



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

PRESENCIA DEL POLIMORFISMO 1892T>C EN EL INTRON 9 DEL
GEN PPARGC1A EN BOS TAURUS Y BOS INDICUS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MAYRA VAELY CORONEL FLORES

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA
COASESORA: M. EN C. ANA ELVIA SÁNCHEZ MENDOZA

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Presencia del polimorfismo 1892T<C en el intron 9 del gen PPARGC1A en Bos Taurus y Bos indicus

Que presenta la pasante: Mayra Vaely Coronel Flores
Con número de cuenta: 410025048 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Enrique Fuentes Prado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El hombre tiene ilusiones como el pájaro
alas. Eso es lo que lo sostiene”.

Blaise Pascal

Agradecimientos

Dedico este trabajo a mis familiares y amigos que me han apoyado en diferentes momentos de mi vida y que en conjunto me dieron la oportunidad de seguir adelante.

A Iván Martínez Rivera por ser parte indispensable en mi desarrollo como Ingeniera en Alimentos y por todo el apoyo brindado para ser posible mi presencia en esta Facultad.

A mi madre por todo el tiempo que ha invertido en ayudarme y hacerme una persona de bien.

A mi padre que ha sido mi fuente de sabiduría e inspiración en los momentos más difíciles y también en los más felices.

A mis amigas Rosa Acevedo, Elidaí Lazcano, Verónica Trejo y Aidee Najera por su apoyo y las bonitas experiencias vividas en este trayecto.

A mi querida Marisa por toda la paciencia y todo el amor que me ha brindado en estos años.

A Antonio Yescas por ser parte de mi vida y por todo el apoyo que me ha brindado en cada momento.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que fueron parte de esta etapa y que me llenaron de gratas experiencias y valiosos conocimientos.

Agradecimientos Técnicos

Al Dr. Francisco Montiel Sosa por la asesoría y el apoyo que me brindo para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza por sus valiosas enseñanzas técnicas, su asesoría y paciencia.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por el apoyo que me brindo durante la experimentación de este proyecto.

A la Dra. Adriana Llorente y al M. en C. Enrique Fuentes por su valiosa asesoría en la revisión de este trabajo.

Al proyecto PAPITT No. IN211413 2014 por el apoyo aportado para la realización de este trabajo.

A la UNAM por todos los conocimientos que me permitió adquirir y por la ética y compromiso social que inculca en sus alumnos.

A todos los profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y experiencias. Ustedes son parte esencial en la formación de los alumnos de la Fes Cuautitlán.

Índice

Índice de figuras.....	i
Índice de cuadros.....	iii
Resumen.....	1
Introducción	2
Capítulo 1. Importancia y generalidades de la carne de bovino.....	4
1.1. La carne.....	4
1.2. El ganado bovino.....	5
1.3. Situación de la carne de bovino en México y el mundo.....	5
1.3.1. En México	5
1.3.2. En el mundo	9
1.4. Características de la carne asociadas con su calidad.....	11
1.4.1. <i>Pre – rigor</i>	12
1.4.2. <i>Rigor mortis</i>	12
1.4.3. Resolución de la rigidez cadavérica	13
1.5. Características organolépticas	14
1.5.1. Capacidad de retención de agua	14
1.5.2. Terneza de la carne.....	14
1.5.3. Jugosidad.....	14
1.5.4. Color de la carne	14
1.5.5. Aroma.....	15
1.6. Diferencia entre <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	15
Capítulo 2. Generalidades de genética	21
2.1. Exones e intrones	21
2.2. Mutaciones	21
2.2.1. Tipos de mutaciones.....	21

Ingeniería en Alimentos

2.3. SNP (single nucleotide polymorphism)	22
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
2.4.1. Característica de la PCR.....	27
2.4.2. Ventajas.....	28
2.4.3. Limitaciones de la PCR.....	28
2.4.4. Aplicaciones de la PCR.....	28
2.5. Electroforesis.....	29
2.6. Técnicas para detectar polimorfismos.....	32
2.6.1. Detección de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	32
2.6.2. Otras formas de detectar polimorfismo SNP.....	34
2.7. Genes asociados con la calidad de la carne.....	35
2.8. PPAR α (peroxysome proliferator – activated receptor – γ coactivator – 1 α) y el polimorfismo	37
Capítulo 3. Metodología experimental.....	39
3.1. Justificación.....	39
3.2. Hipótesis.....	39
3.3. Objetivo general.....	39
3.3.1. Objetivo particular 1.....	39
3.3.2. Objetivo particular 2.....	40
3.3.3. Objetivo particular 3.....	40
3.3.4. Objetivo particular 4.....	40
3.4. Cuadro metodológico.....	41
3.5. Materiales y métodos	42
3.5.1. Extracción de ADN	42
3.5.2. Cuantificación de ADN por medio de absorbancia.....	42
3.5.3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	43
3.5.4. Electroforesis.....	44
3.5.5. Digestión con la enzima de corte	44
3.5.6. RFLP (Polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción).....	44
Capítulo 4. Resultados y discusión	46
Objetivo particular 1	46
Objetivo particular 2	48

Ingeniería en Alimentos

Objetivo particular 3	53
Objetivo particular 4	57
Contrastación de hipótesis.....	60
Conclusiones	61
Bibliografía	62
Anexos.....	66
Anexo 1. Metodología para la evaluación de la secuencia de amplificación.....	66
Anexo 2. Calculo de la temperatura de hibridación.....	71
Anexo 3. Hidratación de primers.....	72

Índice de figuras

Fig. 1. Principales razas de bovino producidas en México	6
Fig. 2. Producción de ganado bovino en pie en México.	8
Fig. 3. Producción de carne de bovino en canal.	8
Fig. 4. Principales estados productores de carne de bovino en canal en México.	9
Fig. 5. Principales países productores de carne de bovino en el mundo.	10
Fig. 6. Principales cambios en el músculo después de la muerte.	13
Fig. 7. Origen de los subgéneros <i>B. taurus</i> y <i>B. indicus</i>	16
Fig. 8. <i>Bos taurus</i>	17
Fig. 9. <i>Bos indicus</i>	17
Fig. 10. Tipos de polimorfismos	22
Fig. 11. Etapas de la PCR.	25
Fig. 12. Condiciones (tiempo-Temperatura) de las etapas de la PCR.	26
Fig. 13. Carga del gel de electroforesis.	30
Fig. 15. Resultado de la electroforesis.	31
Fig. 14. Recorrido de la muestra en el gel de electroforesis.	31
Fig. 16. RFLP.	33
Fig. 17. Genoma bovino.	37
Fig. 18. Localización del gen PPARGC1A en el cromosoma 6.	38
Fig. 19. Programa de la PCR con Tm calculada.	47
Fig. 20. Programa de PCR para la experimentación.	47
Fig. 21. Prueba de especificidad. MP: marcador molecular, Bl: Blanco, M: maíz, CV: café, C: cerdo, P: pollo, A: atún, C+: control positivo.	49
Fig. 22. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras <i>Bos taurus</i> B1, B2, B3, B4 Y B5. MP: marcador molecular 100pb, Bl: Blanco.	50
Fig. 23. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras <i>Bos taurus</i> B1, B6, B7, B8, B9 Y B10. MP: marcador molecular 100pb, Bl: Blanco.	51
Fig. 24. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras <i>Bos indicus</i> BI4, BI6, BI7, BI8, BI9 y BI10. MP: marcador molecular 100pb, Bl: Blanco.	51
Fig. 25. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras <i>Bos taurus</i> B7, B9, B10 y <i>Bos indicus</i> BI1, BI2, BI3, BI4 Y BI5. MP: marcador molecular 100pb, Bl: Blanco.	52
Fig. 26. Corte de la enzima Hae III.	53
Fig. 27. Resultados de RFLP para las muestra B2, B3, B4 y B5.	54
Fig. 28. Resultados de RFLP para las muestras B1, B6, B7, B8, B9 y B10.	54

Ingeniería en Alimentos

Fig. 29. Resultados de RFLP para las muestras BI1, BI2, BI3, BI4 y BI5.	55
Fig. 30. Resultados de RFPL para las muestras BI4 y BI6.	56
Fig. 31. Resultados de RFLP para las muestra BI7, BI8, BI9 y BI10.	56

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición química promedio de la carne.	5
Cuadro 2. Volumen de la producción de carne de bovino mundial	11
Cuadro 3. Ejemplos de razas <i>Bos taurus</i>	18
Cuadro 4. Ejemplos de razas <i>Bos indicus</i>	20
Cuadro 5. Genes asociados con la calidad de la carne.	35
Cuadro 6. Proporciones por muestra.	43
Cuadro 7. Primers para la experimentación.	46
Cuadro 8. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras <i>Bos taurus</i>	48
Cuadro 9. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras <i>Bos indicus</i>	49
Cuadro 10. Resultados para la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en <i>Bos taurus</i>	57
Cuadro 11. Resultados para la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en <i>Bos indicus</i>	58
Cuadro 12. Comparación de la presencia del polimorfismo 1892T>C en las muestras <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	59

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado una investigación acerca de las características que afectan la calidad de la carne de bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), así como los genes que están asociados a dichas características.

Posteriormente se eligió el gen PPARGC1A (peroxysome proliferator – activated receptor – γ coactivator – 1 α), implicado en la síntesis de grasa de la leche. En dicho gen se han detectado 11 polimorfismos de los cuales el polimorfismo 1892T>C presente en el intron 9 ha mostrado tener una influencia significativa que lo relaciona con el contenido de grasa en la leche.

Para evaluar la presencia de dicho polimorfismo en muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus* se analizaron 20 muestras: 10 *Bos taurus* y 10 *Bos indicus*, a las cuales se les aplicó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y subsecuentemente se llevó a cabo la detección del polimorfismo utilizando RFLP.

Una vez evaluadas las muestras se obtuvo como resultado que el polimorfismo 1892T>C no tiene presencia diferente entre los subgéneros *Bos taurus* y *Bos indicus*, debido a que 19 de los individuos no presentaron el polimorfismo y la muestra sobrante resultó ser heterocigoto.

Introducción

La carne de bovino es un producto de gran importancia nacional y mundial, puesto que es la segunda con mayor producción en México después de la carne de ave y la tercera más producida en el mundo después de la carne de porcino y pollo (FAO, 2013).

La calidad de la carne de bovino está determinada por varios atributos, entre los cuales se destacan la composición corporal (por ejemplo: proporción de grasa en la res), la calidad tecnológica (aptitud de la carne para su consumo, conservación o transformación), la calidad nutricional (contenido de elementos que corresponden a las necesidades del consumidor, cantidad de grasa y su composición), y la seguridad alimentaria (Sica et al., 2011).

De los atributos mencionados anteriormente, uno de los más valorados y exigidos es la ternura (Boleman et al., 1997). Por otra parte la grasa intramuscular o grasa infiltrada se ha considerado importante en la producción de carne de vacuno, ya que es un factor importante en la calidad de la carne que influye en la satisfacción del consumidor (Yongfeng et al., 2013) así como el color que ayuda a tomar la decisión de comprar o no un producto cárnico (Soria et al., 2009).

La tendencia actual es estudiar los genes que por su función o posición en el genoma, podrían tener efecto en ciertas cualidades. Por ejemplo el cromosoma 6 es la clave en el metabolismo de la energía, glucosa y grasa (Weikard et al., 2005) y en él se localiza el gen PPARGC1A (coactivador 1 alfa del remorceptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos) (Khatib et al., 2007) que tiene efecto sobre el contenido de grasa en la leche bovina (Weikard et al., 2005) y el tipo de fibra en cerdos (Jacobs et al., 2006), además de que la proteína codificada por este gen es un transcripcional coactivador que regula los genes implicados en el metabolismo de la energía (Ruheena et al., 2011) y que es altamente expresado en diversos tejidos como el tejido adiposo marrón, del riñón y del hígado (Gandolfi et al., 2011).

Se han descrito SNPs (single nucleotide polymorphism) con efectos sobre los atributos de importancia económica en la carne de bovino. En este sentido, en el gen PPARGC1A se han detectado 11 polimorfismos de los cuales el polimorfismo 1892T>C

presente en el intron 9 ha mostrado diferencias significativas en el contenido de grasa en la leche (Weikard et al., 2005).

En este trabajo se pretende evaluar la presencia de dicho polimorfismo en los ganados *Bos taurus* y *Bos indicus* ya que muchos autores han observado diferencias significativas en la carne de razas Europeas y entre la carne de razas de ganado cebuino (Giusti et al, 2013), por ejemplo los *Bos indicus* son tolerantes al clima cálido y son muy populares en los programas de cruzamiento en las zonas tropicales y climas áridos, sin embargo, existen dudas acerca de la calidad de la carne en canal puesto que este ganado tiende a madurar más tarde y tiene menores cantidades de grasa subcutánea e intramuscular en comparación con el ganado *Bos taurus* (Beauchemin et al., 2006).

MARCO TEÓRICO

Capítulo 1. Importancia y generalidades de la carne de bovino

1.1. La carne

La ganadería es una actividad del sector primario que se refiere al cuidado y alimentación de cerdos, vacas, pollos, borregos, abejas, etcétera, para aprovechar su carne, leche, huevos, lana, miel y otros derivados (INEGI, 2011).

Por otra parte la carne se define como la porción de animales sanos destinados para el consumo humano. Está constituida principalmente por tejido muscular y cantidades variables de tejido conectivo, epitelial, nervioso y adiposo, según la localización anatómica, edad, género y especie animal (Guerrero, 2006).

Otra definición de carne es: la parte comestible de los músculos de bóvidos, óvidos, caprinos, equinos y otras especies autorizadas sanas (animales de corral, animales de caza de pelo y pluma y mamíferos marinos), sacrificadas en condiciones higiénicas (Pardo et al., 1998).

Los músculos de los animales se dividen en tres categorías: músculo liso, músculo cardíaco y músculo esquelético. El primero posee la organización estructural más simple de los tres tipos, su funcionamiento es involuntario y se encuentra localizado en los sistemas gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular. El segundo se encuentra en el corazón y en la raíz de los grandes vasos sanguíneos que se unen al corazón, es involuntario y estriado. El tercero actúa bajo control nervioso voluntario y constituye el 40% al 65% del peso (Guerrero, 2006).

