



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**POLIMORFISMO EN LOS GENES CAPN1 y TG Y SU
ASOCIACIÓN CON LA CALIDAD DE CARNE BOVINA
MEXICANA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CINTHYA ARACELI BONILLA CONTRERAS

TUTOR: DRA. MARÍA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

COMITÉ TUTORAL:

DR. JOSÉ M. BERRUECOS VILLALOBOS

DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la valiosa colaboración y apoyo de las siguientes instituciones y personas, que permitieron la culminación exitosa del presente trabajo:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, donde encontré mi segundo hogar .

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia porque en ella pase gran parte de los últimos años, donde encontré amigos para toda la vida.

Al Laboratorio de Ciencia de la Carne y al Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

Al Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del IPN

A mis asesores María, Berruecos y Rocío, por su tiempo, por sus consejos, por todas las facilidades que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo... por formarme un poco más...Gracias.

Ana y Manuel, su incondicional apoyo, su profesionalismo y su calidad humana me ayudaron para alcanzar este objetivo...Gracias!!

A todas las personas que colaboraron en el trabajo de laboratorio, haciendo un esfuerzo en conjunto.

DEDICATORIAS

Ma, Pa, Lau y Luis gracias por estar siempre a mi lado, por tener cada día una palabra de aliento, con su ayuda, con su sola presencia me han inculcado confianza para lograr todo lo que me he propuesto, lo logramos!!!

Amigos que permanecieron conmigo desde hace algunos años, amigos que vine a encontrar ahora, todos son una enseñanza diaria... que bien se siente tenerlos a mi lado.

RESUMEN

Bonilla Contreras Cinthya Araceli. Polimorfismo en los genes CAPN1 y TG y su asociación con la calidad de carne bovina mexicana (Asesor, Dra. María de la Salud Rubio Lozano)

El objetivo de este estudio fue conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo CAPN1 316 G/C, CAPN1 4751 T/C y TG -521C/T, así como su asociación con la calidad de la carne bovina en México. Se colectaron 124 muestras (*longissimus dorsi*) en el Norte, Centro y Sur de la República Mexicana. Se determinó la fuerza de corte mediante Warner Bratzler (FCWB) y el porcentaje de Grasa Intramuscular (GIM) a partir del extracto etéreo. La tipificación de los polimorfismos del gen CAPN1 se realizó mediante un ensayo de discriminación alélica; el gen TG fue tipificado mediante PCR-RFLP. El efecto de los marcadores del gen CAPN1 sobre la FCWB y del gen TG sobre el porcentaje de GIM fueron determinados mediante análisis de varianza donde las variables independientes fueron el origen, genotipo y su interacción; las medias fueron comparadas con una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Los alelos 316G y 4751T tuvieron mayor frecuencia respecto al alelo 316C y 4751C, ya que no se encontraron individuos con genotipo homocigoto 316C/C ni 4751C/C. No existió efecto del marcador CAPN1 316G/C sobre la FCWB ($P>0.05$). En el marcador CAPN1 4751T/C, los heterocigotos tuvieron menor FCWB (4,09kg) que los homocigotos 4751T/T (4.65kg). El porcentaje de GIM fue afectado tanto por el marcador TG -521C/T como por el origen ($P=0.0014$ y 0.014 , respectivamente); los heterocigotos tuvieron 6.6% de GIM a diferencia del 4% de GIM de los homocigotos -521C/C. En México, no se ha incluido dentro de los esquemas de mejora genética características de calidad, lo cual puede observarse en la baja frecuencia de alelos favorables; es posible el uso de los marcadores CAPN1 4751T/C y TG -521C/T como predictores de la suavidad y GIM en carne bovina mexicana.

Palabras clave: Marcadores moleculares; CAPN1, TG, calidad, carne bovina, FCWB y GIM

ABSTRACT

Bonilla Contreras Cinthya Araceli. Polymorphism in CAPN1 and TG genes and their association with Mexican beef quality (Asesor, Dra. María de la Salud Rubio Lozano)

The aim of this study was to know the allelic and genotypic frequencies of the CAPN1 316 G/C, CAPN1 4751 T/C and TG -521C/T polymorphisms, as well as, their association with Mexican beef quality. One hundred and twenty four samples (*longissimus dorsi*) were collected from North, Center and South of the Mexican Republic. Samples were evaluated to determine the shear force using Warner Bratzler's method (WBSF). Samples intramuscular Fat (IMF) percentage was obtained by the etilic ether extraction method. Tipification of the CAPN1 markers, was achieved using an allelic discrimination test for each marker. Meanwhile the TG marker was investigated by a PCR-RFLP test. The effect of the markers of the gene CAPN1 on the shear force and the TG marker on IMF was determined by analysis of variance using origin, genotype and its interaction as independent variables. All the analyses were carried out by the statistical program SAS, means were compared using Tukey's test ($\alpha=0.05$). Alleles 316G and 4751T were more frequent than 316C and 4751C alleles because homocoyote genotypes 316C/C and 4751C/C were absent. There was no effect found on the marker CAPN1 316G/C over the FCWB ($P> 0.05$). In the CAPN1 4751T/C marker, the heterocoyotes (4,09kg) had lower FCWB than that of 4751T/T (4.65kg). The percentage of intramuscular fat was affected by both, the marker TG -521C/T and the origin ($P=0.001$ and 0.014 , respectively); Meat from heterocoyotes had 6.6 % of IMF unlike the 4% of IMF found in meat from genotype -521C/C. The low frecuencies of favorable alleles for tenderness and IMF indicate that quality traits are not included in breeding improvement programs; there is possible the use of the markers CAPN1 4751T/C and TG -521C/T as predictors of quality (tenderness and IMF) in Mexican beef.

Key words: Molecular markers; CAPN1; TG; beef quality, WBSF and IMF

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Mercado de la carne de bovino.....	2
II.2 Características de la producción bovina de carne.....	3
II.3 Factores que influyen en la calidad de la carne.....	5
II.3.1 Composición tisular.....	5
II.3.2 Factores extrínsecos.....	7
II.3.3 Factores intrínsecos	7
II.3.4 Factores postmortem	9
II.4 Estrategias de Mejora Genética para características de calidad de la carne.....	10
II.4.1 Marcadores moleculares como predictores de la calidad de la carne.....	12
II.4.1.1. Marcadores directos.....	12
II.4.1.1A. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)....	13
II.4.1.1B Ensayos de discriminación alélica	15
II.4.2 Marcadores moleculares involucrados en la suavidad de la carne	16
II.4.2.1 El gen de la Calpaína I (CAPN1)	17
II.4.3 Marcadores moleculares involucrados en el marmoleo de la carne	18
III. OBJETIVOS	22
III.1 Objetivo general	22
III.2 Objetivos específicos	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS	24
V.1 Obtención del material biológico y lugar de trabajo	24
V.2 Análisis físico-químicos.....	24
V.2.1 Determinación de porcentaje de grasa intramuscular	24
V.2.2 Fuerza de corte (FCWB)	25
V.3 Extracción de ADN	26
V.4 Análisis de los polimorfismos CAPN1 y TG.....	27
V.4.1 Marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C.....	27
V.4.2 Marcador TG-537C/T	28
V.5 Análisis estadístico.....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
VI.1 Análisis físico-químicos (GIM y FCWB).....	31
VI.1.1 Porcentaje de grasa intramuscular	31
VI.1.2 Fuerza Corte (FCWB)	32
VI.2 Marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C	33
VI.2.1 Frecuencias alélicas	33
VI.2.2 Frecuencias genotípicas	35
VI.2.3 Efecto de los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C sobre la FCWB	36
VI.2.4 Efecto de los haplotipos de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C sobre la FCWB	37
VI.3 Marcador TG –537C/T	38
VI.3.1 Frecuencias alélicas	40
VI.3.2 Frecuencias genotípicas	41

VI.3.3 Efecto del marcador TG –521C/T sobre la GIM	42
VII. CONCLUSIÓN	45
VIII. LITERATURA CITADA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICA

Figura 1. PCR-RFLP	14
Figura 2. Ensayo de discriminación alélica.....	15
Figura 3. Patrón de fluorescencia del ensayo de discriminación alélica.....	28
Figura 4. Patrones de restricción <i>MboI</i> para el gen TG	39
Figura 5. Patrón de restricción para el marcador TG -521C/T.....	40
Gráfica 1. FCWB (kg) de acuerdo al origen de la muestra.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores y sondas para los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C.....	27
Cuadro 2. Frecuencias alélicas de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C respecto a la región.....	35
Cuadro 3. Frecuencias genotípicas de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C	36
Cuadro 4. Efecto del genotipo sobre la FCWB (kg)	36
Cuadro 5. Frecuencias alélicas del marcador TG-521C/T respecto al origen	41
Cuadro 6. Frecuencias genotípicas del marcador TG -521C/T por origen.....	41
Cuadro 7. Efecto del genotipo sobre la GIM (%)	42

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que enfrenta la industria de la carne en México, es la inconsistencia en la calidad de este producto, causada por la falta de estrategias para producir ganado con características definidas y constantes.

En países como Estados Unidos, Australia, Canadá, entre otros, el aumento en la producción de carne ha sido consecuencia del mejoramiento genético en el ganado, el cual se ha enfocado en la selección de características cuantitativas (controladas por varios genes).

En el pasado la mayoría del mejoramiento genético ha sido logrado con el uso de selección a partir de valores estimados de crianza basados en el fenotipo; sin embargo, la disponibilidad de herramientas moleculares ha incrementado el progreso genético basado en la habilidad de utilizar Selección Asistida por Marcadores (MAS) para *loci* de características cuantitativas (QTL) desarrollados para predecir el desempeño productivo de un animal mediante el uso de marcadores moleculares.

Los genes CAPN1 y TG tienen influencia sobre la suavidad y grasa intramuscular, respectivamente; en ambos se han identificado y validado polimorfismos que tienen efecto sobre estas características y permiten predecir la calidad de la carne bovina; sin embargo, en México no se ha validado aun el uso de estos marcadores moleculares, a pesar de la importancia que ha cobrado la investigación en este tema. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo CAPN1 316 G/C, CAPN1 4751 T/C y TG -521C/T, así como su asociación con la calidad de la carne bovina en México.

II. ANTECEDENTES

II.1 Mercado de la carne de bovino

La ganadería bovina para la producción de carne es de las actividades pecuarias que contribuyen en mayor proporción al abasto nacional. Aunque el nivel tecnológico ha avanzado a un menor ritmo que la avicultura y porcicultura, se nota una tendencia creciente a la incorporación de tecnologías en todas las regiones ecológico-ganaderas del país, orientadas a una producción más eficiente (Infoaserca, 2002).

Se sabe que a nivel nacional, la carne de bovino representa el 30.64% de la producción de carne respecto a todas las especies, con una producción de 1.6 millones de toneladas en el 2006. Esta cifra representa un crecimiento del 13.73% respecto a lo logrado en el 2000 (SAGARPA, 2007).

Para el 2006 se exportaron 1.275 millones de becerros en pie a diferencia de los 1.240 millones de cabezas que se exportaron en el 2003 (USDA, 2003). La exportación de carne deshuesada ha ido en crecimiento, ya que para el 2006 se registraron 27,284 ton, a diferencia de las 2,205.1 ton del 2001. (AMEG, 2007)

México exporta carne principalmente hacia los Estados Unidos de América (EUA); en dicho país se hace una diferenciación según estándares de calificación de las canales (prime, choice, select y comercial), dependiendo del rendimiento y marmoleo, extendiendo esta certificación a los cortes, sin otorgar este reconocimiento a la carne procedente de otro país (Meza, 2007). En este sentido, las exportaciones de carne a EUA son calificadas como comerciales, independientemente de la calidad y el tipo de corte que se trate, por lo que los productores mexicanos no obtienen los beneficios que surgen de la diferenciación según estándares. Actualmente existe la Norma Mexicana (NMX) de clasificación de carne de bovino en canal (NMX-FF-078-SCFI-2002), la cual no es obligatoria ni reconocida por los EUA, para mejorar los precios a los exportadores.

Por otra parte, México importa productos de bovino entre los que se encuentra, carne deshuesada, cortes con hueso y carne en canal. En el 2006 fueron importadas 372,000 toneladas, de las cuales el 96% fue carne deshuesada (AMEG, 2007). También se importa ganado en pie, para el 2006, se registró la entrada de 72,000 cabezas (USDA, 2007). Ante

el aumento de importaciones desde los EUA a partir de la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), se creó la marca oficial “México Calidad Suprema” la cual es un signo distintivo propiedad del Gobierno Federal que garantiza la calidad superior, busca la identificación y la diferenciación de los productos mexicanos que cumplen con las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Normas Mexicanas y Normas Internacionales en materia agropecuaria, contribuyendo a la difusión y posicionamiento de la marca como garantía de calidad superior y satisfacción para productores y consumidores a nivel internacional (México Calidad Suprema, 2007).

La publicación del pliego de condiciones para el uso de la marca “México Calidad Suprema” así como la entrada en vigor de la Norma Mexicana de clasificación de carne de bovino en canal (NMX-FF-078-SCFI-2002) serán determinantes en la mejora de las condiciones de compra-venta para los productores mexicanos (Infoaserca, 2002).

II.2 Características de la producción bovina de carne en México

Las características de la producción de carne en el país serán importantes para obtener productos de calidad, por lo que a continuación se describen de manera breve.

La expansión de la ganadería para carne se inició en las zonas tropicales del país, seguido de un proceso de población ganadera en el norte del territorio, el cual ha estado estrechamente ligado al mercado exterior. Paulatinamente el hato ganadero, inicialmente criollo, se ha ido mezclado con animales provenientes de EUA y Europa, destacando razas como la Charolais, Angus, Hereford, Simmental y diversas variedades Cebuínas como la Brahman, Indubrasil, Guzerat y Gyr, principalmente originarias de América del Sur. En las zonas tropicales, el cruzamiento con razas lecheras como la Holstein y la Suizo, han generado en gran medida la ganadería de doble propósito del país. Todas estas razas y variedades, en mayor o menor proporción conforman la ganadería del México actual (Infoaserca, 2002).

