



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE POLIMORFISMOS PROPUESTOS CON POSIBLE
ASOCIACIÓN A LA TERNEZA DE LA CARNE EN DOS ESPECIES DE GANADO BOVINO
(*Bos taurus* y *Bos indicus*)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

Ana Elvia Sánchez Mendoza

Tutor Principal:

Dr. José Francisco Montiel Sosa

UNAM, Fes-C

Comité Tutorial:

Dra. Adriana Llorente Bousquets

UNAM, Fes-C.

Dr. Pedro Sánchez Aparicio

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

México D. F.,

FEBRERO, 2014



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.

***“Después de escalar una montaña muy alta, descubrimos que hay
muchas otras montañas por escalar”***

Nelson Mandela

La autora de la presente, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante dos años, con el número de registro 422754.

Se agradece también el apoyo recibido de los programas *PAPIIT No. IN211413*, *PAPIIT No. IT202312* y *PAPIME No. PE202513* por el apoyo otorgado para el financiamiento del trabajo realizado.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Departamento de Ciencias Biológicas. Área: Morfología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 4.
Cuautitlán, Edo., de México.

SECRETARIO

Dr. José Francisco Montiel Sosa

Departamento de Ciencias Biológicas. Área: Bioquímica,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 8.
Cuautitlán, Edo., de México.

VOCAL

M. en C. Jorge Osorio Avalos

Coordinador de Planeación
Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Toluca. Edo., de México

SUPLENTE

Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate

Departamento de Ciencias Biológicas. Área: Morfología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 4.
Cuautitlán, Edo., de México.

SUPLENTE

Dra. Edith Ponce Alquicira

Departamento de Biotecnología,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa
Iztapalapa, México, D.F.

ASESORES DE TESIS

Dr. J. Francisco Montiel Sosa

Departamento de Ciencias Biológicas. Área: Bioquímica,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 8.
Cuautitlán, Edo., de México.

Dra. Adriana Llorente Bousquets

Departamento de Producción Agrícola y Animal. Área: Inocuidad Alimentaria,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 7.
Cuautitlán, Edo., de México.

Dr. Pedro Sánchez Aparicio

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma del Estado de México
Toluca. Edo., de México

DEDICATORIAS

A mi mami, Lidia Mendoza, por intentar siempre que yo mantuviera la fe, por enseñarme a ser humilde, por ser mi mayor ejemplo de fortaleza.

A mi papi, Carlos Sánchez, por su presencia en los momentos más importantes, por su apoyo, por enseñarme que lo más importante es ser perseverante y firme.

A ustedes dos Mamá y Papá, por ser protagonistas de mi vida cuando han tenido que serlo y saber cuándo ser solo espectadores, pero siempre en primera fila, pendientes de mis tropiezos y aciertos, enseñándome que rendirse jamás es una opción. Todos y cada uno de mis logros son y serán siempre gracias a ustedes.

A mis hermanos Olga, Adrián, Vicky y Dani, por ser mis compañeros de vida, porque de cada uno de ustedes he aprendido cosas excepcionales, por que no importa lo que pase, se “nunca me abandonaran, ni me olvidaran”

A mis tíos, Rosa Y Rosendo, porque siempre han creído en mí y con sus palabras de aliento me lo han demostrado.

A mis tías, Esperanza y Raquel, por sus consejos de vida siempre acertados, por su presencia.

A Iván Pérez Lunat, por todo su apoyo durante el comienzo de esto, por haberme dado la enorme oportunidad de tenerlo como amigo.

A mi amiga Karla, por ser mi asesora moral durante este trayecto, por los momentos buenos y malos que hemos compartido, por todo aquello que aprendimos juntas y que formara parte siempre de mi desarrollo.

A Jonathan, por su amistad, por tener siempre palabras de aliento cuando más las necesite, por su apoyo, por formar parte importante en este trayecto.

A los buenos amigos que tuve la fortuna de encontrar en este camino: Betty, Christian, Lidia, Aura, Ari, Patxi, Bruno, Juan, por los momentos de diversión y las inolvidables experiencias de vida que compartimos.

A todas aquellas personas que quizá mi memoria no logre evocar en este momento, pero quienes con pequeñas o grandes acciones contribuyeron a que yo lograra mi propósito.

A.E.S.M

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Montiel, por depositar en mí su confianza, por permitirme pertenecer y desarrollarme en su grupo de trabajo, por la experiencia compartida, por ayudarme a desarrollar seguridad en mi persona, por el tiempo y dedicación que me brindó durante este proyecto.

A la Dra. Llorente por las contribuciones para lograr buenos resultados en el desarrollo de este trabajo.

A los sinodales que con su tiempo y aportaciones contribuyeron a la mejora de este proyecto.

A la M. en C. Josefina Moreno, por todo el apoyo, por compartir su invaluable conocimiento y tiempo.

Al Dr. Salvador Fonseca y la Q.F.B. Jerusalem Islas por el apoyo desinteresado que siempre brindaron al desarrollo de este trabajo, por compartir sus conocimientos y tiempo para llevar a buen término este proyecto.

A la UNAM, la máxima casa de estudios, a la Fes-C, instituciones de las cuales siempre me sentiré orgullosa de pertenecer, por permitirme desarrollarme académica y profesionalmente, por dejarme en claro cuál es mi propósito social, por darle voz a mi espíritu.

DATOS BIOGRÁFICOS

Ana Elvia Sánchez Mendoza

Estudiante del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Realizó la Licenciatura en Ingeniería de alimentos en el periodo 2006-2010 en la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

Ha colaborado como ayudante de la cátedra “DNA mitocondrial en diferentes fenotipos de especies de interés biomédico, alimentario y biotecnológico” desde 2011 a la fecha, participando en los proyectos de investigación PAPIIT No. IN211413 2013 “Genoma mitocondrial, actividad proteosomal y expresión génica en cáncer de próstata” y PAPIME No. PE202513 2013 “Herramientas moleculares; PCR, qPCR y microarreglos en la asignaturas terminales en una unidad multidisciplinaria”, proyectos realizados en el laboratorio 8 de la UIM, Fes-Cuautitlán, en colaboración con el Dr. J. Francisco Montiel Sosa.

Ha participado como Co-asesor del Proyecto titulado “Determinar la presencia de carne de caballo (*Equus caballus*) en productos comerciales mexicanos que no declaran su presencia, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa” del alumno Aldo Ebany Velázquez Morales para obtener el título en la licenciatura de Ingeniería en alimentos, realizado en la FES-Cuautitlán, Agosto 2013.

Ha participado como ponente en diferentes congresos: “XXXVI Congreso Nacional de Buiatría Mérida, Yucatán” Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. Agosto, 2012., en la modalidad cartel con los trabajos: “El gen de Miostatina en ganado bovino y su importancia productiva” y “La calpaina y su relación con la ternera de la carne en bovinos”, “XVI Congreso Latinoamericano de Buiatría” organizado por la Asociación Ecuatoriana de Buiatría. Mayo, 2013. En modalidad cartel con el trabajo: “Evaluación del marcador c-530 del gen de calpaina y su relación con la ternera de la carne en bovino”, “XL Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. Y IX Seminario Internacional de producción de Ovinos en el Trópico”. Mayo del 2013. Villahermosa, Tabasco., como ponente en modalidad Oral de los trabajos: “Marcador C-530 del gen de calpaina en *Bos Taurus* y *Bos indicus*” y “Desarrollo de un

protocolo para identificar la presencia de carne de ave, cerdo y soya en hamburguesas comerciales mediante PCR multiplex”.

Es autora de 2 artículos científicos y 1 artículo de divulgación: “El gen de Miostatina en ganado bovino y su importancia productiva”, 2012, Carne pres, 20-26., “Marcador C-530 del gen de calpaína en *Bos Taurus* y *Bos indicus*”, contribución del sector agropecuario a la seguridad alimentaria en México, No. ISBN: 978-607-606-120-6., “Desarrollo de un protocolo para identificar la presencia de carne de ave, cerdo y soya en hamburguesas comerciales mediante PCR multiplex”, contribución del sector agropecuario a la seguridad alimentaria en México, No. ISBN: 978-607-606-120-6.

C O N T E N I D O

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
R E S U M E N	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. ANTECEDENTES.....	4
1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR CÁRNICO	4
1.1.1 MIRADA GLOBAL	4
1.1.2 PRODUCCIÓN DE CARNE A NIVEL MUNDIAL	4
1.1.3 EL MERCADO BOVINO EN MÉXICO	6
1.2 CARACTERÍSTICAS DEL GANADO BOVINO.....	7
1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA CARNE	9
1.3.1 FACTORES ANTE-MORTEM.....	9
1.3.2 FACTORES PERI-MORTEM.....	11
1.3.3 FACTORES POST-MORTEM.....	14
1.4 ASPECTOS GENÉTICOS.....	17
1.4.1 MEJORAMIENTO DE CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE CARNE A TRAVÉS DE LA GENÉTICA	17
1.4.2 MARCADORES MOLECULARES.....	18
1.4.2.1 TIPOS DE MARCADORES.....	18
II. DESCRIPCIÓN DE GENES CANDIDATOS A ESTUDIAR.....	22
2.1 GEN DE MIOSTATINA	22
2.2 GEN DE CALPAÍNA	27
III. METODOLOGÍA.....	32
3.1 JUSTIFICACIÓN	32
3.2 HIPÓTESIS	32
3.3 OBJETIVOS.....	32
3.4 VARIABLES	33
3.5 MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	33
3.5.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA	35
3.5.3 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	37
IV. RESULTADOS	41
V. DISCUSIÓN.....	67
VI. CONCLUSIONES.....	71
VII. ANEXOS.....	72
ANEXO 1: Resultados obtenidos de la extracción de DNA y ajuste de concentración para las 120 muestras de tejido bovino.....	72

ANEXO 2: Resultados obtenidos para la identificación de la delección de 11pb del gen de Miostatina para el total de las muestras.	78
ANEXO 3: Resultados obtenidos para la identificación del marcador C-530 de Calpaína en muestras de ambas especies.	81
ANEXO 4: Resultados obtenidos para la identificación del marcador C-316 de Calpaína en muestras de ambas especies.	84
VIII. REFERENCIAS CITADAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perspectiva de la producción y consumo de carne de bovino durante el periodo 2009-2020. Fuente: Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020. Junio, 2011.....	7
Figura 2. Ejemplar de ganado con fenotipo doble musculatura de la raza blanco azul belga, sexo: macho, edad: 4 años, sistema de crianza: intensivo.....	22
Figura 3. Estructura del gen de Miostatina y posición de los principales polimorfismos responsables del fenotipo de doble musculatura (Karim, y col., 2000).....	23
Figura 4. Características del fenotipo doble musculatura en ganado bovino.....	24
Figura 5. Estructura del gen de Calpaína I y los principales marcadores asociados a características de calidad de carne.....	28
Figura 6: Diagrama para la extracción de ADN.....	35
Figura 7: Espectrofotómetro, para cuantificar concentración de ADN.....	36
Figura 8: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para detección del gen de miostatina.....	39
Figura 9: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para detección de los marcadores C316 y C530 del gen de Calpaína.....	39
Figura 10: Alineamiento de primers F (a) y R (b), para el Gen de Miostatina.....	42
Figura 11: Alineamiento de los nuevos primers diseñados F (a) y R (b), para el Gen de Miostatina.....	43
Figura 12: Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% para la especificidad de primers para miostaina, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.....	43
Figura 13: Evaluación electroforética en gel de garosa al 2%, para la especificidad de primers para el marcador C-530, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.....	44
Figura 14: Evaluación electroforética en gel de garosa al 2%, para la especificidad de primers para el marcador C-316, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.....	45
Figura 15: Evaluación electroforética del marcador de miostatina, gel de	

agarosa al 2%, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7, 8) M8.....	46
Figura 16: Evaluación electroforética del marcador de miostatina, gel de agarosa al 2%, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7, 8) M8.....	47
Figura 17: Evaluación electroforética para el marcador de misotatina en gel de poliacrilamida al 8%. A = Primers de 149pb, B = Primers. MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, M1) Muestra 1, M2) Muestra 2, M3) Muestra 3, M4) Muestra 4.....	48
Figura 18: Evaluación electroforética de PCR en gel de agarosa al 2% del marcador C-530, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) B.T 081011-2 2) B.T 070911-1, 3) B.T 080911-3, 4) B.T 240911-1.....	49
Figura 19: Electroferograma de la secuenciación de las muestra 1 y 2 de <i>Bos Taurus</i> , 1) muestra 1, C530-1 (B.T 081011-2), 2) muestra 2, C530-2 (B.T 070911-1), 3) Secuencia de referencia del gen de calpaína.....	50
Figura 20: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8%, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7.....	51
Figura 21: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de <i>Bos taurus</i> , 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M8, 5) M10, 6) M11, 7) M19.....	52
Figura 22: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de <i>Bos taurus</i> , 1)MP, 2)M37, 3)M38 4) M39, 5) M40, 6) M41, 7) M42, 8)M43,9)M44.....	52
Figura 23: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de <i>Bos taurus</i> , 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M50, 5) M51, 6) M452, 7) M58, 8) M59, 9) M60.....	53
Figura 24: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 8 con polimorfismo C-530 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 8.....	54
Figura 25: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 39 con polimorfismo C-530 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 39.....	54
Figura 26: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 50 con polimorfismo C-530 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 50.....	55

Figura 27: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de <i>Bos indicus</i> , 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M15, 5) M16, 6) M17, 7) M18, 8) M19, 9) M20, 10) M21.....	56
Figura 28: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 16 con polimorfismo C-530 de <i>Bos indicus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 16.....	56
Figura 29: Gráficos de pastel para comparación de reparto de genotificado por especie.....	57
Figura 30: Grafico comparativo de las frecuencias genotípicas obtenidas por especie para el marcador C-530.....	58
Figura 31: Evaluación electroforética de PCR en gel de agarosa al 2% del marcador C-316, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 6) M6, 7) M7, 8) M8.....	59
Figura 32: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10%, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M6, 6) M7, 7) M8, 8) M6.....	60
Figura 33: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 6 genotipo heterocigoto para el marcador C-316 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 6.....	60
Figura 34: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10% para muestras de <i>Bos taurus</i> , 1) MP, 3) C+1, 4) M23 5) M24, 6) M25, 7) M26, 8) M27, 9) M28, 10) M29.....	61
Figura 35: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 2 con polimorfismo C-316 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 2.....	62
Figura 36: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 26 con genotipo heterocigoto para C-316 de <i>Bos taurus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 26.....	62
Figura 37: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10% para muestras de <i>Bos indicus</i> , 1) MP, 2) C+1, 3) M15 4) M16, 5) M17, 6) M18, 7) M19, 8) M20, 9) M21.....	63
Figura 38: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 43 con polimorfismo C-316 de <i>Bos indicus</i> , 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 43.....	64
Figura 39: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 2 con genotipo	

heterocigoto para C-316 de <i>Bos indicus</i> 1) Secuencia de referencia del gen de calpaina, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 2.....	64
Figura 40: Gráficos de pastel para comparación de reparto de genotificado por especie.....	65
Figura 41: Gráfico comparativo de las frecuencias genotípicas obtenidas por especie para el marcador C-316.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Panorama del Mercado Mundial de la Carne. Fuente: FAO, perspectivas alimentarias, análisis de los mercados mundiales, Junio 2011.....	5
Tabla 2. Producción y consumo de carne de bovino en México. Fuente: Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020. Junio 2011.....	7
Tabla 3. Diferencias entre bovinos <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i> . Gaytan, (2006).....	8
Tabla 4. Identificación y localización de los principales polimorfismos en el gen de miostatina responsables del fenotipo doble musculatura en diversas razas de ganado bovino.....	26
Tabla 5. Ubicación y polimorfismo que causan cada uno de los marcadores asociados a calidad de carne en el gen de Calpaína.....	28
Tabla 6. Resultados de estudios realizados acerca de los principales marcadores del gen de Calpaína.....	30
Tabla 7. Componentes de PCR.....	38
Tabla 8: Datos de concentración y pureza para el ADN obtenido para muestras de <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i>	41
Tabla 9: Frecuencias genotípicas obtenidas para cada especie para el marcador C-530.....	57
Tabla 10: Frecuencias genotípicas obtenidas para cada especie para el marcador C-316.....	65
Tabla 11. Especificaciones de las muestras para <i>Bos taurus</i> a trabajar, resultados de extracción de ADN y ajuste de concentración de ADN.....	72
Tabla 12. Especificaciones de las muestras para <i>Bos indicus</i> a trabajar, resultados de extracción de ADN y ajuste de concentración de ADN.....	75
Tabla 13. Resultados para la delección 11pb para el gen de Miostatina en <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	78
Tabla 14. Resultados para la identificación del marcador C-530 de Calpaína en <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	81
Tabla 15. Resultados para la identificación del marcador C-316 de Calpaína en <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	84

R E S U M E N

El objetivo de este estudio fue determinar la existencia de asociación del genotipo con la ternera de la carne de dos especies de ganado bovino, mediante la evaluación de mutaciones y polimorfismos presentes en genes que se han asociado a este factor de calidad. Se utilizaron 120 muestras de tejido muscular provenientes del musculo tensor de la fascia lata, las cuales fueron obtenidas en el rastro de Tlalnepantla, Edo., de México, 60 muestras correspondían a ganado *Bos taurus* y 60 a ganado *Bos indicus*. Los genes que se estudiaron fueron el gen de miostatina (delección de 11pb) y dos marcadores del gen de calpaína (marcador C-316 y C-530). A partir de las muestras biológicas se extrajo el material genético, el cual fue analizado posteriormente empleando la técnica de PCR punto final para el caso de la delección de 11pb para miostatina, mientras que para los marcadores de calpaína se empleó PCR-RFLP. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico con la prueba Chi- cuadrada de independencia de variables, esta prueba se llevó a cabo mediante el programa STATGRAPHICS Centurión. De acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó que la delección de 11pb no está asociada al genotipo, para el caso de los marcadores de Calpaína la prueba estadística mostro con nivel de confianza de 95 % y un valor $P=0.458$ que el marcador C-530 no está asociado con la especie, de igual forma para el marcador C-316 se comprobó que no existe relación de la presencia de este polimorfismo con el genotipo ya que así lo demostró la prueba de chi-cuadrada al obtener un valor de $P=0.769$ con un nivel de confianza de 95 %.

Palabras clave: genotipo, polimorfismo, delección, PCR, PCR-RFLP.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the existence of association of the genotype with the meat tenderness of two cattle species through the evaluation of mutations and polymorphisms present in genes that have been associated to this quality factor. There were used 120 samples of tissue muscle from the muscle of *facia lata*, the samples were obtained in the Tlalnepantla´s slaughterhouse, Edo., of Mexico, 60 samples belonged cattle *Bos taurus* and the other 60 belonged cattle *Bos indicus*. The genes studied were myostatin gene (11pb deletion) and twomarkers of calpain gene (markers C-316 and C-530). The genetic material was extracted from each biological sample; after that DNA was analyzed using PCR final point in order to analyze 11pb deletion for myostatin, on the other hand calpin's markers were analized using PCR-RFLP. The results were submitted to a statistical analysis by Chi - squared test of independence of variables, this test was carried out using STATGRAPHICS Centurion program. The results proved that the 11pb deletion is not associated with the genotype, for calpain's markers the statistical test showed with confidence level of 95 % and a value $P=0.458$ that the marker C-530 is not associated with the species, likewise for themarker C-316 was verified that there is not relation of the presence of this polymorphism with the genotype that point was showed of chi-squared on having obtained a value of $P=0.769$ with a confidence level of 95 %.

Key words: genotype, polymorphism, deletion, PCR, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

La calidad de la carne es de gran importancia para la industria de la carne, principalmente la de vacuno, en la que el consumidor está dispuesto a pagar más por productos de mayor calidad (Dekkers, y col., 2002; Shackelford, y col., 2001). Como consecuencia, esta industria está invirtiendo en la investigación dirigida a la identificación de indicadores de calidad con el fin de obtener una mayor comprensión sobre la biología de los músculos y poder controlar las características de calidad (Hocquette, y col., 2006).

Existen diferencias importantes en los rasgos de la calidad de la carne dentro de las diferentes clases de ganado. En particular, diferencias en la textura entre animales de distintas clases son parte importante para determinar las propiedades del músculo y el tejido conectivo, también para el contenido y composición de la grasa intramuscular (Marshall, y col., 1999), estos parámetros son importantes para determinar la calidad de la carne. Se sabe que varias de estas características están bajo el control de genes específicos, evidencia que explica certeramente la existencia de una proporción significativa de la variabilidad fenotípica asociada a la calidad de la carne (Hocquette, y col., 2007).

La mayoría de las características económicamente importantes asociadas a la calidad de la carne se encuentran controladas por muchos genes cuya identidad por lo general se desconoce (Casas, E. 2006). Como consecuencia de esto se ha visto la necesidad de implementar métodos específicos para buscar, determinar y garantizar la calidad de la carne. Los métodos más recientemente empleados y cuya especificidad los convierte en una de las mejores alternativas para este fin, son aquellos en donde se emplean marcadores genéticos desarrollados en regiones específicas del genoma de la especie de interés, los cuales se encuentran asociados a parámetros específicos de calidad (Gill, y col., 2010). Esto ha dado lugar a la posibilidad de usarlos para mejorar características cuantitativas en la carne (Casas, E. 2006; Vries, y col 1998).

Los genes que mayormente se han asociados a la calidad de la carne, son el gen de la *miostatina* (Wiener, y col., 2009; Gill, y col., 2010), el gen PPARGC1A (Soria, y col., 2009), el gen de la hormona del crecimiento (bGH), (Curi, y col., 2010), gen de *i-calpaína* y el gen de calpastatina (Casa, E. 2006; Curi, R., y col., 2010), entre otros. En nuestro país se han realizado pocos estudios acerca de estos genes, de aquí el interés de investigar el efecto de estos sobre la calidad de la carne en términos de terneza.

I. ANTECEDENTES

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR CÁRNICO

1.1.1 MIRADA GLOBAL

La ganadería es una práctica económica antigua que consiste en la crianza de animales para su aprovechamiento. Se conoce como ganadería la práctica de domesticación de los animales como medio de sustento y aprovechar la variedad de los productos derivados, tales como la carne, la leche, huevos, cueros, entre otros (RAE).

Según el modo de producción, la ganadería se clasifica por Ganadería intensiva y extensiva. La intensiva se desarrolla en establos o granjas, donde a través de tecnologías se busca un mayor nivel productivo y la extensiva se realiza en terrenos amplios donde los animales pueden pastar y el ganado se alimenta de forma natural, por lo tanto se requiere de grandes territorios, muchas veces la ganadería extensiva se utiliza con el propósito donde el ganadero cría a las reses, las mantiene pastando y las vende cuando el precio sea mayor (Madera, y col., 2012).

1.1.2 PRODUCCIÓN DE CARNE A NIVEL MUNDIAL

A nivel mundial el sector cárnico presenta un incremento en los precios por la disminución de la oferta de carne con respecto a la demanda mundial y los altos costos de los cereales limitan la rentabilidad del sector. La Participación del sector en el comercio mundial por tipo de carne es de 44 % de carne de aves, seguido por la de **vacuno** 29 %, luego la de cerdo con el 24 % y por último la de ovino que se queda en el 3 % (Madera, y col., 2012).

El informe de perspectivas alimentarias realizado por la FAO para el primer semestre del 2013 prevé que la producción mundial de carne aumente moderadamente, hasta alcanzar los 308,2 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 4,3 millones de toneladas, o sea un 1,4 por ciento, comparada con 2012. En muchos países, los productores continúan luchando contra los precios elevados de los piensos, los cuales, aunque siguen siendo altos según criterios históricos, comenzaron a bajar durante el segundo semestre de 2012 y continuaron bajando durante 2013. Ello ha ofrecido un margen mayor para una producción de carne rentable. Como se puede apreciar en la tabla 1 la producción de la carne de bovino se ha mantenido estancada los últimos años esto debido a la ampliación de los mercados de otros tipos de carne aunado a los problemas que han experimentado algunos países desarrollados para mantener la producción del ganado,

sin embargo, la demanda de esta carne aún sigue colocándose en lugar prioritario para los consumidores, es por esto que la producción de ganado bovino de calidad es un asunto de relevancia en el sector cárnico (FAO, 2013).

Tabla 1. Panorama del Mercado Mundial de la Carne. Fuente: FAO, perspectivas alimentarias, Junio 2013.

PANORAMA DEL MERCADO MUNDIAL DE LA CARNE				
	2011	2012 <i>estimado</i>	2013 <i>pronosticado</i>	Variación de 2013 a 2012
	<i>Millones de toneladas</i>			<i>%</i>
BALANZA MUNDIAL				
Producción	297.6	303.9	308.2	1.4
Carne de bovino	67.3	67.6	68.1	0.9
Carne de ave	102.1	104.6	106.4	1.8
Carne de cerdo	109.0	112.5	114.2	1.5
Carne de ovino	13.5	13.6	13.8	1.2
Comercio	29.2	29.9	30.2	1.1
Carne de bovino	8.1	8.2	8.6	4.6
Carne de ave	12.8	13.1	13.3	1.5
Carne de cerdo	7.3	7.5	7.2	-4.1
Carne de ovino	0.7	0.8	0.9	5.8
INDICADORES DE LA OFERTA Y LA DEMANDA				
Consumo humano per cápita				
Mundo (kg/año)	42.5	43.0	43.1	0.4
Desarrollados (kg/año)	78.1	79.1	79.3	0.3
En desarrollo (kg/an)	32.5	33.1	33.3	0.7
ÍNDICE DE LA FAO PARA LOS PRECIOS DE LA CARNE (2002-2004=100)				
	2011	2012	2013 Ene-May	Variación de Ene-May 2013 a Ene-May 2012 %
	177	175	179	0.9

El panorama en América Latina y el Caribe es favorable teniendo en cuenta que la producción de carne vacuna va ascendiendo, especialmente por el crecimiento de la producción de Brasil (Segundo productor mundial) y que en México los precios internos son un 10 % menores a los de Estados Unidos lo cual estimula el comercio entre estos países. (FAO, 2013).

La FAO pronosticó un ligero aumento en el comercio mundial de carne vacuna del 1.1 % a finales del primer semestre del 2013 con 8.6 millones de toneladas, a pesar del

incremento en los precios, donde los países con un mayor crecimiento económico (desarrollados) demandarán carne importada pues la producción nacional no es proporcional al consumo (FAO, 2013).

1.1.3 EL MERCADO BOVINO EN MÉXICO

En 2011, se estimó un inventario inicial total de 31.7 millones de cabezas de bovinos, de las cuales 6.4 millones pertenecen al hato para la producción de carne; 4.4 millones en la actividad de doble propósito, y 2.3 millones en la producción lechera especializada (SAGARPA, 2011).

Durante el periodo de estudio 2011-2020, se estima que el inventario total incremente a una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 1.4 %. En 2020, se proyecta que existan 6.8 millones de cabezas para la producción de carne, 4.1 millones en doble propósito, y 2.5 millones de vacas lecheras especializadas. Se estima que el número de terneros nacidos crezca de 11.4 millones a 11.8 millones durante el periodo de 2011 a 2020 (SAGARPA, 2011).

Del inventario de 2010, 1.2 millones de becerros fueron exportados a Estados Unidos. Durante el periodo de estudio, se estima un nivel de exportación anual de 1.3 millones de cabezas (SAGARPA, 2011).

La importancia del mercado de Estados Unidos radica, entre otros factores, en la generación de un precio de referencia que proporciona una señal futura a los ganaderos para expandir o contraer el hato. Se prevé que los precios del engordador sigan este mismo patrón (SAGARPA, 2011).

La figura 1 muestra la producción y consumo de carne de bovino durante el periodo 2009-2020, ilustrando así que en 2011, se estimó que aproximadamente 8.4 millones de cabezas de ganado fueron sacrificadas, lo que producirá alrededor de 1.79 millones de toneladas métricas (mtm) de carne. En los próximos tres años, se espera que la producción de carne incremente a una mayor velocidad respecto al largo plazo. Al final del periodo de estudio se estima que esta cifra supere las 1.9 mtm (SAGARPA, 2011).