La composición del tejido muscular varía con la edad, el género, especie y estado de nutrición, pero las proteínas constituyen la fracción más importante de la materia seca (Guerrero, 2006). A continuación, en el Cuadro 1, se muestra la composición química de la carne:

Cuadro 1. Composición química promedio de la carne. Fuente: Amo, 1980.

Componente	Porcentaje
Agua	75 – 80 %
Proteínas	15 – 20 %
Lípidos	3%
Glucógeno	1%
Sales minerales	1%
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1%

1.2. El ganado bovino

Los vacunos se pueden clasificar por su aptitud productiva en animales tipo carne o tipo leche. Se habla también de animales de doble aptitud, aunque las características productivas se pueden definir fácilmente, mediante selección de razas (Castro, 2002).

Una raza lechera se define como un grupo de animales con antepasados comunes desarrollados para la producción de leche que presentan características similares de tipo y producción. Por otra parte, una raza de carne se define como un grupo de animales con antepasados comunes desarrollados para la producción de carne con características similares de tipo y producción (Castro, 1999).

1.3. Situación de la carne de bovino en México y el mundo

1.3.1. En México

La carne de res es una de las más consumidas en nuestro país, por su sabor y contenido nutricional. Ésta es obtenida de los bovinos o bóvidos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), que son animales vertebrados, mamíferos y ungulados. Son rumiantes herbívoros, capaces de digerir hierbas, paja, forrajes, heno, etc. (Financiera rural, 2012).

Existe una gran variedad de razas utilizadas para la obtención de carne, aproximadamente 30 en nuestro país, entre las más importantes encontramos a las siguientes: Hereford, Charolais, Brahman, Nelore, Pardo Suizo Europeo, Indobrasil, Gir,

Ingeniería en Alimentos

Beefmaster, Simmental, Limousin, Brangus, Angus, entre otras (Fig. 1) (Financiera rural, 2012).

Las principales regiones ganaderas en México, de acuerdo con la SAGARPA, son:

- Regiones Árida Y Semiárida: Baja California Norte y Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y parte de Tamaulipas y San Luis Potosí. Predominan las razas europeas puras como la Hereford, Angus y Charolais, y se caracterizan por ser regiones donde se desarrollan los sistemas de producción vaca-becerro y el de engorda en corral. Se basan casi exclusivamente en el pastoreo y su producción se orienta a la cría de becerros y becerras para la exportación, o su engorda en corrales, donde se utilizan métodos y tecnologías modernas de alimentación basadas principalmente en granos. En general, los sistemas en confinamiento son tecnificados y costosos (Financiera rural, 2012).



Fig. 1. Principales razas de bovino producidas en México (Financiera rural, 2012).

Ingeniería en Alimentos

- Región Templada: Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Distrito Federal. Predomina el ganado cruzado con razas europeas. Gran parte de las explotaciones son extensivas, sustentadas en el pastoreo durante la época de lluvias. El sistema que predomina es el de vaca-becerro, para consumo local o para su finalización en corrales de engorda. Aquí se realiza la cría, desarrollo y engorda con sistemas de tipo extensivo (Financiera rural, 2012).
- Región del Trópico Húmedo y Seco: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Morelos, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Predominan las razas cebuínas y su cruce con europeas. Es una zona natural proveedora de becerros para engorda y finalización en corrales, así como de carne en canal para el abasto del D.F. y área metropolitana. En esta región se aprovecha la abundante producción de forrajes debido a las características ecológicas de la zona, y se produce el ganado de doble propósito (carne y leche) (Financiera rural, 2012).

En México, la ganadería bovina es una de las principales actividades agropecuarias, relevante por la variedad de productos obtenidos, como la carne y la leche. De acuerdo con el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007, en México existen alrededor de 1.13 millones de unidades de producción de ganado bovino, 10.3% ubicadas en Veracruz, 7.7% en Chiapas, 7.4% en Oaxaca, 6.5% en Guerrero, 6.1% en el Estado de México, 5.5% en Jalisco y el resto en las demás entidades del país. Alrededor del 60% de estas unidades tienen como actividad principal el desarrollo o engorda de bovino. La existencia aproximada de ganado bovino es de 30 millones de cabezas. Entre 8 y 9 millones son sacrificadas anualmente para la producción de carne (Fig. 2). Cada una con un peso que en promedio se encuentra en 205 kg por cabeza (Financiera rural, 2012).

Ingeniería en Alimentos

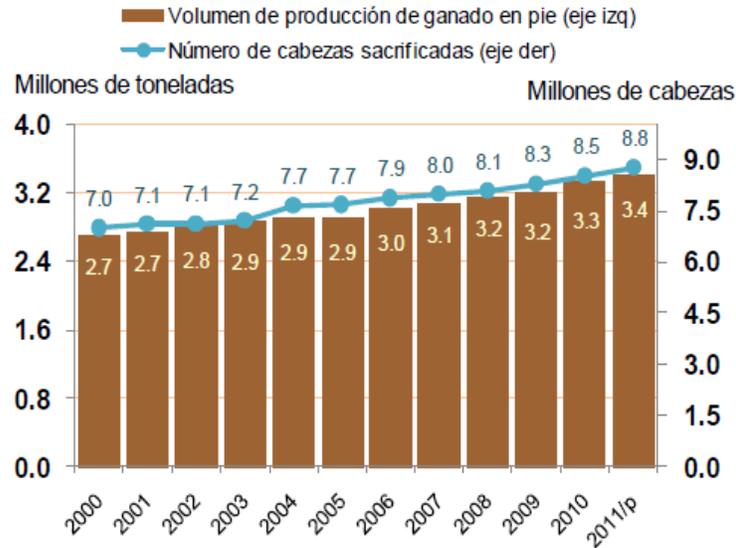


Fig. 2. Producción de ganado bovino en pie en México (Financiera rural, 2012).

Es importante comentar que la carne de bovino es la segunda con mayor producción nacional después de la carne de ave en nuestro país, con una participación de 30.5% en la producción total de carne en canal en México, así como del 35.3% del valor generado. Asimismo, contribuye con el 9.2% del volumen de alimento producido en el sector pecuario nacional y con el 23% del valor total pecuario (Financiera rural, 2012).

Por su parte, la carne en canal aumentó en cinco años, alcanzando 1.74 millones de toneladas en 2010, con un valor de 57,954 millones de pesos (Fig. 3) (Financiera rural, 2012).

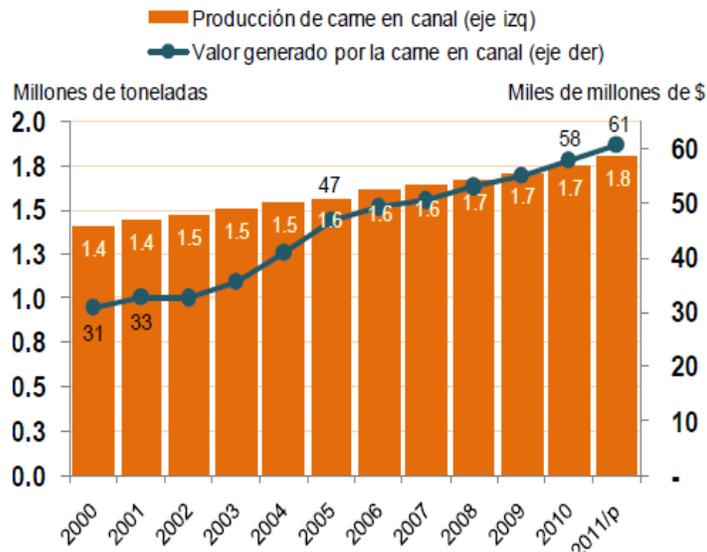


Fig. 3. Producción de carne de bovino en canal (Financiera rural, 2012).

Ingeniería en Alimentos

Veracruz, Jalisco, Chiapas, Chihuahua, Baja California, Sinaloa y Sonora aportan en su conjunto el 51.7% de la carne de bovino producida en México. El 48.3% adicional se divide en prácticamente todas las entidades del país (Fig. 4) (Financiera rural, 2012).

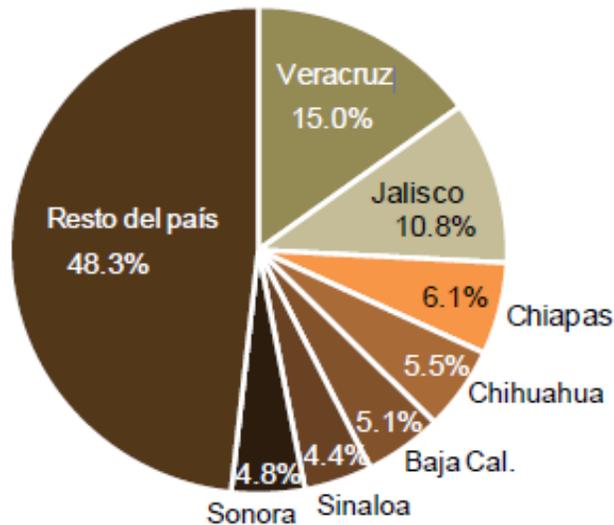


Fig. 4. Principales estados productores de carne de bovino en canal en México (Financiera rural, 2012).

En cuanto al comercio exterior, nuestro país es exportador neto en el rubro de comercio de carne congelada. El superávit alcanzó las 42 mil toneladas en el año 2011, con un valor de 183 millones de dólares. Durante los años 2005 a 2011, las exportaciones se han incrementado a un ritmo anual de 36% tanto en términos de valor como de volumen. Alcanzando el último año indicado 48 mil toneladas en el año 2011, con un valor de 212 millones de dólares. Las exportaciones mexicanas de carne congelada de bovino se destinaron, en términos de valor, en un 52% a Rusia, en un 29% a Japón, en un 8% a Corea, en un 5% a Estados Unidos, 5% a Angola y el restante 1% a ocho países más.

1.3.2. En el mundo

La carne de res es la tercera más producida en el mundo después de la carne de porcino y pollo. Participa con el 22% de la producción total entre otros tipos de carne. Los principales países productores de carne de bovino en el mundo son: Estados Unidos (19.3%), Brasil (11.2%), China (10.0%), Argentina (4.2%), Australia (3.4%) y en el sexto lugar México (2.8%) (Fig. 5) (Financiera rural, 2012).

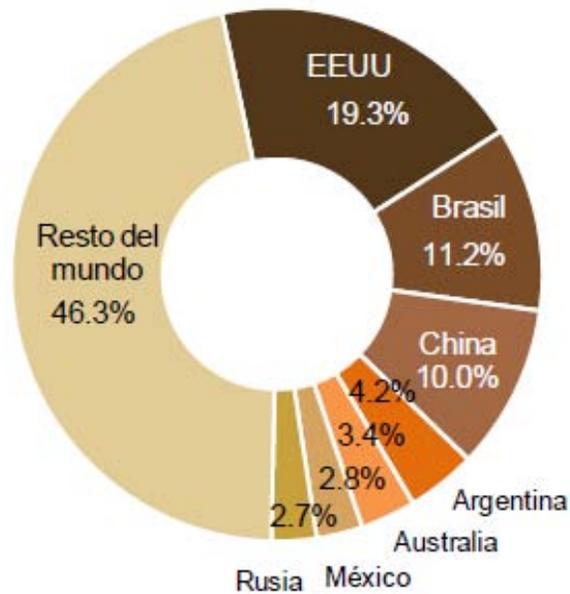


Fig. 5. Principales países productores de carne de bovino en el mundo (Financiera rural, 2012).

Se estima que en 2011 las exportaciones alcanzaron 1.8 millones de toneladas en México con un valor de 8,064 millones de dólares (mdd), mientras que en 2010 alcanzaron un valor de 1.74 y 1.7mdd en 2009, lo que indica un incremento anual de alrededor del 3 %, lo que indica un auge en las exportaciones pues dicho valor ha ido en crecimiento desde el 2002 (Cuadro 2). El 52% del volumen de exportaciones se conforma por cinco países: Alemania (15%), Francia (11%), Polonia (11%), Países Bajos (8%) y Bielorrusia (7%). En tanto, el 56% del volumen de importaciones se conforma por Italia (19%), Rusia (12%), Países Bajos (11%), Francia (8%) y Alemania (6%) (Financiera rural, 2012).

Cuadro 2. Volumen de la producción de carne de bovino mundial. Fuente: FAO, 2013.

Miles de toneladas

País	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Alemania	1 193	1 186	1 199	1 190	1 205	1 170
Argentina	3 034	3 224	3 132	3 378	2 630	2 420
Australia	2 077	2 226	2 132	2 124	2 108	2 110
Brasil	9 020	9 303	9 024	9 395	9 115	9 030
Canadá	1 327	1 279	1 288	1 252	1 272	1 154
China	5 499	5 846	5 841	6 060	6 244	6 182
Colombia	827	856	917	936	930	940
España	670	620	658	598	607	604
Estados Unidos de América	11 863	11 979	12 163	11 891	12 046	11 988
Federación Rusa	1 705	1 690	1 769	1 741	1 727	1 625
Francia	1 473	1 532	1 503	1 516	1 530	1 502
Holanda (Países Bajos)	384	386	378	402	389	382
Irán	356	372	269	247	222	235
Italia	1 109	1 119	1 057	1 049	1 059	1 000
Japón	497	504	520	517	515	500
México	1 613	1 635	1 667	1 705	1 745	1 804
Nigeria	284	287	294	298	302	338
Nueva Zelanda	643	632	635	637	635	623
Polonia	383	380	393	397	401	395
Reino Unido	847	882	862	833	908	936
Sudáfrica	804	805	783	771	848	829
Ex Sudán	1 163	1 169	1 237	1 252	1 255	0
Turquía	341	432	371	325	619	645
Uruguay	600	523	527	491	524	479
Venezuela	516	481	483	482	492	494

Nota: Las cifras corresponden a carne de vaca y ternera únicamente. Los datos se refieren a animales sacrificados en los países, independientemente del origen, así como a la producción total de carne, tanto la comercial como la privada, y se expresan en peso de la canal preparada, excluidos los despojos y grasas de matadero. Para 2009 se incluyen datos estimados.