La producción de ganado bovino cárnico se ha desarrollado en diferentes contextos agroclimáticos, tecnológicos, de sistemas de manejo y por finalidad de explotación, comprendiendo principalmente la producción de novillos para abasto, la cría de becerros para la exportación y la producción de pie de cría. Los sistemas de explotación de bovinos

para carne son el intensivo, con engorda en corral y el extensivo, con alimentación en pastoreo (Infoaserca, 2002). En general, se sacrifican animales entre 9 y 30 meses de edad, lo que se traduce, en la exigencia del sacrificio de animales jóvenes que abastezca el mercado mexicano (Meza, 2007). En el país se pueden distinguir 3 principales áreas de producción; la zona árida-semiárida, la templada y la del trópico húmedo-seco (Trueta, 2003):

- La región árida-semiárida comprende los estados de Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, parte de Tamaulipas y San Luis Potosí. En éstas zonas predominan las razas europeas engordadas en corral, cuyo principal mercado es la exportación de becerros a los Estados Unidos (Infoaserca, 2002), es por esto en que general se sacrifican hembras para el consumo nacional (Meza, 2007).
- La región templada tiene ganado cruzado con explotaciones extensivas, en las cuales se mantiene el ganado en pastoreo durante la época de lluvias y se suplementa el resto del año, los productos se comercializan localmente y hacia la zona metropolitana. Dentro de esta región se encuentra Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Edo. México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y DF.
- La región del trópico húmedo y seco, tiene ganado con gran influencia cebuina por lo que la cantidad de becerro de exportación es escasa, sin embargo la demanda de carne con bajo contenido de grasa propia de ganado *Bos indicus*, permite a esta zona abastecer al mercado local (Meza, 2007). Dentro de la región se encuentra Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Morelos, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán, debido a las características agroclimáticas, existe una gran producción de forraje que rebasa la capacidad de consumo por lo que la producción se basa en el pastoreo, siendo ciclos de engorda que tienden a alargarse debido al tipo de alimentación utilizado.

II.3 Factores que influyen en la calidad de la carne

En términos generales, el concepto de calidad de carne comprende aspectos nutricionales, sensoriales, tecnológicos, sanitarios, de inocuidad, entre otros (Warris, 1996). El aroma, sabor, color, jugosidad y suavidad, son características sensoriales que harán de la carne un producto apetecible, por lo que tienen mayor influencia en la decisión de compra por parte de los consumidores (Bernués *et al.*, 2003; McCarthy *et al.*, 2003).

II.3.1 Composición tisular

La calidad de la carne se encuentra determinada entre otros factores, por la ultra estructura que conforma los diferentes componentes de la misma, tales como las proteínas, la grasa y el tejido conectivo, así como por la cantidad y calidad de estos componentes, por lo que será importante conocer la composición tisular (Ouali, 1990; Takahashi, 1992).

El tejido muscular esquelético está formado por fibras musculares con células multinucleadas dispuestas en haces, éstas se encuentran envueltas por tejido conectivo formando el epimisio, perimisio y endomisio. Cada fibra contiene múltiples miofibrillas (unidades contráctiles). El aspecto estriado de la fibra muscular está determinado por la disposición estructural de los miofilamentos finos y gruesos que microscópicamente se observan como bandas claras (bandas I) y oscuras (bandas A) alternadas. El principal componente de los filamentos finos es la actina, asociada con la nebulina y complejos formados por tropomiosina y troponina (T, I y C). Los filamentos gruesos están formados por miosina asociada con titina (Benett *et al.*, 1997; Soria y Corva, 2004).

Como parte de la estructura muscular se encuentran las proteínas miofibrilares y las citoplasmáticas. Las segundas son las responsables del proceso de maduración (ablandamiento *postmortem*) y están clasificadas en dos sistemas proteolíticos: catepsinas lisosomales y proteasas calcio-dependientes (CDP I-II) del citosol (Koohmaraie, 1992; 1994; Morgan, 1992; Soria y Corva, 2004).

El tejido adiposo, puede ser subcutáneo o intramuscular; el primero se encuentra rodeando la canal, siendo deseable su presencia pues tiene efectos sobre los cambios *postmortem* de la carne, sin embargo únicamente explica del 10 al 15% de las

características de palatabilidad (Nishimura, Hattori y Takahashi, 1999; Soria y Corva, 2004).

Por otra parte el tejido adiposo intramuscular, se encuentra en el perimysio y es denominado veteadado de la carne o marmoleo. Al respecto, Nishimura, Hattori y Takahashi, (1999) han sugerido que este tejido hace la carne más suave ya que disminuye la dureza en las uniones de las fibras de colágeno del perimysio, debido a que el desarrollo de la grasa intramuscular modifica la organización (panal de abeja) del tejido conjuntivo, haciéndolo más delgado y frágil. De ahí que la acumulación de lípidos en este depósito es un carácter muy deseado y tiene una gran influencia en la determinación del valor de la carne. Por su parte Dikeman (1996), concluyó que la relación entre el marmoleo y la suavidad de la carne es baja y variable, sin embargo, este parámetro se encuentra incluido en los sistemas de graduación y clasificación de las canales en países como Japón, Australia y Estados Unidos, donde es considerado el principal predictor de la palatabilidad (USDA, 2001; Strong, 2004).

Más allá de la importancia del marmoleo sobre la suavidad, se encuentra, el efecto que tiene sobre el sabor y la jugosidad de la carne. El marmoleo, tiene un efecto de lubricación durante la masticación, lo cual estimula la salivación dando la sensación de jugosidad al consumidor (Thompson, 2004).

El tejido conectivo rodea las células musculares, las cuales se encuentran incluidas en una matriz extracelular, que contiene proteínas fibrosas entrelazadas dentro de un gel compuesto por proteoglicanos. Las proteínas de la matriz se clasifican en estructurales y de adhesión; las primeras forman las fibras elásticas y de colágeno, siendo este el principal componente proteico fibroso insoluble del tejido conectivo (Liu, Nishimura y Takahashi, 1996). La creación de puentes entre fibras de colágeno es un proceso que avanza con la edad del animal asociándose con una disminución de la suavidad con relación al tiempo. La alimentación y el tipo de músculo influyen sobre éste elemento, así los músculos con mayor actividad y sometidos a gran esfuerzo contarán con una mayor proporción del elemento (Alberts *et al.*, 1994; Warriss, 2000). Por su parte las fibras elásticas están formadas por elastina recubierta por miofibrillas compuestas principalmente por fibrilina (Alberts *et al.*, 1994; Shackelford *et al.*, 1995; Ashworth *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2000).

II.3.2 Factores extrínsecos

Comprenden principalmente a la alimentación, la cual influirá la velocidad de crecimiento, la cantidad de grasa depositada, la jugosidad y la suavidad de la carne. Diversos estudios han demostrado que la alimentación basada en pastoreo dará como resultado una carne con mayor dureza, de coloración más oscura, con grasa amarilla debido a los pigmentos del forraje (carotenos y xantofilas) y en ocasiones con olores extraños (Moloney, 1999). Por el contrario, los concentrados basados en cereales se han asociado con carne más jugosa, suave y de mejor sabor (Bennett *et al.*, 1995).

II.3.3 Factores intrínsecos

Son aquellos referentes al animal. La edad afecta principalmente la solubilidad del colágeno, se sabe que los animales jóvenes producen carne más suave debido a que tienen una mayor proporción de colágeno soluble, el cual es destruido durante el proceso de cocción, en contraste, los animales maduros, tienen mayor cantidad de colágeno insoluble disminuyendo la suavidad (Dufour *et al.*, 1996).

La condición sexual (machos enteros, castrados y hembras) modifica la velocidad de crecimiento, deposición de grasa así como desarrollo muscular. Se sabe que los machos enteros depositan menor cantidad de grasa respecto a las hembras o machos castrados, por lo que la carne de los dos últimos, es más jugosa que la de los primeros (Johnson, Priyanto y Taylor, 1997; Grona *et al.*, 2002).

También se sabe que la constitución genética del animal es una fuente importante de variación en la suavidad y marmoleo de la carne (Yu *et al.*, 2007). Se ha detectado que las razas de origen índico producen carne menos suave y marmoleada que las razas europeas (Sherbeck *et al.*, 1995). Este aspecto de la relación entre genética, suavidad y marmoleo es de gran relevancia para los países latinoamericanos ya que la utilización de razas cebuinas en sistemas de producción de carne es una necesidad por cuestiones agroclimáticas; sin embargo, el conocimiento de una menor suavidad y marmoleo, lleva a poca aceptación de estas reses y a una depreciación de su valor (Smith *et al.*, 1998; Riley *et al.*, 2003). México posee una gran variedad de ecosistemas, entre los que se encuentran regiones tropicales y

subtropicales; condiciones que el ganado cebuino soporta con facilidad debido al medioambiente en el cual ha evolucionado (Turner, 1980). El ganado Cebú, posee una capacidad superior de regular la temperatura corporal durante el estrés calórico. Esta capacidad es el resultado de menores tasas metabólicas y de una mayor capacidad de perder calor asociado a la menor resistencia al flujo de calor entre el cuerpo y la piel, mayor tamaño de las glándulas sudoríparas, mayor pérdida de calor por convección y conducción debido a las características de la piel, aunadas a una menor absorción de radiación solar (Hansen, 2004). Por otra parte se ha estudiado que existe una variación importante en la resistencia a las infestaciones de garrapata (*Boophilus microplus*), entre otros parásitos, en el Cebú. Es por esto que se han utilizado en los sistemas de cruzamiento incorporando genes que confieren adaptabilidad al ganado europeo, logrando un mejor desempeño productivo en el ganado cárnico, el cual explota los mejores parámetros productivos del ganado europeo y la rusticidad del ganado índico (Hansen, 2004).

Algunos investigadores han demostrado que la suavidad de distintos músculos disminuye progresivamente a medida que aumenta el porcentaje de genes cebuinos en las cruzas, siendo más evidente cuando la contribución de la raza índica excede el 25% (Wheeler *et al.*, 1990ab; Shackelford *et al.*, 1995; Pringle, 1997; Soria y Corva, 2004). Una posible explicación a las diferencias anteriormente expuestas es que las proteasas calcio dependientes (CDP), poseen menor actividad y el inhibidor de éstas es más activo en el ganado índico, disminuyendo la intensidad de la degradación del músculo (Wheeler *et al.*, 1990b; Whipple *et al.*, 1990a; Shackelford *et al.*, 1991). Algunos científicos han sugerido que manejando la genética de los animales se podría resolver en parte el problema de la suavidad. Los análisis realizados indican que los factores ambientales también tienen una contribución importante sobre la suavidad. Los mejores indicadores, sugieren que, dentro de una misma raza, la genética controla sólo el 30% de la variación, representando la heredabilidad (efecto de genes aditivos) de la suavidad, y el 70% restante se explica por factores ambientales y efectos de genes no aditivos (Koohmaraie, 1994; Marshall, 1999).

II.3.4 Factores postmortem

Se refieren a las características que modificarán el tejido muscular después del sacrificio; a éste grupo pertenecen el *rigor mortis*, acortamiento por frío y la maduración.

El *rigor mortis* es un proceso metabólico anaerobio en el músculo esquelético debido a la interrupción de la circulación sanguínea. Es una contracción irreversible de los músculos, que se divide en cuatro fases: demora, asentamiento, realización y resolución. El fenómeno inicia con el gasto de ATP y oxígeno por parte del músculo, liberándose calcio; al no haber energía para devolver éste al citoplasma, se produce una contracción sin relajación, se acumula ácido láctico como producto del metabolismo del glucógeno almacenado en las fibras musculares y consecuentemente desciende (15-36 h postmortem) el pH muscular hasta un valor de 5.4-5.8. Durante éste periodo, se produce un refuerzo de las uniones actina-miosina y un acortamiento en la longitud del sarcómero; dichos cambios ocurren entre las 12 y 24 h postmortem (Warriss, 2000).

El acortamiento por frío (AF) se desarrolla durante las primeras horas postmortem, debido a un enfriamiento acelerado del músculo lo cual desencadena una severa contracción en la cual se puede observar una reducción en la longitud del sarcómero ocasionada por sobreposición de los filamentos delgados y gruesos; lo cual aumenta la dureza de la carne (Wheeler y Koohmaraie, 1999; King, *et al.*, 2003).

La maduración se define como el proceso de degradación (autólisis) que sufre el músculo tras la muerte del animal bajo temperaturas de refrigeración (-2 a 5° C), y que se realiza para aumentar la suavidad de la carne (Dransfield, 1981; Morgan *et al.*, 1991; Wheeler, 1994). La degradación *postmortem* del músculo es un factor que afecta enormemente a la suavidad de la carne. En el caso del bovino, se ha encontrado que el tiempo requerido para alcanzar el 80% del ablandamiento es de 14 días (Wheeler, 1990b; Morgan *et al.*, 1991; Sherbeck 1996).

La maduración inicia con la proteólisis a las 12 h *postmortem* siendo dependiente de la concentración de Ca^{+2} intracelular (Koohmaraie, 1988). Durante las primeras 24 h se produce un refuerzo de la unión actina-miosina; entre las 24 y 72 h postmortem (etapa de resolución) comienza a debilitarse la unión, teniendo una mayor relevancia a un pH óptimo de 6.3. Durante éste fenómeno se observa la degradación de proteínas estructurales, así

como la desnaturalización del tejido conectivo intramuscular lo cual repercute en una carne más suave (Dransfield, 1994).

II.4 Estrategias de Mejora Genética para características de calidad de la carne

El mejoramiento genético en el ganado, se ha enfocado en la selección de características cuantitativas (controladas por varios genes). En el pasado la mayoría del mejoramiento genético ha sido logrado con el uso de selección a partir de valores estimados de crianza basados en el fenotipo (Dekkers, 1999). Actualmente, la disponibilidad de herramientas moleculares como el MAS ha incrementado el progreso genético para loci de características cuantitativas (QTL)¹; sin embargo, la respuesta al MAS es afectada por la varianza del QTL, la heredabilidad de la característica y la selección por medio de características fenotípicas (Meuwissen y Goddard, 1996). La respuesta máxima a este tipo de selección es observada en la primera generación disminuyendo paulatinamente hasta reducirse sustancialmente en la quinta o sexta generación. Estrictamente no es aconsejable usar únicamente MAS para programas genéticos, ya que no es posible predecir los efectos de genes menores que se encuentren relacionados con la característica evaluada. Por lo que lo más adecuado sería llevar a cabo programas en los que se consideren tanto las herramientas moleculares como la selección clásica, basada en información fenotípica (Dekkers, 1999).

