the gene, which generates a substitution of the amino acid cysteine for tyrosine at position 313 of the translated protein (C313Y). The objective of the present study was to estimate the genotypic and gene frequencies of the C313Y mutation of the *GDF8* gene in Piedmontese cattle in Mexico using the PCR-RFLP method. For this study, 166 Piedmontese cattle belonging to herds located in the state of Jalisco were genotyped. The genotypic frequencies were 0.976 and 0.024 for the homozygous mutant and heterozygous genotypes, respectively. No individuals with the wild homozygous genotype were found. The allelic frequency of the mutant allele was 0.988, which confirms the high frequency of the mutation in this breed. To date, this is the first report where the frequency of the C313Y mutation is preliminarily described in populations of Piedmontese cattle in Mexico.

Keywords: myostatin, PCR, double muscled.



INTRODUCCIÓN

El ganado Piemontese es una raza de bovino originaria de Italia, especializada en la producción de carne caracterizada por presentar una condición de hipertrofia muscular, comúnmente conocida como “doble musculatura” (Moioli *et al.*, 2004). Esta condición es ocasionada por una mutación en el gen *GDF8* (Factor de crecimiento y diferenciación 8) también conocido como gen de la miostatina (MSTN) (Bongiorni *et al.*, 2016). Mutaciones en el gen MSTN se han descrito en distintas especies como cabras, ovejas, cerdos, equinos, perros, ratas, humanos (Schuelke *et al.*, 2004; Saunders *et al.*, 2006; François *et al.*, 2016; Gu *et al.*, 2016; Nisztuk *et al.*, 2018; Grochowska *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Bi *et al.*, 2021; Pira *et al.*, 2021) y en diferentes razas de ganado bovino (Hales *et al.*, 2020; Haruna *et al.*, 2020; Gaina & Amalo 2022; Meyermans *et al.*, 2022). La miostatina es una molécula encargada de regular negativamente el crecimiento muscular, la cual se activa a través de una serie de modificaciones postraduccionales que inician la vía de señalización de diversos factores de transcripción *Smad* (*Smads*, *Smad 2*, *Smad 3*), los cuáles regulan la expresión de genes miogénicos específicos. La unión de la proteína con su receptor además inhibe la actividad de la proteína cinasa B, molécula que favorece la proliferación de las células musculares (Aiello *et al.*, 2018). La mutación en la raza de ganado Piemontese es ocasionada por una transición de una guanina por adenina en la posición 938 del exón 3 del gen (Kambadur *et al.*, 1997), lo que genera una sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en la posición 313 de la proteína traducida (C313Y), por lo que esta sustitución elimina uno de los cuatro enlaces disulfuro entre los residuos 313-374 del nudo de cisteína (Bongiorni *et al.*, 2016). La ausencia de la cisteína resulta en una pérdida completa o casi completa de la función de la proteína, según se ha observado en cultivos celulares de mioblastos en crecimiento (Berry *et al.*, 2002). Algunos estudios han reportado una alta frecuencia del alelo mutante (*mh*) en diferentes poblaciones de ganado Piemontese, no obstante, persisten algunos animales portadores del alelo silvestre (+) en condiciones de heterocigosis y homocigosis (Bongiorni *et al.*, 2003; Albera, 2005; Pozzi *et al.*, 2009). El alelo mutante en el ganado Piemontese ha sido asociado con algunas características organolépticas como mayor suavidad o ternura en la carne, mayor facilidad de fragmentación, así como menor contenido de hueso, tejido conectivo y grasa en la carne (Wheeler *et al.*, 2001), por lo que estas características y la alta frecuencia de este alelo facilitan realizar un proceso de selección asistida a favor de esta mutación a través del uso de técnicas de biotecnología como la reacción en cadena de la polimerasa mediante fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP), asimismo, por medio de esta técnica es posible amplificar un fragmento de ADN que contiene la mutación e identificar a los animales portadores (Di Stasio & Rolando, 2005). El objetivo del presente estudio fue estimar la frecuencia genotípica y génica de la mutación C313Y del gen *GDF8* en ganado Piemontese de México mediante la técnica de PCR-RFLP.



MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se efectuó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Animal, del Departamento de Producción Animal, de la División de Ciencias Veterinarias, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. El estudio fue aprobado por el Reglamento Interno de Bioética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México (Aprobación No. CC/NN11-12/00/2012).