1.4. Características de la carne asociadas con su calidad

En la calidad de la carne influye una variadísima gama de factores, como son la raza del animal, selección genética de que ha sido objeto, cruces, manejo de la explotación, alimentación, transporte al matadero, inyección de enzimas proteolíticas previas al sacrificio, estimulación eléctrica, sangrado, congelación, tenderización, distribución de las canales y preparación culinaria (López, 1991).

El proceso bioquímico posterior a la muerte lleva a la transformación gradual del músculo de la carne. Este proceso se puede dividir en tres etapas, 1) *pre – rigor* caracterizado por que el músculo es aun elástico, 2) *rigor mortis* y 3) resolución. El tiempo en que ocurren dependen de la especie animal y del método de sacrificio. La calidad de la

carne depende de las condiciones *ante mortem* y del manejo *post mortem* (Guerrero, 2006). A continuación se describe detalladamente cada una de las tres etapas anteriormente mencionadas.

1.4.1. *Pre - rigor*

Al eliminar la sangre del animal en el sacrificio, la fuente de oxígeno se agota al cesar la respiración, por lo que la única fuente de oxígeno para soportar el metabolismo aerobio es aquel que se encuentra unido a la mioglobina. Posteriormente cuando el oxígeno se agota el tejido muscular adopta un metabolismo anaerobio, siendo la glucólisis la única vía para obtener energía, por lo que disminuyen las reservas de glucógeno y el ácido láctico se acumula en el tejido muscular, lo que reduce el pH de 7 hasta 5.3 a 5.7, según la especie y el manejo anterior al sacrificio. Lo anterior provoca un fallo en los reguladores de temperatura controlados por el hipotálamo, debido a que el mecanismo por el cual el calor se distribuye uniformemente por el cuerpo es la sangre y al dejar esta de circular, ya no hay distribución del calor ni acciones reguladoras como la sudoración o el escalofrío. Entonces se da una rápida acidificación cuando la temperatura corporal es aun elevada provocando la desnaturalización de las proteínas, la reducción de la solubilidad y la disminución de la retención de agua (Guerrero, 2006).

1.4.2. *Rigor mortis*

Posterior a la muerte, se pierde el control nervioso, por lo que se inician rápidos ciclos de contracción y relajación muscular. El rigor mortis se presenta poco después de la muerte donde el tejido muscular se encuentra en un estado de rigidez sostenida y es inextensible. El desarrollo de la glucólisis anaerobia y producción de ácido láctico se acompaña también de la reducción de las reservas fosfato de creatina que disminuyen gradualmente para la refosforilación de ADP a ATP. El ciclo de contracción relajación se detiene por la falla en los mecanismos que sintetizan el ATP, por lo que la elasticidad muscular se pierde paulatinamente hasta llegar a un estado de contracción sostenida por la formación irreversible del complejo de actomiosina (Moreno, 2006). La proteína contráctil actomiosina, está compuesta de actina, miosina y del complejo tropomiosina – troponina. La miosina tiene capacidad ATPasa e hidroliza por lo tanto el ATP en ADP y fosfato, con la consiguiente energía para la contracción muscular. La miosina ATPasa, es activada gradualmente con el descenso del pH acelerando la hidrolisis de ATP. La acción ATPasa de

esta proteína es activada por la actina y por la presencia de iones calcio. A su vez la troponina impide la contracción, pero su efecto es inhibido por los iones calcio que son liberados por el retículo sarcoplasmático, resultado de un estímulo nervioso. Por lo tanto, la relajación se inicia ante la reducción de la concentración de los iones calcio. De esta forma la troponina deja de ser inhibida y la miosina ATPasa es desactivada (Prandl, 1994).

1.4.3. Resolución de la rigidez cadavérica

La etapa posterior al *rigor mortis* es la resolución donde el tejido muscular recupera cierta elasticidad debido a la pérdida de la integridad del tejido, mejorando la textura y formando compuestos precursores del aroma de la carne. El aumento de la suavidad se debe a la degradación de proteínas (Guerrero, 2006).

En la Figura 6 se muestra un resumen de los cambios que sufre el animal durante las tres etapas posteriores a la muerte, para transformar el músculo en carne.

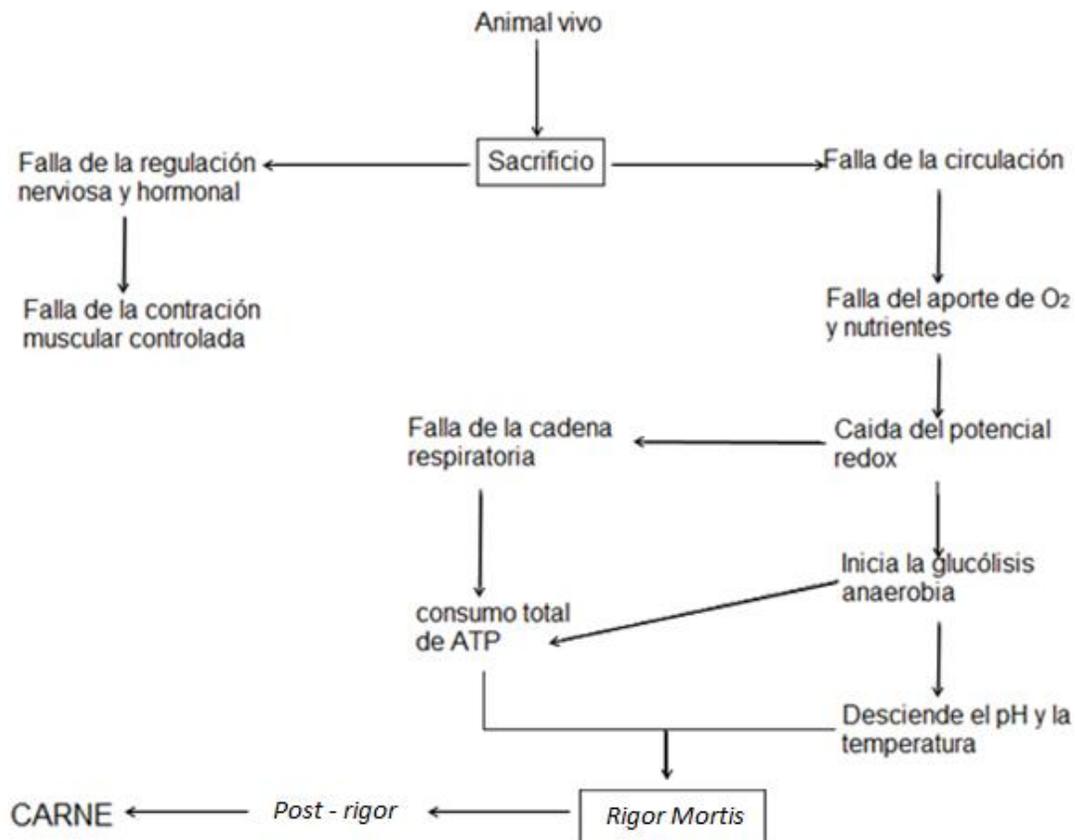


Fig. 6. Principales cambios en el músculo después de la muerte (Guerrero, 2006).

1.5. Características organolépticas

Las características organolépticas son el conjunto de propiedades perceptibles por los sentidos que demandan y cuantifican los consumidores directamente. Las características organolépticas más importantes son el color, la terneza, la jugosidad, el aroma, la textura y el aspecto (López, 1991), las cuales son descritas a continuación.

1.5.1. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) del músculo es una característica importante que afecta a la apariencia de la carne antes, durante y después de la cocción, su impresión de jugosidad y su succulencia en el curso de su masticación (Amo, 1980).

De ella dependen otras características tales como color, terneza y jugosidad. Determina las pérdidas de peso en los procesos de transformación y la calidad de los productos obtenidos. Se define como la propiedad de una proteína cárnica para retener el agua tanto propia como añadida, cuando se somete a un proceso de elaboración (López, 1991).

1.5.2. Terneza de la carne

La terneza de la carne es la cualidad física de ésta de dejarse cortar, trinchar, penetrar y masticar fácilmente. El contenido de colágeno del tejido conjuntivo que rodea al músculo, influye sobre la terneza de la carne (Amo, 1980), siendo más dura cuando más abundante es en colágeno, también influye la cantidad de grasa, a mayor contenido de grasa, más tierna es (López, 1991).

1.5.3. Jugosidad

La jugosidad viene dada por el grado de infiltración de grasa, que evita la sequedad de la carne. La jugosidad, junto con la terneza o ternura, determinan la textura de la carne (Medina et al., 2007).

1.5.4. Color de la carne

El color de la carne está en función de la concentración de cromóforo y de la estructura de la superficie reflectante. El cromóforo del músculo es la mioglobina, presente en concentraciones variables (Amo, 1980). La coloración va asociada al sabor de la carne. La carne muy pálida puede considerarse insípida, y la oscura demasiado sávida (López, 1991), es por ello que los consumidores observan esta característica antes de su elección.

1.5.5. Aroma

El aroma de la carne puede ser considerado como función de cuatro elementos: las fracciones no volátiles y las fracciones volátiles de las carnes crudas y las mismas correspondientes a las carnes cocidas. Los componentes interesantes de la carne cruda incluyen los precursores del aroma que pueden ser ellos mismos no aromáticos, mientras no sufran la acción del calor en la cocción. Los productos aromáticos específicos de cada especie, van seguramente asociados a los compuestos volátiles derivados de los lípidos (Amo, 1980).

Los factores que afectan la calidad de la carne se dividen en tres grupos:

- a) Factores intrínsecos del animal:
 - a. Raza.
 - b. Sexo.
 - c. Alimentación.
- b) Condiciones *Pre mortem*:
 - a. Ambiente o estresantes: cuanto más stress peor es la calidad de la carne.
 - b. Técnica de sacrificio.
- c) Condiciones *Post mortem*:
 - a. Velocidad del descenso del pH.
 - b. Velocidad de enfriamiento.
 - c. Higiene durante la manipulación (López. 1991).

1.6. Diferencia entre *Bos taurus* y *Bos indicus*

Todas las razas actuales de ganado vacuno son descendientes de un tipo ancestral, el Aurochs, que era el tipo prehistórico de vacuno de medio oriente, se calcula que actualmente existen unas 1000 razas de ganado vacuno. Entre estas 1000 razas existe una notable variación en el tamaño corporal, producción de leche, conformación muscular, adaptación al medio ambiente y calidad comestible de la carne de vacuno (Pond, 2006).

De acuerdo con la clasificación zoológica, los bovinos pertenecen a la clase mamíferos, subclase ungulados (previstos de pezuñas), orden artiodáctilos (con dedos pares

o animales de pezuña hundida), suborden rumiantes (poligástricos), familia bovinos (cuernos óseos huecos en su base y sin dientes incisivos superiores), al género *Bos* con dos subgéneros el *taurus* (ganado europeo) y el *indicus* (ganado tropical) (Castro, 2002).

Las diferencias entre los animales de los subgéneros *Bos taurus* y *Bos indicus* provienen de la adaptación a ambientes opuestos, con influencia polar y tropical respectivamente (Castro, 2002). Entre las principales diferencias se encuentran el pelo largo, la piel sin pigmentar, cuernos cortos, sin giba para los *Bos taurus* y pelo corto, piel pigmentada, cuernos largos, con giba para *Bos indicus* (Fig. 7) (Castro, 2002).

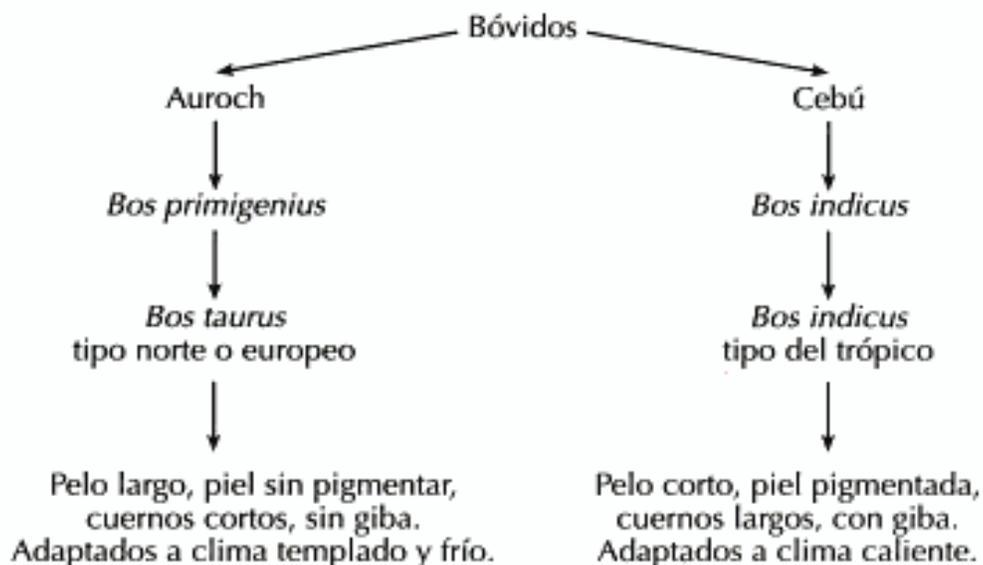


Fig. 7. Origen de los subgéneros *B. taurus* y *B. indicus* (Castro, 2002).

Todas las razas de ganado vacuno tienen determinados atributos que son únicos y deseables. De una manera amplia podemos agrupar las razas vacunas en británicas, continentales europeas, cebú, razas lecheras, o alguna combinación de estas. Entre los grupos británico y Continental Europeo existen algunas razas con un potencial lechero muy elevado. En general las razas británicas producen carne de vacuno tierna y son muy fértiles.

Las razas europeas continentales tienen un esqueleto de mayor tamaño y tienden a ser más magras y más musculadas que las razas británicas. Todas estas razas se clasifican como *Bos taurus* (Pond, 2006).

El *Bos taurus* (Fig. 8) constituye el grupo de razas europeas entre las que destacan las razas de carne Charolais, Angus, Hereford, las cuales se adaptan a las regiones templadas por excelencia (Castro, 2002).



Fig. 8. *Bos taurus*.