Dentro de las herramientas antes mencionadas, se encuentran los marcadores moleculares. Estos son “etiquetas” a lo largo del cromosoma que pueden ser usados para identificar QTLs, en los cuales se encuentran genes de interés también llamados genes candidatos (Yu *et al.*, 2007).

Una vez que se han localizado los QTLs es necesario llevar a cabo un mapeo fino para poder identificar la zona del cromosoma que se encuentra influenciando el fenotipo, para finalmente clonar y secuenciar dicha región. Posteriormente se estudian los genes candidatos y las mutaciones que existen dentro de los QTLs para conocer si tienen efecto sobre el fenotipo con el objetivo de considerarlos marcadores moleculares y utilizar la información para llevar a cabo MAS (Yu *et al.*, 2007).

¹ QTL: lugares en cromosomas donde residen genes que determinan una característica cuantitativa (Van der Werf y Kinghorn, 2000).

Los marcadores pueden, pero no necesariamente estar dentro del gen (Casas, 2002). Algunos de éstos marcadores genéticos son los sitios de enzimas de restricción conocidos como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción ó RFLPs (Garrick y Johnson, 2003). Actualmente se cuenta con marcadores más modernos como el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), minisatélites, microsatélites (STRs) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), entre otros (Casas, 2002; Garrick y Johnson, 2003).

Existen tres tipos de marcadores genéticos con información polimórfica que pueden ser usados para fomentar los programas de mejora genética en animales, los marcadores tipo I son genes codificantes a lo largo del ADN que se utilizan para comparar e identificar genes ortólogos en especies con relaciones evolutivas distantes; los marcadores indirectos de tipo II aparentemente no son funcionales y están ligados a QTLs, y las mutaciones causales o marcadores directos tipo III (O'Brien *et al.*, 1999; Dekkers y Hospital, 2002; BIF 2002).

Los marcadores de tipo II (microsatélites hipervariables, también llamados repeticiones cortas en tandem, short tandem repeats, STRs), son altamente informativos en evaluaciones de pedigrí y de población, debido a que existen cerca de 100,000 STRs distribuidos aleatoriamente a lo largo del genoma de los mamíferos, y que incluyen múltiples alelos en sí mismos (O'Brien *et al.*, 1999). Estos marcadores han sido llamados indirectos o ligados, debido a que su ubicación ofrece sólo información indirecta del efecto de un gen sobre una característica específica (Van der Werf y Kinghorn, 2000).

Los marcadores de tipo III, son polimorfismos comunes, dialélicos, de un solo nucleótido (SNPs) localizados dentro de exones, intrones y regiones intragénicas. Los SNPs, ocurren una vez cada 500 a 1000 pares de bases, totalizando un estimado de 3 millones de SNPs (O'Brien *et al.*, 1999) a lo largo del genoma. Son llamados mutaciones puntuales o funcionales cuando se asocian a características de interés productivo (Dekkers y Hospital, 2002). Estas variantes, pueden consistir en transiciones (cambios purina/purina o pirimidina/pirimidina) o transversiones (cambios de purina/pirimidina y viceversa), con una probabilidad más alta de ocurrencia en las últimas (Vignal *et al.*, 2002).

Dentro de la industria de la carne, pocas asociaciones ganaderas tienen evaluaciones genéticas para suavidad medida a través de la fuerza de corte (FCWB) o marmoleo ya que

la medición de características asociadas con la calidad es costosa, difícil y necesariamente deberá ser estudiada post mortem (Yu *et al.*, 2007). Actualmente en algunos países como los Estados Unidos han iniciado los estímulos hacia los productores que ofrezcan carne de calidad, ya que se ha visto que los consumidores estarán dispuestos a pagar más por productos de calidad (Koohmaraie *et al.*, 1995; Peake, 1999).

II.4.1 Marcadores moleculares como predictores de la calidad de la carne.

Se ha investigado que la calidad de la carne es poligénica, sin embargo, aun no se conocen en su totalidad los genes y las asociaciones de estos con las propiedades de la carne; por lo que el entendimiento de la base genética molecular de la calidad de la carne es limitado y pobre, siendo necesario profundizar en esta área (Yu *et al.*, 2007). Se han estudiado e identificado factores moleculares y biológicos que influyen la calidad de la carne que podrían ser utilizados como herramientas para llevar a cabo MAS tal es el caso de genes candidatos como son la leptina, calpastatina, tiroglobulina y calpaína (Peake, 1999; Smith *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2000 y 2001; Soria y Corva 2004).

Adicionalmente, estudios realizados por Casas *et al.*, (2003ab) señalan que en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 23, 27 y 29 existen QTLs que se asocian con diferentes características que influyen la calidad de la carne. Comparando poblaciones de *Bos taurus e indicus*, se han encontrado algunos datos interesantes que señalan que existen diferencias en la participación de cada subespecie como donadora de alelos para ciertas características, entre las que destacan marmoleo, deposición de grasa y suavidad, entre otras (Morgan 1992; Koohmaraie 1994; Casas *et al.*, 2003ab).

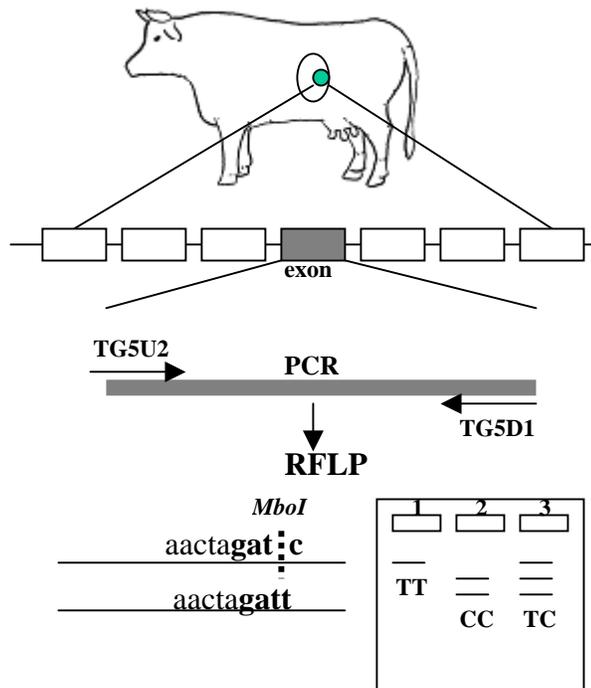
II.4.1.1. Marcadores directos

Para lograr la selección asistida por marcadores basada en genes candidatos, se han buscado y validado SNPs. Estos se caracterizan por el cambio de un solo nucleótido en la secuencia de ADN en una posición dada, el cual para ser considerado SNP debe presentar frecuencias alélicas del 1% en una población. Los SNPs son marcadores bialélicos codominantes, es decir tienen dos tipos de alelos, que en un genotipo heterocigoto se expresan aditivamente (Vignal *et al.*, 2002).

Existen numerosas técnicas para la genotipificación de los SNPs, las cuales constan de dos pasos: 1) la generación de productos alelo-específicos y 2) la separación y detección de dichos productos para la identificación del polimorfismo (Vignal *et al.*, 2002). Para fines de este trabajo únicamente se describirán los RFLPs y los ensayos de discriminación alélica.

II.4.1.1A. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)

Los RFLP son marcadores codominantes, los polimorfismos o variaciones observadas entre muestras de ADN distintas, pueden ser causadas por mutaciones puntuales que resultan en la pérdida o ganancia de sitios de corte de la enzima. El análisis de la variación del ADN por RFLP se usa frecuentemente para el análisis genético donde el número de muestras es moderadamente bajo, considerando no más de 400 muestras. El uso de RFLPs se apoya en la amplificación de segmentos de ADN (por ejemplo, genes con mutaciones conocidas) utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La combinación de la PCR y la aplicación de enzimas de restricción es denominada PCR-RFLP, este procedimiento consiste en la amplificación de regiones específicas del genoma con su posterior digestión mediante enzimas de restricción (figura 1), las cuales cortan secuencias definidas por lo general de 4-8 pares de bases generando fragmentos característicos los cuales constituyen un mapa de restricción (Vignal *et al.*, 2002). Por lo general cuando un nuevo polimorfismo es detectado, se diseña un ensayo de PCR-RFLP donde se incluye la generación de sitios de corte artificiales cuando el sitio de corte no existe.



En la figura se muestra un ensayo de PCR-RFLP. Se amplifica un fragmento de ADN, obteniéndose dos secuencias, las cuales son digeridas con *MboI*; las secuencias sin sitio de restricción generarán únicamente una banda en el gel de agarosa (primer carril), a diferencia de las secuencias con sitio de restricción las cuales generarán dos bandas de menor peso molecular (carril 2). En el caso de los individuos heterocigotos se observarán tres bandas (carril 3).

Figura 1. PCR-RFLP

II.4.1.1B Ensayos de discriminación alélica

Los ensayos de discriminación alélica (Figura 2) detectan SNPs mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de dos sondas marcadas con fluoróforos diferentes (FAM y VIC). Este ensayo se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la DNA polimerasa, que resulta en la emisión de fluorescencia por parte de las sondas marcadas; la intensidad de la fluorescencia es medida mediante PCR en tiempo real (PCRrt). La sonda marcada se localiza entre los dos iniciadores y tiene una temperatura de alineación 10°C superior a la de los iniciadores por lo que estos últimos, se unen primero. La degradación de la sonda por la DNA polimerasa, libera fluorescencia proporcional al producto de PCR formado. El lector de fluorescencia registra la emisión luminosa durante los ciclos de amplificación de cada sonda, dependiendo del alelo presente en la secuencia amplificada, fluoresce FAM o VIC, en el caso de individuos heterocigotos, se observará emisión de ambos fluoróforos (Livak 1999; Vignal *et al.*, 2002).

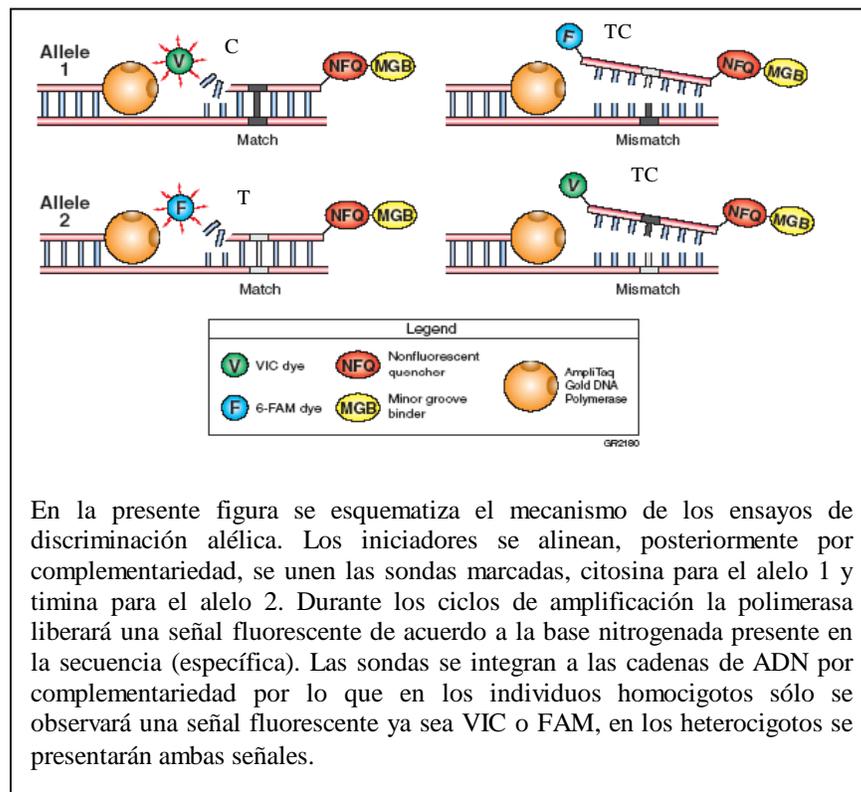


Figura 2. Ensayo de discriminación alélica

II.4.2 Marcadores moleculares involucrados en la suavidad de la carne

La suavidad de la carne es un atributo de aceptación muy importante y se sabe que ésta característica es modificada por la proteólisis, la cual es producida por tres sistemas de enzimas y sus cofactores como son las catepsinas lisosomales, el sistema ubiquitina proteosomal y las proteasas calcio dependientes (Oddy *et al.*, 2001).

Las catepsinas lisosomales degradan actina y miosina, jugando un pequeño papel en la degradación *postmortem*, pues la liberación de estas enzimas es muy escasa. Sin embargo, las catepsinas pueden contribuir al ablandamiento *postmortem* cuando la temperatura está por encima de los 16°C, actuando en combinación con el sistema de la ubiquitina proteosomal (Koochmaraie, 1988).

Las proteasas calcio-dependientes (CDP I-II) son cistein-proteasas activadas por Ca^{+2} , a ésta familia pertenecen las calpaínas (m-CAPN y μ -CAPN) y la calpastatina; ésta última es el inhibidor de la actividad proteolítica (Koochmaraie 1992, 1994; Morgan 1992; Goll *et al.*, 1999; Sorimachi *et al.*, 1999; Suzuki 1999; Soria y Corva 2004). Estas proteínas han sido bien caracterizadas, encontrando que son específicas para cada especie y tejido. Investigaciones más recientes, han descrito que las primeras son, las responsables de la maduración *postmortem* (Koochmaraie *et al.*, 1995; Oddy *et al.*, 2001).

Se han identificado dos isoformas: μ -calpaína (calpaína I) requiere una concentración de calcio micromolar y m-calpaína (calpaína II) la cual actúa a concentraciones milimolares (Suzuki y Sorimachi, 1998). Ambas calpaínas son proenzimas no activas, que se autolizan produciendo proteinasas activas en presencia de calcio. Están compuestas por una subunidad catalítica de 80 kDa, las cuales son producto de diferentes genes y por una unidad reguladora de 30kDa idéntica en ambas (Ilian, 1998).

La subunidad catalítica esta conformada por 4 dominios (I al IV) y su secuencia de amino ácidos es similar en un 50% entre ambas enzimas. Por su parte la subunidad reguladora posee dos dominios, uno N-terminal rico en glicina (V) y otro con cuatro sitios potenciales de unión de Ca^{2+} en el extremo COOH (Simon *et al.*, 1998).