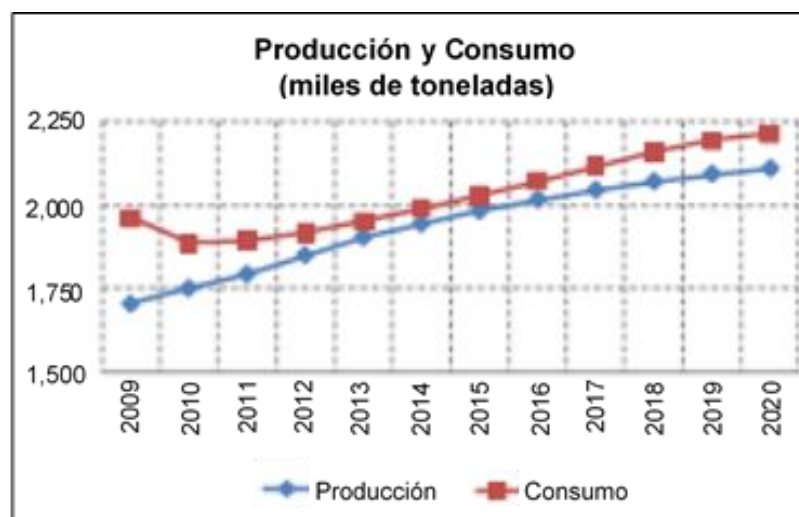


Figura 1. Perspectiva de la producción y consumo de carne de bovino durante el periodo 2009-2020. Fuente: Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020. Junio 2011.

Con respecto al consumo de carne de bovino, como se puede observar en la tabla 2 se proyecta un ligero aumento de éste a lo largo del periodo de estudio. En 2011, se previó un consumo aproximado de 1.9 mtm y en 2020 se estima que éste alcance 2.2 mtm. La diferencia entre la producción de carne doméstica y el consumo interno está constituida por las importaciones. En los próximos años se prevé que el nivel de importaciones disminuya (SAGARPA, 2011).

Tabla 2. Producción y consumo de carne de bovino en México. Fuente: Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020. Junio 2011.

Año	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Calendario												
Carne	(Miles de toneladas métricas)											
Producción	1,705.0	1,751.2	1,792.7	1,850.0	1,903.3	1,943.5	1,982.1	2,015.0	2,043.5	2,069.1	2,091.0	2,107.9
Importaciones	296.7	220.1	189.3	156.6	136.5	134.7	134.3	143.5	160.1	176.5	190.1	192.2
Consumo domestico	1,960.8	1,885.3	1,894.0	1,918.3	1,951.1	1,989.6	2,027.8	2,070.0	2,115.2	2,157.4	2,193.1	2,212.1
Exportadores	40.9	86.0	88.0	88.4	88.7	88.7	88.7	88.6	88.4	88.2	88.0	88.0

1.2 CARACTERISTICAS DEL GANADO BOVINO

El ganado bovino es de gran importancia para el consumo humano, por lo cual su estudio e identificación desde su origen ancestral es de relevancia para el sector cárnico.

Debido a las diferentes áreas geográficas y fin productivo que se le ha dado, actualmente el ganado bovino se ha agrupado en dos subespecies de mayor importancia las cuales son *Bos taurus* o bovinos de origen europeo, y *Bos indicus*, los de origen indopaquistano (Gasque, 2008).

Entre los bovinos *Bos taurus* y los *Bos indicus* se presentan algunas características que permiten su adaptación en ambientes diferentes, algunas de estas características se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Diferencias entre bovinos *Bos taurus* y *Bos indicus*. Gaytan, (2006).

<i>Bos taurus</i>	<i>Bos indicus</i>
Pelo largo, grueso y rizado	Pelo corto, delgado y liso
Piel y mucosas sin pigmento	Piel y mucosas pigmentadas
Cuernos cortos	Cuernos largos
Sin giba	Presencia de giba
Orejas cortas y redondeadas	Orejas grandes, largas y caídas
Temperatura confort entre 5-17oC. Clima templado y/o trópico alto (2000-3000 msnm)	Temperatura confort entre 18-27oC, trópico bajo (0-2000 msnm)
Vísceras con mayor volumen	Vísceras con menor volumen
Aprovechan mejor los alimentos concentrados	Aprovechan mejor las pasturas tropicales
Temperamento dócil o tranquilo	Temperamento activo-vivaz
Patas cortas y hueso grueso	Patas largas y hueso fino
Cuello cortos y finos	Cuello largo y estrecho
Cabeza, proporcionalmente pequeña, corta y ancha entre los ojos.	Cabeza relativamente pequeña, pero larga
Pecho ancho y profundo	Estrecho pero profundo
Cuartos posteriores: con masas musculares bien desarrolladas	Cuartos posteriores muy poco desarrollados
Miembros cortos y bien cubiertos de músculos	Miembros largos con pocas masas musculares
Ubre grande, base amplia atada atrás, con pezones bien desarrollados	Ubre de características por lo general opuestas
Cola de inserción baja	Cola inserción alta
Espalda musculosa	Espalda relativamente musculosa
Arco de costilla: bien arqueada	Costillas derechas, tórax estrecho
Cruz, dorso y lomo: en una sola línea horizontal	Alto de cruz, bajo de dorso y lomo

Además de las diferencias citadas en la tabla 3, se ha puesto de manifiesto la diferencia que existe entre la suavidad de la carne de cada una de las especies siendo esta un factor que determina el consumo y producción de la misma.

Se han realizado varios estudios, donde se ha demostrado que entre ambas especies existe una diferencia importante en cuanto a suavidad de carne. Crouse y col. (1989) y Riley y col. (1986) han demostrado que la carne de *Bos indicus* es menos tierna que la de *Bos taurus*, lo cual tiene que ver con el proceso enzimático de proteólisis del músculo (ablandamiento de la carne por la rotura de partes del componente miofibrilar). Así, la extensión de la proteólisis inducida por las calpaínas en bovinos *Bos indicus* y el vacuno europeo (*Bos taurus*) se correlacionan con la textura, siendo mayor la proteólisis en *Bos taurus*, cuya carne es, por lo general, más tierna; por su parte, los músculos de *Bos indicus* presentan actividades más altas del inhibidor (Vásquez, y col., 2007).

1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA CARNE

La calidad de la carne depende de diversos factores intrínsecos propios del animal (raza, especie, sexo, edad) y extrínsecos o ligados al proceso productivo (alimentación, castración), además de otros relacionados con el manejo del animal y la canal en los momentos previos y posteriores al sacrificio (transporte, reposo, ayuno, estrés, método de aturdimiento, enfriamiento de la canal, maduración, etc.). Dichos factores pueden dividirse en función del espacio temporal en el que actúan (Sierra, 2010).

1.3.1 FACTORES ANTE-MORTEM

- *Raza*

Respecto a la raza existen diferencias morfológicas que originan diferencias en cuanto a los criterios de calidad de cada raza (Sánchez, 2010).

La raza afecta a la composición química de la carne, sobre todo, cuando se comparan razas de madurez precoz y tardía, ya que a la misma edad las primeras presentan una proporción más baja de músculo y más alta de grasa. También existen diferencias en la composición grasa (Sierra, 2010).

En cuanto al efecto de la raza sobre la textura, Smith, 2001., afirma que el ganado vacuno criado y seleccionado durante siglos para la tracción tiene más tejido conectivo y colágeno con mayor grado de cruzamiento de enlaces, que el ganado que ha sido criado y seleccionado para producir carne (Sierra, 2010).

- *Edad y madurez fisiológica*

La contribución del colágeno a la dureza de la carne es un aspecto importante, el cual está relacionado con la edad del animal y la actividad física. Los animales jóvenes

contienen más colágeno total que los animales adultos. Se ha establecido claramente que muchos de los puentes covalentes que unen las moléculas de tropocolágeno son relativamente lábiles en los animales jóvenes y se hacen más estables y fuertes conforme aumenta la edad y la actividad física, aumentando el grado de interacción entre y dentro de las fibras de colágeno, y por lo tanto su dureza. Este descenso en la proporción de puentes covalentes lábiles/estables es el responsable de la contribución del colágeno a la dureza de la carne tratada térmicamente (Sierra, 2010).

La madurez fisiológica es un aspecto altamente relacionado con los cambios biológicos de los tejidos orgánicos como una función de la edad, este es un proceso irreversible que es responsable de los cambios en los músculos que están directamente asociados con la ternura. Los procedimientos para cuantificar la madurez fisiológica de los músculos se basa en la estimación química del tejido conectivo, las proporciones proteína/humedad y el grado de osificación del hueso y el cartílago (Sierra, 2010).

- *Sexo y estado fisiológico*

Existen diferencias musculares entre sexos que se muestran de forma notable tras la pubertad del animal y que pueden deberse a la producción de hormonas sexuales, en concreto la testosterona. Estas diferencias hormonales afectan a la composición del músculo, de modo que en los machos la testosterona favorece una rápida formación de músculo en contra de la deposición de grasa, haciendo que la carne de machos presente un menor contenido graso que la de la hembra o machos castrados, lo que afectará a las características fisicoquímicas y sensoriales de la carne (Sierra, 2010). Las hembras presentan además un menor diámetro de las fibras musculares (Church, y col., 1992), lo cual influye sobre la textura de la carne. Por otro lado, la carne de los animales machos tiene mayor tendencia a incrementar su dureza con la edad en comparación con las hembras, lo que podría deberse en parte al posible efecto estimulador de la testosterona sobre el contenido de colágeno. Debido a esto, generalmente la carne de las hembras es de mejor calidad sensorial que la de los machos (Sierra, 2010).

En cuanto al efecto del estado fisiológico o castración, Purchas, y col., (2002) encontraron en animales de raza Angus de distintos rangos de edad y distintos niveles de crecimiento, que la carne de los terneros castrados presentaba mayor engrasamiento intramuscular, resultando más tierna y jugosa que la de los machos enteros. Además, en este estudio, los machos enteros mostraron mayores tasas de crecimiento, dando lugar a

una carne con menor capacidad de retención de agua, pH más alto y menor actividad proteolítica, lo que también podría explicar la mayor dureza encontrada (Sierra, 2010).

- *Alimentación*

La alimentación de los animales ejerce una influencia importante en ciertos atributos relacionados con la calidad de la carne como la jugosidad, la dureza y el color (Sánchez, 2010). Esta importante influencia se debe a que la nutrición puede tener un efecto regulador sobre los procesos biológicos que tiene lugar en el músculo y que finalmente determinarán la calidad del producto (Sierra, 2010).

Se ha demostrado que la dieta afecta la composición química de la carne de vacuno de modo que dietas ricas en piensos concentrados producen una mayor proporción de grasa en comparación con la carne de animales alimentados con forrajes (O'Sullivan, y col., 2003). De igual manera, la dieta afecta a la composición de la grasa, la ingestión de forrajes produce cambios en el perfil lipídico de la carne (Sierra, 2010).

Con respecto al colágeno, existen resultados contradictorios en cuanto al efecto de la dieta, mientras algunos estudios como los realizados por Mandell, y col. (1998), French, y col., (2001) no han encontrado diferencias producidas por la dieta en la solubilidad del colágeno, otros como los publicados por Miller y cols., 1987, Archile y col. (2010), sugieren que dietas energéticamente más ricas aumentan la cantidad de colágeno soluble y aceleran la tasa de transformación del tejido conectivo, lo que afectaría positivamente a la ternura de la carne (Sierra, 2010).

1.3.2 FACTORES PERI-MORTEM

- *Transporte*

En sentido más amplio, el transporte comprende desde la carga en el vehículo, pasando por el transporte propiamente dicho al matadero y la descarga. Es una sobrecarga para el animal con notables mermas de calidad en la carne, consecuencias de las heridas, estrés e incluso pudiendo provocar la muerte (Sánchez, y col., 2010).

Las consecuencias del transporte sobre la calidad de la carne varían ampliamente en función de la duración del transporte y de las características genéticas del animal (Sánchez, y col., 2010). Los efectos del transporte y movimiento incluyen: Hematomas; posiblemente la pérdida de producción más significativa en la industria cárnica, pisotones, asfixia, fallo cardíaco, envenenamiento, deshidratación, lesiones, insolación, distensión estomacal y

estrés. Este último aspecto puede traer como resultado la obtención de carne oscura, firme y seca (DFD) y carne pálida, blanda y exudativa (PSE) (FAO, 2013)

- *Reposo*

Los animales pueden estresarse por cualquier tensión psicológica (el manejo, los nuevos sucesos) o las tensiones físicas (como hambre, sed, fatiga, lesiones o temperaturas extremas), por lo tanto es conveniente que estos animales tengan tiempo de reponerse, el reposo sirve, tanto para minimizar los factores estresantes ocasionados por el transporte, como para reponer las reservas de glucógeno previniendo características indeseables en la carne (Mota, y col., 2010).

Tras la llegada del ganado al matadero, se deja en reposo en una zona destinada a tal efecto. El tiempo y las condiciones de este reposo son un factor importante a la hora de evitar los efectos del estrés al que se ha visto sometido el animal. Durante el reposo se permite al animal rehidratarse y descansar. Por lo tanto resulta de suma importancia asegurarse que las instalaciones y las condiciones de la zona destinadas al reposo sean adecuadas (Sánchez, y col., 2010).

De 12 a 24 horas es el periodo de descanso recomendado para que el animal se recupere de las condiciones adversas sufridas durante un periodo corto de transporte. Sin embargo, si el tiempo de transporte fue prolongado el ganado exigirá varios días para restablecer su normalidad fisiológica (Ferreira, y col., 2006). De acuerdo a Pardi, Santos, Souza (2001), el reposo está relacionado con la concentración de glucógeno en el músculo, el cual es agotado por la fatiga, el trabajo, la excitación que sufren los animales durante su transporte. Cuando los animales son sacrificados antes de que puedan recuperarse de los efectos del transporte y así poder recuperar el glucógeno muscular, se lleva a cabo una glucolisis póstuma lenta, lo cual trae como consecuencia que se obtenga carne DFD (Ferreira, y col., 2006).

- *Ayuno*

El tiempo que los animales pasan sin alimento y agua reviste importancia desde el punto de vista de su bienestar, al sufrir de hambre, sed y de los efectos que esto puede tener en términos de disminución de peso y calidad de carne (Gallo, y col., 1995)

El efecto que tiene la privación de alimento en bovinos sobre variables sanguíneas indicadoras de estrés difiere según su duración (horas) y según vaya o no acompañada de transporte (Gallo, 2009).

En bovinos el ayuno debe ser entre 12 y 72 horas. Si éste es menor de 12 horas, se presenta plena actividad digestiva; se presenta un estrés leve, que afecta la conversión de músculo a carne. La canal se contamina por el alto contenido intestinal y ruminal. Los tejidos, no tendrán la composición adecuada, por los compuestos que aportan olores y sabores no propios de la carne (Savenije, y col., 2002).

Si el ayuno es excesivo, se acaba con las reservas de glucógeno del animal (el glucógeno es la reserva de energía más rápida del animal), el cual es el responsable de la disminución del pH en el proceso de conversión a carne (si se da un sacrificio con bajo nivel de glucógeno, el pH no disminuye) (Savenije, y col., 2002).

Mientras más largos son los tiempos que los animales están privados de alimento, sea por transporte o simplemente en espera en el establecimiento comercial o en la planta faenadora, mayores probabilidades existen de que se presente estrés por hambre, sed y situaciones ambientales adversas, de que ocurran pérdidas de peso de la canal, contusiones por peleas y accidentes, así como efectos negativos en la calidad de la carne (Gallo, 2009)

- Aturdimiento

El tipo de aturdimiento es un factor de gran importancia ya que este tiene repercusiones importantes sobre la calidad final de la carne. Si bien el aturdimiento es un procedimiento obligatorio en la Unión Europea, para asegurar el adecuado estado de inconciencia del animal en el momento del sacrificio, se han descrito algunas desventajas asociadas al tipo de aturdimiento empleado: hemorragias, fracturas de hueso, riesgo para los operarios, etcétera (Sánchez, y col., 2010).

Los métodos más usuales empleados para el aturdimiento son el eléctrico y el uso de CO₂, este último cada vez más extendido, el cual además puede contribuir a la mejora de la calidad de la carne obtenida, porque favorece el desangrado de la canal (Sánchez, y col., 2010), sin embargo tanto uno como otro son sistemas de aturdimiento capaces de generar un fuerte estrés en los animales y por consiguiente determinar considerables pérdidas de calidad en la carne, ya que dan lugar a carnes PSE sobre todo si los animales son sensibles al estrés (Álvarez, y col., 2010).

El conocimiento de dichas técnicas, su funcionamiento y las condiciones que puedan alterar su normal aplicación deberán ser tenidos en cuenta si se quiere conseguir no solo una rápida inconciencia en los animales minimizando su sufrimiento, sino también una alta calidad de los productos cárnicos (Álvarez, y col, 2010).

- Estrés al sacrificio

Todos los animales destinados a la producción de carne van a sufrir ciertos niveles de estrés al sacrificio, y esto puede tener efectos negativos sobre la calidad del producto. Desde que los animales salen de la granja hasta que son sacrificados están expuestos a numerosos estímulos que perturban su homeostasis y generan respuestas adaptativas para restaurar el equilibrio. Dicha respuesta es muy variable entre individuos, que no sólo no perciben el estrés de igual modo, sino que coordinan de diferentes modos su respuesta al mismo (Moberg, y col., 2001).

El estrés que sufren los animales antes del sacrificio provoca cambios en la composición de metabolitos, cambios en la temperatura, pH al sacrificio y también cambios en la actividad del retículo sarcoplásmico afectando especialmente al transporte de calcio, lo que puede alterar la glucólisis produciendo un consumo excesivo de glucógeno muscular (Ferguson, y col., 2008; Mach, y col., 2008). El nivel de depleción de glucógeno puede depender de infinidad de factores de manejo, tales como el cansancio físico y el estrés al que es sometido el animal, el tiempo que dure el transporte, las condiciones de carga y descarga, el tiempo de espera en el matadero, la ruptura de los grupos sociales, entre otros (Schaefer, y col 1997; Warris, 2003). Todos estos factores pueden tener un gran efecto sobre diferentes atributos de calidad como son cambios en pH, en terneza, color, capacidad de retención de agua y también sobre la maduración de la carne y pueden determinar la aparición de carnes DFD, con un pH elevado y características de color, retención de agua y textura que no son las deseables (Sierra, 2010).

1.3.3 FACTORES POST-MORTEM

- *Enfriamiento*

La velocidad y la temperatura de enfriamiento de la canal en las primeras horas tras la muerte tienen una gran influencia sobre la longitud y, por tanto, sobre la dureza de los músculos. Las bajas temperaturas *post mortem* pueden causar un acortamiento excesivo del músculo, dando lugar al problema denominado “acortamiento por el frío”. No se observa un descenso apreciable de la terneza con acortamientos de un 20 % que, sin embargo, desciende hasta un mínimo, para acortamientos entre un 35 y un 40 %. Curiosamente, músculos con un 60 % de acortamiento son casi tan tiernos como aquellos que no han sufrido este proceso. Se ha visto que los mayores acortamientos se producen a bajas temperaturas (<5 °C) y que se incrementan después de alcanzar 35 °C aproximadamente. Parece ser que la causa de este proceso está relacionada con la imposibilidad del retículo

sarcoplásmico para secuestrar y ligar el exceso de iones calcio liberados por el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias, bajo la influencia de las bajas temperaturas y el descenso del pH en el músculo en *pre rigor* (Onega, 2003).

Si se mantienen las canales a 37°C durante las primeras 2-4 horas *post mortem*, se incrementa la terneza (Marsh, y col., 1980). En ese mismo sentido, Marsh, y col. (1968) observaron que, manteniendo la carne en *pre rigor* unos 16°C hasta el comienzo del *rigor mortis*, se evitaba el acortamiento por frío y el consiguiente endurecimiento de la carne. Pero el método más utilizado para prevenir este fenómeno es la estimulación eléctrica de las canales, puesto que utilizar estas temperaturas tan altas durante la maduración de la carne puede favorecer el crecimiento microbiano más que las bajas temperaturas (Pearson, 1986).

- Estimulación eléctrica

Cuando una corriente eléctrica adecuada (aproximadamente 300 V) atraviesa una canal poco después del sacrificio, las fases de la glicólisis y del *rigor mortis* se aceleran extraordinariamente, eliminando toda posibilidad de acortamiento por el frío, pese a que se la someta a un enfriamiento rápido e intenso (Onega, 2003).

Se ha observado que canales de vacuno estimuladas eléctricamente alcanzan el *rigor mortis* en 4 horas, cuando el tiempo normal es de 15 a 20 horas. La acción de este proceso parece ser debida, en parte, a la depleción de adenosín trifosfato (ATP) y al acortamiento del inicio del *rigor mortis*. Sin embargo, el descenso de la dureza no se debe sólo a la ausencia del acortamiento por el frío, sino también a la estimulación de la proteólisis por activación de las enzimas lisosomales. Otro mecanismo por el que la estimulación eléctrica impediría el endurecimiento de la carne es la rotura tisular como consecuencia de la violenta contracción producida. Además de su efecto ablandador, la estimulación eléctrica tiene otros efectos deseables, principalmente de naturaleza estética (Onega, 2003).

- Maduración

Los procesos metabólicos, aún en desarrollo en el músculo después de la muerte, pueden considerarse concluidos con la aparición de la rigidez cadavérica. La carne lista para el consumo se obtiene después de un cierto tiempo de almacenamiento en refrigeración (0-5 °C), tras el cual la carne resulta más tierna y jugosa (Carballo, y col, 1991). Para una maduración correcta es importante que exista una adecuada acidificación de la carne (pH de 5,4 a 5,8). Los mayores problemas durante la maduración consisten en

el espacio de refrigeración requerido y en la apreciable pérdida de peso que tiene lugar a menudo (Pearson, 1986).

Se acepta, generalmente, que existe una proteólisis del tejido conectivo y de las fibras musculares durante la maduración debido a la presencia de proteinasas endógenas del músculo. También la proliferación microbiana puede contribuir con enzimas exógenas a la hidrólisis de diferentes proteínas de la carne. Mediante microscopía electrónica de transmisión se ha observado una evidente ruptura de la línea Z en la carne madurada. Sin embargo, ha sido difícil probar algún otro cambio químico de importancia durante la maduración. Se piensa que estas enzimas juegan un papel fundamental; sin embargo, el grado de proteólisis ha sido menor del que cabría esperar por el incremento de terneza observado, pero incluso menores cambios en la estructura de las proteínas pueden causar mayores alteraciones en sus propiedades físicas (Onega, 2003).

Algunos autores han discutido la estructura y función del colágeno y su comportamiento durante la maduración. Sugieren que la cantidad de enlaces inter- e intramoleculares pueden alterar las propiedades del músculo, especialmente la terneza. Se sabe que ciertas enzimas hidrolizan el colágeno y podrían jugar un papel importante alterando las propiedades del tejido conectivo durante la maduración (Onega, 2003).

- Congelación

La congelación en sí misma no representa un efecto deletéreo en la calidad de la carne *post rigor*, y la velocidad de congelación tiene un efecto inapreciable. Sólo si la carne se congela rápidamente antes de que el *rigor mortis* haya sido completado, los músculos se pueden acortar muy apreciablemente si la descongelación se lleva a cabo de manera rápida y, además, puede acompañarse de considerables pérdidas por goteo. Este proceso llamado “*rigor* de la descongelación” o “*thaw rigor*” puede prevenirse fácilmente postergando la operación de congelado hasta que se complete el proceso de *rigor mortis*, o por medio de una estimulación eléctrica de la canal que acelera su consecución y permite congelar la carne en fase *pre rigor* sin problemas posteriores (Onega, 2003). Locker y cols. (1975) han señalado que los efectos de este fenómeno indeseable pueden ser minimizados descongelando lentamente la carne. Además indican que la glicolisis continúa durante la congelación, y que un periodo suficiente de almacenamiento en congelación puede prevenir el *rigor* por descongelación. Otra alternativa posible es el empleo de enzimas proteolíticas exógenas como, por ejemplo, la papaína, que pueden inyectarse al animal antes del sacrificio para mejorar la terneza (Carballo, y col, 1991).

1.4 ASPECTOS GENÉTICOS

Las dos herramientas clásicas de mejora genética, son la selección dentro de razas y los cruzamientos. La mayor eficiencia en la mejora genética, es decir el mayor avance genético de una característica, se logra mediante una correcta utilización e implementación de las herramientas mencionadas (Soria, y col., 2004).

Basados en estudios previos se ha relacionado que existen factores genéticos que pudieran estar asociados con la calidad de la carne.

La terneza de la carne está asociada a cuatro principales factores:

- ✓ El estado y la degradación de las fibras musculares.
- ✓ El estado contráctil del músculo.
- ✓ La cantidad y el tipo de tejido conectivo
- ✓ La cantidad de grasa intramuscular o marmoleo.

La variabilidad de cada uno de estos factores puede ser explicada por efectos genéticos o ambientales. Algunas estimaciones señalan que el efecto genético aditivo controla el 30 % de la variación de la terneza (Soria, y col., 2004).

1.4.1 MEJORAMIENTO DE CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE CARNE A TRAVÉS DE LA GENÉTICA

El mejoramiento genético en el ganado bovino, se ha enfocado en la selección de características cuantitativas que en su mayoría se encuentran controladas por varios genes cuya identidad por lo general se desconoce. Sin embargo, se conoce su localización aproximada en el genoma a través del uso de marcadores genéticos desarrollados en estas regiones. Esto ha dado lugar a la posibilidad de usarlas para mejorar características cuantitativas (Casas, 2006).

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, 2002). Actualmente, la disponibilidad de herramientas moleculares como el MAS (selección asistida por marcadores) ha incrementado el progreso genético para *loci* de características cuantitativas (QTL). 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 (Casas, 2006).

Los marcadores moleculares, son etiquetas a lo largo del cromosoma que pueden ser usados para identificar QTLs, en los cuales se encuentran genes de interés, denominados genes candidatos (Yu, y col., 2007).

Una vez que se han localizados 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 candidatos (Yu, y col., 2007).

Debido a que la terneza está asociada a factores genéticos, se puede decir que es posible mejorar la terneza de la carne por la vía genética. Las herramientas posibles a utilizar, podrían ser la selección genética dentro de razas, es decir, en cada generación identificar, seleccionar y utilizar los animales que potencialmente producirán carne más tierna dentro de cada raza (Peluffo, y col., 2002)

La otra herramienta de mejora genética son los cruzamientos, a través de los cuales se busca explotar el vigor híbrido y la complementariedad. La terneza, al igual que muchas otras características de carcasa, presenta muy bajo vigor híbrido. Por lo que los cruzamientos, en la mejora de la terneza, estarían orientados a buscar básicamente la complementariedad entre razas, combinando las virtudes de las razas involucradas (Peluffo, y col., 2002).

1.4.2 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores de ADN tienen una gran ventaja, y ésta radica en las características de la molécula de ADN ya que esta es una molécula de gran estabilidad térmica por lo cual su conservación a pesar de tratamientos de transformación brinda información específica y confiable, además está presente en todos los tejidos del cuerpo y siempre será igual.

El desarrollo de las tecnologías de ADN, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que se centra en la amplificación in vitro de pequeñas cantidades de ADN para su posterior análisis, ha permitido el desarrollo de marcadores genéticos que ofrecen información de acuerdo a lo que se desee analizar.

1.4.2.1 TIPOS DE MARCADORES

Existen dos tipos principales de marcadores, los marcadores multi-Locus y los marcadores uni-Locus.

MARCADORES MULTI-LOCUS

- Minisatélites o VNRT

Los minisatélites son loci que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidas en *tandem*. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en *tandem* puede ser de 10, en otro de 15 en otro de 22, etc. La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada loci puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma y por lo tanto sólo pueden ser utilizados en el diagnóstico de un número muy reducido de enfermedades. Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial (Armour, y col., 1995).

- RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar)

Los RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies. Los RAPDs se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams, y col., 1990).

Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigos dominantes de los heterocigos para un segmento particular (Whitkus, y col., 1994; Backeljau, y col., 1995), por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta.

Los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada (Otero, y col., 1997; Parker, 1998).

- ISSRs (secuencias repetidas intersimples)

Esta es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di ó trinucleotido repetido (Culley, y col., 2001).

Los dos métodos que se utilizan en la electroforesis de ISSRs son: a) gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio, y b) geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 100 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSRs consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados (Culley, y col., 2001).

Comparada con los primers de los RAPDs las secuencias de los ISSRs es usualmente larga lo que resulta en una mayor reproducibilidad de las bandas.

- AFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados)

Son una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, que generalmente reconoce y corta 4 pb y Eco RI que reconoce y corta 6 pb dentro de una secuencia, con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción y dos amplificaciones de PCR usando primers marcados basados en las secuencias ligadas (Vos, y col., 1995).

MARCADORES UNI-LOCUS

- Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (Litt y Luty, 1989) son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Armour, y col., 1994; Coltman, y col., 1996; Gupta, 1996).

Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica (Eduars, y col., 1991; Armour, y col., 1993; Devey, y col., 1996; Queller, y col., 1993), análisis de linajes (Queller, y col., 1993) y de sistemas reproductivos.

- RFLPs (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción)

Este método expresa diferencias específicas del ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas (de origen bacteriano), reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas es decir metiladas. Por consiguiente cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar

el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez, y col., 2000). Para detectar RFLPs hay dos técnicas: southern blot e hibridización, y PCR.

- SNP (polimorfismo de nucleótido simple)

Los SNP son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región. Existen SNP en todo el genoma. Son muy abundantes en el genoma humano, a razón de un SNP por cada 1 000 pares de bases. La mayoría de los SNP se localizan en las regiones no codificantes, y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética funcional (Sachinandam R. y col., 2001).

II. DESCRIPCIÓN DE GENES CANDIDATOS A ESTUDIAR

2.1 GEN DE MIOSTATINA

El gen de Miostatina (MSTN) del ganado bovino productor de carne es de gran importancia en términos de producción y calidad de la carne. La miostatina es una proteína que pertenece a la superfamilia de los factores transformadores de crecimiento β (TGFB) y se expresa fundamentalmente en el músculo esquelético, cuya función parece ser una regulación negativa del crecimiento muscular determinando en algunos animales lo que se ha denominado como fenotipo “doble musculoso”, (Grobet, y col., 1997, Kambandur, y col., 1997; McPherron, y col., 1997) ganado que presenta una apariencia semejante a la ilustrada en la figura 2.



Figura 2. Ejemplar de ganado con fenotipo doble musculatura de la raza blanco azul belga, sexo: macho, edad: 4 años, sistema de crianza: intensivo.

Se ha descubierto que en algunas circunstancias la supresión de este gen provoca aumento de la masa muscular por hiperplasia (aumento en el número de fibras) e hipertrofia (aumento del tamaño de fibras) culminando en un elevado rendimiento de las canales, las cuales poseen mayor conformación y menor engrasamiento (Piedrafita, y col., 2003; Alberti, y col., 2005; Casas, y col., 2005; Alzon, y col., 2007; Wiener, y col., 2009). Derivado de estos hallazgos, se consideró relevante realizar una revisión de los trabajos realizados acerca de la identificación y caracterización de este gen, que lo han llevado a ser candidato como marcador molecular de calidad cárnica, con el objetivo de proporcionar la información suficiente para su empleo en la producción de ganado bovino en México.

DESCRIPCIÓN DEL GEN DE MIOSTATINA

Se ha demostrado en razas de bovinos productores de carne, que el gen de miostatina es un excelente marcador molecular que permite evaluar características de la carne y del crecimiento en los bovinos. La alta heterogeneidad alélica encontrada para éste gen, hace necesario su estudio en diferentes razas de ganado bovino, con el fin de establecer su potencial uso en programas de mejoramiento asistido por marcadores e identificar nuevas mutaciones que puedan explicar los fenotipos de los individuos.

El gen de miostatina es un gen presente en animales vertebrados y está involucrado en el desarrollo de músculo esquelético, a este gen se le atribuye la presencia de hipertrofia muscular en diferentes especies y su caracterización molecular ha permitido establecer la presencia de un alto número de polimorfismos. Estos polimorfismos, provocan que la proteína generada sea altamente inactiva, impidiendo su acción como regulador negativo del crecimiento muscular, provocando así la aparición del fenotipo conocido como doble musculatura (*MY*) (Masumi, y col., 2002; Grobet, y col., 1997; Kambandur, y col, 1997; McPherron, y col., 1997).

El gen de la miostatina se localiza en el genoma bovino en el cromosoma 2, contiene 6691pb distribuidos en 3 exones y dos intrones (Jeanplong, y col., 2001). Se ha reportado la presencia de varios polimorfismos presentes en este gen. Sin embargo, se han identificado a 6 de estos cómo los principales responsables de la manifestación del fenotipo de doble musculatura (*MY*), la posición de estos polimorfismos se ilustran en la figura 3. La relevancia de estos polimorfismos radica en que provocan la aparición de un codón de paro prematuro, lo cual afecta la funcionalidad de la proteína, y propicia la aparición del fenotipo *MY*.

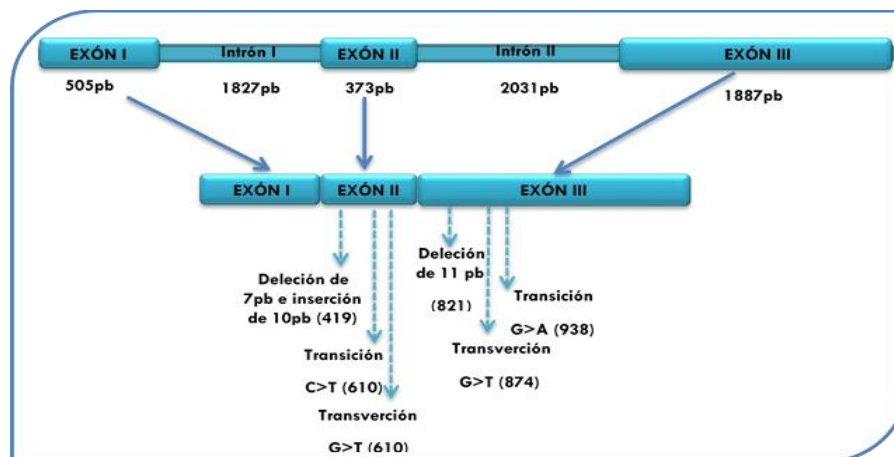


Figura 3. Estructura del gen de miostatina y posición de los principales polimorfismos responsables del fenotipo de doble musculatura (Karim, y col., 2000).

CARACTERÍSTICAS DEL FENOTIPO DE DOBLE MUSCULATURA.

La supresión del gen de miostatina confiere una serie de características propias del ganado con fenotipo de doble musculatura. Las características más sobresalientes del ganado doble musculatura se resumen en la figura 4.

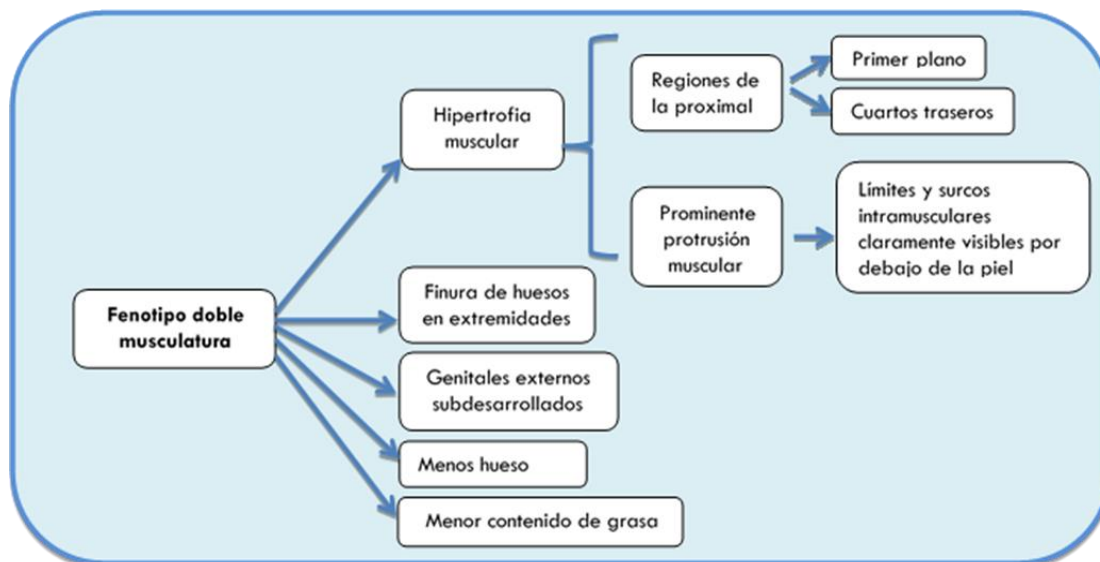


Figura 4. Características del fenotipo doble musculatura en ganado bovino.

DIFERENCIAS ENTRE EL FENOTIPO DE DOBLE MUSCULATURA Y EL GANADO PRODUCTOR DE CARNE “NORMAL”

Se han establecido diferencias bien definidas entre el ganado con fenotipo doble musculatura (MY) y el ganado “normal”, una de las diferencias más importantes es el contenido de fibras musculares desde el nacimiento (Gerard, y col., 1991), siendo casi el doble de cantidad en el ganado MY, además de presentar menor contenido de colágeno (Uytterhaegen, y col., 1994). Respecto a la fatiga que sufren los animales, se sabe que el ganado MY presenta signos de fatiga más rápido que el ganado “normal” (Holmes, y col., 1973), este acontecimiento está relacionado a la presencia de acidosis metabólica a causa de la reducción en la circulación sanguínea, lo que lleva a una deficiencia en el transporte de oxígeno y una reducción de la actividad metabólica aeróbica a nivel muscular (Menissier, y col., 1982a).

FACTORES QUE AFECTAN LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA CARNE

La expresión del fenotipo *MY* se ve influido por la raza, nutrición y sexo (Menissier, y col., 1982b). Una de las características de mayor interés en animales con este fenotipo es el bajo contenido de grasa que presenta la carne a nivel intramuscular (Hanset, y col., 1991). En este sentido, Hocquette, y col. (1999), demostraron que el marmoleo mínimo en la carne, contribuye a la presencia de un sabor característico, es decir menos grasoso, de la carne de animales con este fenotipo.

La terneza de la carne es otra característica relevante que se ve favorecida en el ganado *MY*, ya que este ganado presenta un menor contenido de tejido conectivo y esto contribuye a un aumento significativo de la terneza de la carne (Hanset, y col., 1991). Los expertos en el área de calidad de la carne y catadores de características organolépticas en la carne, han determinado que el proceso de terneza solo se puede llevar a cabo tras la activación del sistema proteolítico Calpaína (μ y m), el cual requiere de calcio para su activación. Al activarse provoca la fragmentación de las proteínas miofibrilares (desmina, titina, nebulina y Troponina-T) dando como resultado un debilitamiento o degradación del disco-Z y con esto un incremento en la terneza de la carne. La actividad de la calpaína puede ser inhibida por la acción de la calpastatina (Hocquette, y col., 1999).

Existen factores que pueden afectar la terneza de la carne independientemente de la genética del animal. La especie afecta la dureza de la carne, este efecto es un reflejo de la textura. Por ejemplo, el mayor tamaño del ganado vacuno en relación a las ovejas y cerdos es causa de que la textura de la musculatura sea más basta. Mientras que la raza, a veces afecta la textura. El origen de esta dureza, es hereditaria en más de 60% y se debe fundamentalmente a que poseen más inhibidores de las calpaínas (enzimas que naturalmente degradan el músculo en condiciones *post-mortem*) (Casas, y col., 2005; Hocquette, y col., 1999)

POLIMORFISMOS RESPONSABLES DE DOBLE MUSCULATURA EN GANADO BOVINO

En las últimas décadas, gracias al avance del conocimiento en el campo de las técnicas moleculares y las herramientas genéticas, se han podido identificar diferentes polimorfismos en ganado bovino y asociar su presencia, principalmente en razas europeas. Existen diversas investigaciones desde 1997 a la fecha que han logrado identificar los principales polimorfismos en el gen de miostatina responsables del fenotipo de doble musculatura (tabla 4).

Tabla 4. Identificación y localización de los principales polimorfismos en el gen de miostatina responsables del fenotipo doble musculatura en diversas razas de ganado bovino.

TIPO DE MUTACIÓN ENCONTRADA (POSICIÓN EN LA PROTEÍNA)	RAZAS DE GANADO BOVINO	AUTORES
Delección de 11pb (821)	<i>Belgian Blue</i>	Grobet, y col., 1997; Dunner, y col., 2003; Bellinge, y col., 2005
	<i>Austuriana, Angus-Sired South Devon</i>	Grobet, y col., 1997 Gill, y col., 2008 Wiener, y col., 2009
Transición G>A (938)	<i>Gasconne, Piedmontese</i>	Fahrenkrug, y col., 1999
Delección de 7 pb e inserción de 10 pb (419)	<i>Maine Anjou</i>	Karim, y col., 2000 Dunner, y col., 2003
Transición C>T (610)	<i>Charolais, Limousine</i>	Karim, y col., 2000 Dunner, y col., 2003
Transversión G>T (676)	<i>Maine Anjou</i>	Karim, y col., 2000
Transversión G>T (874)	<i>Marchigiana</i>	Karim, y col., 2000

Como se muestra en la tabla 4 se han identificado seis principales polimorfismos en el gen de miostatina asociados a la expresión del fenotipo de doble musculatura por su repercusión en la función de la proteína. Sin embargo, el polimorfismo mayormente encontrado en ganado con este fenotipo es la delección de 11 pares de bases en la posición 821 denominado como *del11*, convirtiendo así, a este polimorfismo en un candidato relevante asociado a calidad de la carne. También se ha reportado que la frecuencia alélica de este polimorfismo es un factor que influye en la calidad de la carne, puesto que estudios realizados por Olivan y colaboradores en 2004 y posteriormente por Alday y colaboradores en 2006 demuestran que los animales homocigotos que presentan la delección de 11 pares (genotipo *del11/del11*) tienen menor contenido de grasa y mayor rendimiento de la canal, comparado con los animales homocigotos de genotipo normal (*MY/MY*) y los animales heterocigotos (*MY/del11*) presentan características intermedias con respecto a los dos fenotipos homocigotos.

2.2 GEN DE CALPAÍNA

Las calpaínas constituyen una amplia familia de proteinasas intracelulares citosólicas dependientes de calcio, cisteínas específicas y presentes en muchas isoformas, las cuales se encuentran ampliamente distribuida en todos los tejidos y muestran una actividad regulada a valores de pH fisiológico (Sorimachi, y col., 1997; Suzuki, y col., 1998; Prigge, y col., 1998; Ono, y col., 1998). En mamíferos se encuentran omnipresentes en todos los tejidos, siendo sus características generales variables según la especie y ubicación (Kawashima, y col, 1998).

Dentro de este grupo de proteínas se han identificado dos isoformas asociadas a la terneza de la carne, m-Calpaína y μ -Calpaína, ya que estas actúan durante la maduración *post-mortem* de la carne (Koochmaire, y col., 1992; Morgan, y col., 1991; Soria, y col., 2004).

Estas isoformas difieren en cuanto a la cantidad de calcio que requieren para actuar, mientras que la μ -Calpaína requiere una concentración de calcio micromolar, la m-Calpaína actúa a concentraciones milimolares (Suzuki, y col., 1998). Ambas calpains son proenzimas no activas, que se autolizan produciendo proteínas activas en presencia de calcio. Ambas degradan la mayoría de las proteínas miofibrilares, mostrando su actividad durante los primeros 7 a 10 días *post-mortem* a 2-4 °C con pH óptimo de 7.2-8.2 (Goll, y col., 2003).

Sin embargo, aunque ambas isoformas son muy parecidas, varios autores señalan a la calpaína I (μ - calpaína) como la principal enzima involucrada en la terneza de la carne debido a las concentraciones de calcio a las cuales se activa (Kroohmaraie, y col., 1994; Illian, y col., 2001; Malene, y col., 2008).

El gen de calpaína está localizado en el cromosoma 29 de bovino, estructuralmente, tiene 30 kb, contiene 22 exones y 21 intrones (Page, y col., 2002). Se han logrado identificar más de 100 polimorfismos de nucleótidos en este gen en *Bos taurus* y recientemente en *Bos indicus* (Smith, y col., 2000; Page, y col., 2002; Juszczuk, y col., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que de todos estos polimorfismos 5 de ellos están asociados a características de calidad de la carne (Page, y col., 2002, 2004).

En la figura 5 se muestra la estructura del gen de calpaína y la posición de los polimorfismos más importantes (White, y col., 2005).

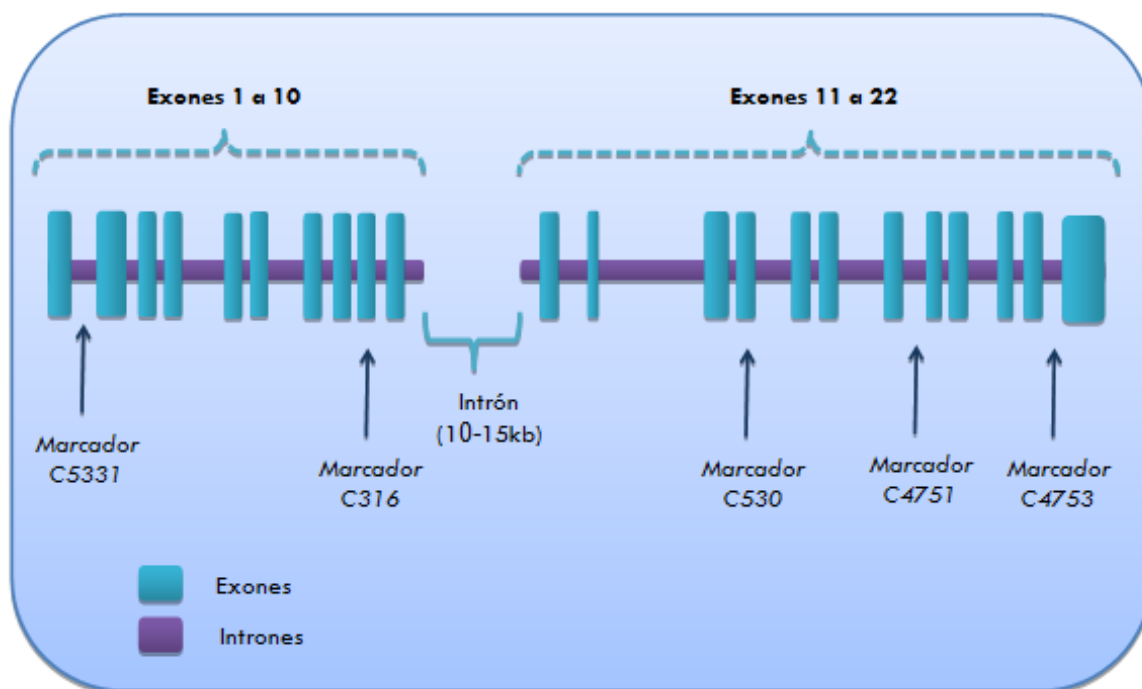


Figura 5. Estructura del gen de Calpaína I y los principales marcadores asociados a características de calidad de carne.

Cada uno de estos marcadores provocan una polimorfismo diferente, los cambios que definen estos marcadores se enlistan en la tabla 5.

Tabla 5. Ubicación y polimorfismo que causan cada uno de los marcadores asociados a calidad de carne en el gen de Calpaína.

Marcador	Ubicación en el gen	Polimorfismo
C5331	Intrón 1	A/T
C316	Exón 9	C/G
C530	Exón 14	A/G
C4751	Intrón 17	C/T
C4753	Intrón 21	A/C

De los cinco marcadores enlistados se ha reportado que dos de ellos C316 y C530, presentan mayor influencia en la terneza de la carne ya que estos están situados en exones lo cual afecta la funcionalidad de la proteína.

Como se muestra en la tabla 5, el marcador C316 provoca un cambio de citosina por guanina en la posición 316 (GGC/GCC) lo cual deriva en la expresión de un aminoácido diferente (sustitución de alanina por glicina) (Page, y col., 2002). En cuanto al marcador C530, este polimorfismo se manifiesta por un cambio de adenosina por guanina en la posición 530 (GTC/ATC) dando como consecuencia el cambio de aminoácido; de valina por isoleucina (Page, y col., 2002).

Se han realizado varios estudios en diferentes razas de ganado bovino para comprobar la influencia de los marcadores de calpaina con la ternera de la carne. Los marcadores más estudiados son C316 y C530 por sus implicaciones en la funcionalidad de la proteína y el C4751, ya que éste se ha asociado a ganado *Bos indicus* mayoritariamente (Corva, y col., 2007).

Los estudios más relevantes y sus resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de estudios realizados acerca de los principales marcadores del gen de Calpaína.

AUTOR	GANADO	MARCADORES ESTUDIADOS	RESULTADO
Corva, y col., 2007	Brangus	C316 y C4751	C316 mostró mayor genotipo CG C4751 mostro mayor genotipo GT
White, y col., 2005	Brahman	C316 y C530	C316 mostró mayor genotipo CG C530 mostro mayor genotipo AG
Williams, y col., 2003	Charolais	C316 y C4751	C316 mostró mayor genotipo CG C4751 mostro mayor genotipo GT
Casas, y col., 2005	Brahman	C316, C5331, C4753	C316 mostro mayor genotipo GG C5331 mostro mayor genotipo AA C4753 mostro mayor genotipo GG
Parra, y col., 2007	Brahman	C316, C530 y C4751	C316 mostro mayor genotipo CG C530 mostro mayor genotipo AA C4751 mostro mayor genotipo GT
Frylinck, y col., 2009	Cruzas con Brahman	C316 y C4751	C316 mostro mayor genotipo GG C4751 mostro mayor genotipo TT
	Cruzas con Simmental	C316 y C4751	C316 mostro mayor genotipo GG C4751 mostro mayor genotipo TT
	Cruzas con Nguni	C316 y C4751	C316 mostro mayor genotipo GG C4751 mostro mayor genotipo CT
Gill, y col., 2009	Brangus	C316 y C4751	C316 mostro mayor genotipo GG C4751 mostro mayor genotipo CT

De acuerdo a los resultados obtenidos por los diferentes autores, se ha demostrado que el genotipo está altamente relacionado con la raza, en muchos de los estudios realizados el

genotipo más frecuente fue el normal, sin embargo, se comprobó que en aquellos animales que mostraron la presencia de la mutación estudiada, los valores de ternera de la carne producida era mayor en comparación con aquellos que no mostraron la mutación (White, y col., 2005; Gill, y col., 2009; Frylinck, y col., 2009).

Esta característica se mostró con mayor claridad en los marcadores C316 y C530, sin embargo, el marcador C4751 ha sido estudiado mayoritariamente con el propósito de demostrar su asociación a esta característica en ganado *Bos indicus*, con el fin de establecerlo como un marcador correspondiente a esta raza, aunque su influencia en la característica de ternera no se ha establecido del todo (White, y col., 2005; Casas, y col., 2005).

III. METODOLOGÍA

3.1 JUSTIFICACIÓN

La calidad de la carne para la industria y los consumidores, ha cobrado gran relevancia en los últimos años, ya que se ha demostrado que la mayoría de las características económicamente importantes asociadas a la calidad de la carne se encuentran reguladas por genes, es por ello que se ha enfocado al desarrollo de mayor investigación dirigida a la identificación de indicadores de calidad y desarrollo de marcadores genéticos en regiones específicas.

3.2 HIPÓTESIS

Miostatina

Si la frecuencia de la delección 11My es mayor en el ganado *Bos taurus*, entonces la terneza de la carne deberá ser mayor, en comparación con la carne proveniente del ganado *Bos Indicus*, corroborando así la asociación entre esta característica de calidad y el fenotipo a consecuencia del gen estudiado.

Calpaína

Si la frecuencia de la delección de los polimorfismos C-316 y C-530 son mayores en el ganado *Bos taurus*, entonces la terneza de la carne deberá ser mayor, en comparación con la carne proveniente del ganado *Bos Indicus*, corroborando así la asociación entre esta característica de calidad y el fenotipo a consecuencia del gen estudiado.

3.3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las mutaciones y polimorfismos presentes en genes que se han asociado a la terneza de la carne, en dos diferentes especies de ganado bovino, por medio del análisis de PCR y PCR-RFLP, para confirmar la existencia de asociación del genotipo con la terneza de la carne.

ACTIVIDAD PRELIMINAR 1

Extracción y cuantificación de ADN de muestras de tejido muscular de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* (60 de cada especie).

ACTIVIDAD PRELIMINAR 2

Selección de primers para la delimitación de la zona de amplificación de PCR y pruebas de especificidad de los mismos.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Identificar la delección 11my para Miostatina, mediante la aplicación de la técnica de PCR.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Identificar los polimorfismos C-316 y C-530 para Calpaína mediante la aplicación de la técnica de PCR-RFLP

3.4 VARIABLES

Estudio del gen de Miostatina

Variable independiente: Especie del ganado (*Bos taurus*, *Bos indicus*)

Variable dependiente: Detección de delección de 11pb en posición 821 de la proteína.

Estudio del gen de Calpaína

Variable independiente: Especie del ganado (*Bos taurus*, *Bos indicus*)

Variable dependiente: Detección de polimorfismos C-316 y C-530

3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para poder llevar a cabo el análisis molecular de los genes asociados a la calidad de la carne se requirieron muestras de tejido muscular de las especies en estudio (*Bos taurus* y *Bos indicus*) para obtener ADN a partir de estas muestras; la extracción de ADN se realizó mediante el protocolo clásico descrito por Sambrook, 2001, el cual está basado en la disolución de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido de una precipitación de ADN con etanol. A continuación se describe el protocolo completo:

- **Material biológico:**

Se utilizaron 120 muestras de tejido muscular; 60 *Bos taurus* y 60 *Bos indicus*) provenientes del músculo tensor de la fascia lata, estas muestras fueron obtenidas del

rastró de Tlalnepantla, Edo de México, todas las muestras provenían de animales machos de 3 años de edad y cuyo método de crianza fue extensivo.

- **Reactivos:**

- Agua desionizada con pH de 7.
- Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- Enzima Proteinasa K
- Mezcla fenol- cloroformo- alcohol isoamílico, en proporción 12:24:1
- Etanol frío.

- **Material y Equipo:**

- Agitador vortex, *Scientific Industries*, Genie K-55-G, Nueva York, Estados Unidos.
- Balanza analítica electrónica, *Symmetry*, PR410, Illinois, Estados Unidos.
- Calentador para tubos, *Eppendorf*, Hamburgo, Alemania.
- Juego de micropipetas, *Rainin*, SL-XLS, California, Estados Unidos.
- Microcentrifuga, *Eppendorf*, Mminispin plus 1400rpm, Hamburgo, Alemania.

- **Método:**

El método para realizar la extracción de ADN se ilustra en la siguiente figura.