Los ejemplares vacuno Brahman son un ejemplo de *Bos indicus* o cebú (Fig. 9), las cuales son razas con joroba. Como grupo, las razas tipo cebú tienden a estar bien adaptadas a los ambientes tropicales, y son longevas. Los ejemplares *Bos indicus* tienden a alcanzar la pubertad más tarde que las razas británicas y europeas y producen carne que es menos tierna en promedio que la procedente de la mayoría de las razas *Bos taurus*. Algunas razas lecheras tienen una musculatura más ligera que las razas productoras de carne. Es importante recordar que entre la totalidad de los tipos de ganado vacuno pueden encontrarse animales que son genéticamente superiores e inferiores para caracteres específicos (Pond, 2006).

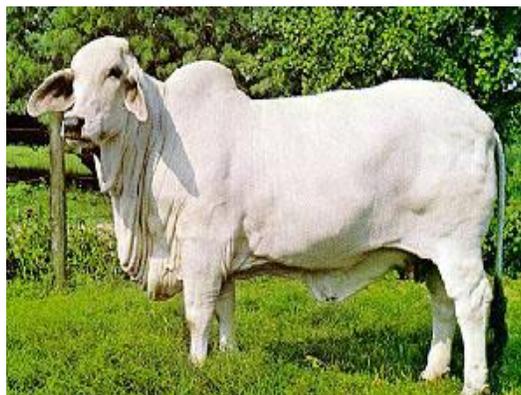


Fig. 9. *Bos indicus*.

Algunas investigaciones reportan que los valores promedios de resistencia al corte aumentan y las puntuaciones de medida del catador disminuyen en las carnes Cebuinas en comparación con las *Bos taurus*. Se ha descubierto que esta menor terneza de la carne cebuina es una manifestación de las propiedades metabólicas del musculo de razas *Bos indicus*. Se refiere a una menor actividad de las calpainas, proteasas responsables de la degradación de las proteínas estructurales de la carne (Blandino, 2005).

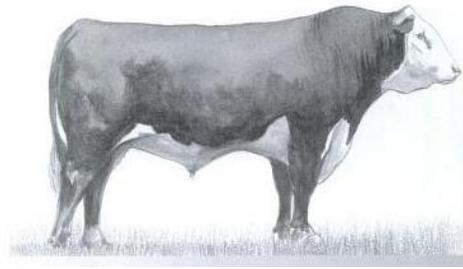
El *Bos indicus* constituye el grupo de las razas tropicales de carne tales como, Nelore, Guzerá, Gir, Brahman e Indobrasil, las cuales tienen mayor resistencia al calor, al ataque de insectos y a algunas enfermedades (Castro, 2002).

A continuación se muestran algunos ejemplos de razas tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* en los Cuadros 3 y 4:

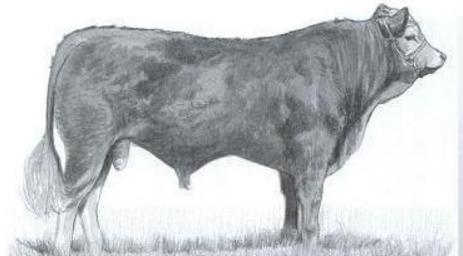
Cuadro 3. Ejemplos de razas *Bos Taurus*. Fuente: Castro, 2002.

Raza	
Charolais	
Angus	

Hereford



Limousin



Simmental



Chianina



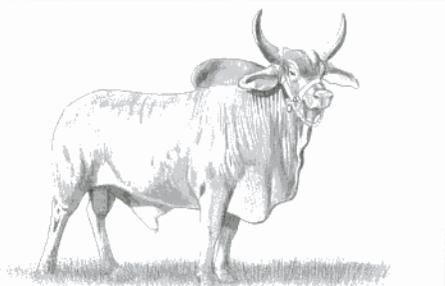
Cuadro 4. Ejemplos de razas *Bos indicus*. Fuente: Castro 2002.

Raza

Nelore



Guzerá



Gir



Brahman



Indobrasil



Capítulo 2. Generalidades de genética

2.1. Exones e intrones

Los genes eucariontes están formados por segmentos de ADN codificantes y no codificantes, llamados exones e intrones respectivamente (Aldridge, 1999). El ADN de un gen es más largo que su correspondiente ARNm debido a que este último se forma de los pares de bases que hibridan. En una primera mirada parecería una carga innecesaria acarrear ADN sin una función evidente dentro de un gen, sin embargo se ha reconocido que este tiene varias ventajas evolutivas (Passarge, 2004).

2.2. Mutaciones

Los cambios en las secuencias de bases del ADN se llaman mutaciones (Audesirk, 2004). El ADN codificante y su correspondiente polipéptido son colineales, una alteración (mutación) de la secuencia de bases del ADN puede dar lugar a un codón diferente. Un codón es una secuencia de tres bases de ADN y este codifica un aminoácido. Por lo tanto una mutación puede dar lugar a la incorporación de otro aminoácido, dependiendo de cómo se altere el codón correspondiente (Passarge, 2004).

2.2.1. Tipos de mutaciones

Hay tres tipos de mutaciones que involucran a un nucleótido, las mutaciones puntuales que consisten en la sustitución o intercambio del nucleótido, la delección que es la pérdida de un nucleótido y la inserción que es la adición de un nucleótido (Fig. 10). Hay dos tipos de sustituciones, la transición que es el intercambio de una purina por otra o de una pirimidina por otra, y la transversión que es el intercambio de una purina por una pirimidina o viceversa. En este tipo de mutaciones las consecuencias dependen de cómo se haya alterado el codón, por ejemplo, una sustitución puede alterar el codón de modo que se presente un aminoácido incorrecto, pero sin presentar cambios en el marco de lectura (Passarge, 2004).

Por otra parte una delección o una inserción causan un corrimiento del marco de lectura, lo que puede provocar que las secuencias siguientes no codifiquen un producto

génico funcional (Passarge, 2004). Una mutación de este tipo ocasiona la interrupción de la colinealidad habitual existente entre los codones del DNA y la secuencia aminoácida del polipéptido que codifica. La disrupción se inicia en el sitio en el que se ha producido la ganancia o la pérdida de una base, ya que a partir de este punto tendrá lugar un desplazamiento en la pauta de lectura del ADN. En consecuencia, el producto polipeptídico tendrá la secuencia aminoácida correcta hasta el lugar de la mutación, pero a partir de este poseerá una secuencia aminoácida falseada, totalmente distinta (Lehninger et al., 1991).

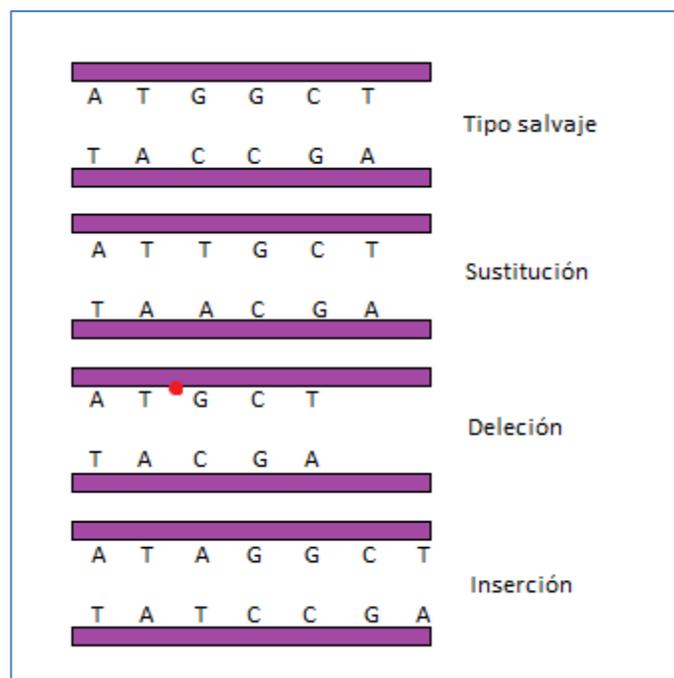


Fig. 8. Tipos de polimorfismos (Passarge, 2004).

2.3. SNP (single nucleotide polymorphism)

El caso conceptualmente más simple es aquel en el que el polimorfismo se manifiesta en forma de nucleótidos alternativos en una cierta posición del genoma, se habla del polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (acrónimo inglés de single nucleotide polymorphism; coloquialmente, “snip”) (Luque y Herraéz, 2002).

El SNP es comúnmente referido como diferencias de una sola base en el ADN entre individuos. Un polimorfismo es una mutación que se encuentra ampliamente repartida en la población (Jiménez, 2003).

Como cualquiera de los cuatro nucleótidos podría estar presente en cualquier posición del genoma, cabría imaginar que cada SNP debería tener cuatro alelos (un alelo es uno de un grupo de formas alternativas de un gen, en una célula diploide cada gen tendría dos alelos). Si bien esto es posible en teoría, en la práctica la mayoría de los SNP existen solo en dos variantes. Esto se debe a que cada SNP se origina cuando ocurre una mutación puntiforme en un genoma, que convierte un nucleótido en otro. Si la mutación afecta las células reproductoras de un individuo, uno o más de sus descendientes podrían heredar la mutación y, después de muchas generaciones, el SNP puede quedar establecido en la población. Pero hay dos alelos: la secuencia original y la versión mutada. Para que surja un tercer alelo, debe tener lugar una nueva mutación en la misma posición del genoma de otro individuo, y éste y su descendencia se deben reproducir de manera tal que el nuevo alelo quede establecido. Este cuadro no es imposible, pero es improbable: en consecuencia, la mayoría de los SNP son bialélicos. En la mayoría de los eucariontes, por lo menos uno por cada 10kb de ADN tiene un SNP. Por lo tanto, los SNP permiten construir mapas muy detallados del genoma (Brown, 2008).

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método que permite clonar fragmento de ADN sin utilizar células, es rápido y sensible. También es estándar. Es un procedimiento *in vitro* para amplificar secuencias definidas de ADN blanco. Además de que permite amplificar fragmentos de ADN mil millones de veces en unas pocas horas. Puede utilizarse con cantidades extremadamente pequeñas de ADN original, incluso una sola molécula (Pierce, 2010). La amplificación selectiva requiere alguna información previa de las secuencias que flanquean el ADN blanco, sobre esta información se diseñan dos oligosacáridos cebadores (primers) de alrededor de 15 a 25 pares de bases de longitud (Maldonado y Jiménez, 1998).

El objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirecta de un ARN (en este caso a través de su ADN complementario, o ADNc), presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de

la muestra integra original. Se puede partir de homogenizados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras de la extracción y aislamiento del ADN, etc., sin embargo, es indispensable conocer una parte de la secuencia de la región de ADN o ARN que se quiere amplificar (Luque y Herraéz, 1997).

El mecanismo es básicamente el utilizado por las células durante la replicación; la desnaturalización capacita a la enzima polimerasa a generar una copia complementaria a la hebra de ADN parental a partir de deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en solución (Walker y Gingold, 1997).

La PCR no es una técnica analítica, es más bien una metodología, resultante de la aplicación de tres conceptos:

- a) Desnaturalización: calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante un incubación breve (Luque y Herraéz, 1997), a alrededor de 93°C a 95°C (Passarge, 2004), generalmente durante unos 5 minutos (Lehninger et al., 1991).
- b) Hibridación o templado del cebador: a unos 50°C – 70°C, dependiendo de la temperatura de fusión esperada de los primers (Passarge, 2004), o la denominada temperatura de hibridación, a la que los cebadores se unen al ADN de cadena sencilla. Los cebadores son complementarios a las secuencias que flanquean en ADN diana a copiar. Los cebadores sirven de punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN diana (Lehninger et al., 1991).
- c) Elongación o replicación: etapa de amplificación a unos 70°C – 75°C (Passarge, 2004), en la que el ADN polimerasa termoestable (Tag polimerasa) elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales, la replicación ocurre en dirección 5' a 3' a partir del extremo –OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización (Luque y Herraéz, 1997). La polimerasa Tag extiende los cebadores añadiendo nucleótidos en dirección 5' - 3', haciendo una copia doble de la cadena diana (Lehninger et al., 1991).

En la primera etapa, la diana que se pretende amplificar es la secuencia que comprende entre los dos cebadores, una parte de una molécula de ADN mayor (Luque y Herraéz, 1997).

La PCR es una reacción en cadena por que las cadenas nuevas de ADN sintetizadas actúan como molde para la posterior síntesis de ADN en los 25 a 35 ciclos subsecuentes (Fig. 11), al final hay al menos 10^5 copias de la secuencia específica. La cual se puede visualizar como una banda distintiva de un tamaño específico luego de una electroforesis en gel (Passarge, 2004).

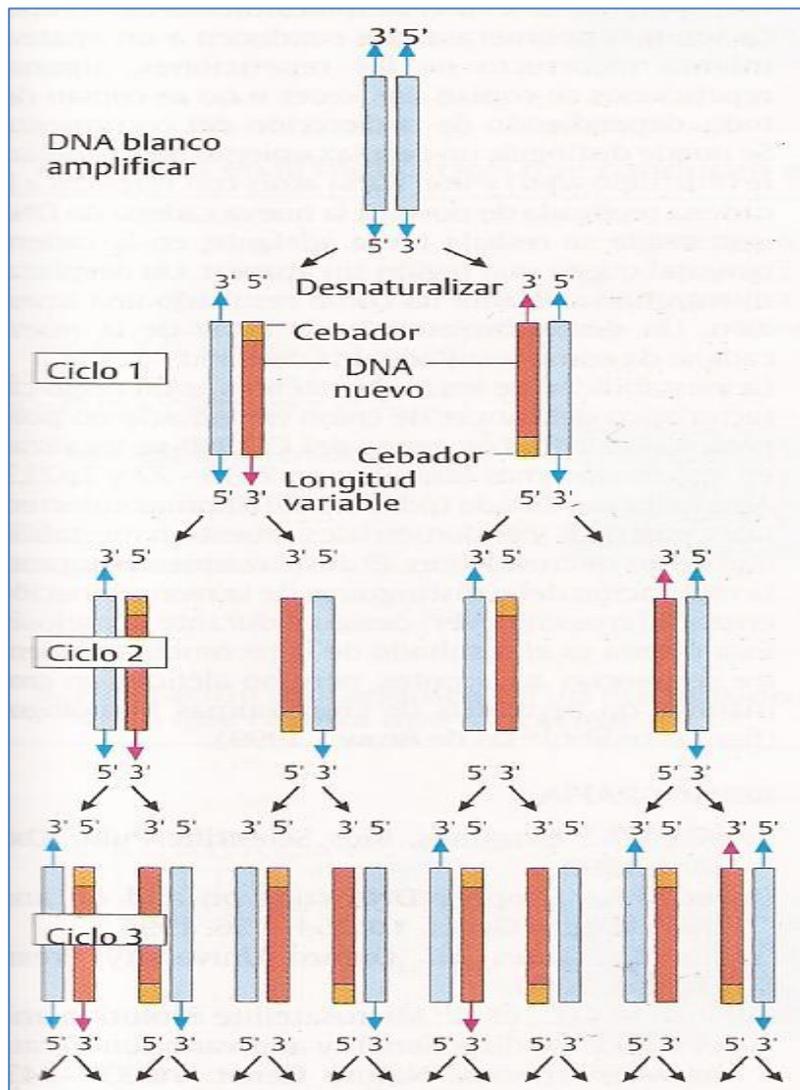


Fig. 9. Etapas de la PCR (Passarge, 2004).