Ambas calpaínas degradan la mayoría de las proteínas miofibrilares, mostrando su mayor actividad durante los primeros 7 a 10 días post mortem a 2-4°C con pH óptimo de 7.2-8.2 (Goll *et al.*, 2003). Varios autores señalan a la calpaína I como la principal enzima del

sistema CDP debido a las concentraciones de calcio a la cuales se activa (Koohmaraie 1994; Illian *et al.*, 2001). La actina y miosina no son susceptibles a su acción a diferencia de estas, la vinculina y distrofina inician su degradación a las 24h postmortem, desapareciendo en su totalidad a los 6 días. La proteólisis de la titina y nebulina se produce en las primeras 72 h (Beltrán 1997; Soria y Corva 2004).

La calpastatina es el inhibidor de las calpaínas, la estructura de aminoácidos tiene 5 dominios, cuatro (I-IV) son repetitivos y desarrollan la actividad inhibitoria, existe un dominio adicional sin función conocida (L) y otro más (XL) en el extremo N-terminal (Cong *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2005). Las diferentes isoformas de la proteína difieren en tamaño; en general se pueden clasificar en dos subtipos, una pequeña de los eritrocitos de 65-70 kDa y una larga de tejidos con un peso de 107-172 kDa. La caracterización completa es difícil ya que presentan isoformas aberrantes debido al splicing alternativo (Goll *et al.*, 2003).

II.4.2.1 El gen de la Calpaína I (CAPN1)

El gen CAPN1 ha sido mapeado en la parte final telomérica de BTA29 (Smith *et al.*, 2000), Casas *et al.*, (2000) reportaron un QTL para suavidad en esta región con efecto sobre la fuerza de corte en la población de ganado perteneciente al Centro de Investigación en Carne Animal (MARC), lo que respaldó la evaluación de CAPN1 como gen candidato para la suavidad de la carne (Page *et al.*, 2002).

Estructuralmente, el gen de la calpaína 1, es de 30kb, contiene 22 exones y 21 intrones (Koohmaraie, 1988; Zhang, 1996; Smith 2000; Juszczuk, 2002; Page *et al.*, 2002).

Page *et al.*, (2002, 2004) describieron dos mutaciones localizadas en los exones 9 y 14 que originan una sustitución de aminoácidos en la proteína respectiva. La mutación localizada en el exón 9 GGC/GCC provoca la sustitución de alanina por glicina en la posición 316 de la secuencia de la proteína mientras que la mutación ubicada en el exón 14 GTC/ATC determina el cambio de valina por isoleucina en la posición 530; demostrándose que la carne proveniente de animales homocigotos 316C/C así como 530G/G es más suave que cualquier otra combinación alélica. El polimorfismo ubicado en la posición 316 (CAPN1 316G/C), se encuentra dentro del dominio II de la proteína, el cual ha sido

identificado como el sitio proteolítico, por lo que una alteración en esta zona puede alterar la actividad de la proteína afectando la suavidad de la carne; convirtiendo a estos SNPs en marcadores moleculares ya que se encuentran asociados con una característica cuantitativa (Page *et al.*, 2002).

Por su parte White *et al.*, (2005), estudiaron nuevos marcadores moleculares en éste gen (4751 en el intron 17 y 4753 en el intron 21) más adecuados para *B.indicus*, ya que las investigaciones anteriores se centraban en *B.taurus*. El marcador 4751 (CAPN1 4751T/C) es un cambio de citosina por timina, este marcador se ha relacionado con la fuerza de corte en ganado con influencia índica a los 7, 14 y 21 días post mortem. A pesar de que el genotipo 4751C/C se ha encontrado en baja frecuencia se ha observado asociación del marcador con la suavidad; el genotipo 4751C/T es el que mostró la menor fuerza de corte en comparación con 4751T/T por lo que se describe a la citosina como alelo favorable para la suavidad de la carne.

Algunos autores han encontrado diversos polimorfismos en la unidad reguladora de ésta proteína, sin embargo no los han asociado con variables de calidad de carne (Zhang *et al.*, 1996; Juszczuk *et al.*, 2002, 2004).

II.4.3 Marcadores moleculares involucrados en el marmoleo de la carne

El marmoleo es la cantidad de grasa entreverada dentro de la carne y se observa principalmente en el área del ojo de costilla en un corte hecho entre las costillas duodécima y decimotercera. En países con Estados Unidos el marmoleo es el factor más importante en el sistema de evaluación de la calidad de la canal. En un intento por producir grasa intramuscular, se han llegado a obtener canales con engrasamiento excesivo en depósitos como el subcutáneo, visceral e intermuscular; grasa que no es útil en las evaluaciones de calidad o rendimiento. Los resultados de esta acumulación de grasa son beneficiosos, pues la deposición de grandes cantidades GIM aumentan la terneza a través del cambio en la velocidad de enfriamiento de la canal inmediatamente después del sacrificio (Jeremiah *et al.*, 2002).

Se ha comprobado que la jugosidad está positivamente relacionada con la GIM, ya que lubrica las fibras musculares durante el cocinado, lo que desarrolla una "aparente"

sensación de jugosidad que favorecerá la estimulación del flujo salivar durante la masticación, dando la sensación de mejor calidad (Savell y Cross, 1986).

También se ha descrito que la presencia de GIM, desarrolla mejores olores y sabores en el producto por lo que el consumidor asocia el marmoleo con mejor sabor, olor, jugosidad y suavidad (Savell y Cross, 1986).

El potencial para marmolear es difícil de predecir por lo tanto la selección genética de ésta característica no es sencilla. La estimación del marmoleo es visual a diferencia del porcentaje de grasa intramuscular por lo que es difícil que ambas mediciones concuerden; además la evaluación de esta característica se lleva a cabo una vez que se ha hecho el sacrificio por lo que hay un periodo de tiempo muy largo entre el uso de un semental y la posibilidad de evaluar a su descendencia respecto a esta característica (Barendse *et al.*, 2004). Otros factores que deberán ser tomados en cuenta son la edad, la alimentación y el sexo pues son factores que intervienen en el desarrollo del tejido adiposo y por lo tanto en el grado de marmoleo. Lo anterior no son obstáculos invencibles, sin embargo hacen de la selección hacia marmoleo una actividad costosa que requiere mucho tiempo (Barendse *et al.*, 2004).

Como la mayoría de las características productivas, el marmoleo, es el resultado de la interacción entre varios genes y el medio ambiente por lo que se espera que muchos genes se encuentren asociados con ésta característica; sin embargo, el marcador TG5 (TG – 537C/T) del gen de tiroglobulina, se ha estudiado debido al bajo efecto pleiotrópico con otras características y a su asociación con el marmoleo (Barendse, 1999; Barendse *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2005; Thaller *et al.*, 2003).

II.4.3.1 El gen de la Tiroglobulina (TG)

Se ha demostrado que el marmoleo es afectado por varios genes, uno de ellos es el gen de la tiroglobulina (Harper y Pethick, 2004).

En respuesta a la actividad tiroidea, el gen TG se expresa dentro del tejido de esta glándula. La proteína (tiroglobulina) es secretada y activada para posteriormente formar T3 y T4. La tiroglobulina tiene un rol indirecto en la regulación metabólica; sin embargo, la

velocidad de expresión del gen, tiene efectos directos sobre la producción de las principales hormonas tiroideas y estas a su vez sobre la deposición de grasa (Harper y Pethrick, 2004).

Barendse (1999) y Barendse *et al.*, (2001 y 2004) encontraron un SNP en el cromosoma 14, asociado con el marmoleo. El SNP se ubica cerca del gen de tiroglobulina, el cual tiene 300kb y codifica la proteína del mismo nombre, la cual indirectamente regula el metabolismo de los lípidos. El polimorfismo TG -537C/T, se localiza en la región 5' no traducible del gen, por lo que probablemente esta involucrado en la regulación de la actividad del gen (Barendse *et al.*, 2004).

La ubicación del polimorfismo se encuentra definida a partir del inicio del primer exon del gen TG, en la posición -537 (de acuerdo a la nomenclatura DenDunnen y Antonarakis éste polimorfismo se localiza en NW_001493192.1.g.290170C>T. Barendse, 2007 Comunicación personal). El polimorfismo esta definido por los alelos 2 y 3, mientras que el alelo 2 muestra la secuencia GATC, el alelo 3 tiene una secuencia GATT. Barendse *et al.*, (2004) estudiaron la asociación del marcador TG -537C/T con el grado de marmoleo en Angus, Shorthorn y cruza comerciales (no se conoce que razas componen el genotipo, sin embargo hay influencia *Bos indicus*) en Australia; encontrando que los homocigotos -537T tenían una mejor calificación de marmoleo en comparación con los homocigotos -537C y los heterocigotos. Cabe mencionar que a pesar de la baja frecuencia de -537T, se encontró asociación con el grado de marmoleo, haciéndose más evidente a medida que aumentó la frecuencia del alelo; por otra parte, al ser removido el genotipo -537T/T dejó de observarse asociación significativa.

Además de la asociación con el grado de marmoleo, se estudió el efecto que tiene el marcador TG -537C/T sobre la deposición de grasa subcutánea, el peso de la canal caliente o el peso final, sin encontrar efecto significativo; por lo que el autor señala que el uso de este marcador podría ser de utilidad en la crianza y engorda de ganado cárnico debido a que no hay efecto sobre otras variables.

A diferencia de lo encontrado por Barendse *et al.*, (2004), Casas *et al.*, (2005) señalan que en poblaciones de ganado con influencia *B. indicus* el marcador TG -537C/T únicamente muestra una tendencia hacia la asociación con el grado de marmoleo por lo que

en el caso de éste tipo de animales, el polimorfismo del gen TG no es útil como marcador molecular.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo CAPN1 316 G/C, CAPN1 4751 T/C y TG -521C/T, así como su asociación con la calidad de la carne bovina en México..

III.2 Objetivos específicos

- Determinar las variantes y frecuencias alélicas de los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C, en carne bovina en México.
- Determinar las variantes y frecuencias alélicas del marcador TG -521C/T del gen TG, en carne bovina en México.
- Establecer la asociación entre las variables de calidad (FCWB y GIM) y los genotipos de los marcadores analizados.

IV. HIPÓTESIS

Los alelos favorables de los genes CAPN1 y TG asociados con la calidad de la carne se encontrarán en menor frecuencia que los no favorables, conservando la asociación con la FCWB y el porcentaje de GIM.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Obtención del material biológico y lugar de trabajo

En el estudio realizado por Meza (2007), se llevó a cabo un muestreo a nivel nacional en los rastros Tipo Inspección Federal (TIF) y Municipales de mayor sacrificio representando las principales regiones agro-climáticas del país (norte, centro y sur) para caracterizar el ganado que se tiene en México. La caracterización se realizó mediante la toma de medidas para determinar el rendimiento y calidad según variables objetivas y subjetivas, incluyendo las que se mencionan en la norma estadounidense y en los patrones de clasificación europea. A partir de dicho estudio se decidieron los sitios de muestreo para el presente trabajo.

Se colectaron 124 muestras (área del músculo *longissimus dorsi* entre la 12va y 13va costilla) de las cuales, 71 fueron obtenidas en el rastro TIF de la ciudad de Mexicali, B.C.; 25 del rastro TIF de la ciudad de Hermosillo, Son.; 16 de la ciudad de Guadalajara, Jal.; obtenidas en punto de venta y 12 de la ciudad de Veracruz obtenidas en punto de venta.

Cabe mencionar que las muestras provenientes de Hermosillo, fueron de ganado tipo europeo; es decir, a pesar de que no se conoce la composición racial de las cruza, fenotípicamente el ganado tiene apariencia europea (sin giba, sin papada, de orejas cortas y no pendulantes, ente otras características);

Los análisis físico-químicos de las muestras se realizaron en el laboratorio de ciencia de la carne en lo que se refiere a la determinación de fuerza de corte, así como, en el laboratorio de bioquímica y nutrición animal para la determinación de extracto etéreo, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria-UNAM.

Los análisis moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica -IPN.

V.2 Análisis físico-químicos

V.2.1 Determinación de porcentaje de grasa intramuscular

El porcentaje de grasa intramuscular (GIM) se determinó mediante extracción con éter etílico (AOAC, 1997). Para la determinación de extracto etéreo, es necesaria la obtención

del porcentaje de humedad y materia seca (MS), para lo cual, se recortó la grasa subcutánea y el epimio de las muestras (chuletas de 2.5 cm de grosor). Se molió finamente la carne magra. Se pesaron 10g de muestra, por duplicado, sobre papel filtro a peso constante (se mantuvo durante 8 horas en estufa de desecación). Posteriormente se introdujeron las muestras de carne en una estufa de desecación durante 12 h a 110°C, se pesaron de nuevo las muestras una vez que estuvieron a temperatura ambiente y por diferencia de pesos se calculó el porcentaje de humedad.

Una vez obtenidas las muestras (sin humedad) se machacaron para reducir el tamaño de partícula. Seguidamente, se pesaron entre 2 y 3g por duplicado y se envolvieron en papel filtro Whatman No. 4. El papel fue colocado en un cartucho de celulosa tapándose con algodón, colocándose el cartucho en el extractor Soxhlet. Por otra parte, se añadieron aproximadamente 150 ml de éter etílico en matraces de bola de fondo plano, tarados previamente, que contenían 3 perlas de vidrio. Los matraces se acoplaron a los extractores y se realizó la extracción durante 5 h, a razón de 4 descargas/h. Al finalizar la extracción, los matraces se colocaron en la estufa a 100°C durante 30 min, para eliminar los residuos de éter. Por último, se dejaron enfriar los matraces con el extracto en desecadores al vacío y se pesaron. El porcentaje de GIM se calculó según las siguientes fórmulas:

$$\%Grasa_{base\ seca} = \frac{\text{Peso extracto}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

$$\%GIM_{base\ húmeda} = \%Grasa_{base\ seca} \times \%MS/100; \text{ donde:}$$

$$\%MS = 100 - \%humedad$$

V.2.2 Fuerza de corte (FCWB)

La suavidad se estimó mediante la técnica de resistencia al corte utilizando un Warner Bratzler, según el método descrito en el Guidelines of Cookery (AMSA, 1995). Se utilizó una chuleta de 2.5 cm de grosor, removiéndose la grasa y tejido conectivo. Las muestras de carne se cocinaron en calor seco de horno eléctrico hasta una temperatura interna de 70°C

estimada con un termómetro. Se obtuvieron hasta 8 trozos de carne con sacabocado paralelamente a la fibra muscular de diferentes partes del músculo para obtener un estimado representativo de la suavidad. Los trozos cilíndricos se colocaron perpendicularmente en la cuchilla triangular del equipo. Se calibró el dinamómetro a cero y se tomaron las lecturas de la fuerza ejercida en kilogramos, para cortar los trozos de cada muestra. Se utilizaron los parámetros para clasificar la suavidad según Belew *et al.*, (2003); como se describe a continuación: muy suave (FCWB < 3.2kg); suave (3.2 kg < FCWB <3.9 kg); intermedia (3.9 kg < FCWB <4.6 kg) y dura (FCWB > 4.6 kg).