Poblaciones y muestreo

Para este estudio se incluyeron 166 bovinos pertenecientes a unidades de producción agremiadas a la Asociación Mexicana de Criadores de Razas Italianas, ubicadas en el estado de Jalisco. Se colectaron aproximadamente 3 ml de sangre periférica de cada animal en tubos vacutainer® con EDTA, previa desinfección del área anatómica respectiva; se extrajo la muestra por medio de punción en la vena caudal, se identificó cada tubo y se mantuvieron en refrigeración durante su transporte al laboratorio.

Obtención de ADN y genotipificación

Para la extracción del ADN se utilizó un kit universal (Quick-DNA; Zymo Research). Para la amplificación del fragmento que contiene la mutación C313Y se utilizaron los primers F-CCAATTACTGCTCTGGAGGAT- y R-GGAGACATCTTTGTAGGAGTACAGC- descritos por [Di Stasio & Rolando \(2005\)](#), los cuales amplifican un fragmento de 124 pb. Para realizar las pruebas de PCR se utilizó un kit (DreamTaq; Thermo Scientific) con un volumen de reacción de 20 µl, contenía ~100 ng de lisado de DNA sanguíneo, 2 µl de buffer de PCR 1 x con 20 mM MgCl₂, 1 µl de 10 mM dNTP mix, 0.5 µl de DNA polimerasa, 5 pmol de ambos primers y el volumen restante de agua bidestilada. La amplificación del fragmento del gen *GDF8* fue realizada en un termociclador (TC-5000; Techne) con el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial por 5 mins a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C por 30 s, y una extensión final a 72°C por 5 mins. Posterior a la amplificación se utilizó la enzima de restricción *BtsCI* de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (New England Biolabs). El fragmento digerido fue analizado por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 4 % teñido con un agente intercalante (GelRed; Biotium) y visualizado bajo luz ultravioleta.

Estimación de frecuencias genotípicas y génicas para cada alelo

La estimación de frecuencias genotípicas y génicas para cada alelo se realizó mediante la aplicación del método de conteo directo descrito por [Nei \(1987\)](#).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de PCR-RFLP fue posible genotipificar a los 166 animales muestreados. Los bovinos homocigóticos (*mh/mh*) para la mutación mostraron la presencia de una banda sin digerir correspondiente a un tamaño de 124 pb. En los animales heterocigóticos (*+/mh*), los fragmentos resultantes posteriores a la digestión enzimática fueron de 24 pb y 100 pb para el alelo silvestre y un fragmento sin digerir de 124 pb para el alelo mutante. En el estudio no se encontraron animales con el genotipo homocigótico silvestre (*+/+*), solamente en las muestras control, las cuales mostraron fragmentos de 24 pb y 100 pb (Figura 1). Las frecuencias genotípicas y génicas se presentan en la Tabla 1.