Además de las 3 etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos (Fig. 12). La previa, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización), sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas (caso de un ADN genómico completo). La etapa final por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos (Luque y Herraéz, 1997).

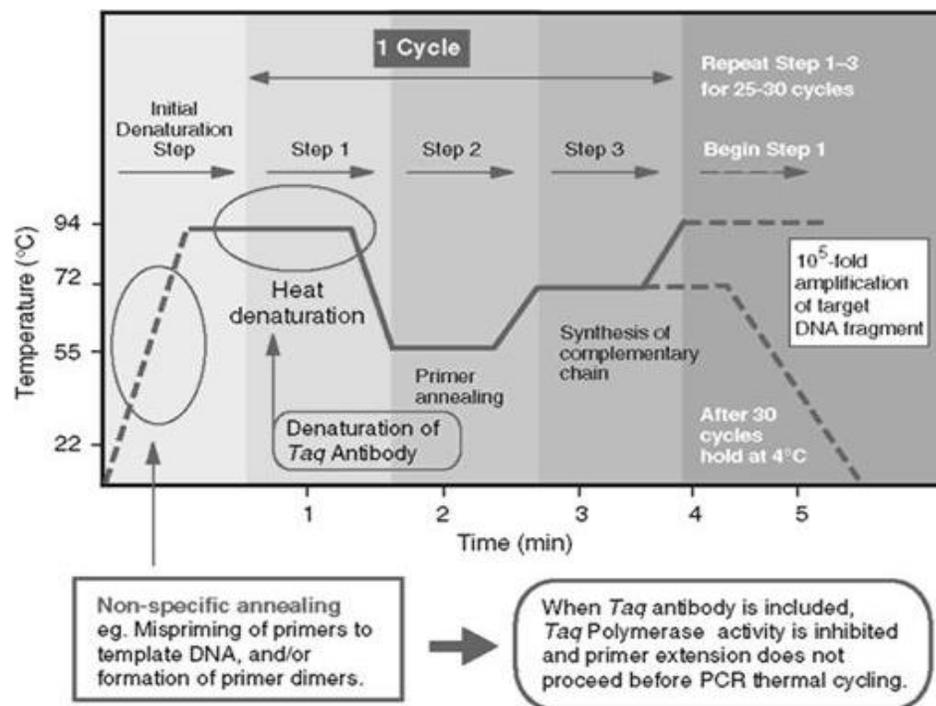


Fig. 10. Condiciones (tiempo-Temperatura) de las etapas de la PCR (Luque y Herraéz, 1997).

Este proceso está automatizado y lo realiza una máquina llamada termociclador, que se puede programar para que realice un número predeterminado de ciclos (Lehninger et al., 1991).

2.4.1. Característica de la PCR

Rendimiento: puesto que los productos de cada ciclo sirven de molde para el siguiente, la acumulación de copias (tanto totales como dianas) es exponencial en vez de lineal. Sin embargo, en la práctica el rendimiento de cada etapa no es completo, por lo que las cifras se ven algo reducidas. A pesar de ello, siguen siendo muy elevadas. El número de copias al final de los ciclos realizados se puede calcular como:

$$N = N_0(1 + R)^x$$

Dónde:

N = número de copias obtenidas

N₀ = número de moléculas iniciales

R = rendimiento de cada ciclo (generalmente, de 70 a 85%), expresado en tanto por uno (0.70-0.85)

x = número de ciclos (Luque y Herraéz, 1997).

Duración: la duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos debe optimizarse. Dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar (Luque y Herraéz, 1997).

Especificidad: es muy elevada. Esta determinada especialmente por la secuencia de cebadores utilizados y por las condiciones de templado. Se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados: la aparición de una banda única indica que la técnica es específica (Luque y Herraéz, 1997).

Capacidad de detección: es muy alta, tanto que la PCR puede permitir detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra. Sin embargo, esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra.

Fidelidad: es decir, la capacidad de copiar secuencias con precisión, sin inducir mutaciones (cambios en la cadena de nucleótidos) (Luque y Herraéz, 1997).

2.4.2. Ventajas

La clonación de ADN basada en la PCR presenta diversas ventajas respecto a la clonación basada en células. La PCR es rápida y puede realizarse en unas pocas horas, en vez de días, como la clonación basada en células. Además, el diseño de los cebadores para la PCR se hace automáticamente con un programa de ordenador, y la síntesis comercial de oligonucleótidos también es rápida y económica (Lehninger et al., 1991).

La PCR es muy sensible, y amplifica secuencias específicas de ADN a partir de pequeñas muestras de ADN prácticamente indetectables, incluyendo el ADN de una sola célula. Otra ventaja es que no necesita ADN intacto (Yen et al., 2001), pueden utilizarse muestras de ADN que están parcialmente degradadas, que se encuentran mezcladas con otros materiales, o que están incluidas en un medio (como el ámbar), lo que sería difícil o imposible con las técnicas de clonación convencionales (Lehninger et al., 1991).

2.4.3. Limitaciones de la PCR

Aunque la PCR es una técnica muy valiosa, también tiene sus limitaciones: se debe disponer de alguna información sobre la secuencia de nucleótidos del ADN diana. La segunda desventaja potencial de este método es la amplificación de los falsos positivos debido a contaminación (Tatti, 2008). Cualquier contaminación de la muestra con otras fuentes, por pequeña que esta sea, puede causar problemas, lo que dificulta la obtención de resultados precisos. Las reacciones de PCR siempre deben realizarse en paralelo con controles adecuados cuidadosamente diseñados (Lehninger et al., 1991).

2.4.4. Aplicaciones de la PCR

Secuenciación: una de las razones más comunes para el uso del PCR es la generación de suficiente ADN molde para su secuenciación. Es mucho más rápido y sencillo que el clonaje, y la amplificación y secuenciación pueden realizarse en una única operación continua si se desea. Los productos lineales de PCR realinearán brevemente después de la desnaturalización, lo cual inhibe la unión de los cebadores de secuenciación (Walker y Gingold, 1997). La PCR se utiliza para proporcionar grandes cantidades de cualquier gen a partir de pequeñas cantidades de ADN para uso en diversos estudios (Alberts et al., 2006).

Manipulación genética y estudios de expresión: los cebadores de oligonucleótidos no necesitan ser complementarios al ADN molde en sus extremo 5' para que suceda la síntesis durante una PCR. Esta propiedad suministra al biólogo molecular con una vía conveniente de alterar un fragmento de ADN y estudiar los efectos que proceden. También puede ser útil para el estudio de ARN mensajero generados por expresión génica (Walker y Gingold, 1997).

La PCR y sus variantes tienen muchas otras aplicaciones. Identifica rápidamente variaciones en las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, así como también variaciones en el número de repeticiones de secuencias de ADN repetidas en tándem, que pueden usarse como marcadores genéticos en estudios de cartografía genética. Los cebadores específicos del alelo proporcionan una manera de rastrear mutaciones en el ADN genómico, lo que permite determinar con rapidez la naturaleza de una mutación. Se pueden diseñar cebadores que distingan entre dos secuencias diana que se diferencien en un solo nucleótido. El uso de cebadores aleatorios permite amplificar ADN de manera indiscriminada, lo que es ventajoso para explorar regiones no caracterizadas adyacentes a regiones conocidas (Lehninger et al., 1991). También se utiliza para identificar especies en productos alimenticios, detección de alimentos transgénicos y hacer pruebas de paternidad.

2.5. Electroforesis

Dado que muchas proteínas o ácidos nucleicos de tamaño y forma diferentes tienen relaciones de carga y masas casi idénticas, la separación por electroforesis de estas macromoléculas en solución es muy escasa o nula. No obstante es posible lograr la separación de proteínas y ácidos nucleicos mediante la electroforesis en distintos geles (suspensiones semisólidas en agua) en lugar de hacerlo en soluciones líquidas (Lodish, 2006).

Esta técnica usa en gel como tamiz molecular para separar los ácidos nucleicos o las proteínas en función de su tamaño, su carga eléctrica y otras propiedades físicas. Como las moléculas de ácidos nucleicos poseen cargas negativas en sus grupos fosfato, en un campo eléctrico viajan hacia el electrodo positivo. A medida que se mueven, la mayor parte de las

fibras poliméricas obstruyen el paso de las moléculas más largas en mayor medida que el de las moléculas más cortas y, de esta manera, las separa de acuerdo con su longitud. Por tanto la electroforesis en gel separa una mezcla de moléculas de ADN lineal en bandas, cada una formada por moléculas de ADN de diferente longitud (Campbell y Reece, 2005). Los geles más utilizados son poliacrilamida y agarosa (Voet y Voet, 2006). La poliacrilamida es corrientemente el medio de soporte más efectivo para la electroforesis de proteínas y pequeñas moléculas de ARN. Para los ácidos nucleicos de mayor tamaño, es mejor utilizar los geles de agarosa (Freifelder, 2003).

En la técnica de la electroforesis cada muestra que está formada por una mezcla de moléculas de ADN se coloca en un carril separado cerca de un extremo de una lámina delgada de gel. El gel se sostiene entre placas de vidrio sumergido en una solución acuosa, y posee electrodos adheridos en cada extremo (Fig. 13) (Campbell y Reece, 2005).

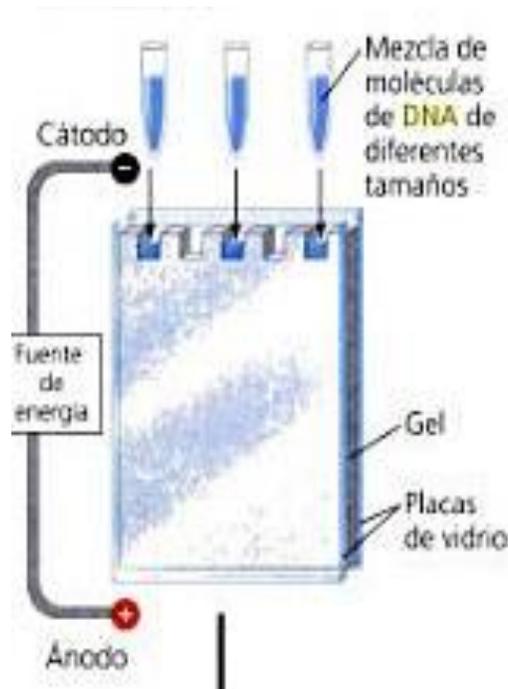


Fig. 11. Carga del gel de electroforesis (Campbell y Reece, 2005).

Cuando se activa la corriente, las moléculas de ADN con carga negativa se mueven hacia el electrodo positivo y las moléculas más cortas se mueven con mayor rapidez que las más largas (Fig. 14) (Campbell y Reece, 2005).

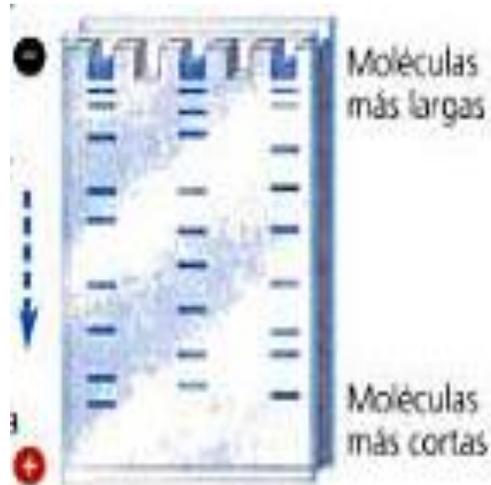


Fig. 13. Recorrido de la muestra en el gel de electroforesis (Campbell y Reece, 2005).

Después de desactivar la corriente se agrega un colorante de unión al ADN. Este colorante es de color rosa fluorescente bajo luz ultravioleta y de esta manera revela las bandas a las que se unió. En este gel verdadero, las bandas de color rosa reflejan los fragmentos de ADN con diferentes longitudes separados por electroforesis (Fig. 15). Si todas las muestras se cortan en el momento inicial con la misma enzima de restricción, los patrones de bandas diferentes indicaran que provienen de fuentes distintas (Campbell y Reece, 2005).

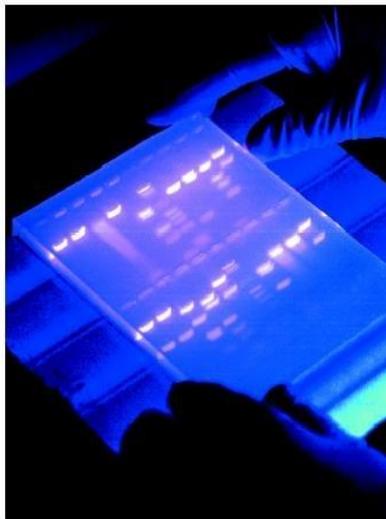


Fig. 12. Resultado de la electroforesis.

2.6. Técnicas para detectar polimorfismos

Para detectar las variaciones (polimorfismos) en la secuencia del genoma de distintos individuos se acude a distintas estrategias con enfoques característicos, o una combinación de ellas. En principio, la forma más directa de detectar un polimorfismo es la secuenciación del ADN, pero por su laboriosidad se suele acudir a otras técnicas, entre las que destaca el análisis RFLP (Luque y Herraéz, 2002).