V.3 Extracción de ADN

Se colectaron 5 g de carne sin grasa, ni tejido conectivo de cada muestra, los cuales se conservaron a -20° C hasta su procesamiento.

Para el aislamiento del ADN de las muestras se siguió el protocolo del estuche comercial de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, Inc.). Brevemente, se pesaron 25mg de tejido muscular (sin grasa ni tejido conectivo), se maceraron con 600µl de solución de lisis de núcleo, una vez terminado, se colocaron en hielo dos min; se incubaron a 65°C/30 min; se adicionaron 30µl de RNAsa, se mezclaron por inversión, y se incubaron a 37°C/30 min, se enfrió a temperatura ambiente; se adicionaron 200µl de solución de precipitación de proteína, se mezcló en vórtex y enfrió en hielo por 5 min, se centrifugó a 14000 rpm/4 min; el sobrenadante se transfirió a un tubo con 600µl de isopropanol, se mezcló por inversión, se centrifugó a 14000 rpm/1 min, se removió el sobrenadante, al precipitado se le agregaron 600µl de etanol al 70% , se mezcló y centrifugó como en el paso anterior, se aspiró el etanol y se secó la pastilla de ADN por 15 min mediante vacío, finalmente, se rehidrató con 100µl de solución de rehidratación por 1 h/65°C o toda la noche a 4°C.

Una vez hecha la extracción del ADN se verificó la integridad y se cuantificó. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1.5%, depositándose 5µl de ADN de la muestra + 2µl de buffer de corrimiento con syber gold 1; en el primer y último carril se depositó 1µl de marcador de masa (Lambda ADN 500ng/µl GIBCOBRL®) + 2µl de syber gold con buffer de corrimiento. Se colocó en una cámara de electroforesis a 115 volts por 1 hora.

Posteriormente, se visualizó mediante luz u.v, se fotografió y cuantificó utilizando el programa Gel-Imagen de Kodak 1Digital Science (Kodak Digital Science, 1995-1999).

V.4 Análisis de los polimorfismos CAPN1 y TG

V.4.1 Marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C

Ambos marcadores se analizaron utilizando un ensayo de discriminación alélica (II.4.1.1B). Los iniciadores y sondas necesarias fueron sintetizados en la compañía Applied Biosystems tomando como base las secuencias reportadas en el GenBank (No. de Acceso, AF248054 y AF252504S2; Cuadro 1), los polimorfismos fueron localizados de acuerdo a lo reportado por Page *et al.*, (2004), Casas *et al.*, (2005) y White *et al.*, (2005). Los ensayos de discriminación alélica fueron diseñados para trabajar en condiciones de amplificación universales por lo que pueden ser realizados simultáneamente, es decir, en la placa de detección pueden detectarse, homocigotos para cualquier alelo o heterocigotos. Las condiciones para el ensayo de discriminación alélica de los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C fueron estandarizadas por Parra *et al.*, 2007; brevemente, se utilizaron 250ng de ADN, 12.5µl de Taqman PCR Master mix (Applied Biosystems) y 0.625µl de la mezcla de las sondas e iniciadores (Assay SNP mix), se utilizó Agua MiliQ como control negativo en tres pozos por cada placa.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores y sondas para los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C

Marcador	Primer Forward	Primer Reverse	Sonda
CAPN1 316	GCAGTGCCGTTTCCTACAG	AGCTGCTCCCGCATGTAAG	VIC-CCACGGCGTTCCA
			FAM-CCACGCCGTTCCA
CAPN1 4751	F TGGCATCCTCCCCTTGACT	CCCCGTCACCTTGACACA	VIC-CTGCGCCTCTGTTT
			FAM-CTGCGCCTCCGTTT

Cada ensayo se realizó de forma individual en placas ópticas de 96 pozos en el equipo ABI Prism® 7000 (Sequence Detection System), bajo las siguientes condiciones; un ciclo a 50°C/2 min y 95°C/10 min, 40 ciclos de dos pasos 92°C/15 seg y 60°C/1 min. Para el

análisis de cada genotipo se utilizó el programa ABI Prism 7000 (Real-Time Sequence Detection Software).

Los resultados son desplegados en una pantalla en la cual cada curva corresponde a un fluoróforo(Figura 3) al finalizar la PCR el genotipo fue asignado de acuerdo a la fluorescencia predominante VIC (homocigotos CAPN1 316G/G o CAPN14751 T/T), FAM (homocigotos CAPN1 316C/C o CAPN1 4751C/C) o ambas señales (heterocigotos CAPN1 316 G/C o CAPN1 4751T/C).

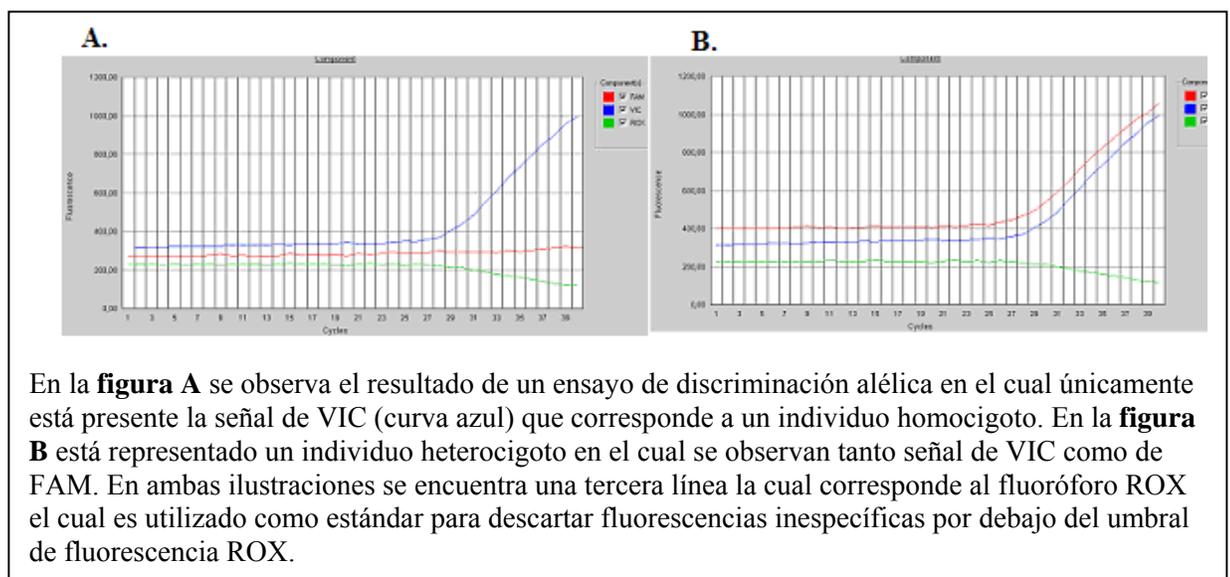


Figura 3. Patrón de fluorescencia del ensayo de discriminación alélica

V.4.2 Marcador TG -537C/T

Para la determinación del polimorfismo TG -537C/T, se llevó a cabo una PCR utilizando los iniciadores TG5U2 5' ggg gat gac tac gag tat gac tg 3' y TG5D1 5' gtg aaa atc ttg tgg agg ctg ta3' que generan un fragmento de 545pb (Barendse *et al.*, 2004). La secuencia reportada como el sitio de localización del polimorfismo se corroboró con la secuencia de tiroglobulina del GenBank (No. de Acceso, X05380). Un volumen total de 25µl contenía: 1X de Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP's, 0.1µM de cada iniciador, 100ng de ADN y 0.125 U de Taq Polimerasa. La reacción se realizó en el termociclador DNA Engine

Tetrad 2® bajo las siguientes condiciones; un ciclo a 95°C/5 min y 95°C/45 seg, 5 ciclos a 62°C/45 seg disminuyendo 2°C en cada ciclo y 72°C/45 seg, 30 ciclos a 95°C/45 seg, 55°C/45 seg, 72°C/45 seg y 72°C/10 seg. En todos los ensayos, los productos amplificados fueron verificados en un gel de agarosa al 1.5% utilizando como marcador de peso molecular DNA λ digerido con *Pst*I, Agua miliQ como control negativo y una muestra previamente amplificada como control positivo.

La detección del polimorfismo TG -537C/T se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Barendse (1999). La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen total de 10 μ l el cual contenía 1X Buffer, 0.5U de *Mbo*I y 200ng de producto amplificado. Se digirieron los productos de PCR durante toda la noche a 37°C, los fragmentos fueron separados en un gel de acrilamida al 20% el cual contenía: 7.5ml de acrilamida (29:1 acrilamida:bis acrilamida), 1.5ml de TBE 10x, 5.83ml Agua miliQ, 150 μ l PSA 10% y 22 μ l TEMED. Los fragmentos fueron detectados mediante luz ultravioleta utilizando como marcador de peso molecular ADN 50pb y producto de PCR sin digerir como control negativo.

V.5 Análisis estadístico

Se generaron las frecuencias génicas, genotípicas (marcadores CAPN1 316G/C, CAPN1 4751T/C y TG -537C/T) y haplotípicas (marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C) por región contabilizando la ocurrencia de los alelos, de los genotipos y haplotipos. Posteriormente, se confirmó el equilibrio genético de Hardy-Weinberg mediante una prueba de χ^2 (Falconer y McKay, 1996).

Para establecer la asociación entre las variables de calidad con los genotipos de los marcadores analizados se ajustó un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (1997). El modelo empleado fue:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = FCWB y GIM

μ = media general

A_i = i-ésimo efecto del genotipo

B_j = j-ésimo efecto del origen de la muestra

$(AB)_{ij}$ = interacción del efecto del i-ésimo genotipo y el efecto del j-ésimo origen de la muestra

E_{ij} = error aleatorio

Para la FCWB se realizó un análisis alternativo agrupando los orígenes por zonas (Norte, Centro y Sur) de la República Mexicana.

Las medias de la FCWB y GIM fueron comparadas mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de la tecnología molecular en la industria pecuaria ha ubicado marcadores polimórficos asociados con la suavidad y el marmoleo (medido como porcentaje de GIM), sin embargo, en México no se ha evaluado la asociación del polimorfismo de los genes CAPN1 y TG, ambos, genes con efecto sobre la calidad de la carne bovina. A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de carne mexicana.

VI.1 Análisis físico-químicos (GIM y FCWB)

VI.1.1 Porcentaje de grasa intramuscular

De las 124 muestras de carne que se obtuvieron durante el muestreo, no fue posible determinar el porcentaje de GIM en las que provenían de Veracruz debido a la poca disponibilidad de muestra para realizar la determinación, por lo que se decidió remover los datos de dicha ciudad para el análisis estadístico.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P=0.01$) de acuerdo al origen de la muestra respecto al porcentaje de GIM. Las muestras obtenidas en la ciudad de Hermosillo tuvieron $9.9\pm 4\%$ de GIM siendo la ciudad con la carne de mayor contenido de GIM en comparación con la ciudad de Mexicali (3.8 ± 1) y Guadalajara (3.1 ± 1), entre las cuales, no existieron diferencias ($P>0.05$). Probablemente, la diferencia en el contenido de grasa intramuscular (%) entre las ciudades se debe a que la carne colectada en Hermosillo provenía de ganado tipo europeo el cual normalmente registra un mayor marmoleo en comparación con cruza con mayor porcentaje de *B. indicus* (Sherbeck *et al.*, 1995).

Delgado *et al.*, (2005) estudiaron carne bovina de importación (choice y sin sello), así como carne mexicana obtenida en tres regiones del país (norte, centro y sur). En la carne de importación se encontró que las muestras con calificación choice tuvieron 6.3% de GIM a diferencia del 2.9% de la carne sin sello ($P<0.05$); la carne mexicana tuvo 3.1% GIM en promedio, sin registrar diferencias respecto a la región del país siendo un porcentaje inferior al encontrado en el presente estudio donde en promedio la carne tuvo 4.9% de GIM.

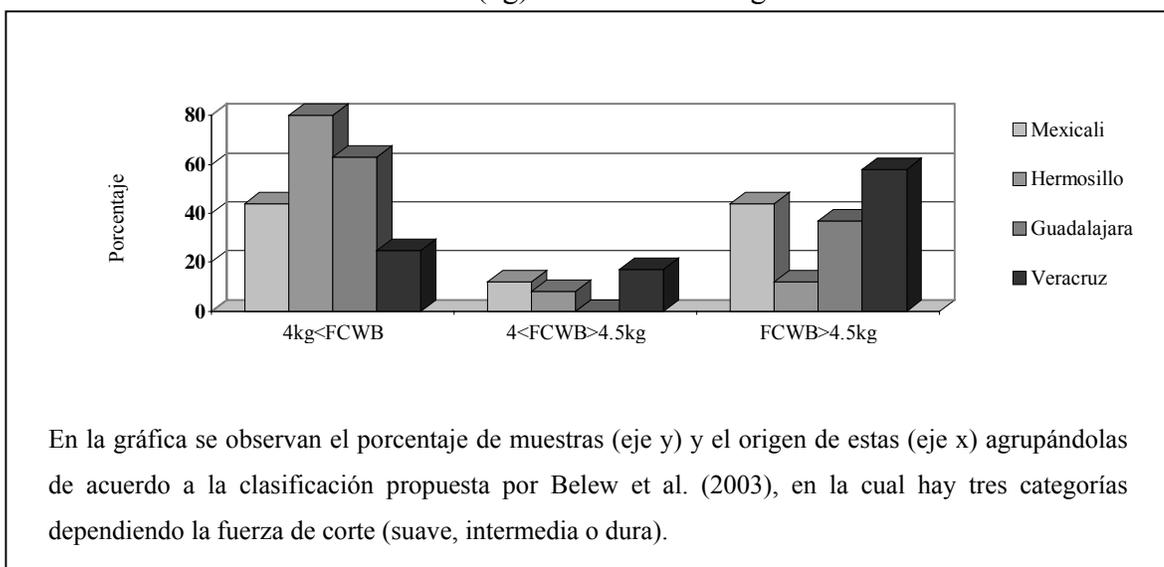
Thaller *et al.*, (2003) estudiaron el porcentaje de GIM en razas Holstein alemán y Charolais, encontrando 5.77 y 3.17% respectivamente. Ambas razas mostraron una menor cantidad de GIM en comparación con la carne obtenida en Hermosillo; por su parte las muestras obtenidas en Guadalajara y Mexicali tuvieron un porcentaje similar al obtenido en la raza Charolais.