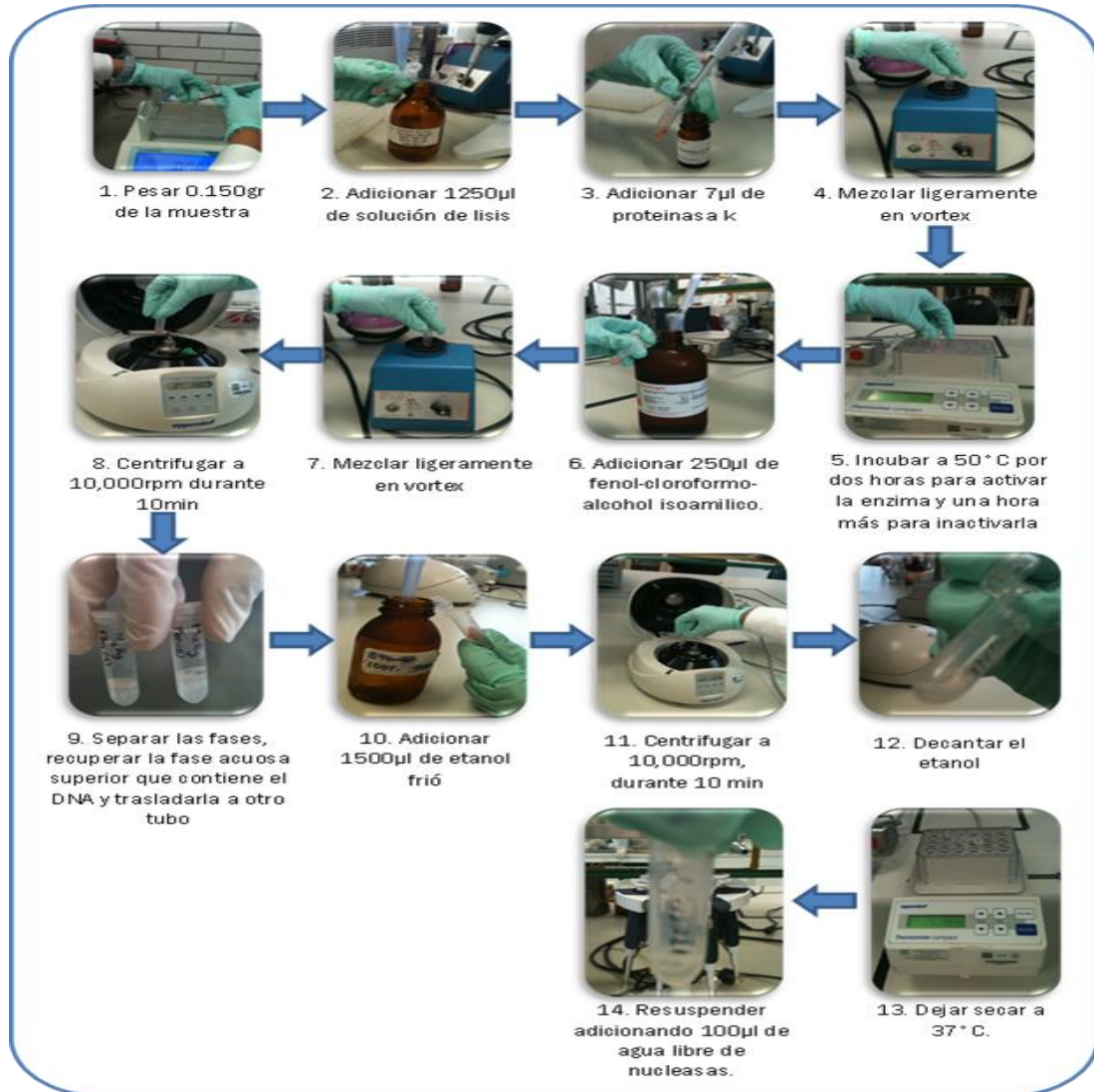


Figura 6: Diagrama para la extracción de ADN

Posteriormente, se realiza un ajuste de concentración mediante dilución, el DNA ajustado y listo para emplear en PCR se almacena a -20°C.

3.5.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contiene la nuestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tiene valores de 1.8, mientras que valores de 2 muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.7

entonces no puede cuantificar el DNA presente en la muestra (Sambrook, y col., 2001; Winter, F. 2000).

- **Reactivos:**

- Muestras de DNA extraído de las diferentes muestras biológicas.
- Agua libre de nucleasas.

- **Material y equipo:**

- Espectrofotómetro, *Accesolab* NanoDrop ND-1000 A113
- Micropipeta
- Tubos de 1.5ml.

- **Método:**

- Calibra el equipo colocando 2µl de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo



Figura 7: Espectrofotómetro, para cuantificar concentración de ADN.

- Abrir el programa de Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos.
- Colocar nuevamente 2 µl de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
- Correr el programa.
- Colocar 2 µl de la muestra de ADN a cuantificar y correr el programa.
- Registrar la concentración de ADN proporcionada por la relación 260/280, registrada por el equipo.
- Limpiar adecuadamente el equipo.

3.5.3 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Se llevo a cabo por medio de PCR utilizando el kit de PCR Master Mix que está compuesto por la enzima Taq polimerasa, nucleótidos (dNTPs) y cloruro de magnesio (MgCl₂); primers específicos en función del fragmento a estudiar, todo en una solución de pH controlado, mediante un programa específico en un termociclador.

- **Reactivos:**

- Kit para PCR, *Promega* que contiene:
- Agua libre de nucleadas.
- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400μM de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).

- **Primers:**

Los primer utilizados para la identificación del gen de miostatina, fueron diseñados con ayuda del programa bioinformático BLAST, para la identificación del gen de calpaína se emplearán los primers reportados por Casa E., y col., 2005 para la identificación del marcador C-530, mientras que para el marcador C-316 se diseñaron los primers.

- Gen de miostatina:

Primer F

(5´-TTGATTGTGATGAACACTCC -3´)

Primer R

(5´-CATTCTCCAGAGCAGTAATTGG -3´)

Amplificado: 130pb

- Gen de Calpaína:

Marcador C530

Primer F

(5´-GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT -3´)

Primer R

(5´-CCTTGCTGGCTAGAGACCAA-3´)

Amplificado de 261pb

Marcador C316

Primer F

(5´-GAGCTGGCCCTCATAAGATAA-3´)

Primer R

(5´-GGGGGCTGCTCACCAGAACT-3´)

Amplificado de 241pb

- **Materiales y equipo:**

- Termociclador, *Apollo*, ATC401, Estados Unidos.
- Juego de micropipetas, *Rainin*, SL-XLS, California, Estados Unidos. icropipetas.
- Tubos 0.2ml.

- **Preparación de la reacción**

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250nM, mientras que el DNA requiere una concentración baja puesto que, teóricamente, una sola copia de DNA debería ser suficiente para la adecuada amplificación, sin embargo, la extracción del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales.

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa promega para el kit de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de 25µl tal como se muestra en la tabla 7:

Tabla 7. Componentes de PCR.

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
Mezcla master mix	12.5	1X
Primer F	0.25 - 2.5	0.1-1.0mM
Primer R	0.25 -2.5	0.1-1.0mM
DNA	1-5	< 250ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 µl	N.A.

- **Etapas y ciclos de la reacción**

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a las condiciones señaladas en las figuras 8 y 9, las condiciones están basadas en las recomendaciones de Gill y col, para el caso del gen de miostatina, para el gen de calpaína se tomaron las condiciones reportadas en el artículo publicado por Casas y col., (2005).

Gen de Miostatina

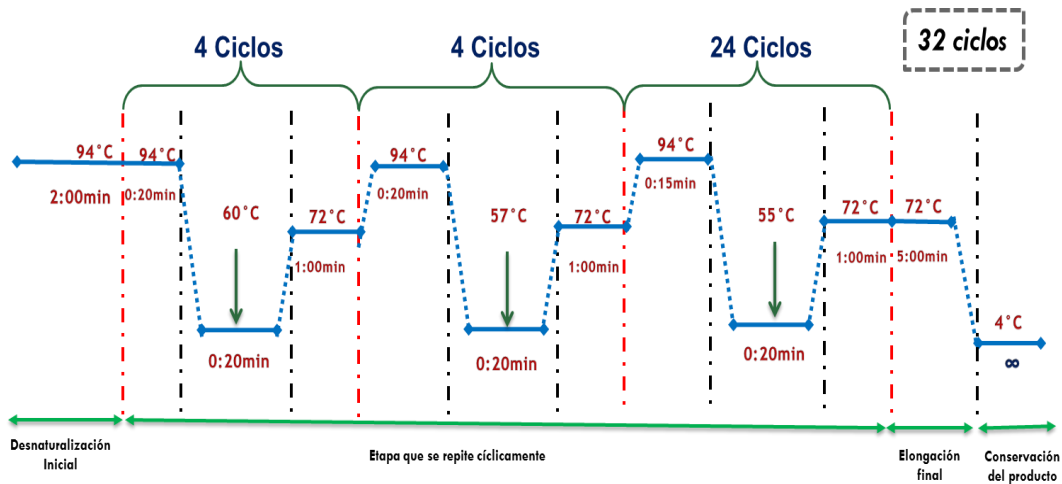


Figura 8. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para detección del gen de miostatina.

Gen de Calpaína:

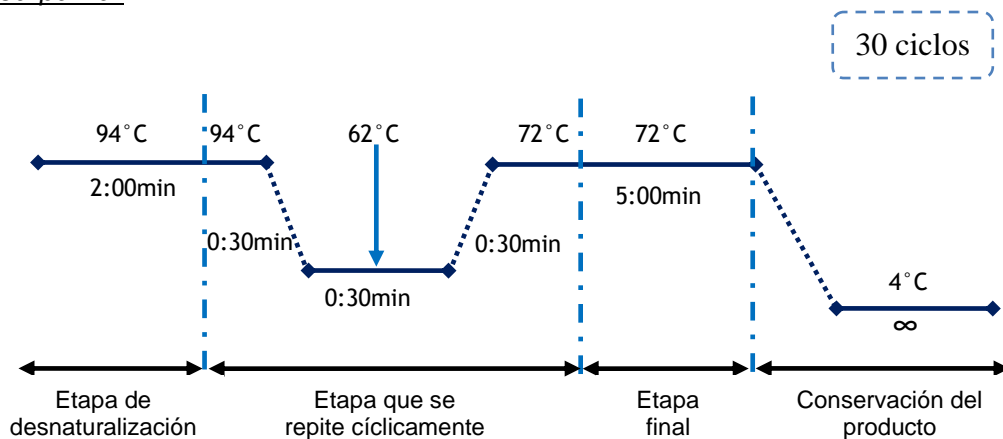


Figura 9: Etapas y condiciones programadas en el termociclador para detección de los marcadores C316 y C530 del gen de Calpaína.

- **Análisis de productos**

El análisis de productos obtenidos por la ampliación se llevará a cabo mediante electroforesis empleando gel de agarosa al 2 %, y su posterior exposición a luz ultravioleta en un transiluminador de luz U.V, Bio-Imaging Systems, UVP, California, Estado Unidos.

- **Fragmentos de restricción**

Para el caso de la identificación de los diferentes genotipos para el gen de calpaina, se llevará a cabo el análisis de fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima Ava II para el marcador C-530 y la enzima Dsa I para el marcador C-316.

La digestión de los productos de PCR con las enzimas correspondientes se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones:

10µl de reacción: 6.8 µl de agua destilada
 1 µl de buffer
 0.2 µl (2 unidades) enzima de restricción
 2 µl de producto de PCR

Posteriormente se separaron los fragmentos obtenidos de la digestión en un gel de poliacrilamida al 8%.

Los fragmentos esperados para cada uno de marcadores serán los siguientes:

C-530

- Individuo con polimorfismo A/A: 182pb, 39pb y 40pb.
- Individuo sin polimorfismo G/G: 122pb, 60pb, 40pb y 39pb.
- Individuo heterocigoto G/A o A/G: 182pb, 122pb, 60, 40pb y 39pb.

C-316

- Individuo con polimorfismo G/G: 241pb.
- Individuo sin polimorfismo C/C: 171pb y 70pb.
- Individuo heterocigoto C/G o G/C: 241pb, 171pb y 70pb.

IV. RESULTADOS

ACTIVIDAD PRELIMINAR 1

Los valores de concentración de ADN obtenidos para la mayoría de las muestras estuvieron por encima de los 1,000ng/μl por lo que para poder emplear este material en la reacción de PCR, estas concentraciones tuvieron que ajustarse diluyendo el ADN obtenido para obtener concentraciones cuyos valores estuvieran entre 60ng/μl y 100ng/μl y así obtener una amplificación adecuada. En cuanto a la relación 260/280 los valores resultantes estuvieron dentro del rango de 1.7-1.9, lo cual nos indicaba que la pureza del material obtenido era óptima para que las muestras fueran analizadas por PCR. La tabla 8 muestra los resultados para las primeras ocho muestras de cada especie a las cuales se les asignó un código para su identificación, el resto de los datos obtenidos en esta actividad se encuentran concentrados en el anexo 1.

Tabla 8: Datos de concentración y pureza para el ADN obtenido para muestras de *Bos indicus* y *Bos taurus*.

Muestras especie <i>Bos indicus</i>				
Código	Muestra a ajustar		Muestra ajustada	
	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul
030911-6	1.94	1803.1	1.73	60.1
030911-3	1.92	2044	1.72	60.2
020911-2	1.92	1817.3	1.71	65.8
020911-1	1.89	1738.5	1.69	51.2
030911-02	1.94	2734.7	1.73	123.3
160511-3	1.86	2798	1.83	81.8
160511-2	1.92	3106.6	1.8	79.2
160511-4	1.95	2169.8	1.81	67.6
Muestras especie <i>Bos taurus</i>				
081011-4	1.79	1052.4	1.88	166.7
240911-1	1.85	4387.3	1.7	172.6
070911-1	1.82	1371.4	1.78	93
081011-3	1.81	822.8	1.71	80.8
081011-2	1.84	1618.3	1.84	96.5
240911-2	1.79	2280.1	1.8	146.1
081011-1	1.75	1234.1	1.57	58
240911-3	1.74	1910.1	1.7	359.7

ACTIVIDAD PRELIMINAR 2

➤ SELECCIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN DE MIOSTATINA

Los primers inicialmente propuestos para la identificación del gen de miostatina fueron verificados realizando un alineamiento de las secuencias reportadas para los primers reverso y frontal mediante el programa *Sequencher*, V. 4.1.1, 1991 - 1992., identificando la posición exacta de la delección de 11pb bases que se pretende hallar. Haciendo uso de la secuencia del Cromosoma 2 del bovino con No. Ref. AF320998 se alinearon las secuencias de ambos primers y se encontró que para el caso del primer R había un error en la tercera base del extremo 3', este error impedía la correcta hibridación de los primers y el flanqueo de la zona de interés a delimitar, por lo tanto se tuvo que recurrir al diseño de un nuevo par de primers, el alineamiento realizado se muestra en la figura 10.

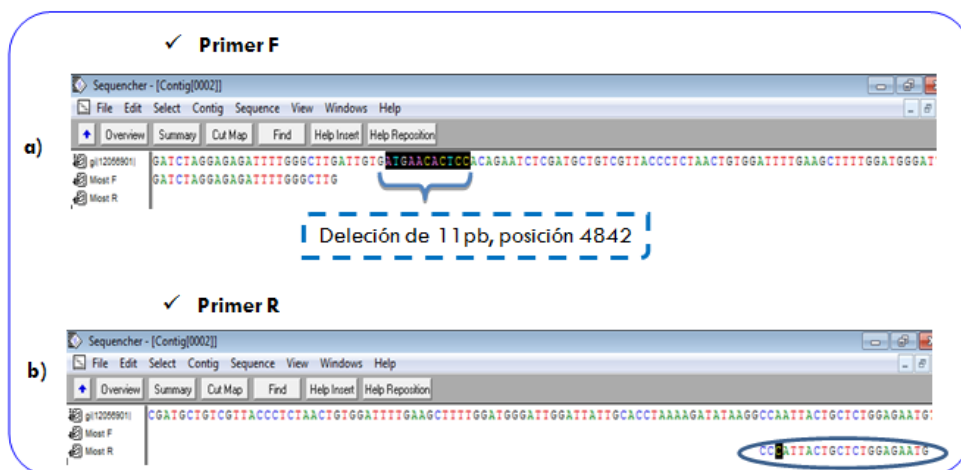


Figura 10: Alineamiento de primers Frontal (a) y Reverso (b), para el Gen de Miostatina.

El nuevo par de primers diseñados también fueron corroborados mediante su alineamiento con ayuda del programa bioinformático *BLAST*, V. 2.2.25, 2011., en la figura 11a) se ve el alineamiento del primer Frontal, el cual fue diseñado de tal forma que abarcara la delección de 11pb, con la finalidad de que este nuevo par de primers mostrara la ausencia o presencia de la delección por amplificación de un fragmento de 130pb, es decir, cuando se apreciara la ausencia de amplificado, esto indicaría que existe la delección en el individuo, mientras que si se mostrara el amplificado indicaría que el individuo no posee dicha delección. La figura 11b) muestra el alineamiento del primer Reverso, en el cual

solamente fue corregido el error en la tercer base y con esto se comprobó que el alineamiento fuera correcto.



Figura 11: Alineamiento de los nuevos primers diseñados Frontal (a) y Reverso (b), para el Gen de Miostatina.

Posteriormente se comprobó la especificidad de los primers diseñados experimentalmente llevando a cabo PCR empleando DNA de diferentes especies (pollo, cerdo, humano y soya). En la figura 12 se puede apreciar que el único amplificado en el gel de electroforesis corresponde a la muestra de bovino en el carril número 1, mientras que en los carriles donde se encontraban las muestras de las otras especies no se aprecian amplificados, así queda comprobado que los primers diseñados son específicos para la especie de interés.

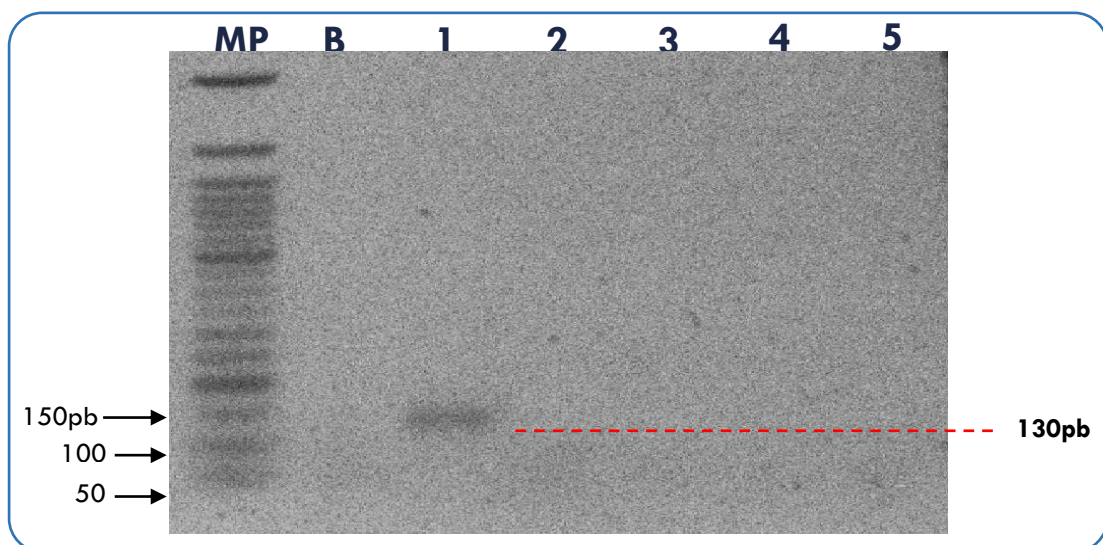


Figura 12: Evaluación electroforética en gel de agarosa al 2% para la especificidad de primers para miostatina, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.

➤ CALPAÍNA

✓ Marcador C-530

Para el marcador C-530 de calpaína, se emplearon los primers reportados por Casas E., en su publicación de 2005, estos primers fueron corroborados mediante el programa bioinformático SEQUENCHER y se comprobó que alineaban de forma correcta, por lo cual se procedió a comprobar experimentalmente su especificidad de la misma forma en que se hizo con los primers para miostatina.

Primer F

(5´- GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT -3´)

Primer R

(5´- CCTTGCTGGCTAGAGACCAA-3´)

Amplificado de 261pb

Los resultados para la prueba de especificidad se muestran en la figura 13 donde se observa que los primers son específicos para la identificación del marcador C-530 en bovino, ya que en el carril correspondiente a esa muestra (carril 1), es donde únicamente se aprecia el amplificado esperado de 261pb, mientras que para las otras especies con las que fueron probados no presentaron amplificados.

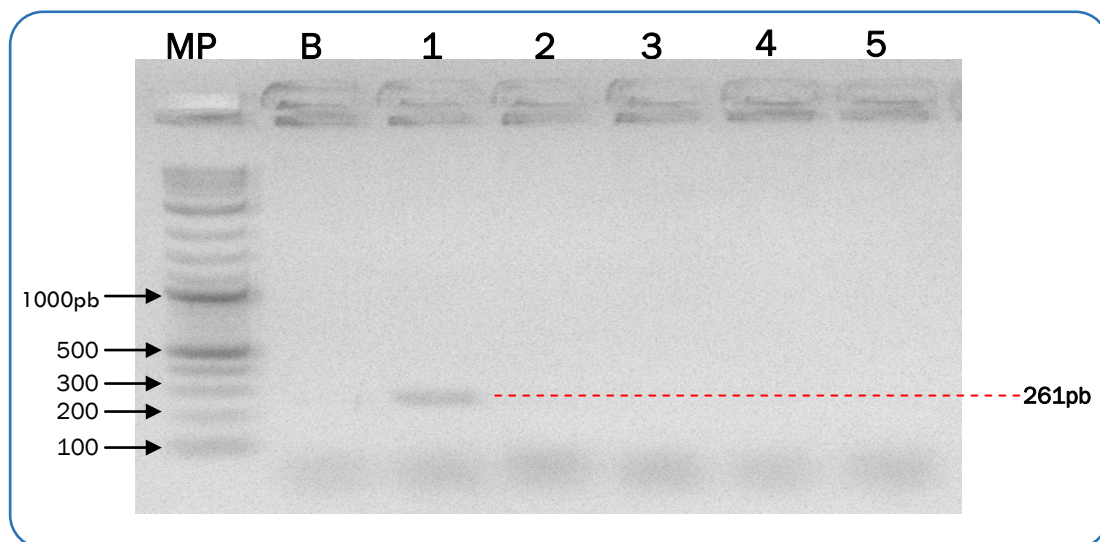


Figura 13: Evaluación electroforética en gel de garosa al 2%, para la especificidad de primers para el marcador C-530, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.

✓ Marcador C-316

Para el marcador C-316 de calpaína, se tomaron como referencia los primers reportados por Casas E., en su publicación de 2005, haciendo solo modificación en el primer Reverso, para obtener un amplificado mayor (de 241pb), estos primers fueron corroborados mediante el programa bioinformático SEQUENCHER y se comprobó que alineaban de forma correcta, posteriormente se comprobó experimentalmente su especificidad de la misma manera que se hizo para los primers anteriores.

Primer F

(5´ - GAGCTGGCCCTCATAAGATAA-3´)

Primer R

(5´ - GGGGGCTGCTCACCAGAACT-3´)

Amplificado de 241pb

Los resultados para la prueba de especificidad se muestran en la figura 14, se puede observar el amplificado de 241pb en el carril correspondiente a la muestra de bovino (carril 1), mientras que para los demás carriles correspondientes a las muestras de otras especies no se observan amplificados, por lo tanto se puede comprobar que los primers son específicos para la especie de interés.

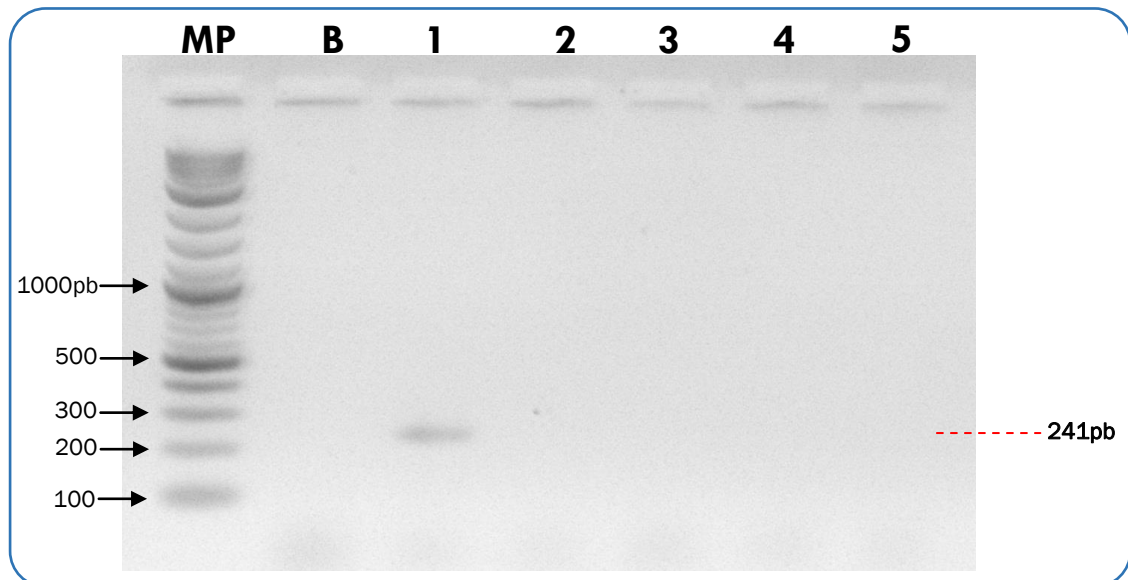


Figura 14: Evaluación electroforética en gel de garosa al 2%, para la especificidad de primers para el marcador C-316, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) C+ Bovino, 2) Cerdo, 3) Pollo, 4) Humano, 5) Soya.

OBJETIVO 1

Los resultados correspondientes para la delección de 11pb del gen de miostatina que se obtuvieron al realizar el ensayo para las 120 muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%, estos resultados son mostrados a continuación.

En las figuras 15 y 16, se puede observar que todas las muestras de ambas especies dieron negativo para la presencia de la delección de 11pb, ya que en todas se obtuvo el amplificado de 130pb.

El ensayo de PCR se llevó a cabo de la misma manera para el resto de las muestras de ambas especies. Los resultados para el resto de las muestras fueron concentrados en una tabla, mostrada en el anexo 2.

En el resto de las muestras analizadas no se encontró ninguna que presentara la delección de 11pb, ya que todas mostraron amplificado.

- Muestras de *Bos taurus*

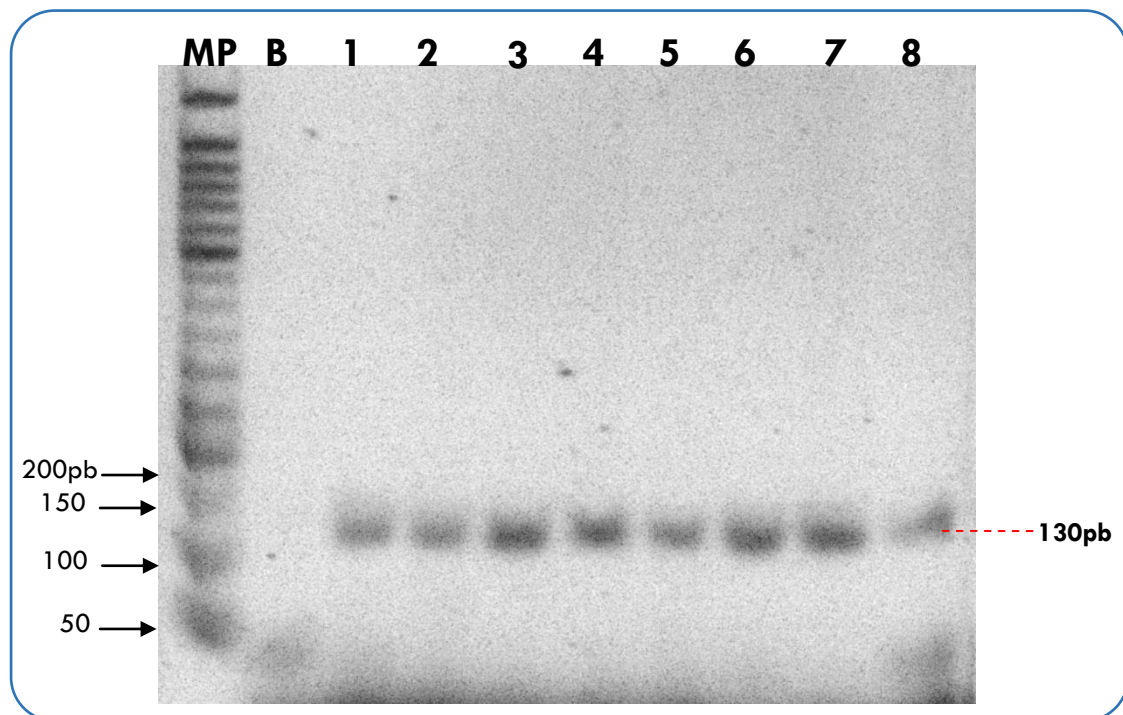


Figura 15: Evaluación electroforética del marcador de miostatina, gel de agarosa al 2%, (MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7, 8) M8.