2.6.1. Detección de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Este es uno de los primeros métodos desarrollados para la detección de polimorfismos, y el que más se ha empleado durante muchos años. Se basa en la detección de aquellas variaciones de la secuencia del ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción. Casi siempre la variación afecta a un solo nucleótido. Por lo tanto los fragmentos de restricción que se obtienen son diferentes dependiendo de qué alelo esté presente en la muestra; de ahí su nombre (restriction fragment length polymorphism) (Luque y Herraéz, 2002).

Se basa en la amplificación de un segmento de ADN y su exposición posterior a una enzima de restricción determinada. Una enzima de restricción (o endonucleasa de restricción) es una enzima que puede reconocer una secuencia determinada de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y córtalo en un punto concreto llamado sitio o diana de restricción, el cual depende de la enzima utilizada. Las enzimas de restricción reconocen secuencias entre 4 y 12 pares de bases. El corte del ADN se realiza rompiendo 2 enlaces fosfato en la doble hebra, dando lugar a dos fragmento (Bartrés y Faz, 2008).

Este método distingue fragmento de ADN de diferentes tamaños de una misma región que se pueden utilizar como marcadores para distinguir alelos (Passarge, 2004). Cada muestra de ADN generará múltiples fragmentos de longitud diferente en función de los sitios de restricción presentes (Herráez, 2012).

Con el fin de poder utilizar el método sobre cantidades pequeñas de muestras, es común realizar una amplificación previa por PCR; ello exige disponer de un par de cebadores específicos para secuencias que flaqueen la región polimórfica. En este caso, puede ser innecesario el uso de la hibridación, pues la cantidad de ADN es suficiente para

detectarlo en el gel con un método de tinción, y se podrá observar la diferencia en el patrón de fragmentación (Herráez, 2012).

Los RFLP se detectan separando los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel. En este procedimiento la mezcla de los fragmentos restricción de ADN se carga en una zona hendida o pozo del gel. Cuando se aplica una corriente eléctrica al gel los fragmentos de ADN que al tener carga negativa, se desplazan hacia el electrodo con carga positiva. En consecuencia los fragmentos más pequeños se desplazan con mayor rapidez y dejan atrás a los fragmentos más grandes. Al final los fragmentos de ADN quedan separados según su tamaño, formando bandas definidas en el gel (Audesirk et al., 2003).

En la Figura 16 se muestra que la región específica da ADN se amplifica con cebadores específicos. Tras la comprobación de que la amplificación ha sido correcta en un gel agarosa, se digiere el ADN amplificando con endonucleasas específicas de la región. En caso de tener el sitio específico de restricción, las muestras presentaran dos bandas de ADN digerido. En el caso de no poseerlo, se observará una única banda correspondiente al ADN sin digerir (Alonso, 2004).

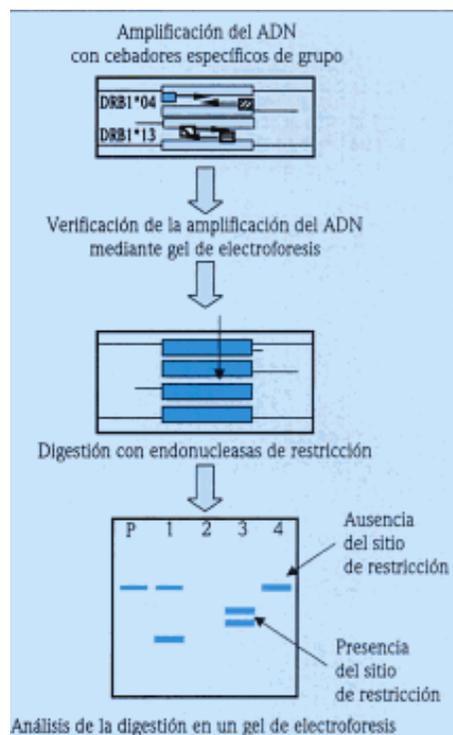


Fig. 14. RFLP (Herráez, 2012).

2.6.2. Otras formas de detectar polimorfismo SNP

Una vez conocido el nucleótido variable y la secuencia en la que está inmerso, se acude a otras técnicas para discernir cuál es la variante presente en la muestra. La mayor parte de los métodos que no dependen de la alteración de dianas de restricción, se basan en la técnica de hibridación o PCR “específicas de alelo”. Se trata de diseñar oligonucleótidos complementarios a cada una de los alelos (denominados oligonucleótidos específicos de alelo o ASO, allele specific oligonucleótides). Éstos pueden emplearse como sondas de hibridación o bien como cebadores de PCR (Herráez, 2012).

- Extensión del cebador: si se diseña un cebador cuyo extremo 3' coincide con el punto polimórfico, la ADN polimerasas en la PCR no lo elonga si su último nucleótido no empareja con el molde. En otras aproximaciones el cebador puede hibridar con un región común a ambos alelos y luego, empleando etiquetas marcadoras o incluso espectrometría de masas, se detecta que nucleótidos se incorporan cuando se elonga el cavador sobre la secuencia polimórfica (Herráez, 2012).
- Enzimas sensibles al desemparejamiento parcial: en algunas técnicas se tolera la hibridación imperfecta pero se aprovecha la selectividad de enzima, a parte de la propia ADN polimerasa, se han utilizado ligasas para unir dos oligonucleótidos hibridados en posición contigua, solo si están completamente emparejados, o también la endonucleasa FEN1, que es muy sensible a las bases desemparejadas (Herráez, 2012).
- Propiedades del ADN bicatenario: tanto la hibridación de una sonda como la elongación de cebadores mediante PCR generan moléculas bicatenarias. Se pueden detectar estas por la incorporación de intercalantes flourescentes (Herráez, 2012).
- SSCP (single strand conformation polymorphism, polimorfismo de conformación de moléculas monocatenarias): Otras técnicas aprovechan las diferentes propiedades derivadas del emparejamiento perfecto o imperfecto de las cadenas por ejemplo en esta técnica los productos de la PCR se desnaturalizan con alta temperatura y formaldehido, y luego se permite que renaturalicen mientras avanzan por un gel de electroforesis. El emparejamiento intracatenario que se genera es diferente como

consecuencia de la mutación y conduce a conformaciones alternativas que se separan en el gel (Herráez, 2012).

- TGGE (temperatura gradient gel electrophoresis, electroforesis en gel con gradiente de temperatura): aprovecha, así mismo, las diferencias de movilidad, en este caso resultantes de la desnaturalización gradual al avanzar por un gel cuya temperatura va aumentando. Las diferencias de secuencias entre alelos afecta a la temperatura de fusión del ADN, lo que se traduce en una movilidad diferente de las moléculas en el gel (Herráez, 2012).

2.7. Genes asociados con la calidad de la carne

Los caracteres que determinan la calidad de la carne son mayoritariamente de herencia cuantitativa, eso significa que actúan en su determinación muchos genes con efecto individual pequeño. Además, el ambiente influye sobre ellos de manera importante (Sica et al., 2011).

La tendencia actual es estudiar genes candidatos con el propósito de desarrollar marcadores moleculares que puedan asistir a la selección (Sica et al., 2011). A continuación se muestra una lista de algunos genes asociados con la calidad en la carne:

Cuadro 5. Genes asociados con la calidad de la carne.

Gen	Asociación con la calidad en la carne
CAPN1 (subunidad mayor de la μ -calpaína)	Asociado con la terneza (Smith et al., 2000).
PPAGC1A (coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos)	Asociado con efecto sobre contenido de grasa en leche bovina (Weikard et al., 2005) y tipo de fibra en cerdos (Sica et al., 2011).

Ingeniería en Alimentos

MC4R (receptor de melanocortina 4)	Se asocia con la profundidad de grasa dorsal ultrasónica, promedio diario, ganancia y consumo de alimento diario en los cerdos (Gill et al., 2010).
POU1F1 (clase POU 1 homeobox 1)	Asociado con el espesor de grasa, espesor de la grasa dorsal y el peso al nacer (Gill et al., 2010).
SST (Somatostatina)	Asociado con grado de marmoleo y altura en un año (Gill et al., 2010).
PRKAG3 (proteína quinasa , activada por AMP , gamma 3 subunidad no catalítica)	Asociado con la capacidad de retención de agua y su pérdida por cocción en los cerdos (Gill et al., 2010).
CRH (hormona liberadora de corticotropina)	Se ha asociado el espesor de la grasa subcutánea y el grado de marmoleo en carne de los bovinos (Gill et al., 2010).
GH (hormona del crecimiento)	Asociado con vetas de grasa y grasa de la cadera en el corral de Ganado de engorda (Gill et al., 2010).
POMC (Propiomelanocortina)	Asociado con el peso de la canal caliente (Gill et al., 2010).
PPARA (peroxisomas proliferatoractivated receptor alfa)	Se encuentra cerca de un QTL del cerdo asociado con grasa dorsal (Gill et al., 2010).
PGAM2 (fosfoglicerato mutasa 2)	Se ha asociado con la pérdida por goteo en los cerdos (Gill et al., 2010).
IGF2 (factor de crecimiento 2 similar a la insulina)	Asociado con él % de grasa en área del músculo y en el área de la costilla (Gill et al., 2010).

2.8. PPARGC1A (peroxysome proliferator - activated receptor - y coactivator - 1 α) y el polimorfismo

El gen del bovino PPARGC1A (coactivador 1 alfa del remorceptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos) es un gen candidato asociado con la calidad en la carne por que se encuentre en el cromosoma 6 (Fig. 17 y 18), que es la clave en el metabolismo de la energía, glucosa y grasa (Weikard et al., 2005).

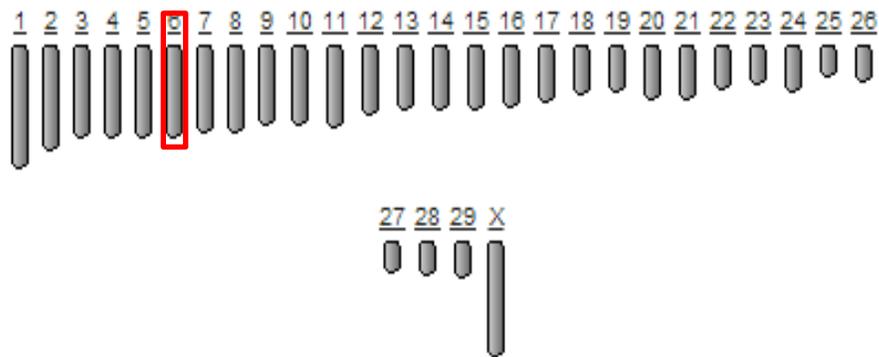


Fig. 15. Genoma bovino.

Tiene una similitud del 92 - 95% en su secuencia proteica con respecto a la secuencia del humano, el ratón y la rata, además está implicado en el desarrollo de la obesidad. En los bovinos está implicado en la síntesis de grasa de la leche, se cree que se relaciona con el metabolismo que se da en la lactancia. Y en el humano se relacionado con las concentraciones de insulina. (Weikard et al., 2005).

Su organización consiste en 13 exones que comprenden 6,324 pares de bases, además es expresado en diferentes niveles en un largo número de tejidos (Weikard et al., 2005).

En él se han identificado 11 polimorfismos, sin embargo solo el polimorfismo en el intron 9 (1892T>C) ha mostrado diferencias significativas en el contenido de grasa en la leche (Weikard et al., 2005).

Genomic context

Location: chromosome: 6

Sequence: Chromosome: 6; AC_000163.1 (44854113..45590824, complement)

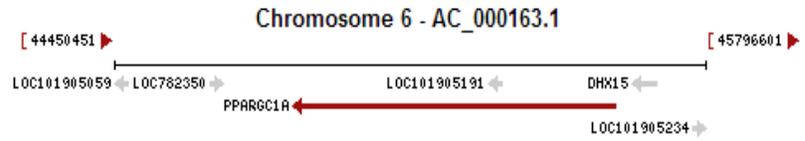


Fig. 16. Localización del gen PPARGC1A en el cromosoma 6.

Capítulo 3. Metodología experimental

3.1. Justificación

La carne de res es la segunda más producida en México y la tercera en el mundo, al ser uno de los tipos de carne más importantes nace la necesidad de hacer estudios sobre su calidad para satisfacer las necesidades del consumidor. Se sabe que las características de calidad de la carne están asociadas con los genes, así como con otros factores.

El gen PPARGC1A, es uno de los genes candidatos asociados con la calidad de la carne, y por otra parte se ha reportado que el polimorfismo 1892T>C en el intron 9 de dicho gen, está asociado con la síntesis de grasa.

El presente estudio permite evaluar la frecuencia del polimorfismo en los subgéneros *Bos taurus* y *Bos indicus*, lo cual es de gran importancia, para que el ganadero realice posteriores cruzas entre el ganado que aseguran la presencia del polimorfismo en la población, de esta manera, se podrá producir carne con las características deseadas, asociados con el polimorfismo.

3.2. Hipótesis

El polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A puede tener diferente presencia entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* que tienen diferente perfil en las características de su carne.

3.3. Objetivo general

Evaluar la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A por PCR RFLP en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*.

3.3.1. Objetivo particular 1

Establecer la zona de amplificación y los primers apropiados que permitan conocer la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Actividad 1

Evaluar la zona de amplificación y primers propuestos en trabajos previos que permitan utilizarlos o modificarlos en la presente experimentación.

Actividad 2

Definir la estrategia de amplificación que se empleara en el siguiente trabajo.

3.3.2. Objetivo particular 2

Aplicar la técnica de PCR en diferentes muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus* para la posterior detección del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A.

Actividad 1

Extracción del ADN de las muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Actividad 2

Amplificación de PCR en las muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Actividad 3

Electroforesis y visualización de los amplificadores mediante luz U. V.

3.3.3. Objetivo particular 3

Estimar la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A mediante RFLP.