VI.1.2 Fuerza Corte (FCWB)

En el caso de la FCWB se contaba con la información de las 124 muestras, por lo que se estudiaron los 4 orígenes en donde fueron colectadas las muestras. Respecto a la fuerza de corte en promedio fue de 4.3 ± 1 kg, sin que se registraran diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre el origen de la muestra; . Delgado *et al.*, (2005) realizaron un estudio en tres ciudades de México (Monterrey, Guadalajara y Villahermosa) encontrando que la carne del Norte fue la más suave (3.6kg) en comparación con la del Centro y Sur entre las cuales no existió diferencia (4.6kg).

De acuerdo a lo descrito por Belew *et al.*, (2003) la carne puede ser suave ($FCWB < 4$ kg), de suavidad intermedia ($4 \leq FCWB < 4.5$) o dura ($FCWB \geq 4.5$); en el presente estudio se encontró que el 52% de las muestras fueron suaves, el 13.8% fueron de suavidad intermedia y 34% duras. Cabe mencionar que la mayoría de las muestras obtenidas en Hermosillo se agruparon en la categoría de carne suave como se muestra en la Gráfica 1, en contraste, la mayor parte de la carne proveniente de Veracruz es dura; estas diferencias probablemente se deben a la constitución racial del ganado proveniente de cada región así como al tipo de alimentación (Trueta, 2003).

Gráfica 1. FCWB (kg) de acuerdo al origen de la muestra



Debido a que en el análisis de FCWB las muestras no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) de acuerdo al origen, se decidió agruparlas por región del país en: Norte (Mexicali y Hermosillo), Centro (Guadalajara) y Sur (Veracruz) y de esta manera hacer los análisis de las frecuencias alélicas, genotípicas y la asociación de los marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C con la FCWB. A continuación se presentan los resultados encontrados en los marcadores evaluados.

VI.2 Marcadores CAPN1 316G/C y CAPN1 4751T/C

VI.2.1 Frecuencias alélicas

Los análisis de discriminación alélica fueron realizados en la totalidad de las muestras, con estos resultados se identificaron el tipo y frecuencia de las variantes alélicas en la población analizada. En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo a la región donde se colectó la muestra. Los alelos 316G y 4751T tuvieron una mayor frecuencia respecto al alelo 316C y 4751C, ya que no se encontraron individuos con genotipo homocigoto (316C/C ni 4751C/C).

Page *et al.*, (2004) llevaron a cabo una investigación en los Estados Unidos con ganado Simmental x Angus así como cruza de razas *B. taurus* encontrando que el alelo 316C tiene

una frecuencia del 17%, siendo menor respecto al alelo 316G. En particular, la raza Angus registró la mayor frecuencia del alelo 316C (59%) mientras que en otras razas puras la frecuencia se encontró en un rango de 0-19%. White *et al.*, (2005) encontraron en ganado Brahman el alelo 4751C en una frecuencia del 9.6%, a diferencia del 58 y 64% encontrado en ganado *B. taurus* y cruza *B. taurus-B. indicus*.

Parra *et al.*, (2007) caracterizaron el polimorfismo del marcador CAPN1 316G/C, CAPN1 4751T/C y CAPN1 530G/A del gen CAPN1 mediante ensayos de discriminación alélica en ganado Brahman de registro en México encontrando que la frecuencia del alelo 316C fue del 46%, debido a que el 92% fueron heterocigotos.

A partir de las frecuencias alélicas, se pudo observar que las poblaciones (Norte, Centro y Sur) no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (excepto la región sur). Por su parte, Parra *et al.*, (2007) reportaron que una población de ganado Brahman de registro tampoco estaba en equilibrio. En ambos casos, se sabe que existen fuerzas que están modificando el equilibrio génico, como son la migración y selección que influyen la presencia de algunos genotipos (Falconer y Mackay, 1996). Debido a que en el país el mercado de la carne se encuentra orientado hacia una producción de volumen en la cual es más importante obtener ganancias que calidad (Zambrano, 2007), probablemente se han tomado en cuenta criterios de selección basados en el fenotipo, los cuales, han llevado al desequilibrio de las poblaciones respecto a características de calidad como la suavidad lo cual se ve reflejado en la nula frecuencia del alelo 316C y 4751C del gen CAPN1 (FIRA, 1999; Casas *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Frecuencias alélicas de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C respecto a la región

Región	CAPN1 4751T/C		CAPN1 316G/C	
	C	T	C	G
Norte (n=96)	0.34	0.65	0.31	0.68
Centro (n=16)	0.47	0.53	0.41	0.59
Sur (n=11)	0.23	0.77	0.27	0.73
Total	0.35	0.65	0.32	0.67

VI.2.2 Frecuencias genotípicas

De acuerdo a los resultados de las variantes alélicas encontradas en la población bajo estudio, se formaron los genotipos y se analizó su frecuencia. Como se muestra en el Cuadro 3, el genotipo 4751T/T se encontró con una frecuencia del 30% a diferencia del 70% de individuos heterocigotos encontrados. Un punto importante a resaltar es que el genotipo 4751C/C no fue encontrado en las muestras analizadas; White *et al.*, (2005) y Casas *et al.*, (2006) no encontraron individuos con el genotipo 4751C/C en Brahman. Estos autores, además evaluaron ganado *B. taurus* y cruzas de *B. taurus*-*B. indicus* en las cuales se encontraron los tres genotipos (4751C/C, 4751C/T y 4751T/T), los heterocigotos tuvieron la mayor frecuencia (47.5%) respecto a los homocigotos 4751CC, siendo los homocigotos 4751T/T el genotipo que se encontró en menor frecuencia. En la población Brahman estudiada por Parra *et al.*, (2007) al igual que en el presente estudio no se encontró el genotipo 4751C/C y únicamente se presentó el genotipo 4751T/T en el 1% de lo individuos estudiados por lo que el 99% de los genotipos fueron heterocigotos.

En este estudio tampoco se encontraron individuos con genotipo 316C/C, el genotipo 316G/G se observó en un 36%, encontrándose los heterocigotos en mayor frecuencia. En ganado Brahman de registro, en México, se encontró de igual manera ausente el genotipo 316C/C y los heterocigotos en un 92% (Parra *et al.*, 2007). Page *et al.*, (2004) estudiaron en ganado *B. taurus* que los homocigotos 316G/G tuvieron la mayor frecuencia (65%) y los individuos con genotipo 316C/C fueron los menos frecuentes en la población (3.3%).

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C

Región	CAPN1 4751T/C			CAPN1 316G/C		
	CC	CT	TT	CC	CG	GG
Norte (n=96)	--	0.69	0.31	--	0.620	0.38
Centro (n=16)	--	0.94	0.06	--	0.8113	0.193
Sur (n=11)	--	0.455	0.546	--	0.546	0.455

VI.2.3 Efecto de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C sobre la FCWB

El análisis del efecto de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316 G/C sobre la FCWB (Cuadro 4), mostró que únicamente existe asociación del primer polimorfismo con la suavidad ($P=0.03$), sin encontrarse efecto del origen, ni interacción de los factores ($P>0.05$).

El genotipo 4751C/T mostró tener menor FCWB respecto al genotipo 4751T/T ($P<0.05$), a diferencia de ese marcador, los genotipos 316C/G y 316G/G no fueron diferentes respecto a la FCWB. La literatura señala que el alelo 316C y 4751C es favorable para la calidad de la carne, ya que los individuos que lo poseen, registran FCWB inferiores a los animales con alelo 4751T o 316G (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006). La diferencia registrada entre los genotipos favorables y los no favorables, en la literatura, es de 0.4-0.6 kg; en el presente estudio se encontró una diferencia de 0.56 kg (Page *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Efecto del genotipo sobre la FCWB (kg)

FCWB (kg)	CAPN1 4751T/C		CAPN1 316G/C	
	CT	TT	CG	GG
	4.09 ^b	4.65 ^a	4.27 ^a	4.25 ^a

a, b: literales distintas indican diferencia estadísticas significativa ($P<0.05$).

Se ha descrito que la aparición del polimorfismo CAPN1 4751T/C se generó antes de la división entre *B. taurus* y *B. indicus* por lo que este marcador tiene el poder de predicción en ambas subespecies, por el contrario el polimorfismo CAPN1 316G/C se generó una vez que se hizo la división de estas subespecies, particularmente en *B. taurus* por lo que tiene mayor efecto sobre la FCWB en este tipo de ganado (White *et al.*, 2005).

VI.2.4 Efecto de los haplotipos de los marcadores CAPN1 4751T/C y CAPN1 316G/C sobre la FCWB

En años recientes se ha desarrollado gran interés en asociar haplotipos con el fenotipo para ciertas características generándose diversos modelos estadísticos para las asociaciones, sin embargo, estos modelos se complican cuando existen heterocigotos en dos o más SNPs; ya que los haplotipos no pueden ser determinados con certeza (Souverein *et al.*, 2008). Por ejemplo en el caso de los genotipos 316G/C y 4751T/C, en los cuales no se conoce el alelo heredado por el padre o la madre. Debido a lo anteriormente expuesto, los haplotipos fueron determinados de acuerdo a la combinación de genotipos para los marcadores del gen de calpaína.

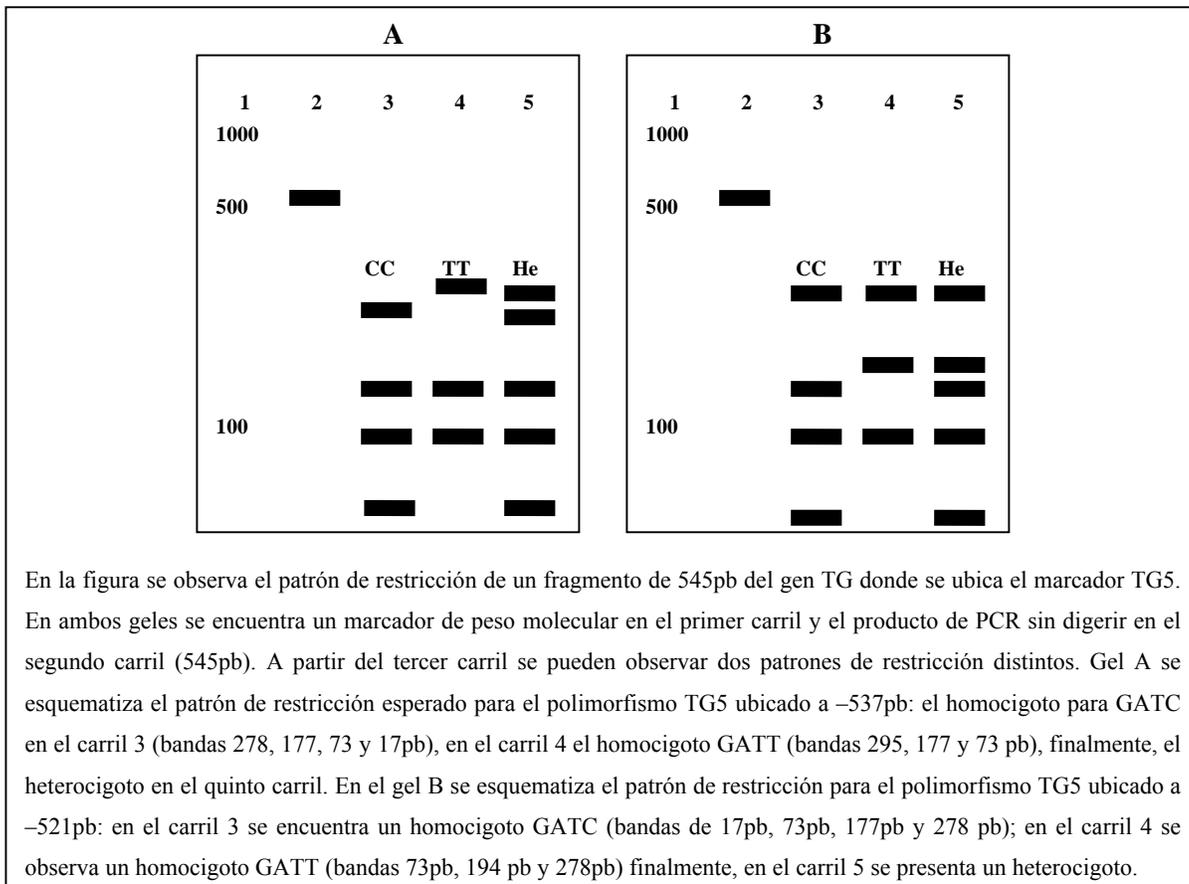
Se encontraron 4 haplotipos de los cuales el haplotipo 316CG/4751CT se presentó en una frecuencia del 50% de las muestras, seguido por el haplotipo 316GG/4751CT con un 20% de presentación y finalmente los haplotipos 316CG/4751TT y 316GG/4751TT con una frecuencia del 15% cada uno.

El análisis del efecto de los haplotipos para los marcadores del gen de calpaína sobre la FCWB no encontró efecto significativo ($P=0.23$), sin embargo, se observó que los haplotipos 316GG/4751CT y 316CG/4751CT tuvieron en promedio 4kg de FCWB, en comparación con los 4.6kg de los homocigotos 316CG/4751TT y 316GG/4751TT. La literatura señala que los haplotipos que contienen el alelo C tienen una menor FCWB, destacando que los heterocigotos muestran efectos intermedios (Casas *et al.*, 2005; White *et al.*, 2005), sin embargo en el presente estudio no se identificó dicho efecto. Otra posible explicación a la falta de efecto del haplotipo sobre la FCWB, es que como se ha mencionado anteriormente, el marcador CAPN1 316G/C tiene un mayor poder de predicción en ganado *B. taurus* a diferencia del marcador CAPN1 4751T/C que se ha

utilizado en *B. indicus* y cruzas, por lo que, es necesaria la separación por genotipos para poder detectar la asociación de los marcadores con la FCWB (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006).