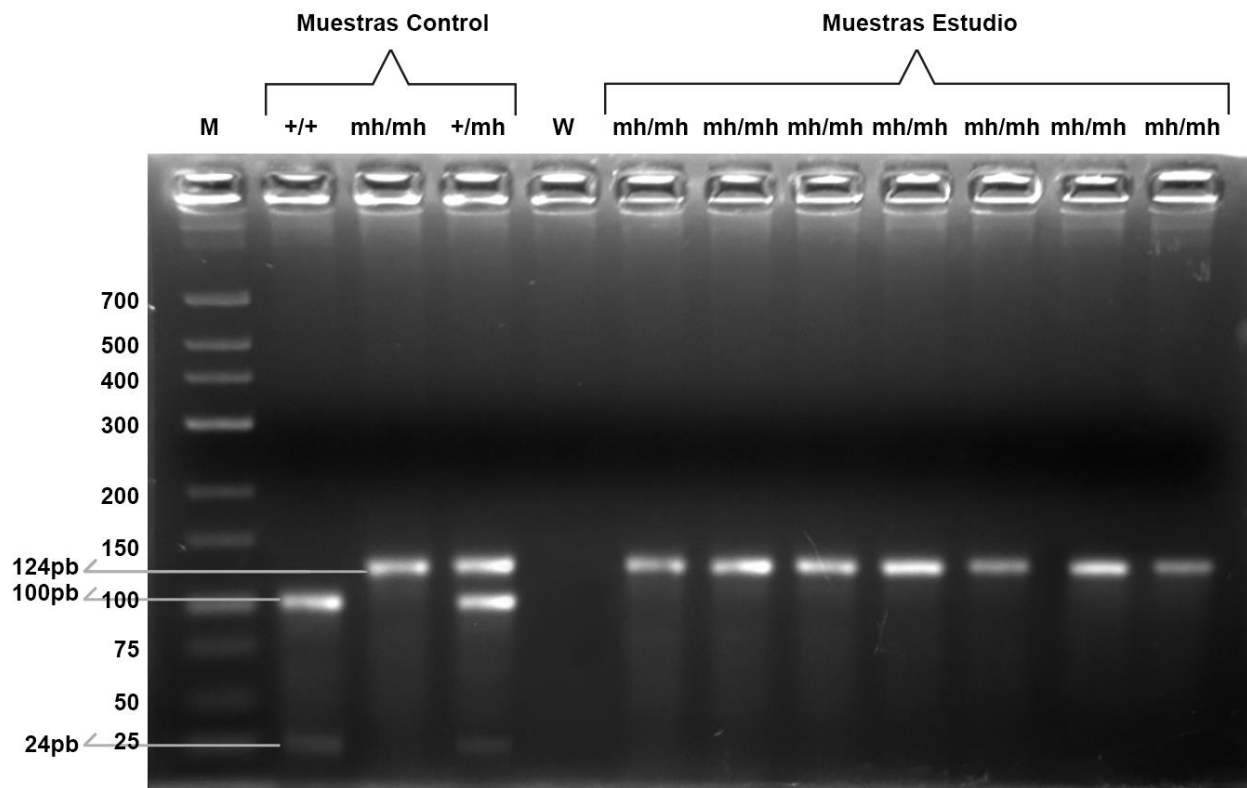


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de PCR-RFLP de la variante C313Y del gen de la miostatina de bovinos Piemontese. *+/+*: homocigótico silvestre; *mh/mh*: homocigótico mutante; *+/mh*: heterocigótico; M: marcador molecular (25 pb, Thermo Fisher Scientific); W: blanco de reacción. Las flechas indican los tamaños de los fragmentos de restricción.



Tabla 1. Frecuencias genotípicas y génicas de la mutación C313Y del gen *GDF8*

Genotipo	No. de animales	Frecuencia genotípica	Alelos	Frecuencia génica
<i>mh/mh</i>	162	0.976	<i>mh</i>	0.988
<i>mh/+</i>	4	0.024	+	0.012
+/+	0	0		
Total	166			

Las frecuencias genotípicas aquí encontradas fueron 0.976 y 0.024 para los homocigótico mutante (*mh/mh*) y heterocigótico (*mh/+*), respectivamente, mientras que el genotipo homocigótico silvestre (+/+) estuvo ausente. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Bongioni (2003) y Albera (2005) en poblaciones de bovinos en Italia, donde encontraron frecuencias de 0.972 y 0.960 para el genotipo homocigótico mutante y frecuencias de 0.027 y 0.039 para el genotipo heterocigótico, respectivamente; en ambos estudios no se encontraron animales homocigóticos silvestres. Lo anterior es posible como resultado de una constante presión de selección que se ha dado en estas poblaciones, en donde han excluido a todos los animales que no posean cuando menos un alelo de la mutación. En otro estudio, realizado por Pozzi *et al.* (2009) se genotipificaron muestras de carne de bovinos Piemontese procedentes de expendios con certificación de origen por COALVI (Consorzio di tutela della Razza Piemontese), de las cuales se encontraron las frecuencias de 0.942, 0.048 y 0.01 para los genotipos homocigótico mutante, heterocigótico y homocigótico silvestre, respectivamente; lo que refleja que, si bien la frecuencia génica de la mutación es alta, al igual que lo encontrado en este estudio (0.988), aún hay presencia del alelo silvestre (0.012). Esto puede deberse a que los animales heterocigóticos muestran también el fenotipo de la “doble musculatura”, situación que dificulta su discriminación bajo criterios de selección fenotípica/morfométrica, lo que genera que existan animales que poseen la hiperplasia muscular pero que a su vez tienen un 50% de probabilidad de heredar la variante silvestre a su progenie. Por ello, actualmente las asociaciones de criadores en distintos países como la Asociación de Piemontese de los Estados Unidos (PAUS), la Asociación Norteamericana de Piemontese (NAPA) y la Asociación Nacional de Criadores de la Raza Bovina Piemontese (ANABORAPI) de Italia, realizan estudios de genotipificación a todos los animales cuyo registro sea solicitado, en los libros genealógicos de la raza y se excluye del registro a los animales no homocigotos a la mutación, esto con el propósito de fijar la mutación en todos los ejemplares. Por lo anterior, es importante realizar la genotipificación de manera obligatoria en cada animal que será inscrito en los libros genealógicos de las asociaciones de criadores, con el fin de formar poblaciones de la raza Piemontese completamente homogéneas al polimorfismo C313Y, con un 100% de probabilidades de heredar la mutación a su descendencia. Previo a este estudio, no existen reportes que describan la frecuencia de la mutación en poblaciones de ganado Piemontese en México, aunque la Asociación de Criadores de Razas Italianas de México no considera obligatorio el genotipado de los animales que serán inscritos en su libro genealógico, la alta frecuencia de la mutación encontrada en el presente estudio, puede