Actividad 1

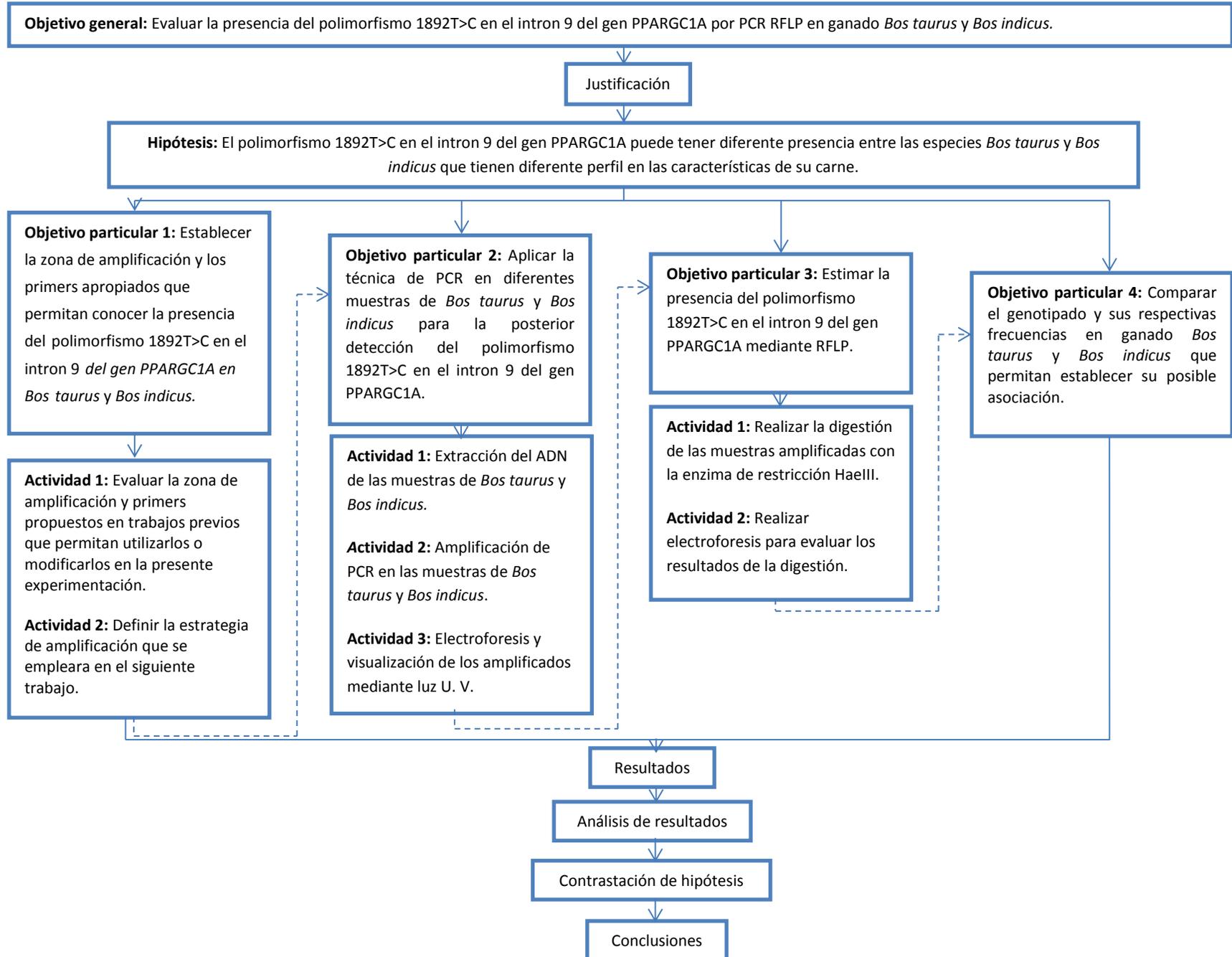
Realizar la digestión de las muestras amplificadas con la enzima de restricción HaeIII.

Actividad 2

Realizar electroforesis para evaluar los resultados de la digestión.

3.3.4. Objetivo particular 4

Comparar el genotipado y sus respectivas frecuencias en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* que permitan establecer su posible asociación.



3.5. Materiales y métodos

Para evaluar la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A, se utilizaron 20 toros: 10 de subgénero *taurus* y 10 de subgénero *indicus*. Todos con edades de entre 3 y 4 años y con sistema de crianza intensivo. De estos 20 toros se extrajo una porción del músculo tensor de la facia lata para su análisis en esta investigación. Todas las muestras fueron obtenidas del rastro de Tlalnepantla de Baz en el Estado de México. Para su conservación, todas las muestras fueron congeladas y mantenidas a una temperatura de -18°C.

3.5.1. Extracción de ADN

Para la disgregación del tejido se congeló la muestra utilizando nitrógeno líquido y posteriormente se molió. Se tomaron 0.125g de muestra a la cual se le agregó 1250µL de solución de lisis y 7µL de enzima Proteinasa k, para encubarla a 50°C en un Termoblok Thermomixer compact Eppendorf, por 2 horas y después a 60°C por 1 hora para desactivar la enzima.

Una vez disgregado el tejido se procedió a la extracción de proteínas y polisacáridos agregando 2500µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a la muestra y centrifugándola a 10,000rpm por 10 minutos. Al terminar la centrifugación, se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN.

Finalmente se precipitó el ADN añadiendo 1500µL de etanol y centrifugando a 10,000rpm durante 10 minutos. Posterior a la centrifugación, se decantó el etanol y se dejó secar el ADN a 37°C en el termoblok durante 1 hora. Después se le adicionó agua desionizada para resuspender el ADN.

3.5.2. Cuantificación de ADN por medio de absorbancia

Al cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se toman a 260 y 280nm. La lectura de 260nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50ng/µL de ADN de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos

nucleicos. Preparaciones puras de ADN tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8, por lo tanto no es posible cuantificar el ADN presente en la solución (Sambrook y Russel, 2001).

Para cuantificar el ADN se empleó un Nano espectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000, en el cual se agregó 2 μ L de muestra para realizar las lecturas pertinentes.

3.5.3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Antes de realizar la PCR, se hidrataron los primers en una proporción de 1:10 (Anexo 3). Una vez terminado lo anterior se procedió a la preparación de la muestra con las siguientes proporciones (Cuadro 6):

Cuadro 6. Proporciones por muestra.

Componente	Proporción
<i>Master mix</i>	12.5μL
<i>Agua libre de nucleasas</i>	10.5 μL
<i>Primer F</i>	0.5 μL
<i>Primer R</i>	0.5 μL
<i>ADN</i>	2 μL

Para realizar la reacción de PCR se utilizó un termociclador ATC 4011, Apollo Instrumentation, programado a las diferentes condiciones según la etapa de la reacción en turno y durante 30 ciclos.

3.5.4. Electroforesis

La electroforesis para evaluar el amplificado de la reacción de PCR se llevó a cabo en gel de agarosa al 3%.

El gel de agarosa se preparó pesando 1500mg de agarosa que se disolvió en 50mL de TAE 1X. Posteriormente se la agregó 1 gota de BRET. Después de colocó la muestra en el soporte del gel de la cámara de electroforesis. Una vez listo el gel, se colocó de manera correctamente en la cámara de electroforesis y se cubrió con TAE 1X.

Para cargar el gel se agregó en cada pocillo 3 μ L de BRET; 3 μ L de colorante blue/orange y 5 μ L de la muestra resultante de la PCR y 1 μ L de marcador de peso molecular invitrogen 100bp DNA Ladder en lugar de la muestra para el primer pocillo del gel.

Los geles de agarosa se corrieron a 60V durante 1 hora y 30 minutos en una cámara de electroforesis Apollo 75.10. Finalmente los geles se visualizaron en un transluminador de luz U.V.

3.5.5. Digestión con la enzima de corte

Para la digestión con la enzima de corte se prepararon 10 μ L de reacción, compuesta de 4.8 μ L de agua bidestilada, 1 μ L de buffer de la enzima Hae III, 0.2 μ L de la enzima de restricción HaeIII y 4 μ L de ADN producto de la PCR.

Las reacciones resultantes se colocaron en el Termociclador ATC 4011, Apollo Instrumentation a 37°C por 1 hora.

3.5.6. RFLP (Polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción)

La evaluación de los cortes resultantes de la digestión enzimática, fueron evaluados en geles de poliacrilamida al 10%, los cuales se prepararon agregando 2.33mL de acrilamida al 30%, 3.22mL de agua bidestilada, 1.4mL de TBE 5X, 0.049mL de APS y 2.45 μ L de TEMED, dando como resultado un total del 7mL de gel.

Para cargar el gel se agregó en cada pocillo 3 μ L de colorante blue/orange y 5 μ L de la muestra resultante de la digestión enzimática y 1.5 μ L de marcador de peso molecular

Ingeniería en Alimentos

invitrogen 100bp DNA Ladder en lugar de la muestra para el primer pocillo del gel. Los geles de poliacrilamida se corrieron a 80V durante 1 hora.

A continuación se presentan los fragmentos esperados después de la digestión enzimática:

- Ausencia del polimorfismo C/C: 19pb, 159pb.
- Presencia del polimorfismo T/T: 178pb.
- Individuo heterocigoto T/C o C/T: 19pb, 159pb y 178pb.

Capítulo 4. Resultados y discusión

Objetivo particular 1

Establecer la zona de amplificación y los primers apropiados que permitan conocer la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Los primers que se utilizaran durante la experimentación están reportados en una publicación previa (Weikard et al., 2005), para su identificación se hizo uso de la aplicación online “blast two sequences” (comparar dos secuencias), disponible en la página de NCBI.

La secuencia reportada no se encontró, por lo que se recurrió a la base de datos del GenBank y del programa bioinformático “sequencher”, la metodología que se realizó se encuentra en el Anexo 1 de la sección de anexos.

A continuación en el Cuadro 7, se muestran los primers que se utilizaron en la experimentación:

Cuadro 7. Primers para la experimentación.

Primer	Secuencia	No. De bases	Tamaño del amplificado
Frontal	AGGTAATGATGCACGTTGGC	20	178pb
Reverso	CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC	21	

Una vez establecidos los primers se calculó la temperatura de hibridación correspondiente (Anexo 2) y se realizó el programa de la PCR:

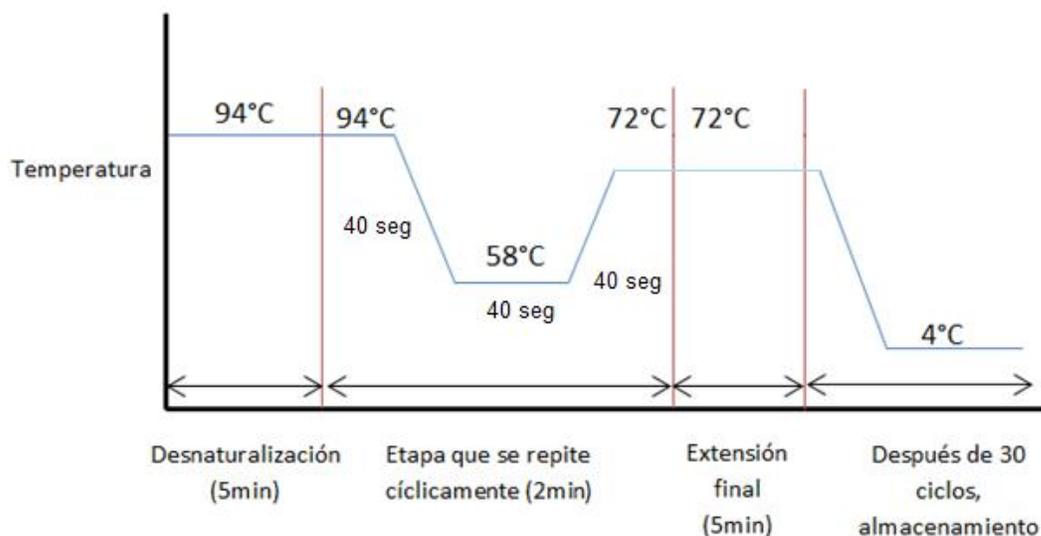


Fig. 17. Programa de la PCR con T_m calculada.

Posteriormente se llevó a cabo el programa de PCR de manera experimental, pero los resultados arrojados demostraron que a la T_m calculada no hay amplificado. Por esa razón se varió la temperatura de T_m obteniendo amplificado a 57°C y a 52°C, y obteniendo a 52°C una banda más visible.

Por lo tanto durante la posterior experimentación se realizó la PCR a las condiciones siguientes:

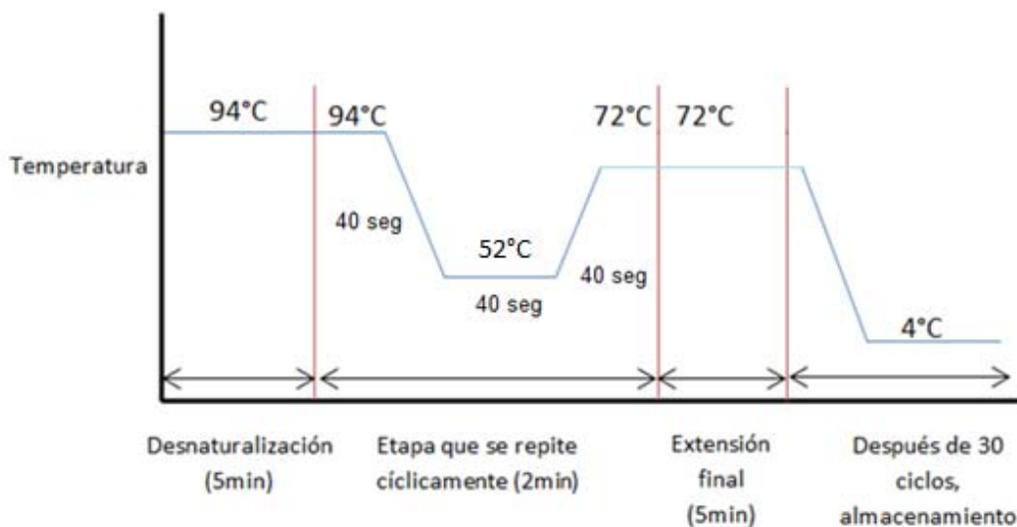


Fig. 18. Programa de PCR para la experimentación.

- Desnaturalización inicial con una duración de 5 min a 94°C.
- 94°C durante 40s, a 52°C (Tm) por 40s y finalmente a 72° durante 40s, para la etapa que se repite cíclicamente.
- Una vez concluidos los 30 ciclos, la extensión final durante 5 min a 72°C y almacén de la muestra a 4°C.