VI.3 Marcador TG –537C/T

Los genotipos del marcador TG –537C/T fueron determinados mediante PCR-RFLP, (sección V.4.2). Sin embargo, los resultados obtenidos después de la digestión de los productos de PCR permitieron observar que los patrones de restricción eran diferentes a los reportados (Figura 4A y B). Este resultado llevo a analizar en detalle la secuencia del producto de amplificación, encontrándose que además del sitio de restricción a –537 pb existe otro sitio de corte a –521pb (Figura 4B). Estos resultados fueron corroborados con el Dr. Barendse (comunicación personal), razón por la cual se procedió a hacer el análisis de las muestras utilizando el sitio –521 como el lugar correcto de localización del polimorfismo en lugar del –537 como se había reportado originalmente (Fig. 4B).



En la figura se observa el patrón de restricción de un fragmento de 545pb del gen TG donde se ubica el marcador TG5. En ambos geles se encuentra un marcador de peso molecular en el primer carril y el producto de PCR sin digerir en el segundo carril (545pb). A partir del tercer carril se pueden observar dos patrones de restricción distintos. Gel A se esquematiza el patrón de restricción esperado para el polimorfismo TG5 ubicado a -537pb: el homocigoto para GATC en el carril 3 (bandas 278, 177, 73 y 17pb), en el carril 4 el homocigoto GATT (bandas 295, 177 y 73 pb), finalmente, el heterocigoto en el quinto carril. En el gel B se esquematiza el patrón de restricción para el polimorfismo TG5 ubicado a -521pb: en el carril 3 se encuentra un homocigoto GATC (bandas de 17pb, 73pb, 177pb y 278 pb); en el carril 4 se observa un homocigoto GATT (bandas 73pb, 194 pb y 278pb) finalmente, en el carril 5 se presenta un heterocigoto.

Figura 4. Patrones de restricción *MboI* para el gen TG

Cabe resaltar que a partir de este momento se mencionará al marcador del gen de TG de acuerdo a la posición correcta TG -521C/T, cuyo patrón de restricción puede observarse en la Figura 5.

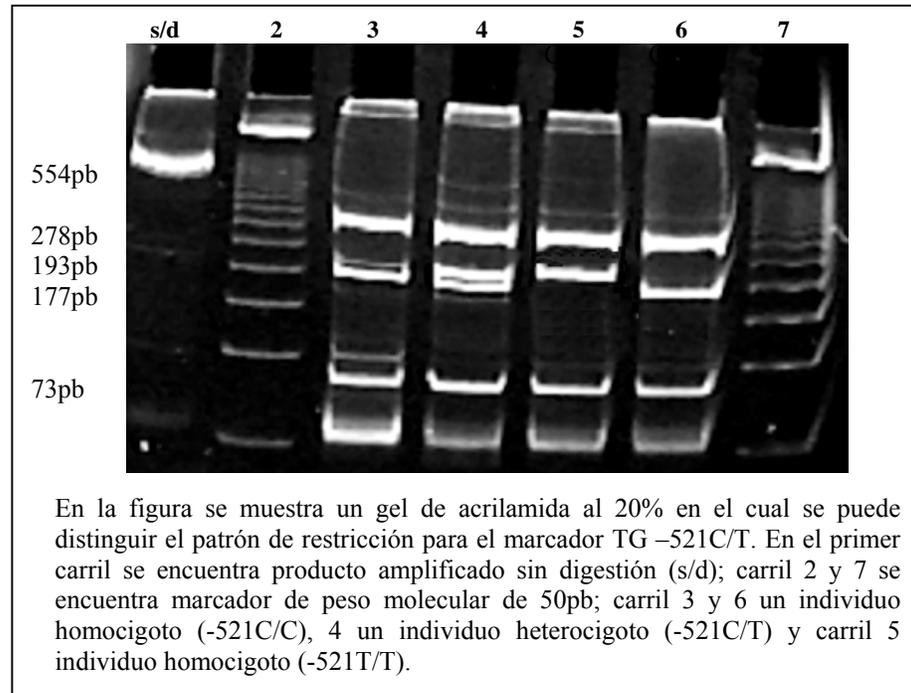


Figura 5. Patrón de restricción para el marcador TG -521C/T

VI.3.1 Frecuencias alélicas

El alelo TG -521C se encontró entre el 70 y 90% de las muestras analizadas para todos los orígenes (Mexicali, Hermosillo, Guadalajara y Veracruz) y estos resultados fueron similares a los reportado por Thaller *et al.*, (2003).en ganado de raza Holstein Alemán y Charolais. Por su parte Casas *et al.*, (2007) encontraron el alelo TG -521T entre un 21 y 24% en ganado *B. taurus*, siendo muy similar a lo encontrado en este estudio (Cuadro 5), cabe mencionar que la presencia de este alelo ha sido asociada a un mayor porcentaje de GIM (Barendse, 1999).

Cuadro 5. Frecuencias alélicas del marcador TG -521C/T respecto al origen

Origen	TG -521	
	C	T
Mexicali (n=70)	0.9	0.1
Hermosillo (n=25)	0.8	0.2
Guadalajara (n=16)	0.9	0.1
Veracruz (n=11)	0.7	0.3
Total	0.9	0.1

VI.3.2 Frecuencias genotípicas

En el Cuadro 6 se presentan las frecuencias genotípicas de acuerdo al origen de la muestra. Se encontró únicamente un individuo con genotipo -521T/T en todas las muestras analizadas, debido a la baja frecuencia, dicho dato fue removido del análisis estadístico.

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas del marcador TG -521C/T por origen.

Origen	TG -521C/T	
	CC	CT
Mexicali (n=70)	0.8	0.2
Hermosillo (n=25)	0.56	0.44
Guadalajara (n=16)	0.81	0.19
Veracruz (n=11)	0.64	0.36
Total	0.74	0.26

a, b: literales distintas indican diferencia estadísticas significativa ($P < 0.05$).

Se encontró en mayor frecuencia el genotipo -521C/C, en general se presentó en el 74% de los individuos a diferencia del 26% de individuos heterocigotos. Barendse, *et al.*, (2004) encontró el genotipo -521T/T en 3.7% describiendo que normalmente es encontrado en baja frecuencia a diferencia del genotipo -521C/C (66%) el cual es el más común. Por su parte Thaller *et al.*, (2003) encontraron que en raza Holstein y Charolais,

el genotipo -521T/T se encuentra entre un 3-10%, encontrando que los homocigotos -521C/C tienen la mayor frecuencia (50-60%). En el caso de ganado *B. indicus*, el genotipo -521C/C se ha reportado hasta en un 94% conservándose la baja frecuencia de los individuos -521T/T (Casas *et al.*, 2005). Casas *et al.*, (2005) señalan que la baja frecuencia de cualquier genotipo, puede interferir en la determinación de la asociación del marcador TG -521C/T con el porcentaje de GIM, especialmente si existe algún mecanismo de acción recesivo/dominante o si el efecto aditivo de los genotipos en más baja frecuencia es pequeño.

VI.3.3 Efecto del marcador TG -521C/T sobre la GIM

En la literatura se ha señalado la existencia de una asociación del marcador TG -521C/T con el marmoleo, sin embargo este es evaluado subjetivamente y depende de la apreciación del evaluador por lo que podrían existir errores en la estimación de la asociación (Barendse *et al.*, 2004). Ante esta observación, en el presente estudio se cuantificó el porcentaje de GIM mediante extracción con éter, logrando que la GIM fuera cuantificada objetivamente para buscar el efecto del polimorfismo sobre ésta.

Cuadro 7. Efecto del genotipo sobre la GIM (%)

GIM (%)	TG -521C/T	
	CC	CT
	4.4 ^b	6.6 ^a

a, b: literales distintas indican diferencia estadísticas significativa (P<0.05).

Se encontró que el marcador TG -521C/T tiene efecto (P=0.04) sobre el porcentaje de GIM (Cuadro 7), se ha descrito el alelo -521T como favorable para la presentación de una mayor cantidad de marmoleo; al respecto, los individuos heterocigotos tuvieron mayor porcentaje de GIM en comparación con los homocigotos como lo señalado en la literatura (Barendse, 1999).

Barendse *et al.*, (2004) encontró que los genotipos -521T/T y -521C/T tuvieron asociación con el marmoleo a pesar de que el -521T/T es raro, debido a la baja frecuencia

de este genotipo, en dicho experimento se removieron los individuos que lo presentaron, reflejando que cuando se encuentra ausente, se perdía el efecto del marcador TG -521C/T sobre el marmoleo. A diferencia de lo reportado por Barendse *et al.*, (2004), en este trabajo se removió el único individuo que presentó genotipo -521T/T, encontrando asociación significativa con la GIM.

El genotipo -521C/T presentó un mayor porcentaje de GIM (6.6%) en comparación con el genotipo -521C/C; a diferencia de estos resultados, Thaller *et al.*, (2003) y Barendse *et al.*, (2004) encontraron que el marmoleo era igual para ambos genotipos ($P > 0.05$).

Rincker *et al.*, (2006) así como Casas *et al.*, (2005 y 2007) no encontraron asociación del marcador TG -521C/T con el marmoleo en poblaciones de ganado *B. taurus* y *B. indicus*, sólo se encontró que descendientes de ganado Wagyu con genotipo -521T/T tuvieron mayor marmoleo respecto a los que tenían genotipo -521C/T o -521C/C, por lo que los autores sugieren que es un marcador que podría ser utilizado en ganado con influencia Wagyu, describiendo que el alelo tiene una herencia recesiva. Además de buscar el efecto del marcador TG -521C/T sobre el marmoleo, estudiaron el efecto del polimorfismo sobre otras variables como ganancia diaria de peso, peso al sacrificio, grosor de la grasa dorsal en la 12^a costilla, área de ojo de la chuleta, altura de la giba, entre otras; sin embargo no encontraron asociación, por lo que señalan que la selección basada en este marcador no tendría efecto alguno sobre otras características (Rincker *et al.*, 2006; Casas *et al.*, 2005 y 2007)

El mecanismo exacto de cómo se relaciona el polimorfismo TG -521C/T con el almacenamiento de T3 y T4 así como con el crecimiento y la diferenciación de los adipositos es desconocido (Barendse *et al.*, 2004). Aún no existe una investigación que explique como afecta el gen de tiroglobulina a la deposición de grasa, sin embargo, es probable que el polimorfismo TG -521C/T sea el causante de las diferencias o que éste marcador se encuentre cerca de alguna mutación que determine la GIM (Barendse *et al.*, 2001; Rincker *et al.*, 2003).

Respecto a la asociación del marcador TG -521C/T con el porcentaje de GIM y marmoleo, la literatura señala que su consistencia indica que puede ser utilizada para seleccionar ganado, sin necesidad de conocer las relaciones de parentesco o la raza ya que

las asociaciones encontradas en poblaciones heterogéneas son fuertes indicadores de que el polimorfismo es el causante del cambio en el marmoleo o en el porcentaje de GIM (Barendse *et al.*, 2004).

VII. CONCLUSIÓN

Para tener resultados sólidos y confiables del uso de marcadores genéticos como CAPN1 316G/C, CAPN1 4751T/C y TG -521C/T, es necesario llevar a cabo estudios de validación en hatos o poblaciones locales, con la finalidad de conocer las frecuencias alélicas y genotípicas así como la asociación que guardan los marcadores con características productivas de interés como la suavidad y el porcentaje de GIM. En la literatura científica se han descrito estos marcadores genéticos ampliamente, sin embargo, este es el primer reporte en carne bovina en México.

En este estudio se encontraron ausentes los genotipos homocigotos favorables para el gen CAPN1 (316C/C y 4751 C/C) por lo que la frecuencia de los alelos favorables (316C y 4751C) para ambos marcadores fue menor que la de los alelos no favorables (316G y 4751T); por otra parte, respecto al gen TG, el genotipo homocigoto favorable (-521T/T) únicamente se presentó en un individuo por lo que no fue de carácter informativo, repitiéndose la baja frecuencia del alelo favorable en este marcador (TG -521T). Los resultados anteriores son concordantes con el hecho de que en el país no se han incluido variables de calidad dentro de los programas de mejoramiento genético, sin embargo, la información de los marcadores puede ser utilizada para incrementar la frecuencia del marcador que esta asociado positivamente con la característica de interés, mediante la selección de animales portadores de alelos favorables.

Se encontró que el marcador CAPN1 316G/C no tiene efecto sobre la suavidad de la carne bovina en México por lo que no es útil como predictor de esta característica. El marcador CAPN1 4751T/C tuvo efecto sobre la suavidad así como el marcador TG - 521C/T sobre el porcentaje de grasa intramuscular por lo que estos marcadores podrían ser usados como una herramienta para predecir la calidad (suavidad y porcentaje de GIM) del ganado antes del sacrificio.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. Biología molecular de la célula. 2ª edición. Barcelona: Editorial Omega SA, 1994.
2. ameg.org (página web en Internet). México: Asociación Mexicana de Engordadores de Ganado Bovino, A.C. Disponible desde: <http://www.ameg.org.mx/>
3. AMSA. Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat. Chicago, IL: American Meat Science Association & National Livestock and Meat Board. 1995
4. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. USA (Washington, D.C): AOAC, 1997.
5. Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA y Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implication for connective tissue remodeling. *Biochem J* 1999;340:171.
6. Barendse W, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S, Donaldson N. The TG5 thyroglobulin gene test for marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust J Exp Agric* 2004;44:669-674.
7. Barendse WJ, inventor. World International, Property Organization. Assessing lipid metabolism. International Publication Number WO 99/23248. 1999.
8. Barendse WJ, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S, Donaldson N. The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle. 2001. Available from: URL:<http://www.beef.crc.org.au/Publications/MarblingSym/Day1/Tg5DNA>.