ser el resultado del uso de material genético (semen o embriones) importado de países en donde si se realicen las pruebas de genotipificación para identificar la mutación y realizar selección asistida a favor de ésta. La técnica de PCR-RFLP representa una metodología confiable, rápida, económica y de fácil acceso que contribuiría a la identificación de animales homocigotos o heterocigotos con doble musculatura en una etapa temprana de la vida, lo que podría ser de utilidad a los criadores para planificar los empadres de sus hatos con base en la inclusión de las pruebas para la genotipificación de la mutación C313Y (Wakchaure *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

En el presente estudio fue posible genotipificar a los 166 bovinos Piemontese incluidos mediante la técnica de PCR-RFLP. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.976 y 0.024 para los genotipos homocigótico mutante y heterocigótico, respectivamente. No se encontraron animales con el genotipo homocigótico silvestre. La frecuencia génica del alelo mutante fue 0.988, lo cual indica la alta frecuencia de la mutación en los ejemplares de la raza. Este es el primer reporte donde se describe, de manera preliminar, la frecuencia del marcador molecular C313Y en poblaciones de ganado bovino Piemontese en México.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo a la Asociación Mexicana de Criadores de Razas Italianas y sus agremiados, por facilitar las muestras del estudio. Este estudio fue financiado en su totalidad por la Universidad de Guadalajara a través del proyecto P3E-270377

LITERATURA CITADA

AIELLO D, Patel K, Lasagna E. 2018. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal Genetics*. 49(6):505-519. ISSN: 1365-2052. <https://doi.org/10.1111/age.12696>

ALBERA A. 2005. Risultati dello studio sulla Miostatina. Razza Piemontese. *Associazione Nazionale Allevatori Bovini di Razza Piemontese*. 36(1):3-4.

BERRY C, Thomas M, Langley B, Sharma M, Kambadur R. 2002. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *American Journal Physiology Cell Physiology*. 283(1):135-141. ISSN:0363-6143. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00458.2001>

BI Y, He L, Feng B, Lan X, Song X, Qu L, Pan C. 2021. A 5-bp mutation within MSTN/GDF8 gene was significantly associated with growth traits in Inner Mongolia White Cashmere goats. *Animal Biotechnology*. 32(5):610-615. ISSN:1532-2378. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1736088>



BONGIONI G, Pozzi A, Galli A. 2003. Genotyping of the Double-Muscling Locus (mh) in Piemontese cattle. *Book of Abstract of the 54th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Roma, Italia. Pp. 96.

BONGIORNI S, Valentini A, Chillemi G. 2016. Structural and Dynamic Characterization of the C313Y Mutation in Myostatin Dimeric Protein, Responsible for the "Double Muscle" Phenotype in Piedmontese Cattle. *Frontiers in Genetics*. 7:14. ISSN:1664-8021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00014>

DI STASIO L, Rolando A. 2005. A PCR-RFLP method for genotyping the myostatin locus in Piemontese cattle. *Animal Genetics*. 36(6):521. ISSN:1365-2052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01356.x>

FRANÇOIS L, Jäderkvist FK, Eriksson S, Andersson LS, Tesfayonas YG, Viluma A, Imsland F, Buys N, Mikko S, Lindgren G, Velie BD. 2016. Conformation traits and gaits in the Icelandic horse are associated with genetic variants in Myostatin (MSTN). *Journal of Heredity*. 107(5):431-437. ISSN:1465-7333. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw031>

GAINA CD, Amalo FA. 2022. Genetic polymorphism of myostatin gene in Sumba Ongole (*Bos indicus*) cattle and its association with growth traits. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 9(4):565-572. ISSN:2311-7710. <http://doi.org/10.5455/javar.2022.i625>