- Muestras de *Bos indicus*

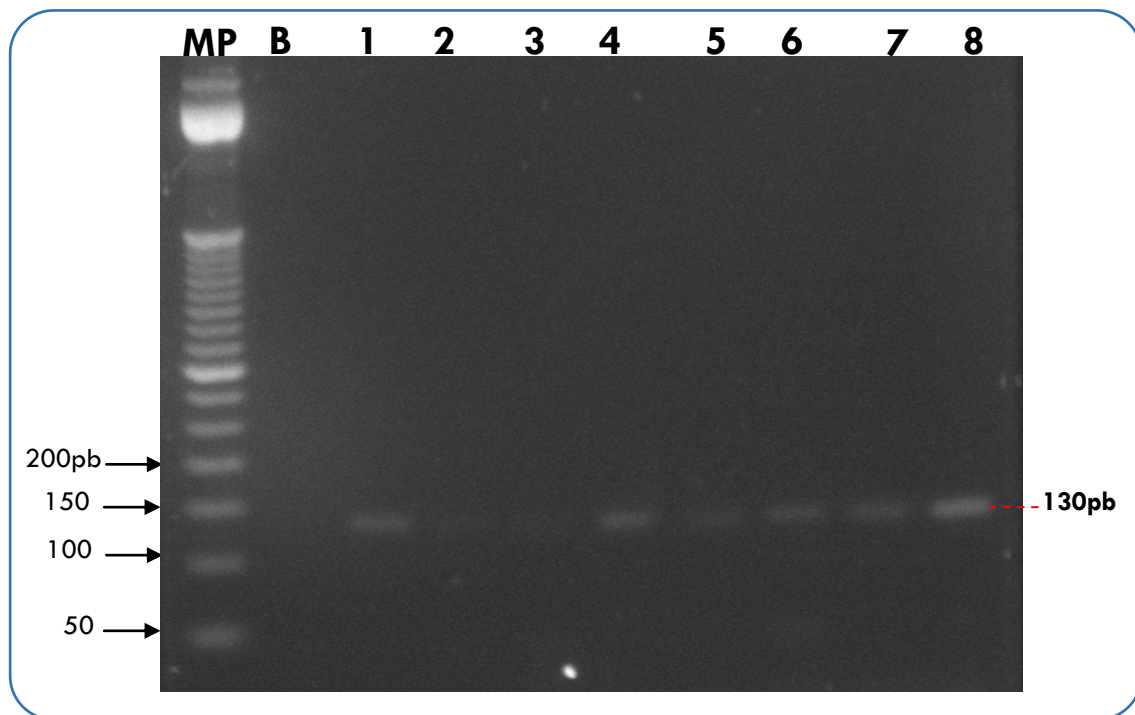


Figura 16: Evaluación electroforética del marcador de miostatina, gel de garosa al 2%, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7, 8) M8.

Se realizó una actividad complementaria buscando comprobar la eficiencia de los primers diseñados, se obtuvieron 4 muestras de ganado doble musculatura, provenientes del estado de Tabasco, de las cuales se aisló el ADN siguiendo la metodología propuesta y se realizó el ensayo de PCR.

De acuerdo a los resultados obtenidos ninguno de los individuos analizados presentaron la deleción ya que en todos los ensayos de PCR se obtuvieron amplificados de 130pb lo cual indica que no poseen la deleción. Para comprobar estos resultados, a estas muestras se les realizó análisis de PCR empleado los primers de Gill y col, 2008., con el primer R corregido. Los resultados de los ensayos de estas pruebas se muestran en la figura 17, donde se puede observar que ninguno de los individuos analizados posee la deleción de 11pb, ya que al emplear ambas parejas de primers se observan amplificados que corresponden a este resultado, para el caso de los primers reportados por Gill y Col., 2008., se observa el amplificado de 149pb indicando así que no existe deleción, lo mismo demuestra el empleo de los primers que se diseñaron pues se aprecia el amplificado de

130pb. El fenotipo de doble musculatura de los individuos probados puede atribuirse a otro polimorfismo en el gen de miostatina pero no a la delección de 11pb.

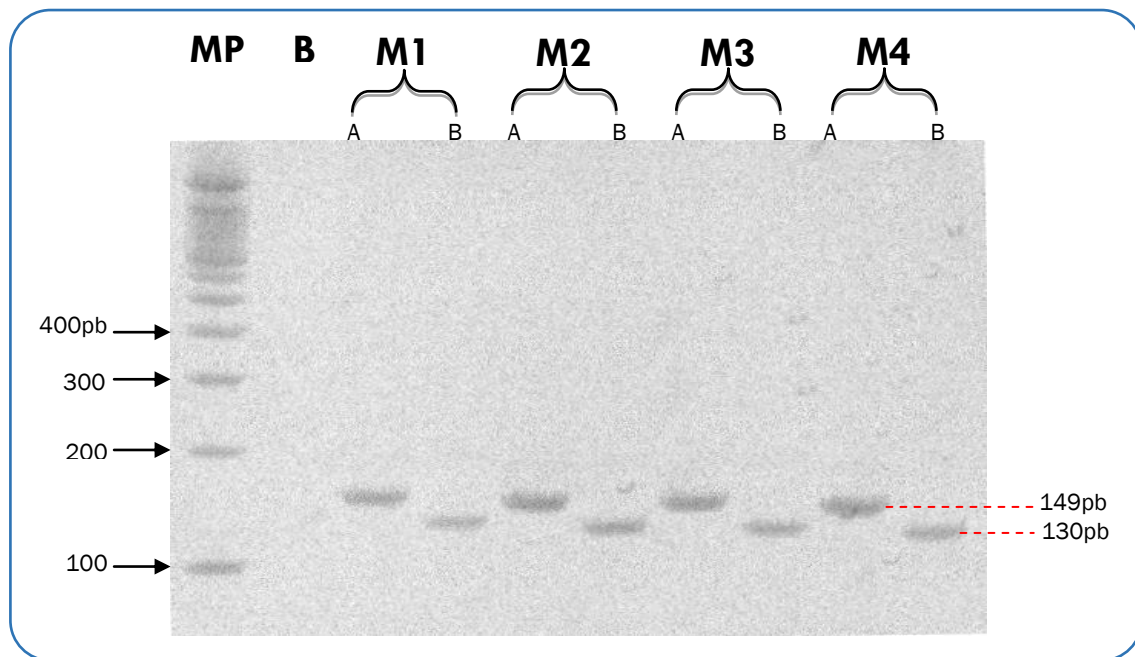


Figura 17: Evaluación electroforética para el marcador de miostatina en gel de poliacrilamida al 8%. A = Primers de 149pb, B = Primers. MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, M1) Muestra 1, M2) Muestra 2, M3) Muestra 3, M4) Muestra 4.

OBJETIVO 2

MARCADOR C-530

Para identificar el marcador C-530 se llevó a cabo la amplificación por PCR de las muestras a estudiar, buscando obtener suficiente material genético para su posterior análisis mediante RFLP. La figura 18 muestra los resultados de PCR para las primeras 4 muestras correspondientes al ganado *Bos taurus*, se puede observar que la intensidad de las bandas es diferente, lo cual nos proporcionó un estimado de la cantidad de material genético obtenido durante la reacción, con base en esto se puede decir que la cantidad de ADN replicado en la muestra 2 es menor comparado con lo obtenido para el resto de las muestras, debido a que este ADN sería tratado posteriormente con enzimas de restricción para su corte se buscaba que el material genético replicado fuera suficiente, por lo que solo se someterían a RFLP aquellas muestras donde se obtuviera una banda intensa en el

análisis de PCR y las que no, se les realizó nuevamente este análisis ajustando condiciones para obtener los resultados deseados.

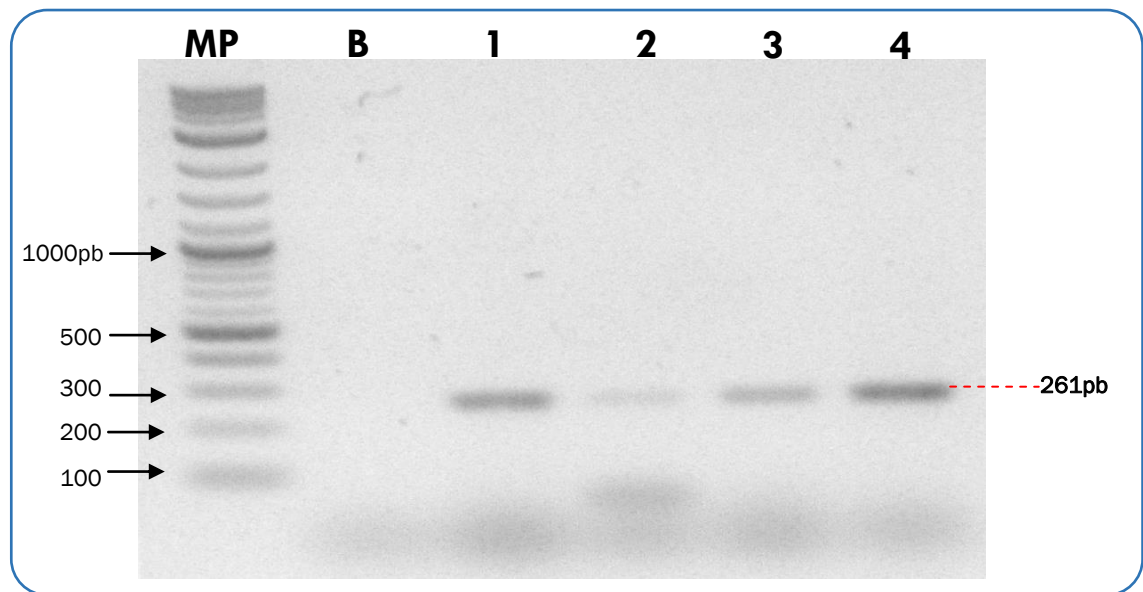


Figura 18: Evaluación electroforética de PCR en gel de agarosa al 2% del marcador C-530, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) B.T 081011-2 2) B.T 070911-1, 3) B.T 080911-3, 4) B.T 240911-1.

Posteriormente las muestras donde se obtuvo una banda definida por medio de PCR (muestras 1, 3 y 4) fueron sometidas a un análisis de secuenciación con el objetivo de analizar la zona amplificada, los resultados obtenidos de este análisis se ilustran mediante el electroferograma correspondiente (figura 19), donde se puede observar que la muestra C530-1 (B.T 081011-2) y la muestra C530-2 (B.T 070911-1) corresponden a individuos que no presentan la mutación, sin embargo se puede observar que para el caso de la muestra C530-1 el electroferograma se puede apreciar cómo se encuentran sobrepuestas las curvas que corresponde a G y A, lo que nos indica que se trataba de un individuo heterocigoto, es decir que presenta el genotipo G/A.

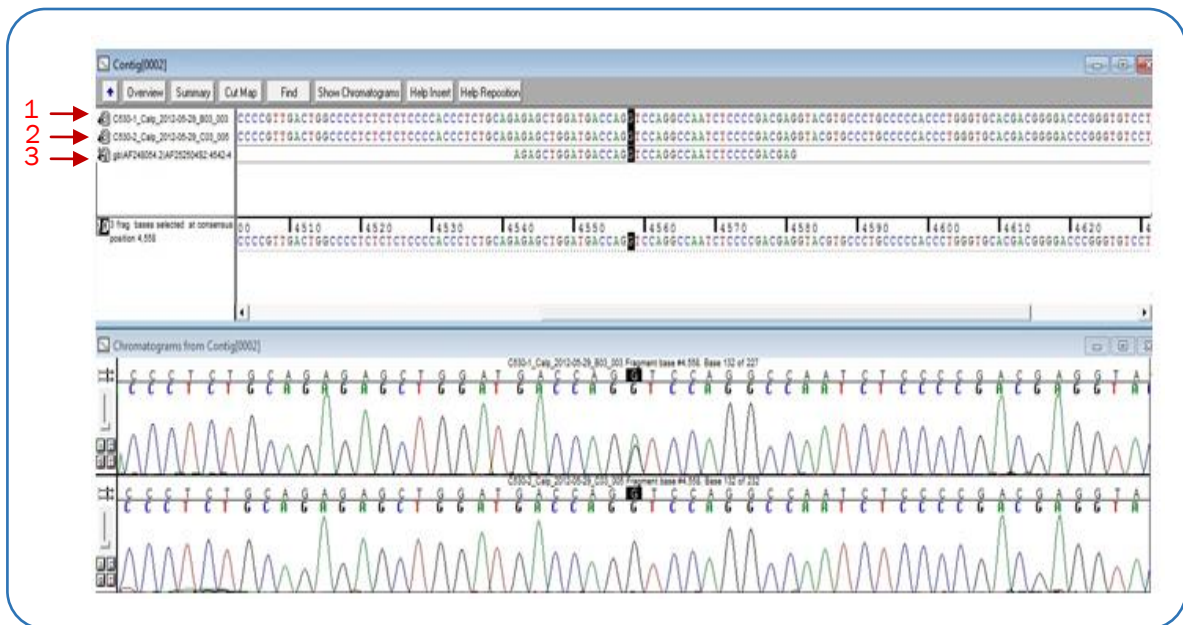


Figura 19: Electroferograma de la secuenciación de las muestra 1 y 2 de *Bos Taurus*, 1) muestra 1, C530-1 (B.T 081011-2), 2) muestra 2, C530-2 (B.T 070911-1), 3) Secuencia de referencia del gen de calpaína.

Posteriormente a la obtención de estos resultados con la ayuda del programa *Sequencher* se analizaron los patrones de corte que se obtendrán mediante la enzima *Ava II*, que permitirán la identificación del polimorfismo además del genotipificado de las muestras a estudiar. Así los patrones de corte obtenidos serán los siguientes:

- Individuo con polimorfismo A/A: 182pb, 40pb y 39pb
- Individuo sin polimorfismo G/G: 122pb, 60pb, 40pb y 39pb
- Individuo heterocigoto G/A o A/G: 261pb, 182pb, 60pb y 40pb

Al llevar a cabo el análisis de RFLP para las muestras de ganado bovino se obtuvieron los patrones de banda esperados, los cuales se pudieron apreciar con mejor resolución en geles de poliacrilamida al 8% y cuyos resultados se presentan a continuación.

- *Análisis de RFLP para Bos taurus*

El análisis de RFLP para las primeras 7 muestras de ganado *Bos taurus* se muestran en la figura 20 donde los carriles 1 y 2 corresponden a las muestras que fueron secuenciadas (B.T 081011-2 y B.T 070911-1) y que sirvieron como control posteriormente (c+1 y c+2) ya

que se obtuvo los patrones esperados correspondientes a un individuo sin mutación (M2_{B.T} 070911-1) y un individuo heterocigoto (M1_{B.T} 081011-2).

El resto de las muestras fueron sometidas al mismo análisis.

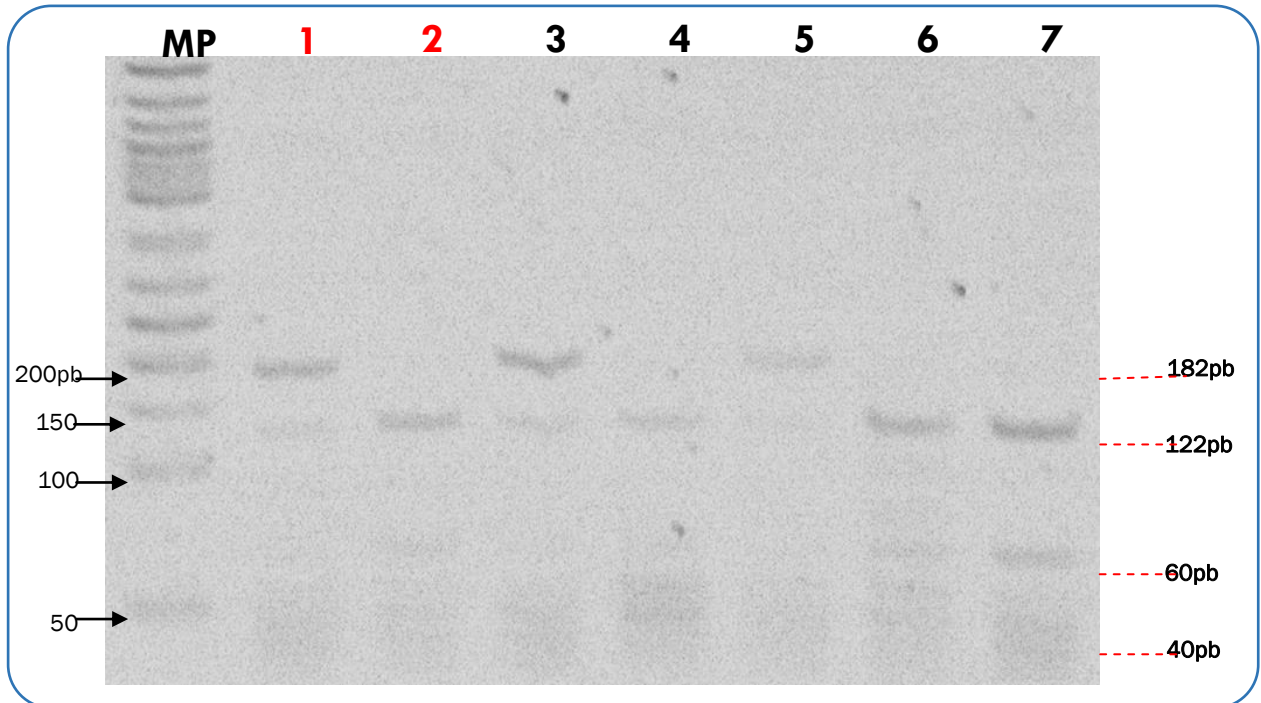


Figura 20: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8%, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M5, 6) M6, 7) M7.

- Muestras de *Bos Taurus*

Para el caso de *Bos taurus* se detectaron 3 muestras que presentaron el polimorfismo C-530 (cambio de Adenosina por Guanina), el patrón de corte que evidencia dicho polimorfismo pudo ser apreciado como se muestra en las siguientes figuras.

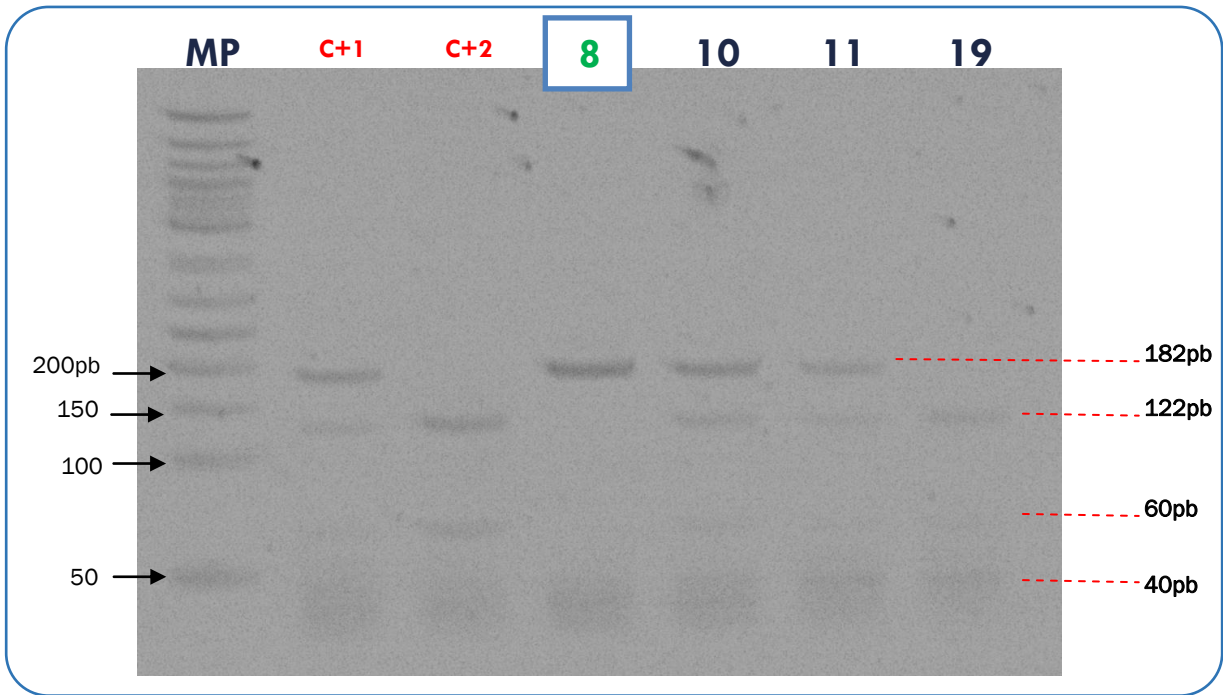


Figura 21: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de *Bos taurus*, 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M8, 5) M10, 6) M11, 7) M19.

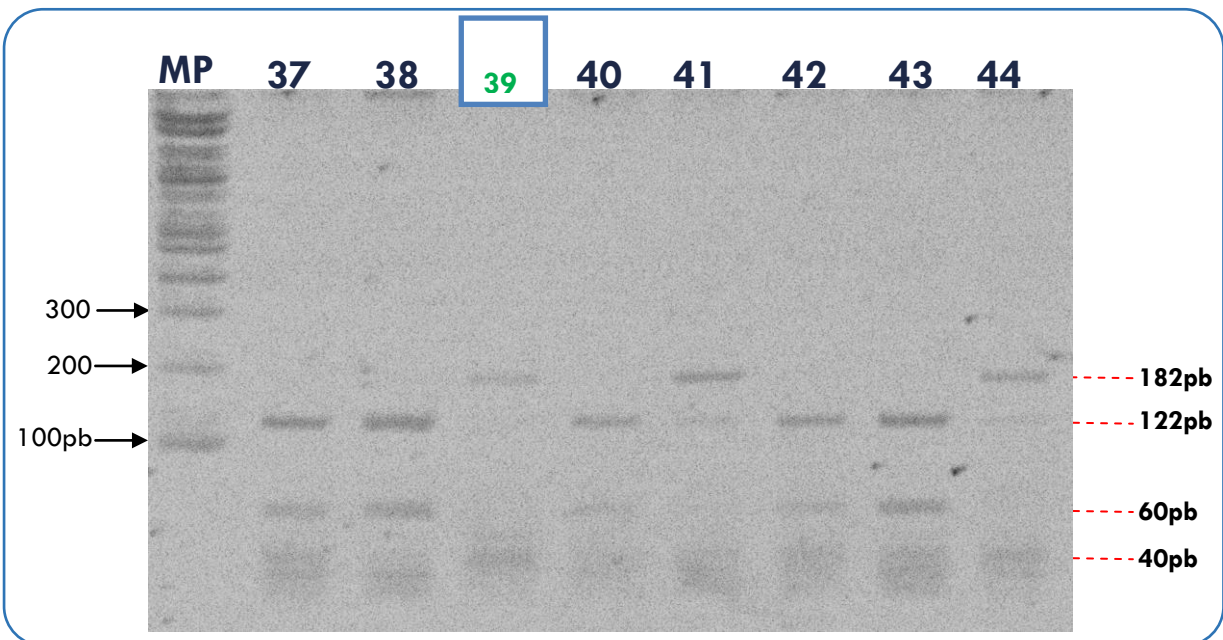


Figura 22: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de *Bos taurus*, 1)MP, 2)M37, 3)M38 4) M39, 5) M40, 6) M41, 7) M42, 8)M43,9)M44.

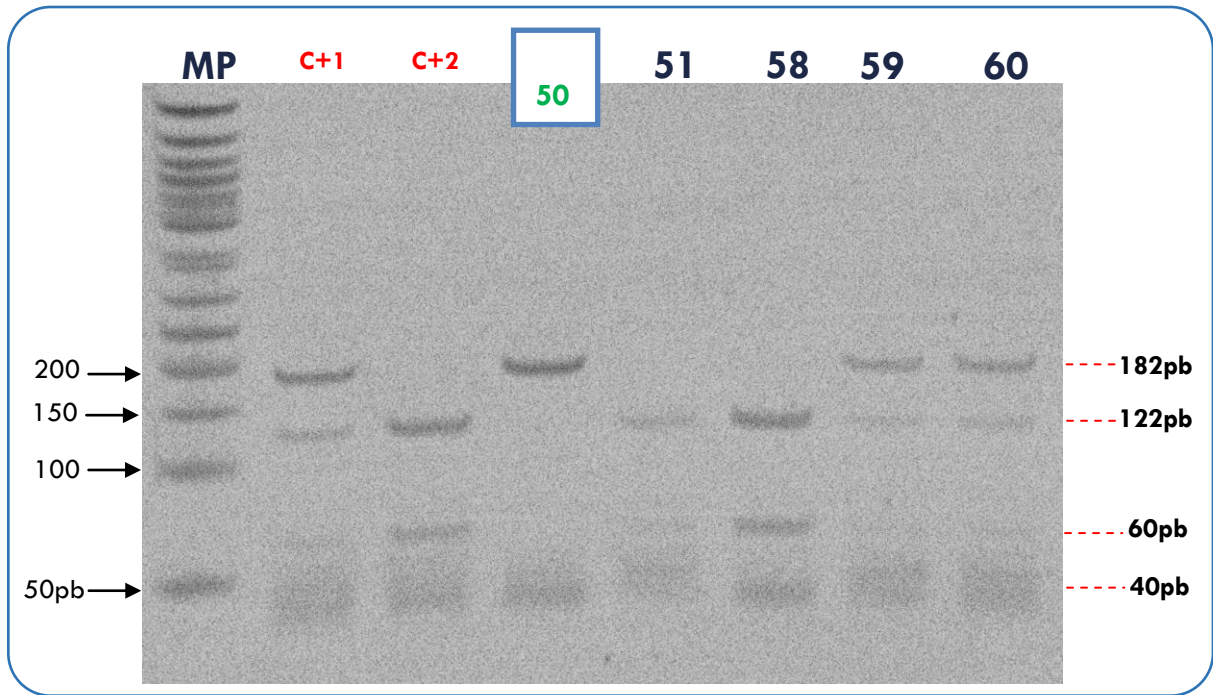


Figura 23: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de *Bos taurus*, 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M50, 5) M51, 6) M452, 7) M58, 8) M59, 9) M60.

Las figuras 21, 22 y 23, muestran el análisis de RFLP para las muestras donde se detectó el polimorfismo A por G, el cual se confirmó por el patrón de bandas correspondiente (182pb y 40pb), dichas muestras fueron la M8 (Fig. 21), M39 (Fig. 22) y M50 (Fig. 23).

Las muestras que resultaron positivas para el polimorfismo fueron analizadas por secuenciación (estudio que se llevó a cabo en la unidad de secuenciación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala) para corroborar la presencia del genotipo A/A. Las figuras 24, 25 y 26 muestran los resultados obtenidos de la secuenciación para las muestras 8, 39 y 50, donde se puede observar resaltado en color negro la posición del polimorfismo hallado en las muestra 8, 39 y 50 con respecto al amplificado para el marcador C-530 y la secuencia de referencia para *Bos taurus*, este polimorfismo puede también ser observado en el electroferograma mostrado en la parte inferior de las imágenes correspondientes. Así se confirma que los resultados de RFLP realizado son confiables.



Figura 24: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 8 con polimorfismo C-530 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 8.



Figura 25: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 39 con polimorfismo C-530 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 39.

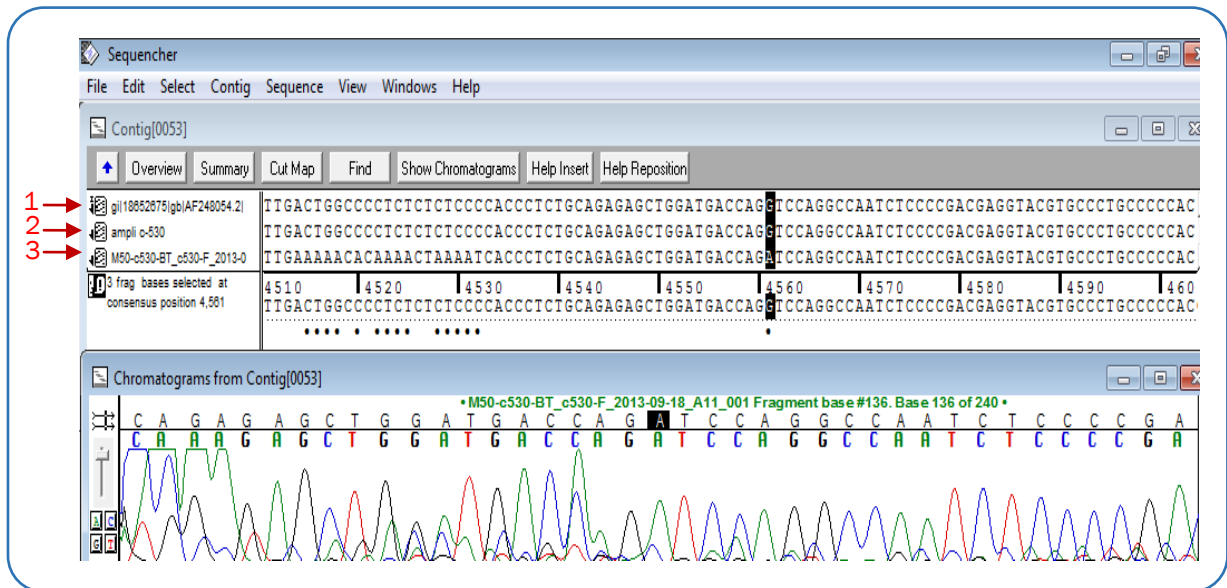


Figura 26: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 50 con polimorfismo C-530 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 50.