9. Beef Improvement Federation. Uniform guidelines for beef improvement programs. Athens (GA): BIF, 2002.
10. Bennett PM, Hodkin TE, Hawkins C. Evidence that the tandem Ig domain near the end of the muscle thick filament form an inelastic part of the I-Band Titin. *J Struct Biol* 1995 ;129:93.
11. Bernués A, Olaizola A, Corcoran K. Extrinsic attributes of red meat and indicators of quality in Europe: An application for market segmentation. *Food Quality and Preference* 2003,14:265-276.
12. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M. Quantitative trait loci affecting growth carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci* 2000;78:560-569.
13. Casas E, Stone RT, Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmaraie M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of myostatin gene. *J Anim Sci* 2001;79: 854-860.
14. Casas E. Identification of quantitative trait loci in beef cattle. *Arch Latinoam Prod Anim* 2002;10:54-61.
15. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TPL, Stone RT. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J Anim Sci* 2003a;81:2976-2983.
16. Casas E., Keele J.W., Shackelford S.D., Koohmaraie M. y Stone R.T. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Animal Genet* 2003b;35:2-6.

17. Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brenneman RA, Olson TA, *et al.* Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 2005;83:13-19.
18. Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, *et al.* Effects of *calpastatin* and μ -*calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci* 2006;84:520–525.
19. Casas E, White SN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M, Bennett GL, Smith TPL. Assessing association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass cattle. *J Anim Sci* 2007;85:2807-2814.
20. Cong M, Thompson VF, Goll DE, Parker. The bovine calpastatine gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J Biol Chem* 1998;273:660–666.
21. Dekkers JCM. Optimizing strategies for marker assisted selection. *Proc. Plant and Animal Genome VII*. San Diego 1999 (cited 2003 March 12); Available from: URL:<http://www.genome.iastate.edu/edu/MAS/Dekkers/PAGVII/>
22. Dekkers JCM, Van Arendonk JAM. Optimizing selection for quantitative traits information on an identified locus in outbred populations. *Genet Res* 1998;71:257-275.
23. Dekkers JCM, Hospital F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet* 2002;3:22-32.

24. Delgado EJ, Rubio MS, Iturbe FA, Méndez RD, Cassís L, Rosiles R. Composition and quality of Mexican and imported retail beef in Mexico. *Meat Sci* 2005;69 465–471
25. Dikeman ME. The relationship of animal leanness to meat tenderness. Proceedings of the 49th Annu Recip Meat Conf 1996, Provo, UT. 1996:87-101.
26. Dransfield E, Jones RCD, MacFie HJH. Quantifying changes in tenderness during storage of beef. *Meat Sci* 1981;5(2):131-137.
27. Dransfield E. Optimisation of tenderization, ageing and tenderness. *Meat Sci* 1994;36: 105-121.
28. Dufour E, Dalgarrondo M, Hervé G, Goutefongea R, Haertlé T. Proteolysis of type III collagen by collagenase and cathepsin B under high hydrostatic pressure. *Meat Sci* 1996;42, 3: 261-269.
29. Falconer DS, Mackay TF. *Introducción a la genética cuantitativa*. Zaragoza: Acribia, 1996.
30. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). Boletín informativo. Oportunidades de desarrollo en la industria de la carne de bovino en México. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura* 1999;32, 312.
31. Garrick DJ, Johnson PL. Examples of marker-assisted selection in sheep and cattle improvement in New Zealand. In Proceedings: 8th Genetic Prediction Workshop “Molecular Approaches to Genetic Improvement”; 2003 december 4-6; Kansas City (Missouri) USA. 16-34.

32. Goll DE, Taylor RG, Christiansen JA, Thompson VF. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. National Livestock and Meat Board. Proceedings of the 44th Annu Recip Meat Conf 1999; Chicago, IL. 1999:2536.
33. Goll DE, Thompson VF, Hongqi Li, Wei Wei, Jinyang Cong. The Calpain System. *Physiol Rev* 2003;83:731–801.
34. Grona, Tatum AD, Belk KE, Smith GC, Williams FL. An evaluation of the USDA standards for feeder cattle frame size and muscle thickness. *J Anim Sci* 2002;80:560-567.
35. Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:349-360.
36. Harper GS, Pethick DW. How might marbling begin?. *Aust J Exp Agric* 2004;44:653-662
37. Illian MA, Morton JD, Bekhit AE, Roberts N, Palmer B, Sorimachi H. Effect os preslaughther feed withdrawal period on *Longissimus* tenderness and the expression of calpains in the ovine. *J Agric Food Chem* 2001;49:1990-1998.
38. Infoaserca.gob.mx. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Claridades Agropecuarias; 2002. Disponible desde: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/>
39. Johnson E, Priyanto R, Taylor D. Investigations into the Accuracy of Prediction of Beef Carcass Weight II. Improving the Accuracy of Prediction. *Meat Sci* 1997;46, 2:159-172.

40. Jeremiah LE, Dugan ME, Aalhus JL, Gibson LL. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscles groups. *Meat Sci* 2003;65:1013-1019
41. Juszczuk KE, Rosochacki SJ, Wicinska K. A note on restriction fragment length polymorphism for HhaI in the bovine calpain gene. *Anim Sci Papers and Reports* 2002;20, 3:181-185.
42. Juszczuk KE, Sakowski T, Flisikowski K, Wicińska K, Oprzdek J, Rosochacki SJ. Bovine μ -calpain (*CAPN1*) gene: new SNP within intron 14. *J Appl Genet* 2004;45(4):457-460.
43. King DA, Dikeman ME, Wheeler TL, Kastner CL, Koohmaraie M. Chilling and cooking rate effects on some myofibrillar determinants of tenderness of beef. *J Anim Sci* 2003;81:1473-1481.
44. Koohmaraie M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. Proceedings of the 41th Annu Recip Meat Conf 1988; Wyoming, USA. 1988:89-97.
45. Koohmaraie M. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain1. *J Anim Sci* 1992;70:3071-3080.
46. Koohmaraie M. Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Sci* 1994;36:93-104.
47. Koohmaraie M, Wheeler TL, Shackelford SD. Beef tenderness: Regulation and Prediction. CSIRO Meat Proceedings. 1995:4. En: www.ars.usda.gov/SP2UserFile/Place/54380530/19950004A1.pdf

48. Liu A, Nishimura T, Takahashi K. Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles. *Meat Sci* 1996;43, 1:43-49.
49. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14:143-149.
50. McCarthy M, De Boer M, O'Reilly S, Cotter L. Factors influencing intention to purchase beef in the Irish market. *Meat Sci* 2003;65:1071-1083.
51. Marshall DM. Genetics of meat quality. In: *The Genetics of Cattle*. Ed. by R. Fries, A. Ruvinsky. CABI Publishing, Wallingford, 1999.
52. Meuwissen TH, Goddard ME. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet Sel Evol* 1996;28(2):161-177.
53. México Calidad Suprema. [Portal.veracruz.gob.mx](http://portal.veracruz.gob.mx). México: México Calidad Suprema. Disponible desde:
54. http://www.portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/TAB3885839/MEXICO_CALIDAD_SUPREMA.PDF/
55. Meza MC. Caracterización de las canales de bovinos en México (tesis de maestría). DF (México) México. UNAM, 2007.
56. Moloney AP, Mooney MT, O'Kiely P, Troy DJ. Fat colour and the quality of meat from beef cattle offered grass silage or maize silage-based diets. *Proceedings of Twelfth International Silage Conference*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden on 5-7 July, 1999:309-310.

57. Morgan JB. Tenderness problems and potential solutions. In: The Final Report of the National Beef Quality Audit – 1991;1992, 180-187.
58. Morgan JB, Savell JW, Hale DS, Miller RK, Griffin DB, *et al.* National Beef Tenderness Survey. *J Anim Sci* 1991;69:3274-3280.
59. Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese Black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *J Anim Sci* 1999;77, 93-104.
60. O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, *et al.* The promise of comparative genomics in mammals. *Genome Rev* 1999;286:458-481.
61. Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL, McDonagh MB. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Aust J Exp Agr* 2001;41:921.
62. Ouali A. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. *J Muscle Foods* 1990;1(2): 129-165.
63. Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, *et al.* Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci* 2002.80:3077-3085.
64. Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, *et al.* Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci* 2004;82:3474–3481.

65. Parra BM, Sifuentes RA, Cienfuegos RE, Tewolde MA, Martínez GJ. Polimorfismo en el gen μ -calpaína en ganado Brahman de registro de México. Arch Lationoam Prod Anim 2007,15:33-38.
66. Peake A. Assisted selection for beef palatability characteristics. Animal Science Department Michigan State University East Lansing, MI 48824, 1999.
67. Pringle TD, Williams SE, Lamb BS, Johnson DD, West RL. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. J Anim Sci 1997;75:2955-2961.
68. Raynaud P, Jayat-Vignoles Ch, Laforet M-P, Leveziel H, Amarger V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. Arch Biochem Biophys 2005;437:69-77.
69. Resurrección AVA. Sensory aspects of consumer choices for meta and meta products. Meat Sci 2003;66:11-20.
70. Riley D, Chase C Jr, Pringle T, West R, Johnson D, Olson T, *et al*. Effect of sire on μ - and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. J Anim Sci 2003;81:2440-2447.
71. Rincker CB, Pyatt NA, Berger LL, Faulkner DB. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. J Anim Sci 2006,84:686-693.
72. SAS. Institute Inc. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Version 6.12. Edition. Cary, North Carolina. USA 1996.

73. Savell JW, Cross HR, Smith GC. Percentage ether extractable fat and moisture content of beef longissimus muscle as related with to USDA marbling score. J Food Sci 1986;51, 838-840.
74. Shackelford SD, Koohmaraie M, Whipple G, Wheeler TL, Miller MF, Crouse JD, Reagan JO. Predictors of beef tenderness: Development and verification. J Food Sci 1991;56:1130.
75. Shackelford SD, Wheeler TL, M Koohmaraie. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. J Anim Sci 1995;73:3333.
76. Sherbeck JA, Tatum JD, Field TG Morgia JB, Smith GC. Feedlot performance, carcass traits, and palatability traits of Hereford and Hereford x Brahman steers. J Anim Sci 1995.73:3613-3620.
77. Sherbeck JA, Tatum JD, Field TG, Morgan JB, Smith GC. Effect of phenotypic expression of Brahaman breeding on marbling and tenderness traits. J Anim Sci 1996. 74:304-309
78. Sagarpa.gob.mx. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SIAP SAGARPA; 2007. disponible desde: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
79. Simon J, Arthur C, Greer PA, Elce JS. Structure of mouse calpain small subunit gene. Biochim Biophys Acta 1998;1388, 247-252.
80. Smith SC, Gill DR, Bess III C. Effects of selected characteristics on sale price of feeder calves in eastern Oklahoma. Oklahoma, USA en: <http://www.ansi.okstate.edu/research/2000rr/04.htm>

81. Smith TPL, Casas E, Rexroad CE, Kappes SM, Keele JW. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci* 2000;78:2589-2594.
82. Soria LA, Corva PM. Factores genéticos y ambientales que determinan la suavidad de la carne bovina. *Arch Latinoam Prod Anim* 2004;12(2): 73-88
83. Sorimachi H, Nishimura S. y Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 1999;328:721.
84. Souverein WO, Zwinderman HA, Jukema WJ y Tanck WM. Estimating effects of rare haplotypes on failure time using a penalized Cox proportional hazards regression model. *BMC Genetics* 2008;9:9.
85. Strong J. Differences in carcass grading schemes used in the USA, Japan and Australia. *Aust J Exp Agric* 2004;44, 675-680.
86. Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 1998;433:1.
87. Takahashi K. Non enzymatic weakening of myofibrillar structures during conditioning of meat: calcium ions at 0.1 mM and their effect on meat tenderization. *Biochimie* 1992;74(3): 247-250.
88. Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, *et al.* DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet* 1992;34, 354–357.

89. Thompson JM. The effects of marbling on flavour and juiciness scores of cooked beef after adjusting to a constant tenderness. *Australian J of Experimental Agriculture* 2004,44:645-652
90. Trueta SR. Crónica de una muerte anunciada, impactos del TLC en la ganadería bovina mexicana. *Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatría*; 2003 junio 12-14; Villahermosa (Tabasco) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2003: 57-89.
91. Turner J, W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. *J Anim Sci* 1980;50:1201-1205.
92. USDA (United States Department of Agriculture). 2001. United States standards for grades of carcass beef. Disponible desde:
93. <http://www.ams.usda.gov/lsg/stand/standards/beefcar.pdf> Accessed: March 13, 2003/
94. Van der Werf J, Kinghorn B. Basic of marker assisted selection. In: *Course notes: Identifying and Incorporating Genetic Marker and Major Genes in Animal Breeding Programs*. Belo Horizonte, Brazil. 31 May-5 June. 2000;15:119-127.
95. Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 2002,34:275-305.
96. Warriss PD. *Meat Science: An Introductory Text*. New York:CABI 2000.
97. Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK, Smith SB. Effect of postmortem treatments on the tenderness of meat from Hereford, Brahman and Brahman-cross beef cattle. *J Anim Sci* 1990a,68:3677-3686.

98. Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK, Smith SB. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *J Anim Sci* 1990,68:4206-4220.
99. Wheeler TL, Koohmaraie M. Pre rigor and post rigor changes in tenderness of ovine *longissimus* muscle. *J Anim Sci* 1994,72:1232-1238.
100. Wheeler TL, Koohmaraie M. The extent of proteolysis is independent of sarcomere length in lamb *Longissimus* and *Psoas major*. *J Anim Sci* 1999,77: 2444-2451
101. Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M. Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscle. *J. Anim. Sci.* 2000,78:958.
102. Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse JD. Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. *J Anim Sci* 1990,68:4193.
103. White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase Jr CC, Johnson DD, Keele JW, Smith TPL. A new SNP in *CAPNI* is associated with tenderness in cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci* 2005,83:2001-2008.
104. Yu G, Zhang R, Hu X, Li N. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. *Meat Sci* 2007,77:36-45.
105. Zambrano, R. Requisitos para Producir y comercializar carne de Bovino, ¿Qué se paga mejor? En Simposio de ganadería, producción con fines de calidad. Memorias del XIII Congreso Bienal AMENA “Dr. José Alberto Rivera Brechu”, 2007 octubre

23-26; Boca del Río (Veracruz) México. México (DF). Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, 2007.

106. Zhang HM, DeNise SK, Ax RL. Rapid communication: A novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. *J Anim Sci* 1996,74:1441.