GU H, Cao Y, Qiu B, Zhou Z, Deng R, Chen Z, Li R, Li X, Wei Q, Xia X, Yong W. 2016. Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 477(1):115-122. ISSN:1090-2104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.030>

GROCHOWSKA E, Borys B, Lisiak D, Mroczkowski S. 2019. Genotypic and allelic effects of the myostatin gene (MSTN) on carcass, meat quality, and biometric traits in Colored Polish Merino sheep. *Meat Science*. 151:4-17. ISSN:1873-4138. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.12.010>

HALES KE, Tait JRG, Lindholm-Perry AK, Cushman RA, Freetly HC, Brown-Brandl TM, Bennett GL. 2020. Effects of the F94L Limousin associated myostatin gene marker on metabolic index in growing beef heifers. *Applied Animal Science*. 36(6):851-856. ISSN: 2590-2865. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02046>



HARUNA IL, Ekegbu UJ, Ullah F, Amirpour-Najafabadi H, Zhou H, Hickford JG. 2020. Genetic variations and haplotypic diversity in the Myostatin gene of New Zealand cattle breeds. *Gene*. 740:e144400. ISSN:1879-0038.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144400>

KAMBADUR R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*. 7(9):910-916. ISSN:1549-5469. <https://doi.org/10.1101/gr.7.9.910>

LI W, Li R, Wei Y, Meng X, Wang B, Zhang Z, Wu W, Liu H. 2020. Effect of MSTN mutation on growth and carcass performance in Duroc × Meishan hybrid population. *Animals*. 10(6):932. ISSN:2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani10060932>

MEYERMANS R, Janssens S, Coussé A, Gorssen W, Hubin X, Mayeres P, Veulemans W, Claerebout E, Charlier C, Buys N. 2022. Myostatin mutation causing double muscling could affect increased psoroptic mange sensitivity in dual purpose Belgian Blue cattle. *Animal*. 16(3):100460. ISSN:1751-732X.

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100460>

MOIOLI B, Napolitano F, Catillo G. 2004. Genetic diversity between Piedmontese, Maremmana, and Podolica cattle breeds. *Journal of Heredity*. 95(3):250-256. ISSN: 0022-1503. <https://doi.org/10.1093/jhered/esh032>

NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York Chichester, West Sussex: *Columbia University Press*. Pp. 327. ISBN: 9780231886710. <https://doi.org/10.7312/nei-92038>

NISZTUK S, Ślaska B, Zięba G, Rozempolska-Rucińska I. 2018. Association of MSTN gene polymorphism (C354T) with performance traits in raccoon dogs. *Canadian Journal of Animal Science*. 98(2):341-346. ISSN:1918-1825. <https://doi.org/10.1139/cjas-2017-0070>

PIRA E, Vacca GM, Dettori ML, Piras G, Moro M, Paschino P, Pazzola M. 2021. Polymorphisms at myostatin gene (MSTN) and the associations with sport performances in Anglo-Arabian racehorses. *Animals*. 11(4):964. ISSN:2076-2615.

<https://doi.org/10.3390/ani11040964>

POZZI A, Bongioni G, Galli A. 2009. Comparison of three PCR-based methods to detect a Piedmontese cattle point mutation in the Myostatin gene. *Animal*. 3(6):773-778. ISSN: 1751-7311. <https://doi.org/10.1017/S1751731109004121>



SAUNDERS MA, Good JM, Lawrence EC, Ferrell RE, Li WH, Nachman MW. 2006. Human adaptive evolution at Myostatin (GDF8), a regulator of muscle growth. *The American Journal of Human Genetics*. 79(6):1089-1097. ISSN:1537-6605.

<https://doi.org/10.1086/509707>

SCHUELKE M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New England Journal of Medicine*. 350(26):2682-2688. ISSN:1533-4406.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa040933>

WAKCHAURE R, Ganguly S, Praveen P, Kumar A, Sharma S, Mahajan T. 2015. Marker assisted selection (MAS) in animal breeding: a review. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*. 6(5): e127. ISSN:2157-7609. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000e127>

WHEELER TL, Shackelford SD, Casas E, Cundiff LV, Koohmaraie M. 2001. The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *Journal of Animal Science*. 79(12):3069-3074. ISSN: 0021-8812. <https://doi.org/10.2527/2001.79123069x>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>