- Análisis de RFLP para *Bos indicus*

Las muestras de ganado *Bos indicus*, fueron sometidas al mismo tratamiento para RFLP que las de *Bos taurus*, de las 60 muestras analizadas para esta especie sólo se encontró la presencia del polimorfismo C-530 en una sola muestra, esto se puede observar en la figura 27 que corresponde a un gel de poliacrilamida al 8% y se observa de acuerdo a los patrones de corte esperados que el polimorfismo C-530 está presente sólo en la muestra 16.

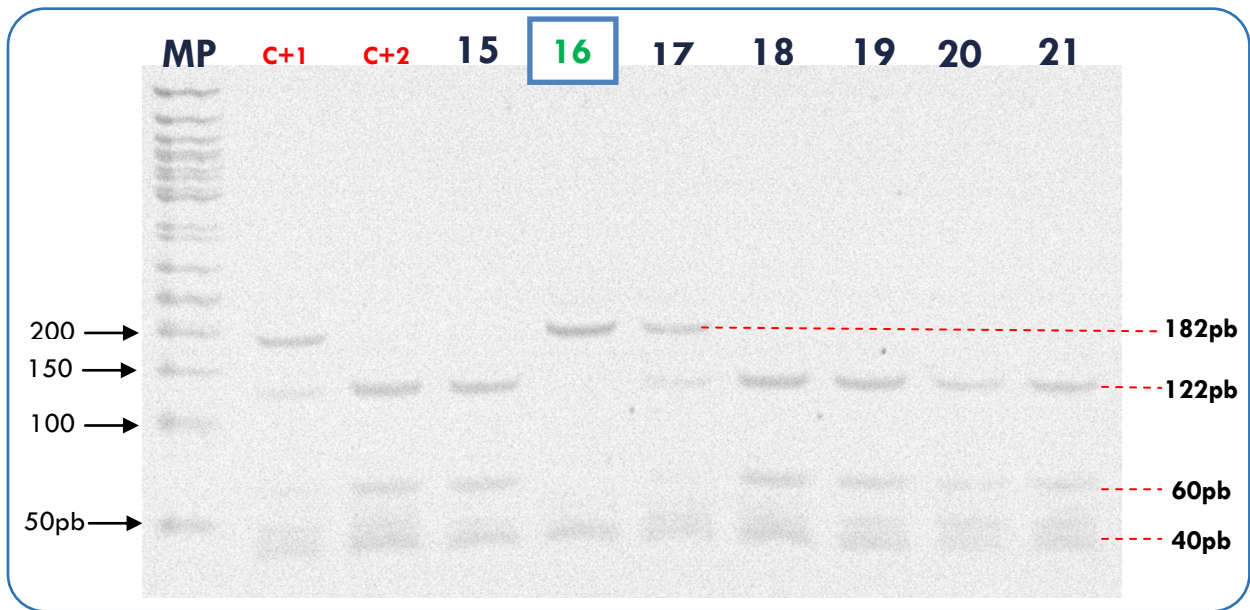


Figura 27: RFLP para C-530 en gel de poliacrilamida al 8% para muestras de *Bos indicus*, 1) MP, 2) C+1, 3) C+2 4) M15, 5) M16, 6) M17, 7) M18, 8) M19, 9) M20, 10) M21.

Al igual que las muestras con polimorfismo obtenidas en ganado *Bos taurus*, la muestra 16 fue analizada por secuenciación, confirmando así la presencia del polimorfismo de interés (A/A), este análisis se ilustra en la figura 28, donde se observa resaltado en color negro la posición del polimorfismo encontrado en la muestra 16 de *Bos indicus* con respecto a la secuencia de referencia y el amplificado para el marcador C-530, en la parte inferior de la imagen se puede corroborar esto con el electroferograma correspondiente.

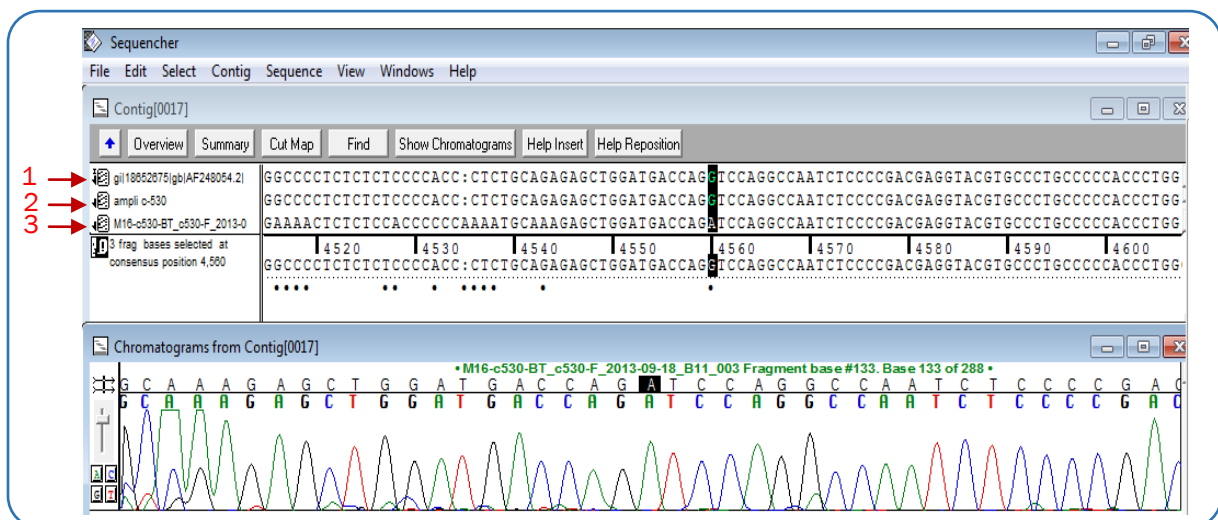


Figura 28: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 16 con polimorfismo C-530 de *Bos indicus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-530, 3) Muestra 16.

Los resultados correspondientes al genotipificado por RFLP para las muestras tanto de *Bos taurus* como de *Bos indicus* se concentraron en una tabla mostrada en el anexo 3.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA MARCADOR C-530

Los datos obtenidos para el marcador C-530 fueron analizados mediante una prueba de hipótesis para independencia de datos categóricos mediante la prueba de Chi-cuadrada. Estos datos están presentados en gráficos de pastel para comparar el reparto del genotipificado obtenido por especie figura 29.

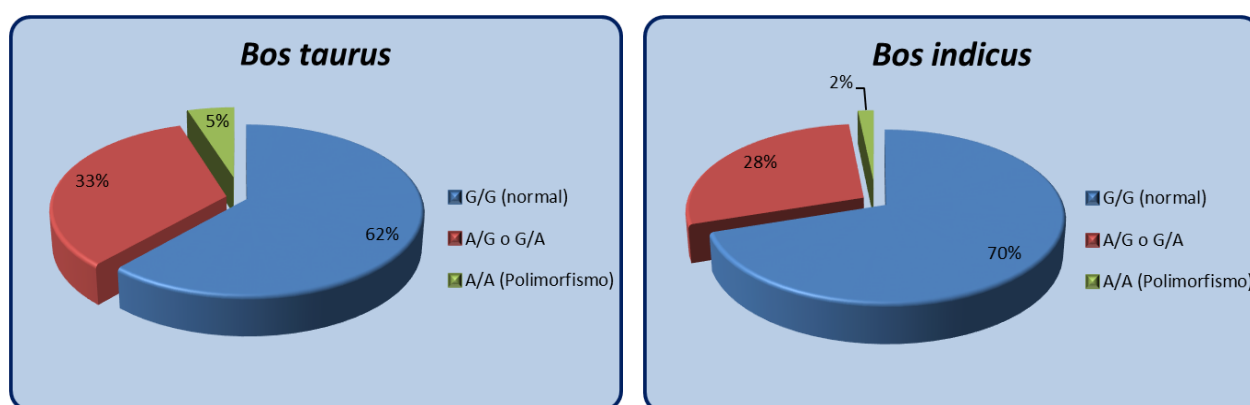


Figura 29: Gráficos de pastel para comparación de reparto de genotipificado por especie.

Posteriormente se calcularon las frecuencias genotípicas obtenidas para cada especie (tabla 9) y se realizó un gráfico comparativo de éstas (figura 30).

Tabla 9: Frecuencias genotípicas obtenidas para cada especie

CALPAINA C-530				
	<i>Bos taurus</i>		<i>Bos indicus</i>	
	No. muestras	Frecuencia	No. muestras	Frecuencia
G/G (normal)	37	0.62	42	0.70
A/G o G/A	20	0.33	17	0.28
A/A (Polimorfismo)	3	0.05	1	0.02
Total	60	1.00	60	1.00

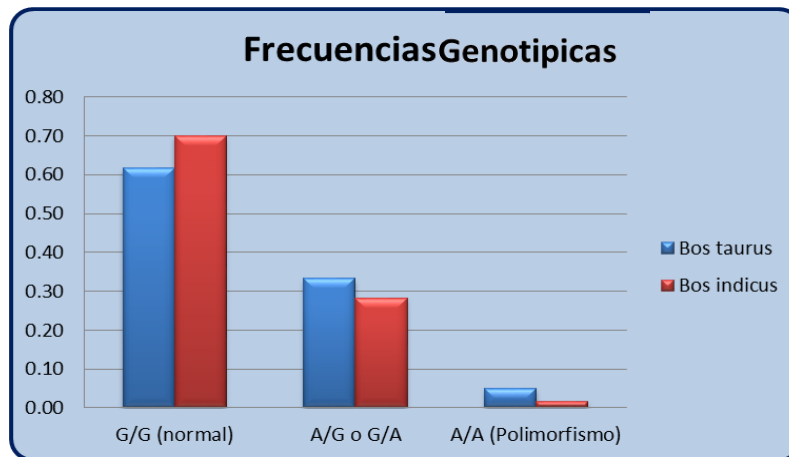


Figura 30: Gráfico comparativo de las frecuencias genotípicas obtenidas por especie.

La finalidad de la prueba era corroborar estadísticamente si el polimorfismo se hallaba asociado a la especie animal.

Para llevar a cabo la prueba de independencia se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho= La presencia del polimorfismo es independiente de la especie (no existe asociación)

H1=la presencia del polimorfismo no es independiente de la especie (existe posible asociación)

Se llevó a cabo una prueba de Chi-cuadrada, la cual se realizó mediante el programa STATGRAPHICS Centurion, de acuerdo a esta prueba, con un nivel de confianza del 95% y dado que el valor $P > 0.05$ ($P = 0.458$) no se puede rechazar la hipótesis de que la presencia del polimorfismo es independiente (H_0) de la especie del individuo, por lo tanto se puede decir que estadísticamente no hay evidencia suficiente para decir que existe asociación entre el polimorfismo y la especie.

MARCADOR C-316

Las muestras para el estudio del marcador C-316 fueron analizadas por PCR bajo las condiciones establecidas, al igual que para el marcador C-530 se buscaba que las bandas de los amplificados fueran definidos para su posterior análisis por RFLP, los resultados de PCR para las primeras 8 muestras de ganado *Bos taurus* se ilustran en la figura 31, donde se puede observar que los amplificados son del tamaño esperado y las bandas resultantes aparecen bien definidas.

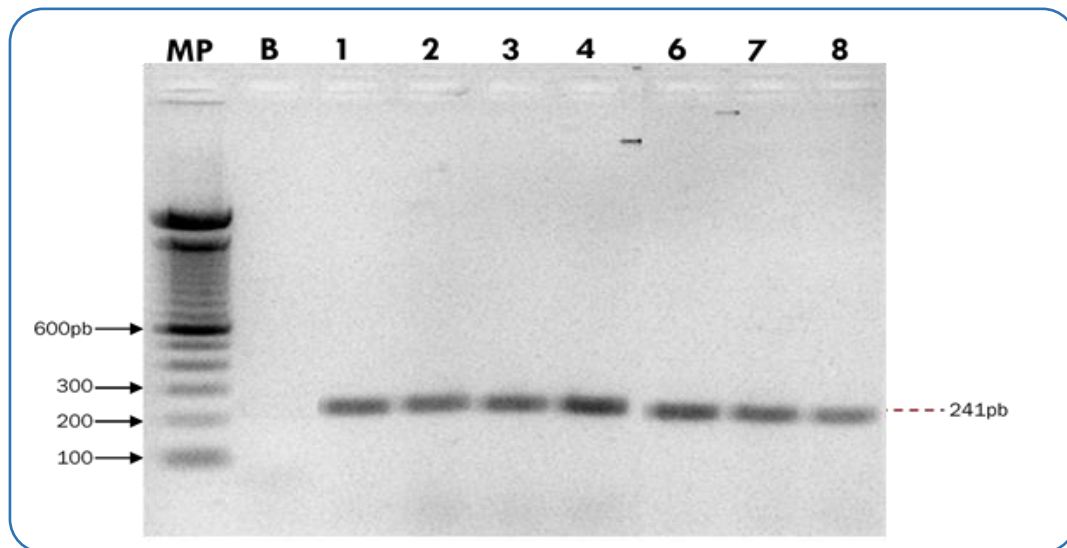


Figura 31: Evaluación electroforética de PCR en gel de agarosa al 2% del marcador C-316, MP) marcador de peso molecular, B) Blanco, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 6) M6, 7) M7, 8) M8.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de los patrones de corte que se obtendrían con el RFLP planteado con la enzima Dsa I, esto se realizó con la ayuda del programa bioinformático *Sequencher* realizando una simulación tomando como referencia las secuencias reportadas en el Gen Bank para el exón 9 del gen de Calpaína en *Bos taurus*. Así de acuerdo a la simulación con *sequencher* los patrones de corte obtenidos para el marcador C-316 serían los siguientes:

- Individuo con polimorfismo G/G: 241pb
- Individuo sin polimorfismo C/C : 171pb y 70pb
- Individuo heterocigoto C/G: 241pb, 171pb y 70pb

Al llevar a cabo el análisis de RFLP para las muestras de ganado bovino se obtuvieron los patrones de banda esperados, los cuales se pudieron apreciar con mejor resolución en geles de poliacrilamida al 10%, cuyos resultados se muestran a continuación.

- *Análisis de RFLP para Bos taurus*

El análisis de RFLP para las primeras 7 muestras de ganado *Bos taurus*, se presenta en la figura 32 donde el carril 5 y 8 corresponden a la muestra 6 confirmando por el patrón de corte que esta muestra corresponde a un individuo heterocigoto, mientras que las muestras 1, 2, 3, 4, 7 y 8 (carriles 1, 2, 3, 4, 6 y 7) no presentaron corte por lo tanto estos individuos tiene un genotipo homocigoto para el polimorfismo G/G. El resto de las muestras fueron sometidas al mismo análisis. La muestra 6 fue secuenciada para confirmar que el genotipo

correspondía a un individuo heterocigoto (G/C o C/G) para emplearla posteriormente como control positivo, los resultados de esta secuenciación se muestran en la figura 33 la cual muestra el electroferograma en la parte inferior donde de acuerdo a la posición correspondiente del polimorfismo con respecto a la secuencia de referencia del gen de calpaína (1) y el amplificado para el marcador C-316 (2) se observan las dos líneas sobrepuesta de las bases C y G corroborando así que esta muestra corresponde a un individuo con genotipo heterocigoto.

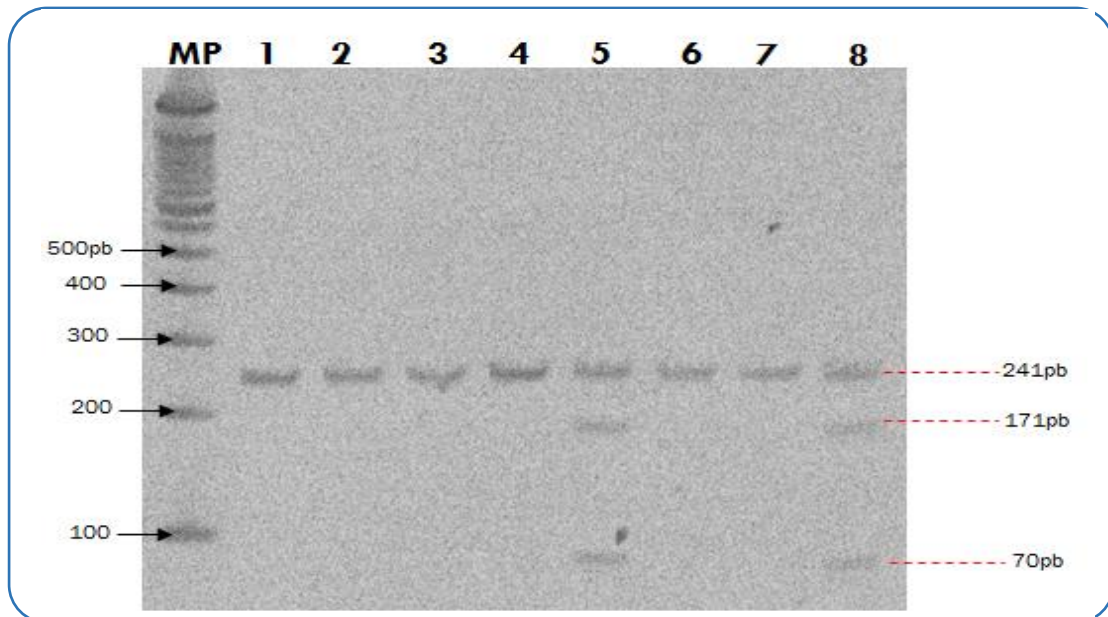


Figura 32: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10%, 1) M1, 2) M2, 3) M3, 4) M4, 5) M6, 6) M7, 7) M8, 8) M6.

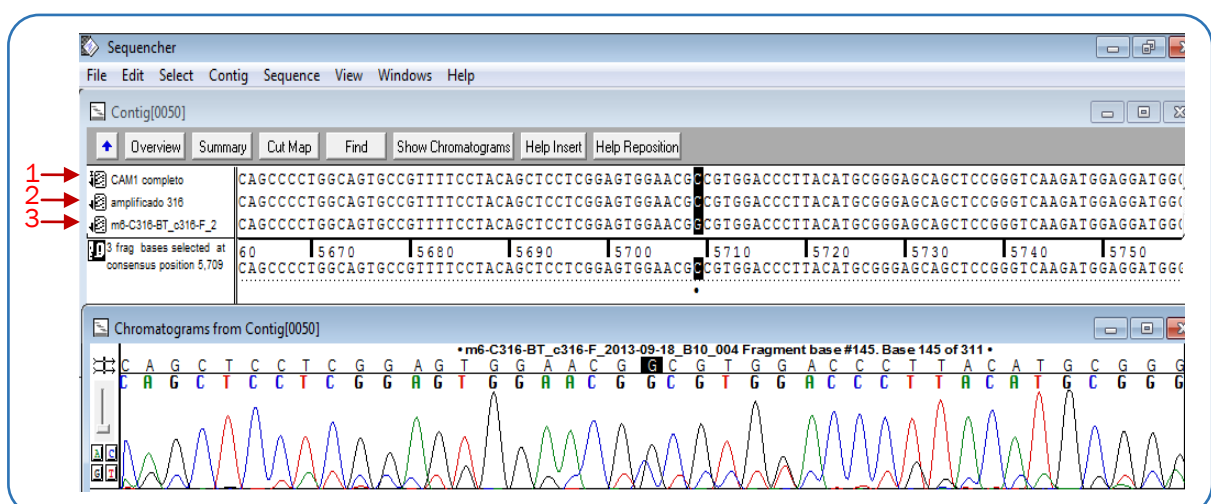


Figura 33: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 6 genotipo heterocigoto para el marcador C-316 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 6.

Para el caso del ganado *Bos taurus* no se encontraron individuos homocigotos para el genotipo C/C (normal), la mayoría de las muestras corresponden a individuos homocigotos G/G y algunos heterocigotos.

Los resultados de RFLP para las muestras 23 a 29 de *Bos taurus* que se ilustra en la figura 34, mostraron que las muestras 25, 26 y 29, de acuerdo al patrón de corte pertenecen a individuos heterocigotos, además de estas muestras se detectaron a las muestras 19 y 48 como individuos heterocigotos.

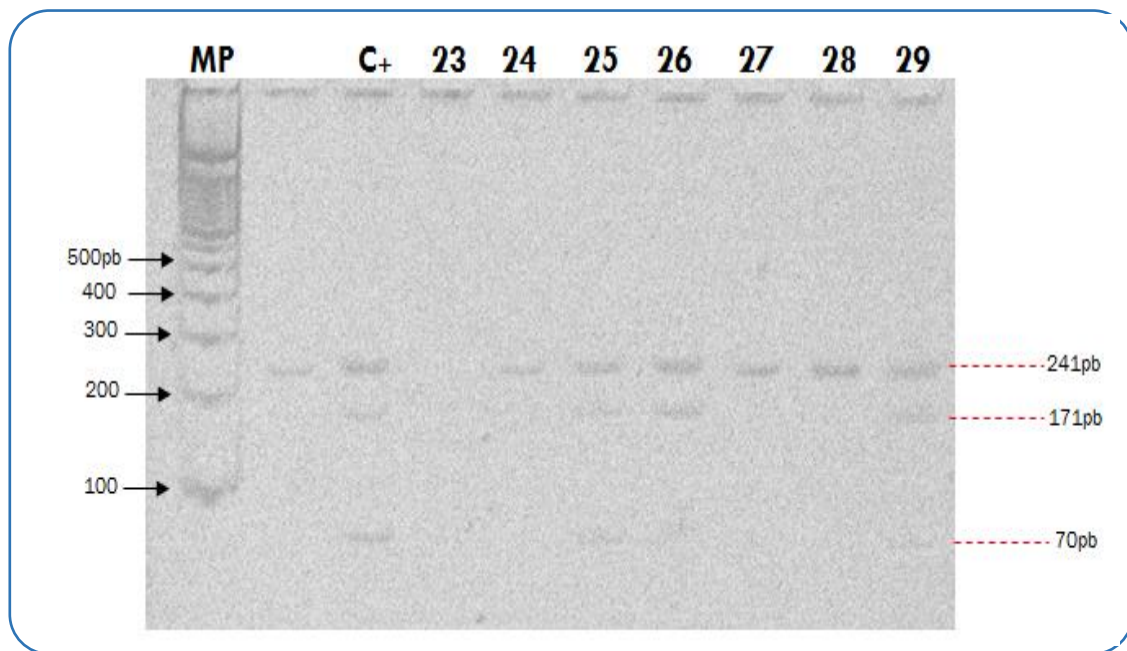


Figura 34: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10% para muestras de *Bos taurus*, 1) MP, 3) C+1, 4) M23 5) M24, 6) M25, 7) M26, 8) M27, 9) M28, 10) M29.

Para corroborar el análisis de RFLP para *Bos taurus*, se realizó la secuenciación de una muestra que presentara el polimorfismo (M2) y una muestra con genotipo heterocigoto (M26). Los resultados obtenidos de la secuenciación se pueden observar en las figuras 35 y 36.

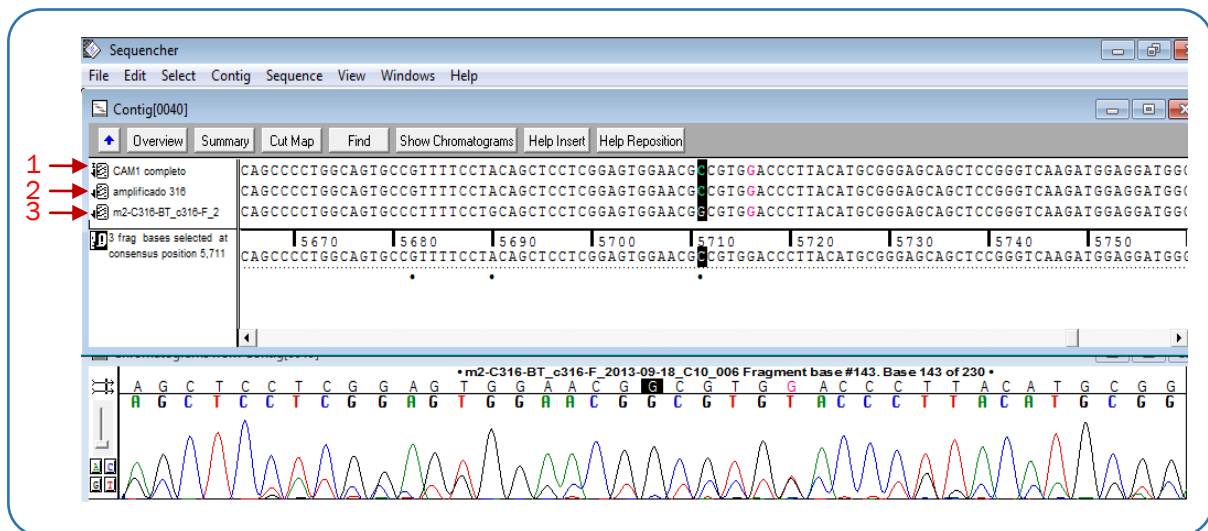


Figura 35: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 2 con polimorfismo C-316 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 2.

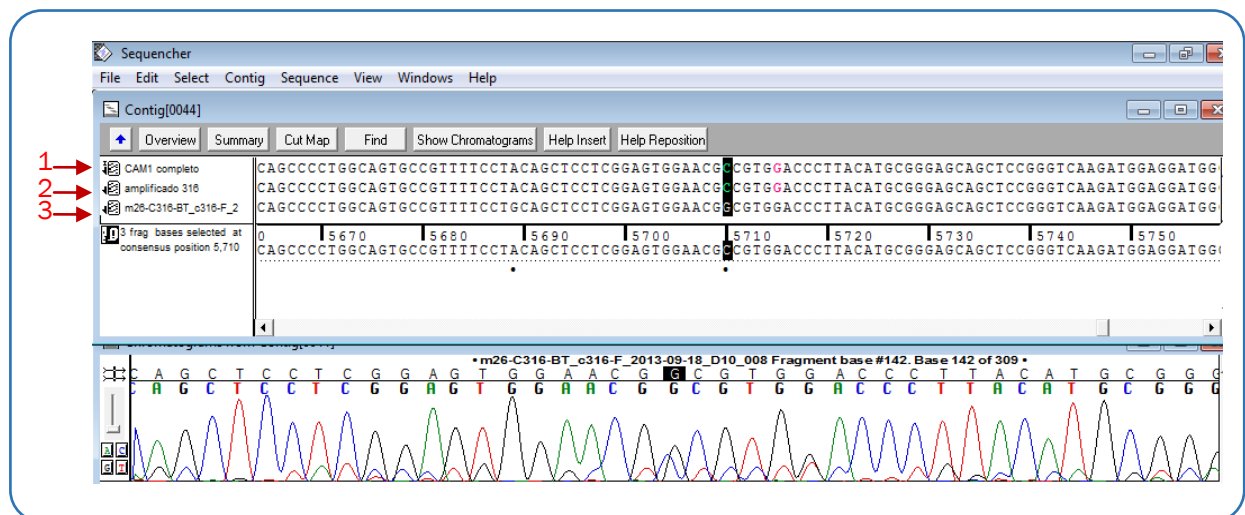


Figura 36: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 26 con genotipo heterocigoto para C-316 de *Bos taurus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 26.

Las figuras 35 y 36 muestran los resultados de secuenciación para muestras homocigotas para el polimorfismo G/G y heterocigoto C/G o G/C correspondientemente, estos resultados comprobaron que el análisis por RFLP se llevó a cabo de manera adecuada pues los patrones de corte obtenidos correspondían a los genotipos esperados, los

electroferogramas mostrados en la parte inferior de cada una de las imágenes confirma esto mismo.

- Análisis de RFLP para *Bos indicus*

Las muestras de ganado *Bos indicus*, fueron sometidas al mismo tratamiento de RFLP que las de *Bos taurus*, de las 60 muestras analizadas no se detectó ningún individuo con genotipo C/C (normal), al igual que en *Bos taurus* la mayoría de los individuos presentaron el polimorfismo G/G y se detectaron algunas muestras correspondientes a individuos heterocigotos. La figura 37 muestra el RFLP para las muestras 15 a 21, se puede observar que la muestra 20 al igual que la 21 corresponden a individuos heterocigotos, mientras que el resto de las muestras son de individuos homocigotos para el polimorfismo G/G. además de las muestras 20 y 21 en *Bos indicus* se detectaron a las muestras 25, 42, 43, 48, 49 y 55 como individuos heterocigotos, las demás muestras fueron positivas para el genotipo G/G.

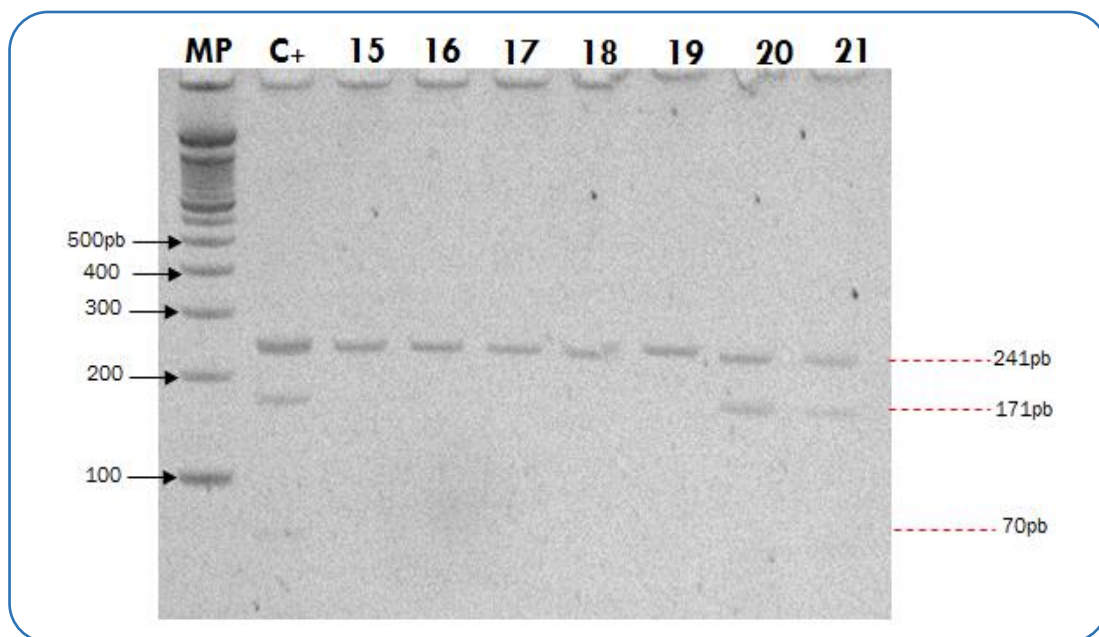


Figura 37: RFLP para C-316 en gel de poliacrilamida al 10% para muestras de *Bos indicus*, 1) MP, 2) C+1, 3) M15 4) M16, 5) M17, 6) M18, 7) M19, 8) M20, 9) M21.

Al igual que las muestras para *Bos taurus*, se secuenciaron una muestra que presentara el polimorfismo (M43) y una muestra con genotipo heterocigoto (M2), con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos por RFLP. Los resultados obtenidos de la secuenciación

para las muestras mencionadas se muestran en las figuras 38 y 39, en ellas se puede corroborar lo obtenido por RFLP.

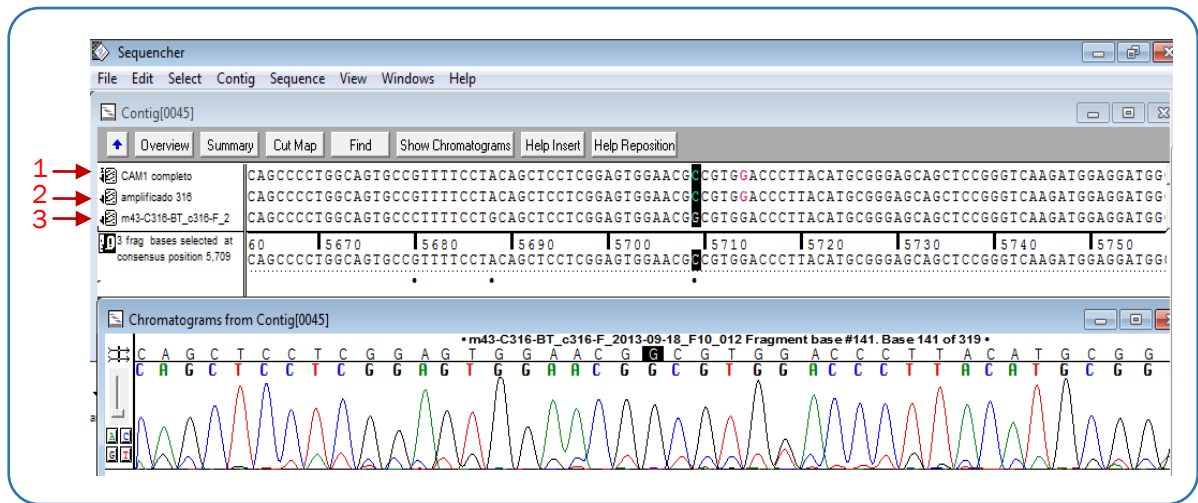


Figura 38: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 43 con polimorfismo C-316 de *Bos indicus*, 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 43.

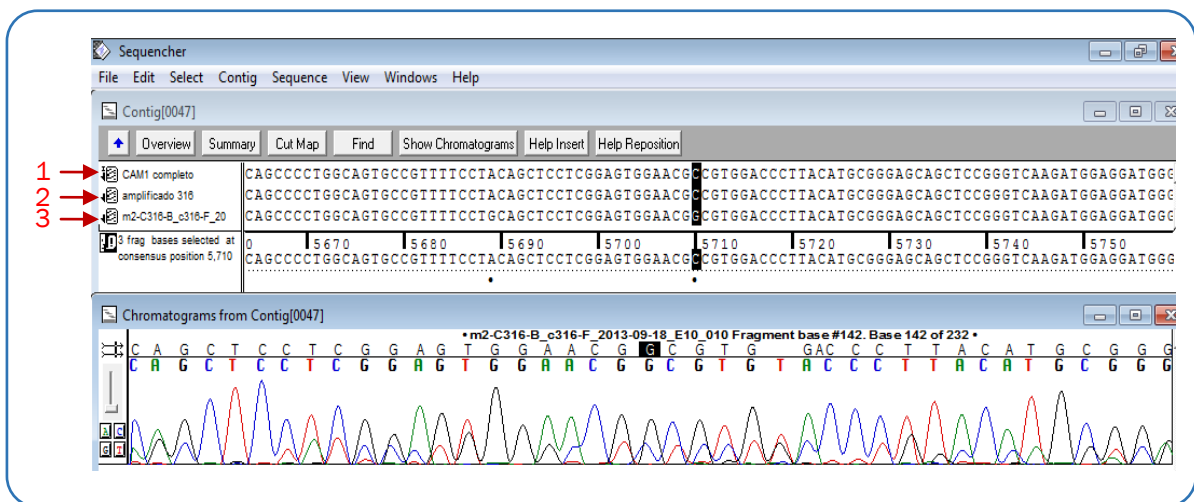


Figura 39: Electroferograma de la secuenciación de la muestra 2 con genotipo heterocigoto para C-316 de *Bos indicus* 1) Secuencia de referencia del gen de calpaína, 2) Amplificado para marcador C-316, 3) Muestra 2.

Los resultados correspondientes a las demás muestras tanto de *Bos taurus* como de *Bos indicus* se concentraron en una tabla mostrada en el anexo 4.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA MARCADOR C-316

Los datos obtenidos para el marcador C-316 fueron analizados de igual forma que los del marcador C-530 mediante una prueba de hipótesis para independencia de datos categóricos mediante la prueba de Chi-cuadrada. Estos datos fueron graficados en gráficos de pastel para comparar el reparto del genotificado obtenido por especie figura 40.

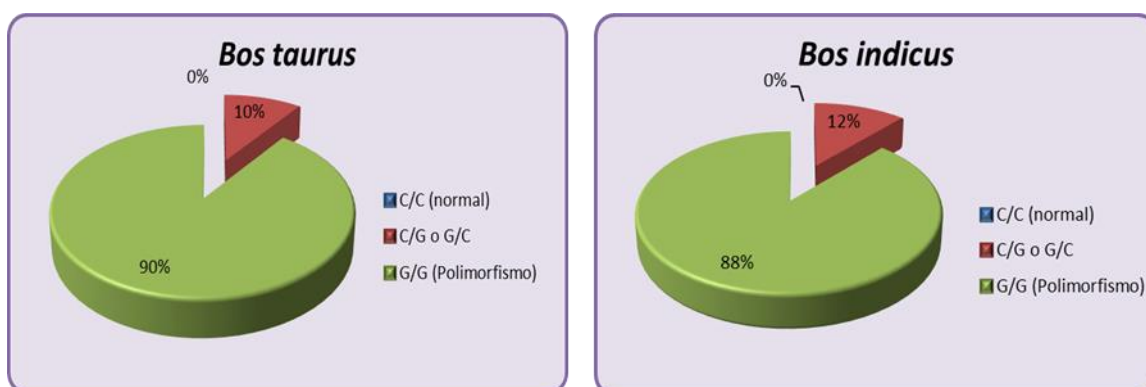


Figura 40: Gráficos de pastel para comparación de reparto de genotificado por especie.

Posteriormente se calcularon las frecuencias genotípicas obtenidas para cada especie (tabla 10) y se realizó un gráfico comparativo (figura 41).

Tabla 10: Frecuencias genotípicas obtenidas en cada especie para el marcador C-316.

CALPAINA C-316				
	<i>Bos taurus</i>		<i>Bos indicus</i>	
	No. muestras	Frecuencia	No. muestras	Frecuencia
C/C (normal)	0	0.00	0	0.00
C/G o G/C	6	0.10	7	0.12
G/G (polimorfismo)	54	0.90	53	0.88
Total	60	1	60	1

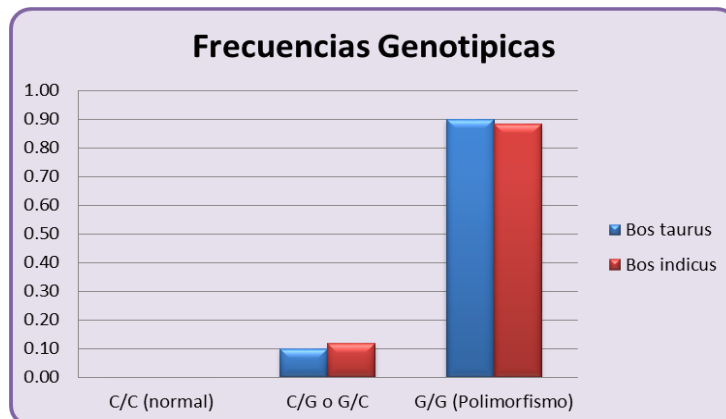


Figura 41: Gráfico comparativo de las frecuencias genotípicas obtenidas por especie para el marcador C-316.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por la prueba de Chi-cuadrada. Para llevar a cabo este análisis se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho = La presencia del polimorfismo es independiente de la especie (no existe asociación).

H1= la presencia del polimorfismo no es independiente de la especie (existe posible asociación).

Se llevó a cabo una prueba de Chi-cuadrada, la cual se realizó mediante el programa STATGRAPHICS Centurion, de acuerdo a esta prueba, con un nivel de confianza del 95% y dado que el valor $P > 0.05$ (0.769) no se puede rechazar la hipótesis de que la presencia del polimorfismo es independiente (H_0) de la especie del individuo, por lo tanto se puede decir que estadísticamente no hay evidencia suficiente para decir que existe asociación entre el polimorfismo y la especie.

V. DISCUSIÓN

La selección asistida por marcadores tiene un gran potencial para mejorar rasgos de interés económico en ganado bovino como mejora de la calidad de carne con respecto a factores como terneza, contenido graso además de rendimiento de la canal y producción de leche (Casas, y col., 2006; Corva, y col., 2007; Dekkers, y col., 2002). El reto actual es encontrar marcadores específicos para las diferentes especies bovinas y así poder dar un seguimiento a la heredabilidad de las características de interés y poder potencializarlas. Los marcadores C-530, C-316 para calpaína y la del11pb para miostatina han sido ampliamente estudiados en ganado *Bos taurus* (Casas, y col., 2005, Gill, y col., 2008) y se ha estableciendo que presenta una posible relación con la terneza de la carne, debido a que su presencia se ha detectado mayormente en este ganado del cual se obtiene carne con mayor suavidad. Sin embargo su estudio en *Bos indicus* ha sido menor, por lo que el objetivo de este trabajo al llevar a cabo un estudio comparativo entre ambas especies y la prevalencia de dichos marcadores resultó de importancia.

En cuanto al marcador C-530 en estudios previos (Casas, y col., 2005 y White, y col., 2008) reportaron que el cambio de G por A favorecía los valores de terneza en la carne proveniente de ganado *Bos taurus* por lo que se estableció que la carne de individuos homocigotos para el polimorfismo (A/A) resultaba tener mayor suavidad que los individuos homocigotos para el genotipo sin polimorfismo (G/G), mientras que los individuos heterocigotos (G/A o A/G) tenían valores intermedios de terneza con respecto a los otros dos genotipos, sin embargo estos estudios fueron realizados tomando como unidad experimental solo al ganado *Bos taurus*, ya que también se ha establecido que la terneza en esta especie es mayormente favorecida. En cuanto al ganado *Bos indicus* no se tenía establecida la asociación de este polimorfismo, así, este trabajo realizó la comparación de los genotipos en ambas especies para establecer la asociación entre la especie y el polimorfismo. Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a las frecuencias genotípicas para *Bos taurus* favorecieron al genotipo homocigoto G/G, obtenido el patrón correspondiente a este genotipo en 37 muestras de 60, lo que representa una frecuencia de la ausencia del polimorfismo de 0.62, el número de muestras que presentaron el genotipo heterocigoto A/G o G/A fue de 20 correspondiente a una frecuencia de 0.33 y finalmente la frecuencia para los individuos homocigotos para el polimorfismo A/A fue de

0.05 lo que corresponde a sólo 3 muestras. Con respecto a los valores obtenidos para las muestras de ganado *Bos indicus*, el número de muestras con el genotipo G/G fue 42, lo que representa una frecuencia de 0.75. Para el genotipo heterocigoto A/G o G/A fueron 17 muestras la que presentaron este genotipo que corresponde a una frecuencia de 0.28 y para el genotipo homocigoto para el polimorfismo A/A sólo se detectó una muestra, obteniendo así una frecuencia de 0.02 para el polimorfismo. Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos para cada especie de ganado se puede apreciar que la presencia del polimorfismo se presenta con mayor frecuencia en el ganado *Bos taurus* probado en este trabajo sin embargo, con el análisis estadístico realizado se encontró que no existe asociación entre la especie y el polimorfismo, lo cual indica que no existen evidencias que establezcan que el polimorfismo es característico de la especie, por lo tanto su favorecimiento a la diferencia de terneza con base al estudio realizado entre un ganado y otro no puede atribuirse a este.

De igual forma se analizó la posible asociación del marcador C-316 con la especie de ganado, para este caso se evaluó el cambio de C por G, estudios realizados con anterioridad en ganado *Bos taurus* determinaron que la presencia del polimorfismo se presentaba mayormente que la ausencia de este; así, Parra, y col, 2007 y Page, y col., 2004 determinaron que la presencia del genotipo C/C era mucho menor que el genotipo para el polimorfismo G/G, también establecieron que este último favorecía la terneza de la carne, los resultados obtenidos para el ganado tratado en este trabajo se apegaron a las tendencias de genotipificado reportadas, ya que el porcentaje de individuos sin polimorfismo en ambas especies fue nulo, por lo que el reparto sólo se dio entre individuos homocigotos para el polimorfismo e individuos heterocigotos, así el número de muestras que presentaron el genotipo G/G en ganado *Bos taurus* fue de 54 representando una frecuencia de 0.90 mientras que para el ganado *Bos indicus* la frecuencia obtenida fue de 0.88 que corresponde a 53 muestras con este genotipo, con respecto a las muestras que presentaron el genotipo heterocigoto C/G o G/C para el caso del ganado *Bos taurus* fueron de 6 y mientras que para ganado *Bos indicus* fue de 7, obteniendo a partir de estos datos las correspondientes frecuencias que fueron de 0.10 y 0.12, aunque al realizar la comparación de las frecuencias obtenidas se observaba un ligero favorecimiento de la presencia del polimorfismo en ganado *Bos Taurus*. Al llevar a cabo el tratamiento estadístico de estos datos de igual forma que para el marcador C-530 se estableció que estadísticamente no existe relación entre el polimorfismo y la especie de ganado, así que

tampoco puede definirse a este marcador como característico de la raza con mayor ternura en su carne. Es importante señalar que ambos polimorfismos generan cambio de aminoácido (para el caso del marcador C-316 el cambio es de alanina por glicina y para el marcador C-530 valina cambia por isoleucina) de la proteína sintetizada, sin embargo, a pesar de este cambio no se espera un impacto relevante debido a que son aminoácidos con estructura y polaridad similar. El número de muestras empleado puede considerarse también como un factor de importancia para la obtención de estos resultados, estudios previos muestran que la presencia del polimorfismo es bajo (Parra, y col., 2007; Page, y col., 2004; Casas, y col., 2005), sin embargo, la mayoría de estos estudios están basados sólo en el análisis de ganado de la especie *taurus*, por lo que al tratarse de un estudio comparativo con la especie *indicus* donde la tendencia de los polimorfismos no estaba definida el número de muestras podría haberse ampliado para obtener una tendencia más clara de la frecuencia de los polimorfismos estudiados.

Para el caso de la delección de 11 pares de bases estudiada en el gen de miostatina, en este trabajo se encontró la ausencia de esta delección en todas las muestras trabajadas de ambas especies, esto se puede atribuir a que las muestras probadas no provenían de razas puras para este fenotipo, ya que este ganado es poco convencional y su presencia en rastros públicos es poco frecuente, o a que tal vez la heredabilidad de esta delección no logró permanecer en la descendencia de este ganado (Gill, y col., 2008; Wiener, y col., 2009; Sierra, y col., 2010). Sin embargo, también resulta importante que la técnica propuesta de PCR permite de manera indirecta confirmar la presencia de individuos heterocigotos, la identificación de estos se basa en la intensidad de banda obtenida en los amplificadores con los primers diseñados en este trabajo, la intensidad de banda nos indicaba la presencia de forma indirecta de los alelos con delección o sin ella, es decir un individuo con posible genotipo heterocigoto nos mostraría una intensidad de banda menor a la que presentaría un individuo homocigoto, no se realizó el conteo de posibles individuos heterocigotos ya que los resultados obtenidos resultaban subjetivos para la finalidad de este trabajo. Otra causa probable sobre estos resultados puede ser que el fenotipo doble musculatura no solo se presenta por la presencia de esta delección (del11pb), ya que aquí fueron tratadas 4 muestras de ganado doble musculatura que estaban certificadas para este fenotipo; sin embargo, tampoco se detectó en ninguna de ellas la presencia de esta delección esto se puede atribuir a que existen otras alteraciones en el genoma que propician este fenotipo como diferentes transiciones G>A, C>T, la transversión G>T, la delección de

7pb, o inserción de 10pb (Fahrenkrug, y col., 1999; Karim, y col., 2000; Dunner, y col., 2003) todas estas alteraciones repercuten en la síntesis de una proteína trunca, la cual no puede desarrollar correctamente su función, sin embargo, estas alteraciones no fueron objeto de estudio en este trabajo.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del genotipificado de 120 muestras de ganado bovino realizado por medio de la técnica de PCR-RFLP en este trabajo, no existe evidencia estadística ($P > 0.05$) de la asociación de los polimorfismos C-530 y C-316 con la especies de ganado bovino estudiadas, lo cual implica que la terneza que para objeto de este estudio y basado en reportes bibliográficos está asociada a la especies, sin embargo, esta asociación no puede ser atribuida a la presencia o ausencia de los polimorfismo estudiados de calpaína.

En cuanto a la delección de 11pb para el gen de miostatina, en este trabajo no se obtuvo tampoco evidencia que permitiera asociar esta delección con el genotipo y por lo tanto el fenotipo de las diferentes especies de ganado bovino estudiadas, es importante mencionar que para poder establecer esta asociación claramente se requieren de muestras de ganado provenientes de individuos que muestren claramente el fenotipo característico del ganado doble musculatura.

Para dar continuidad con este trabajo se recomienda ampliar el número de muestras trabajadas, así como hacer una separación no solo a nivel de especies sino también de razas, para lograr establecer más certeramente el efecto de los polimorfismos estudiados. También es recordable profundizar más en el tema y establecer el efecto de los polimorfismos a nivel de expresión genética empleando técnicas moleculares como el diseño de microarreglos, que permitan un análisis completo del tema.

VII. ANEXOS

ANEXO 1: Resultados obtenidos de la extracción de DNA y ajuste de concentración para las 120 muestras de tejido bovino.

Tabla 11. Especificaciones de las muestras para *Bos taurus* a trabajar, resultados de extracción de ADN y ajuste de concentración de ADN.

Muestras de la especie <i>Bos taurus</i>									
		Especificaciones de la muestra				Muestra a ajustar		Ajuste	
FECHA	Código	Sexo	Edad	Procedencia	Sistema de crianza	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul
19-ene-12	081011-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	1052.4	1.88	166.7
	240911-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	4387.3	1.7	172.6
	070911-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	1371.4	1.78	93
	081011-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	822.8	1.71	80.8
	081011-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.84	1618.3	1.84	96.5
	240911-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	2280.1	1.8	146.1
	081011-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	1234.1	1.57	58
	240911-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	1910.1	1.7	359.7
20-ene-12	130511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	3078.5	1.79	184.8
	130511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.7	1016.3	1.54	31.6
23-ene-12	081011-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	1895.7	1.73	126.7
	130511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1971	1.7	110
	240911-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.91	2419.4	1.78	157.8
	240911-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.88	1717.1	1.74	81.9
25-ene-12	020511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	1883.3	1.72	111.2
	020511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.84	1680.8	1.8	78.7

	020511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.91	2344	1.83	124.6
	040511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	2391.7	1.85	84.8
26-ene-12	020511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.88	2661.2	1.8	70.3
	040511-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.87	2597.5	1.69	99.3
31-ene-12	020511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.94	1212.1	1.86	133.2
	040511-8	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.89	657.9	1.73	72.1
14-feb-12	210511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1314	1.4	132
01-mar-12	210511-8	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	2392.1	1.82	115.3
	070911-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	2251.5	1.46	107.7
	210511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	365.8	1.74	65.2
	210511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.61	915.2	1.61	54.2
	210511-13	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	1027.3	1.7	54.1
	210511-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.57	1148.5	1.63	37
	130511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	824.6	1.74	54.9
	210511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.73	2001.8	1.58	64.2
	210511-12	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.65	779.4	1.72	84.3
	210511-11	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	735.7	1.72	64.8
	210511-9	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.78	384.6	1.8	61.7
	210511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.8	478.9	1.79	62.9
	020511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	491.3	1.8	56.8
	140511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.76	415.9	1.71	42.7
	210511-13	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.77	452.2	1.69	46.4
	210511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.8	480.2	1.79	50.8
	210511-10	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	361.4	1.78	33.6
	131011-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.93	381.4	1.75	79.5
	131011-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.67	459.1	1.82	81
	131011-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	504.4	1.88	85.2
131011-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	718.2	1.78	75.4	
131011-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	1007.6	1.81	72.3	

131011-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.83	1175.3	1.81	65
181011-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	997.2	1.76	66.2
181011-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.77	788.8	1.73	63
181011-10	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	731.9	1.74	68.1
181011-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.83	1066.2	1.73	34.4
181011-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.83	1427.4	1.67	57.4
181011-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.76	394.8	1.52	63
181011-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.8	1233.3	1.65	61.9
181011-9	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.87	756.2	1.77	63.9
191011-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	366.2	1.72	56.1
181011-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.88	809.6	1.83	58.4
181011-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.79	521.3	1.83	71.6
191011-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	497	1.8	60.9
191011-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.78	372.3	1.67	57.3
131011-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.7	433.8	1.65	58.8

Tabla 12. Especificaciones de las muestras para *Bos indicus* a trabajar, resultados de extracción de ADN y ajuste de concentración de ADN.

Muestras especie <i>Bos indicus</i>									
		Especificaciones de la muestra				Muestra a ajustar		Ajuste	
FECHA	Código	Sexo	Edad	Procedencia	Sistema de crianza	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul
20-ene-12	030911-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.94	1803.1	1.73	60.1
	030911-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	2044	1.72	60.2
	020911-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	1817.3	1.71	65.8
	020911-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.89	1738.5	1.69	51.2
23-ene-12	030911-02	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.94	2734.7	1.73	123.3
	160511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.86	2798	1.83	81.8
	160511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	3106.6	1.8	79.2
	160511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.95	2169.8	1.81	67.6
25-ene-12	090411-14	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.86	2025.6	1.64	96.4
	060511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.92	2280.9	1.76	104.4
	060511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	2047.1	1.75	68.2
	070511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.95	2513	1.79	73.1
26-ene-12	070511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.93	2787.6	1.71	75.9
	070511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.91	3160.7	1.82	70
	040511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	2059.6	1.75	71
	090411-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.88	2754.3	1.78	67.3
	060511-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.54	3927.5	1.68	60.6
	040511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.99	3343.8	1.68	88.7
27-ene-12	130511-8	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.78	1319.7	1.85	144.8
	090411-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	931.9	1.81	74.3
	030911-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.84	593.1	1.84	80.1

	020911-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	1182.4	1.78	146.6
	030911-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.78	948.4	1.88	846.4
	090411-13	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.84	328.7	1.62	63.7
31-ene-12	060511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.97	883.7	1.84	65.7
	090511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.85	776.6	1.75	73.5
	160511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.87	1128	1.79	94.1
	020911-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	990.4	1.79	70.9
	020911-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.88	565.9	1.64	75
	020911-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.89	928.7	1.9	842
	030911-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	4092	1.92	1048.7
14-feb-12	070511-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1318.5	1.86	132.9
	090411-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	1520.2	1.88	72
	090411-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.84	1247.1	1.92	90.8
	040511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	3487	1.87	45.3
	060511-10	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	1286.1	1.89	96
	060511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.83	2700.6	1.76	78.3
	090611-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	1574.9	1.82	69
	160511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.72	1403.6	1.67	75.3
	040511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	1657.3	1.88	95.6
	060511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	1970.1	1.87	70.3
	070511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.9	1139.1	1.93	51.2
	070511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	1962.1	1.9	60.6
	090411-12	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.8	1619.3	1.88	97.5
	060511-9	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1153.5	1.88	114.8
	090411-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.76	936.9	1.87	71.6
	090411-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.67	1408.2	1.78	70.8
	140511-7	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	1668.5	1.81	71.6
030911-8	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.87	1532.2	1.77	62.6	
01-mar-12	070511-5	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.77	2250.8	1.69	73.7

140511-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.8	2555	1.7	83.7
090511-6	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.74	2200	1.65	66.9
140511-10	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.75	1779.8	1.73	57.5
090511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1465.5	1.8	54.8
140511-3	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.87	1130.9	1.93	50.6
030911-1	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.81	1031.9	1.85	60.3
060511-8	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.77	1687.2	1.75	81.6
140511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.66	1598.1	1.82	74.5
140511-2	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.82	2805.8	1.66	62.8
060511-4	Macho	3-4 años	Edo. México	Intensivo	1.71	1486.8	1.65	75.5

ANEXO 2: Resultados obtenidos para la identificación de la delección de 11pb del gen de Miostatina para el total de las muestras.

Tabla 13. Resultados para la delección 11pb para el gen de Miostatina en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

<i>Bos taurus</i>				<i>Bos indicus</i>			
No. Muestra	Clave	Miostatina Delección 11pb		No. Muestra	Clave	Miostatina Delección 11pb	
		Sin delección	Con delección			Sin delección	Con delección
1	081011-2	+		1	020911-1	+	
2	070911-1	+		2	020911-2	+	
3	080911-3	+		3	030911-8	+	
4	240911-1	+		4	030911-6	+	
5	240911-3	+		5	160511-3	+	
6	081011-1	+		6	160511-2	+	
7	240911-2	+		7	090411-14	+	
8	081011-4	+		8	060511-5	+	
9	020511-3	+		9	040511-5	+	
10	020511-1	+		10	060511-3	+	
11	240911-5	+		11	090411-13	+	
12	240911-4	+		12	060511-7	+	
13	081011-5	+		13	040511-4	+	
14	130511-1	+		14	070511-3	+	
15	130511-2	+		15	090511-4	+	
16	130511-3	+		16	070511-2	+	
17	020511-4	+		17	020911-4	+	
18	040511-8	+		18	160511-1	+	
19	040511-7	+		19	020911-6	+	

20	020511-5	+		20	020911-5	+	
21	020511-2	+		21	030911-7	+	
22	040511-6	+		22	090411-7	+	
23	210511-8	+		23	040511-1	+	
24	131011-1	+		24	130511-8	+	
25	131011-2	+		25	030911-5	+	
26	131011-4	+		26	090411-6	+	
27	131011-5	+		27	070511-4	+	
28	131011-6	+		28	020911-3	+	
29	131011-7	+		29	030911-3	+	
30	181011-3	+		30	030911-2	+	
31	181011-1	+		31	070511-7	+	
32	181011-4	+		32	090411-5	+	
33	181011-7	+		33	090411-4	+	
34	181011-2	+		34	060511-10	+	
35	181011-5	+		35	090611-1	+	
36	181011-9	+		36	040511-2	+	
37	181011-6	+		37	040511-3	+	
38	181011-2	+		38	090411-1	+	
39	081011-3	+		39	140511-7	+	
40	191011-2	+		40	060511-9	+	
41	210511-4	+		41	070511-6	+	
42	210511-1	+		42	070511-1	+	
43	191011-3	+		43	090411-12	+	
44	210511-10	+		44	060511-1	+	
45	131011-3	+		45	140511-9	+	
46	210511-6	+		46	090511-1	+	
47	181011-10	+		47	090511-5	+	
48	191011-1	+		48	140511-10	+	
49	210511-3	+		49	140511-4	+	

50	210511-2	+		50	140511-2	+	
51	210511-11	+		51	030911-1	+	
52	210511-12	+		52	090511-6	+	
53	020511-6	+		53	140511-3	+	
54	210511-13	+		54	160511-4	+	
55	130511-13	+		55	090411-3	+	
56	210511-7	+		56	070511-5	+	
57	140511-5	+		57	140511-1	+	
58	070911-1	+		58	060511-8	+	
59	210511-5	+		59	060511-4	+	
60	210511-9	+		60	090511-2	+	

ANEXO 3: Resultados obtenidos para la identificación del marcador C-530 de Calpaina en muestras de ambas especies.

Tabla 14. Resultados para la identificación del marcador C-530 de Calpaina en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

<i>Bos taurus</i>					<i>Bos indicus</i>				
No. Muestra	Clave	Calpaina C-530			No. Muestra	Clave	Calpaina C-530		
		G/G (normal)	A/A (Polimorfismo)	A/G o G/A (heterocigoto)			G/G (normal)	A/A (Polimorfismo)	A/G o G/A (heterocigoto)
1	081011-2			+	1	020911-1	+		
2	070911-1	+			2	020911-2	+		
3	080911-3			+	3	030911-8			+
4	240911-1	+			4	030911-6			+
5	240911-3			+	5	160511-3	+		
6	081011-1	+			6	160511-2			+
7	240911-2	+			7	090411-14			+
8	081011-4		+		8	060511-5	+		
9	020511-3			+	9	040511-5	+		
10	020511-1	+			10	060511-3	+		
11	240911-5	+			11	090411-13	+		
12	240911-4	+			12	060511-7	+		
13	081011-5			+	13	040511-4	+		
14	130511-1	+			14	070511-3	+		
15	130511-2			+	15	090511-4	+		
16	130511-3			+	16	070511-2		+	
17	020511-4			+	17	020911-4			+
18	040511-8			+	18	160511-1	+		

19	040511-7			+	19	020911-6	+		
20	020511-5			+	20	020911-5	+		
21	020511-2	+			21	030911-7	+		
22	040511-6			+	22	090411-7	+		
23	210511-8	+			23	040511-1	+		
24	131011-1			+	24	130511-8	+		
25	131011-2	+			25	030911-5	+		
26	131011-4	+			26	090411-6			+
27	131011-5	+			27	070511-4	+		
28	131011-6	+			28	020911-3	+		
29	131011-7	+			29	030911-3			+
30	181011-3	+			30	030911-2			+
31	181011-1	+			31	070511-7			+
32	181011-4	+			32	090411-5			+
33	181011-7	+			33	090411-4			+
34	181011-2	+			34	060511-10	+		
35	181011-5	+			35	090611-1	+		
36	181011-9	+			36	040511-2	+		
37	181011-6	+			37	040511-3	+		
38	181011-2	+			38	090411-1	+		
39	081011-3		+		39	140511-7	+		
40	191011-2	+			40	060511-9	+		
41	210511-4			+	41	070511-6			+
42	210511-1	+			42	070511-1			+
43	191011-3	+			43	090411-12	+		
44	210511-10	+			44	060511-1	+		
45	131011-3			+	45	140511-9			+
46	210511-6	+			46	090511-1	+		
47	181011-10	+			47	090511-5	+		

48	191011-1	+			48	140511-10			+
49	210511-3	+			49	140511-4	+		
50	210511-2		+		50	140511-2	+		
51	210511-11	+			51	030911-1	+		
52	210511-12	+			52	090511-6			+
53	020511-6			+	53	140511-3	+		
54	210511-13			+	54	160511-4	+		
55	130511-13			+	55	090411-3	+		
56	210511-7	+			56	070511-5	+		
57	140511-5	+			57	140511-1	+		
58	070911-1	+			58	060511-8	+		
59	210511-5			+	59	060511-4	+		
60	210511-9			+	60	090511-2			+

ANEXO 4: Resultados obtenidos para la identificación del marcador C-316 de Calpaína en muestras de ambas especies.

Tabla 15. Resultados para la identificación del marcador C-316 de Calpaína en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

<i>Bos taurus</i>					<i>Bos indicus</i>				
No. Muestra	Clave	Calpaína C-316			No. Muestra	Clave	Calpaína C-316		
		G/G (Polimorfismo)	C/C (Normal)	C/G o G/C (heterocigoto)			G/G (Polimorfismo)	C/C (Normal)	C/G o G/C (heterocigoto)
1	081011-2	+			1	020911-1	+		
2	070911-1	+			2	020911-2			+
3	080911-3	+			3	030911-8			
4	240911-1	+			4	030911-6	+		
5	240911-3	+			5	160511-3	+		
6	081011-1			+	6	160511-2	+		
7	240911-2	+			7	090411-14	+		
8	081011-4	+			8	060511-5	+		
9	020511-3	+			9	040511-5	+		
10	020511-1	+			10	060511-3	+		
11	240911-5	+			11	090411-13	+		
12	240911-4	+			12	060511-7	+		
13	081011-5	+			13	040511-4	+		
14	130511-1	+			14	070511-3	+		
15	130511-2				15	090511-4	+		

16	130511-3	+			16	070511-2	+		
17	020511-4	+			17	020911-4	+		
18	040511-8	+			18	160511-1	+		
19	040511-7			+	19	020911-6	+		
20	020511-5	+			20	020911-5			+
21	020511-2	+			21	030911-7			+
22	040511-6	+			22	090411-7	+		
23	210511-8				23	040511-1	+		
24	131011-1	+			24	130511-8	+		
25	131011-2			+	25	030911-5			+
26	131011-4			+	26	090411-6	+		
27	131011-5	+			27	070511-4	+		
28	131011-6	+			28	020911-3	+		
29	131011-7			+	29	030911-3	+		
30	181011-3	+			30	030911-2			
31	181011-1				31	070511-7			
32	181011-4				32	090411-5			
33	181011-7				33	090411-4	+		
34	181011-2				34	060511-10	+		
35	181011-5				35	090611-1	+		
36	181011-9	+			36	040511-2	+		
37	181011-6	+			37	040511-3	+		
38	181011-2	+			38	090411-1	+		
39	081011-3	+			39	140511-7	+		
40	191011-2	+			40	060511-9	+		
41	210511-4	+			41	070511-6	+		
42	210511-1	+			42	070511-1	+		

43	191011-3	+			43	090411-12	+		
44	210511-10	+			44	060511-1	+		
45	131011-3	+			45	140511-9	+		
46	210511-6	+			46	090511-1	+		
47	181011-10	+			47	090511-5	+		
48	191011-1			+	48	140511-10			+
49	210511-3	+			49	140511-4			+
50	210511-2	+			50	140511-2	+		
51	210511-11	+			51	030911-1	+		
52	210511-12				52	090511-6	+		
53	020511-6	+			53	140511-3	+		
54	210511-13	+			54	160511-4	+		
55	130511-13				55	090411-3			+
56	210511-7				56	070511-5	+		
57	140511-5	+			57	140511-1	+		
58	070911-1	+			58	060511-8	+		
59	210511-5				59	060511-4	+		
60	210511-9	+			60	090511-2	+		

VIII. REFERENCIAS CITADAS

- Albertí, P., Ripoll, G., Goyache, F., Lahoz, F., Olleta, J.L., Panea, B., Sañudo, C. (2005). Carcass characterisation of seven Spanish beef breeds slaughtered at two comercial weights. *Meat Science*, 71, 514-521.
- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., Nájera, A.I. (2006). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physicochemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Science*, 72, 486-495.
- Álvarez, A. D. (2010). Sistema de aturdimiento con CO₂ en el porcino: Bienestar animal y calidad de la carne. (Eds.) Mota, R. D., Guerrero, L. I., Trujillo, O. M.E. Editorial BM Editores. México. Pp: 235-248.
- Alzon, M., Mendizabal, J.A., Arana, A., Alberti, P., Purroy, A. (2007). Adipocyte cellularity in diferent adipose depots in bulls of seven Spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal*, 1, 261-267.
- Archile, C. A.C., Mandell, I.B., Purslow, P.P. (2010). Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. *Meat Science*, 86, 491-497.
- Armour, A. L., R. Neuman, S. Gobert y A. J. Jeffreys. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3(4), 599-605.
- Armour, A.L., M. Crosier, S. Malcolm, J. C. Chan, A. J. Jeffreys. (1995) Human minisatellite loci composed of interspersed GGA-GGT triplet repeats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*; 261, 345-349.
- Backeljau T., L. De Brun, H. De Wolf, K. Jordaens, S. Dongen, R. Verhagen y B. Winnepeninckx. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*, 11,119-130.
- Bellinge, R. H. S., Liberles D. A., Iaschi S. P. A., O'Brien P. A., Tay G. K. (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics*, 36, 1-6.
- Carballo, B., López de Torre, G. (1991). Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Servicio de Investigación Agraria de la Junta de Extremadura.

-
- Casas E. (2006). Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 14, 23-3.
 - Casas, E., S.N. White, D.G. Riley, T.P.L. Smith, R.A. Brenneman, T.A. Olson, D.D. Johnson, S.W. Coleman, G.L. Bennett and C.C. Chase Jr. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Animal Science*, 83, 13-19.
 - Church, P.N., Wood, J.M. (1992). The manual of manufacturing meat quality (3rd ed). Elsevier Science Publishers Ltd., Inc.
 - Coltman D.W., D.W. Bowen y J.M. Weith. (1996). PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology*, 5, 161-163.
 - Corva, P., Soria, L., Papeo M. J., Villarreal, E., Melicci, L., Mezzadra, C., Schor, a., Motter, M. (2007). Evaluación de marcadores moleculares asociados a diferencias en terneza de la carne de novillos Brangus. *Sitio argentino de producción animal*, 1-5.
 - Crouse, J.D., Cundiff, L.V., Koch, R.M., Koohmaraire, M., Seideman, S.C. (1989). Comparison of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristic and mean palatability. *Animal Science*, 67, 2661-2668.
 - Culley M.T. y Wolfe A.D. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86:545-556.
 - Curi, R. A., Chardulo L. A., Giusti J.,Silveira, A. C., Martins, C. L., Oliveira, H. N. (2010). Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*-*Bos indicus* cross beef cattle. *Meat Science*, 86, 915-920.
 - Dekkers, J. C. M., & Hospital, F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews. Genetics*, 3, 22-32.
 - Dervey M. E., J.C. Bell, D.N. Smith, D.B. Neale y G.F. Moran. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92:673-679.

-
- Dunner, S., Miranda, M., Amiguesb, Y., Cañón, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J., Ménissierf, F. (2003). Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35, 103-118.
 - Eduars A., A. Civetello, H.A. Hammond y T. Caskey. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human Genetics*, 49, 746-756.
 - Fahrenkrug, S., Casas, E., Keele, J., .Smith, T. (1999). Technical note: Directgenotyping of the double-muscling locus mh in piedmontese and Belgian blue cattle by fluorescent PCR. *Animal Science*, 77, 2028-2030.
 - FAO (Food and Agriculture Organization). (2013). Informe Perspectivas Alimentarias: Análisis de los mercados mundiales. Consultado on-line en: <http://www.fao.org/docrep/014/al978s/al978s00.pdf>
 - Ferguson, D.M., Warner, R.D. (2008). Review Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants?. *Meat Science*, 80, 12-19.
 - Ferreira, G.B., Andrade, C.L., Costa, F., Freitas, M.Q., Silva, T.J.P., Santos I.F. (2006). Effects of transport time and rest period on the quality of electrically stimulated male cattle carcasses. *Meat Science*, 74, 459-466.
 - French, P., O´Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., Mooney, M.T., Troy, D.J., Moloney, A.P. (2001). The eating quality of meat of steers fed grass and/or concentrates. *Meat science*, 57 (4), 379-386.
 - Frylinck, L., Wyk, G.L., Smith, T.P.L., Strydom, P.E., Marle, E., Webb, E.C., Koohmaraie, M., Smith, M.F. (2009) Evaluation of biochemical parameters and genetic markers for association with meat tenderness in South African feedlot cattle. *Meat Science*, 83,657-665.
 - Gallo, C. (2009). Transporte y reposo *pre-sacrificio* en bovinos y su relación con la calidad de la carne. En: Bienestar Animal y Calidad de la Carne. (Eds.) Mota, R., Guerrero, L. I. Editorial BM Editores. Mexico. Pp: 15-36.
 - Gallo, C., Carmine, X., Correa, J., Ernst, S. (1995). Análisis del tiempo de transporte y espera, destare y rendimiento de canal en bovinos transportados desde Osorno a Santiago. En: Resúmenes XX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. *Sociedad Chilena de Producción Animal A.G.*, 205-206.
 - Gasque G, R. (2008). Enciclopedia Bovina. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. pp: 305-306.

-
- Gaytan G. V. (2006). Principales razas de bovinos productores de carne en México, Tesis de licenciatura. . Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 17-18.
 - Gerard, D.E., Thrasher, K.H., Grant, A.L., Lemenager, R.P., Judge, M.D. (1991) Serum-induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscled and normal cattle. *Animal Science*, 69, 317.
 - Gill, J.L., Bishop, S.C., McCorquodale, C., Williams, J. L., Wiener, P. (2009). Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of AberdeenAngus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution*, 41, 36.
 - Gill, L., J. Bishop, C., S., McCorquodale, C., Williams L., J., Wiener, P. (2008). Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Science*, 86, 985–993.
 - Goll, D.E., Thompson, V.F., Hongqi, L., Wei, W., Jinyang, C. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83, 731-801.
 - Grobet, L., Martin, L. J. R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71–74.
 - Gupta M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson y J.L. Own. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical. Applied Genetics*, 89:998-1006.
 - Hanset, R. (1991). Breeding for disease resistance in farm animals. In: CAB International (Ed. by J. B. Owen & R. F. E. Axford), pp. 467–78. Axford, Wallingford, UK.
 - Hemsworth, P.H., Barnett, J.L. (2001). Human-animal interactions and animal stress. En: G.P. Morberg and J.A. Mench (Eds.), *The biology of animal stress- Basic principles and implications for animal welfare* (pp. 309-336). Oxon, UK CABI Publishing.
 - Hocquette J. F, Renand G, Leveziel H, Picard B, Cassar-Malek I. (2006). The potential benefits of genetics and genomics to improve beef quality – a review. *Animal Science Papers and Reports*, 24, 173–89.
 - Hocquette, J.F., Bas, P., Bauchart, D., Vermorel, M. Geay, Y. (1999). Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-muscled young growing bulls. *Comparative*

Biochemistry and Physiology: Part A. Molecular and Integrative Physiology, 122, 127–38.

- Hocquette, J.F., Lehnert, S., Barendse, W., Cassar- Malek, I., Picard, B. (2007). Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, 1, 159-173.
- Holmes, J.H., Ashmore, C.R., Robinson, D.W. (1973). Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy. *Animal Science*, 36, 684–94.
- http://web.udl.es/usuaris/e4650869/docencia/segoncicle/genclin98/temes_teorias/diagnostic_mol/diagno3.html
- Illian, M.A., Morton, J.D., Bekhit, A.E., Roberts, N., Palmer, B., Sorimachi, H. (2001). Effect of pre-slaughter feed withdrawal period on *Longissimus* tenderness and the expression of calpains in the ovine. *Agricultural food chemistry*, 49, 1990-1998.
- Jeanplong F, Sharma M, Somers WG, Bass JJ, Kambadur R. (2001). Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 220,31-37.
- Juszczuk-Kubiak, E., Sakowski, T., Flisikowski, K., Wicinska, K., Oprzadek, J., Rosochacki, S.J. (2004). Bovine μ -calpain (CAPN1) gene: new SNP within intron 14. *Journal of applied genetics*, 45,457-460.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7, 910–916.
- Karim L, Coppieters W, Grobet L, Valentini A, Georges M. (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutation causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics*, 31,396–399.
- Kawashima, S., Akanuma, H., Asaoka, K. (1998). Comparison of calpains from rabbit, monkey, human and rat. *Current Contents ISSN. 1431-6730*.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science*, 36, 93-104.
- Koohmaraie, M. (1995). Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain1. *Animal science*, 70, 3071-3080.
- Litt, M., Luty J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401.

-
- Locker, R.H., Davey, C.L., Nottingham, P.M., Haughey, D.P., Law, N.H. (1975). New concepts in meat processing. *Advances in Food Research*, 21, 157-222.
 - Mach, N., Bach, A., Velarde, A., Devant, M. (2008). Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat Science*, 78, 232-238.
 - Madera, G. L.F., Saavedra, P. A. (2012). Internacionalización del sector cárnico (bovino) en el departamento de córdoba (plan de negocios), Colombian Beef. Facultad de Administración Universidad del Rosario Bogotá D.C. Pp.5-7.
 - Malene, B. H., Per E., Margrethe, T. (2008). In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. *Meat Science*, 79, 77–85.
 - Mandell, I.B., Buchanan, S. J.G., Campbell, C.P. (1998). Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousincross steers when time on feed is controlled. *Animal Science*, 76(10), 2619-2630.
 - Marsh, B.B., Lochner, J.V., Takahashi, G., Kragness, D.D. (1980). Effects of early *post mortem* pH and temperature on beef tenderness. *Meat Science*, 5, 479-483.
 - Marsh, B.B., Woodhams, P.R., Leet, N.G. (1968). Studies on meat tenderness. V. Effects of carcass cooling and freezing before completion of *rigor mortis*. *Food Science*, 33, 12-19.
 - Marshall D. M. (1999). Genetics of meat quality. In: Fries RF, Ruvinsky A, editors. *The genetics of cattle*. New Cork: CABI Publishing; 605–636.
 - Masumi, N., Akihiro, Y., Shinichirou, N., Tsutomu, N., Takashi, Y., Mitsuo, I., Keiji, M., Hideyo, O., Sumihare, N. (2002). A missense mutant *myostatin* causes hyperplastic without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 247-251.
 - McPherron, A. C., y Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 12457–12461.
 - Menissier, F. (1982a). General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its Use to Improve Beef Production* (Ed. by J.W.B. King & F. Menissier), pp. 23–53. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.

- Menissier, F. (1982b) Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. In: *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its Use to Improve Beef Production* (Ed. by J.W.B. King & F. Menissier), pp. 387–428. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.
- Miller, M.F., Cross, H.R., Crouse, J.D., Jenkins, T.G. (1987). Effect of feed energy-intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. *Meat Science*, 21 (4), 287-294.
- Morgan, J.B., Savell, J.W., Hale, D.S., Miller, R.K., Griffin, D.B. (1991). National Beef tenderness survey. *Animal Science*, 69, 3274-3280.
- Mota, R. D., Guerrero, L. I., Trujillo, O. M. E., Roldan, S. P., Martinez, R. R., Aguilera, E., Bermudez, C. A., (2010). Factores predisponentes en la incidencia del musculo PSE en cerdos. En: *Bienestar Animal y Calidad de la Carne*. (Eds.) Mota, R., Guerrero, L. I., Trujillo, O. M.E. Editorial BM Editores. Mexico. Pp: 249-269.
- O´Sullivan, A., Galvin, K., Moloney, A.P., Troy, D.J., O´Sullivan, K., Kerry, J.P. (2003). Effect of Pre-slaughtering rations of forage and/or concentrates on the composition and quality of retail packaged beef. *Meat Science*, 63, 279-286.
- Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, P., Olleta, J.L., campo, M.m., Olivér, M.A., Serra, X., Gil, M., Piedrafita, J. (2004a). Effect of muscular hypertrophy on physicochemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Science*, 68, 567-575.
- Onega, P. M. E. (2003). Evaluación de la calidad de carnes frescas: aplicación de técnicas analíticas, instrumentales y sensoriales. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Pp: 31-36.
- Ono, Y., Sorimachi, H., Susuki, K. (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochemical and biophysical research communications*, 245, 289-294.
- Otero A.A., M. De la Cruz y K. Oyama. (1997). El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:85-117.
- Page, B. T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele and T.P. Smith. (2002). Evaluation of single nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *Animal Science*, 80, 3077–3085.

-
- Page, B.T., E. Casas, R.L. Quaas, R.M. Thallman, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, S.N. White, G.L. Bennett, J.W. Keele, M.E. Dikeman and T.P. Smith. (2004). Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Animal Science*, 82, 3474–3481.
 - Pardi, M. C., Santos., I. F., Souza, E. R., Pardi, H. S. (2001). *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Editora UFG, Goiânia, Brasil.
 - Parker P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. (1998). What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79,361-382.
 - Parra, G.M., Sifuentes, A.M., Cienfuegos, E.G., Tewolde, A., Martínez, J.C. (2007). Polimorfismo en el gen de la μ -calpaína en ganado Brahman de registro de México. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 1, 32-37.
 - Pearson, A.M. (1986). Physical and Biochemical Changes Occurring in Muscle during
 - Peluffo, M., Monteiro, M. (2002). *Terneza: Una característica a tener en cuenta*. Instituto Plan Agropecuario. Uruguay.
 - Piedrafita, J., Quintanilla, R., Sañudo, C., Olleta, J.L., campo, M.M., Panea, B., Renand, G., Turin, F., Jabet, S., Osoro, K., Oliván, M., Noval, G., garcia, M.D., y cols (2003). Carcass quality of ten beef cattle breeds of the south-west of europe. *Livestock Production Science*, 82, 1-13.
 - Prigge, J.T., Kirkpatrick, D.C., Killefer, J. (1998). Isolation and characterization of calpain activator in chicken skeletal muscle. *Poultry science*,77,1411-1416.
 - Purchas, R. W., Burnham, D.L., Morris, S.T. (2002). Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. *Animal Science*, 80, 3211-3221.
 - Queller D.C., J.E. Strassmann, C.R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 285-289
 - RAE. Diccionario Real Academia de la Lengua Española.
 - Riley, R.R., Smith, H.R., Cross, H.R., Savell, J.W., Long, C.R., Cartwright, T.C. (1986). Chronological age and breed type effects on carcass characteristic and palatability of bull beef. *Meat Science*, 17, 18.
 - Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill,

P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. y Altshuler, D.; International SNP Map Working Group. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409, 928–933.

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), SFA (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios). (2011). *Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020*
- Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. E.U.A, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, Z. E., Navarro, R. de V. C., Sayas, B. M.E., Sendra, N. E., Fernandez, L. J., Perez, A. J. A. (2010). Efecto de las condiciones *ante-mortem* y *post-mortem* sobre los factores que determinan la calidad de la carne. En: bienestar animal y calidad de la carne. (Eds) Mota, R. D., Guerrero, L. I., Trujillo, O. M.E. editorial BM Editores. México. Pp. 329-349.
- Savenije, B., Lambooi, E., Gerritzen, M. A., Venema, K., y Korf, J. (2002). Effects of Feed Deprivation and Transport on Preslaughter Blood Metabolites, Early Postmortem Muscle Metabolites, and Meat Quality. *Poultry Science*, 81, 699–708
- Schaefer, A.L., Jones, S.D., Stanley, R.W. (1997). The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *Animal Science*, 75, 258-265.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Meade, M. K., Reagan, J. O., Byrnes, B. L., & Koohmaraie, M. (2001). Consumer impressions of Tender Select beef. *Animal Science*, 79, 2605–2614.
- Sierra, S. V. (2010). Evolución *post-mortem* de parámetros indicativos de calidad en carne de vacuno: efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. Pp: 14-24.
- Smith, G.C. (2001). Global sources of, and markets for, beef (and perhaps, for buffalo meat); factors affecting palatability of beef and of meat from the water buffalo. Proceeding VI World Buffalo Congress. The buffalo. An alternative for Animal Agriculture in the Third Millennium. PP. 172-101.

-
- Smith, T.P., Casas, E., Rexroad, C.E., Kappes, S.M., Keele, J.W.,(2000). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Animal science*, 78, 2589-2594.
 - Soria, L.A., Corva, P.M. (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la suavidad de la carne bovina. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 12 (2), 73-88.
 - Soria, L.A., Corva, P.M., Branda Sica, A., Villarreal, E.L., Melucci, L.M., Mezzadra, C.A., Papaleo Mazzucco, J., Fernandez Macedo, G., Silvestro C., Schor, A., Miquel, M.C. (2009), Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth,slaughter and meat quality traits in Brangus steers. *Molecular and Cellular Probes*, 23, 304–308.
 - Sorimachi, H., Ishiura, S., Susuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal*, 328, 721-732.
 - Storage and Preservation. En: Muscle as Food. Ed. P.J. Bechtel. Academic Press, NewYork.
 - Suzuki, K., Sorimachi, H. (1998). A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters*, 433, 1.
 - Uytterhaegen, L., Claeys, E., Demeyer, D. (1994) Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Animal Science*, 72, 1209–23.
 - Valadez E. y G. Kahl. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. México.
 - Vásquez, R. E., Ballesteros, H.H., Muñoz, C. A. (2007). Factores asociados con la calidad de la carne. I parte: la terneza de la carne bovina en 40 empresas ganaderas de la región Caribe y el Magdalena Medio. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(2), 60-65.
 - Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van deLee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman,J. y Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407–1444.
 - Vries, A. G. . Sosnicki, A., Garnie, J. P.,. Plastowh, G. S. (1998). The Role of Major Genes and DNA Technology in Selection for Meat Quality in Pigs. *Meat Science*, 49, 245-255.
 - Warris, P.D. (2003). Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: A review. *Veterinary Research*, 153, 170-176.

-
- White, S.N., E. Casas, T.L. Wheeler, S.D. Shakelfold, M. Koochmaraie, D.G. Riley, C.C.Jr. Chase, D.D. Johnson, J.W. Keele and T.P.L. Smith. (2005). A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Animal Science*, 83, 2001-2008.
 - Whitkus R., J. Doebley y J.F. Wendel. (1994). Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: Phillips R.L. y J.K. Vasil (ed.). *DNA-based markers in plants*. Klumer Academic Publishers, Netherlands. pp. 116-141.
 - Wiener, P., Woolliams, J.A., Frank-Lawale, A., Ryan, M., Richardson, R.I., Nute, G.R., Wood, J.D., Homer, D., Williams, J.L. (2009). The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Science*, 83, 127–134.
 - Williams J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
 - Yu, G., Zhang, R., Hu, X., Li, N. (2007). Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. *Meat science*, 77, 36-45.