Objetivo particular 2

Aplicar la técnica de PCR en diferentes muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus* para la posterior detección del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A.

Se realizó la extracción del ADN de 10 muestras *Bos taurus* y 10 muestras *Bos indicus* utilizando el protocolo detallado anteriormente, obteniendo los siguientes resultados (Cuadro 8 y 9):

Cuadro 8. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras *Bos taurus*.

Muestra	Relación 260/280	ng/μL
B1	1.61	58.2
B2	1.66	65.2
B3	1.50	88.0
B4	1.83	55.4
B5	1.66	66.4
B6	1.55	57.3
B7	1.71	85.7
B8	1.59	79.1
B9	1.72	71.3
B10	1.66	56.0

Cuadro 9. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras *Bos indicus*.

Muestra	Relación 260/280	ng/ μ L
BI1	1.49	86.2
BI2	1.55	66.9
BI3	1.67	64.3
BI4	1.79	89.1
BI5	1.69	55.7
BI6	1.61	74.7
BI7	1.75	63.1
BI8	1.62	85.0
BI9	1.74	74.4
BI10	1.49	53.4

Los resultados de la relación 260/280 para las muestras *Bos taurus* y *Bos indicus* demuestran que no hay contaminación significativa con proteínas en el ADN. Por otra parte la concentración de ADN es adecuada para su uso en la PCR.

Antes de llevar las muestras a PCR se comprobó la especificidad de los primers utilizando ADN de maíz, café, cerdo, pollo y atún; obteniendo el siguiente gel (Fig. 21):

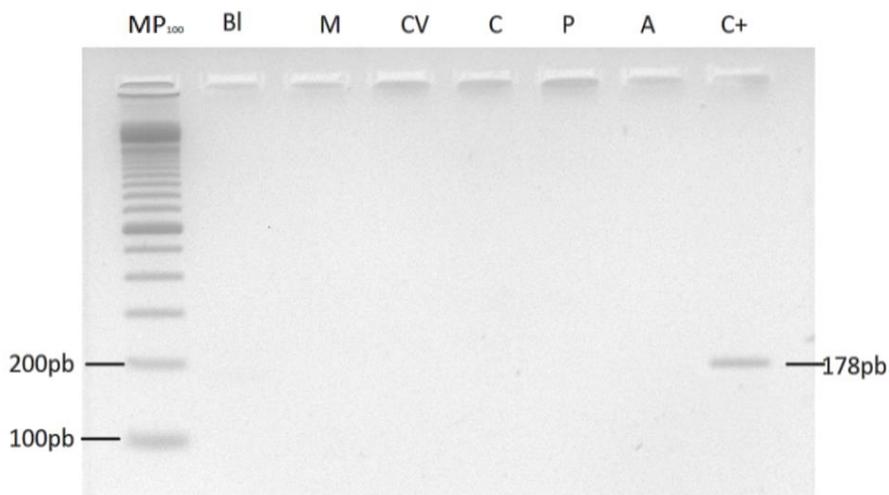


Fig. 19. Prueba de especificidad. MP: marcador molecular, BI: Blanco, M: maíz, CV: café, C: cerdo, P: pollo, A: atún, C+: control positivo.

En la Figura 21 se muestra que los primers si son específicos, pues únicamente amplificaron con la muestra C+ que es el control positivo utilizado en la prueba, que es una muestra de carne de Bovino. Además de que se obtuvo el amplificado esperado de 178pb.

Una vez mostrada la especificidad de los primers se realizó PCR a las 20 muestras totales. Los resultados de la PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 3%, sometidos en un campo eléctrico a 60V por aproximadamente 1h y 30 min.

En la Figura 22 se observa que las muestras B2, B3, B4 y B5 de la especie *Bos taurus* amplificaron en la reacción de PCR, obteniendo bandas claras, indicando que las muestras son útiles para realizar RFLP posteriormente, pues las bandas claras indican que se obtendrá una buena visualización de los fragmentos de restricción resultantes. Sin embargo, la muestra B1 no amplificó, por lo que fue necesario repetir el experimento.

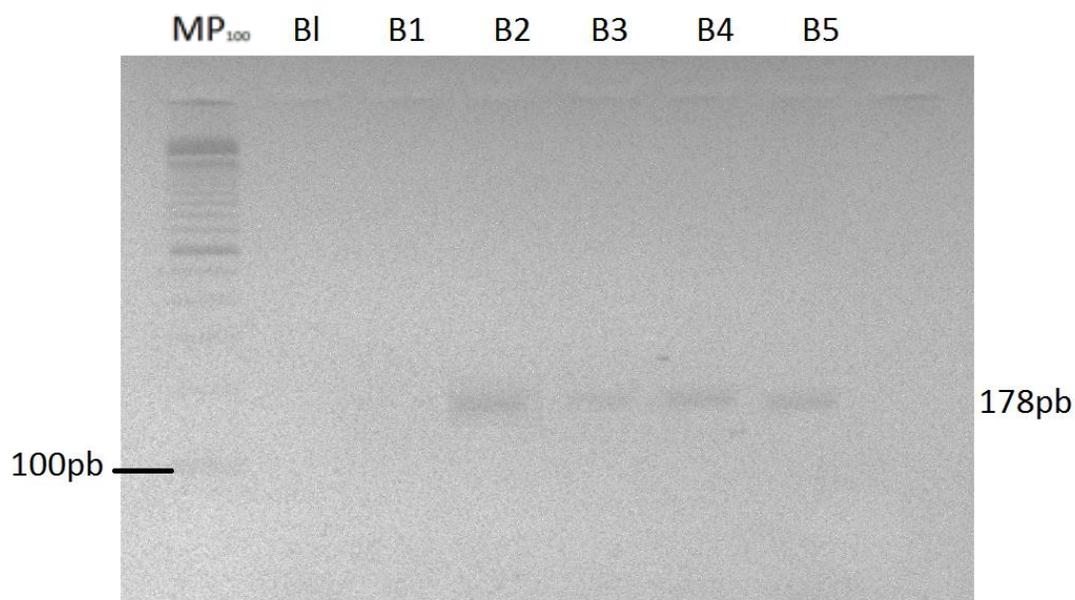


Fig. 20. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras *Bos taurus* B1, B2, B3, B4 Y B5. MP: marcador molecular 100pb, Bl: Blanco.

En el siguiente gel (Fig. 23) se puede visualizar que todas las muestras amplificaron, pero debido a que las muestras B7, B9 y B10 presentan una banda más clara, fue necesario realizar de nuevo la reacción de PCR para estas muestras. Las muestras B1, B6 y B8 fueron aptas para realizar RFLP.

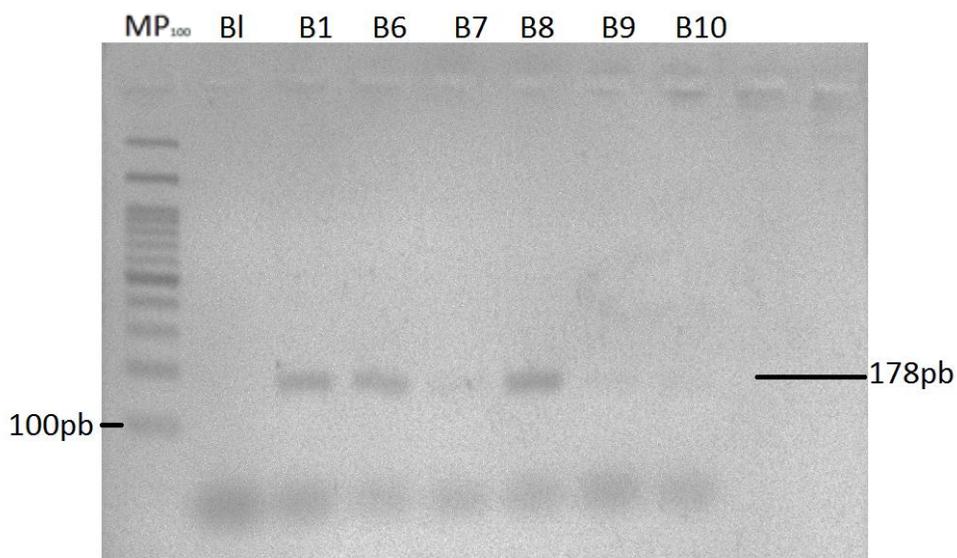


Fig. 21. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras *Bos taurus* B1, B6, B7, B8, B9 Y B10. MP: marcador molecular 100pb, BI: Blanco.

En la Figura 24 se observan las bandas de las muestra *Bos indicus* BI6, BI7, BI8, BI9 Y BI10. Las cuales se utilizaron en el RFPL. Por otra parte, el individuo BI4 no amplificó, por lo que fue necesario repetir la reacción de PCR.

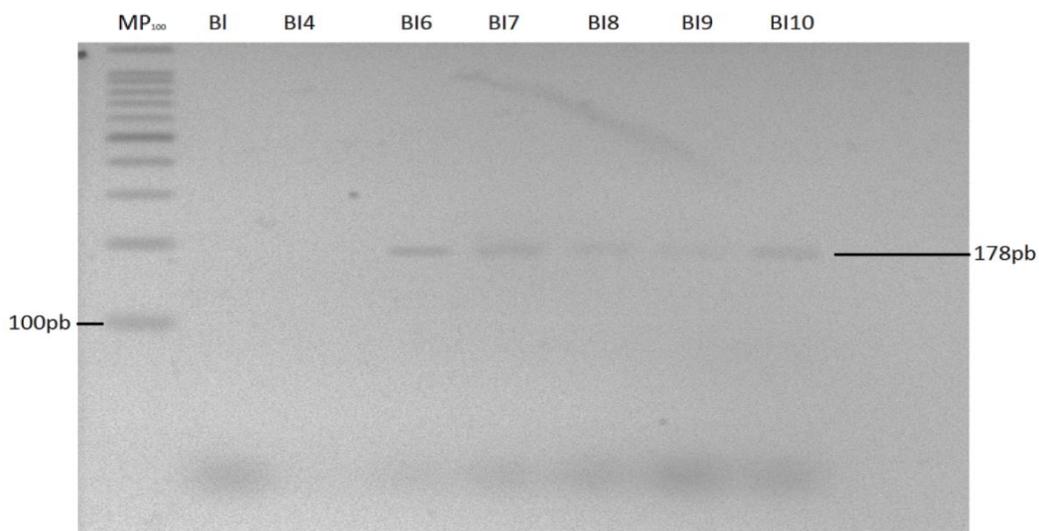


Fig. 22. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras *Bos indicus* BI4, BI6, BI7, BI8, BI9 y BI10. MP: marcador molecular 100pb, BI: Blanco.

Finalmente, (Fig. 25) se visualizaron las bandas de las muestra *Bos taurus* B7, B9 Y B10 y de las muestras *Bos indicus* BI1, BI2, BI3, BI4 Y BI5. Todos los individuos presentaron amplificado útil para RFLP.

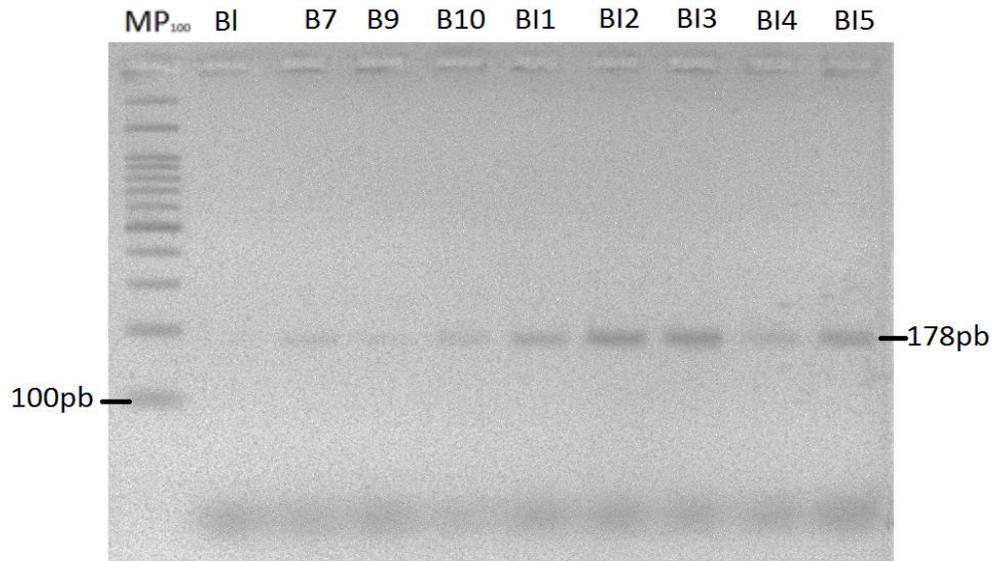


Fig. 23. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% para las muestras *Bos taurus* B7, B9, B10 y *Bos indicus* BI1, BI2, BI3, BI4 Y BI5. MP: marcador molecular 100pb, BI: Blanco.

Una vez obtenido el amplificado de todas las muestra, se paso al siguiente objetivo en el cual se realizo el RFLP.

Objetivo particular 3

Estimar la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A mediante RFLP.

El ADN resultante de la reacción de PCR fue sometida a digestión con la enzima Hae III siguiendo la metodología descrita anteriormente. La zona de corte de la enzima es la siguiente (Fig. 26):



Fig. 24. Corte de la enzima Hae III.

Los primers que se utilizaron en la experimentación tienen un cambio en el nucleótido 18 del amplificado de una C por una G, que corresponde a la primera G de la zona de corte de la enzima (ver Anexo 1). Esto fue realizado para garantizar el corte por la enzima y así detectar el polimorfismo. Por lo tanto, si el amplificado resultante cuenta con la secuencia GGCC y su correspondiente CCGG (Fig. 26), la enzima realizará el corte, indicando la ausencia del polimorfismo, mientras que si la secuencia no presenta corte entonces el polimorfismo está presente. Los resultados de la digestión fueron evaluados en geles de poliacrilamida al 10%, sometidos en un campo eléctrico a 80V, obteniendo los siguientes geles:

Geles de las muestras *Bos taurus*:

En el primer gel (Fig. 27), se observa que en las muestras B2, B3, B4 y B5, la enzima Hae III realizó un corte, indicando la ausencia del polimorfismo 1892T>C.

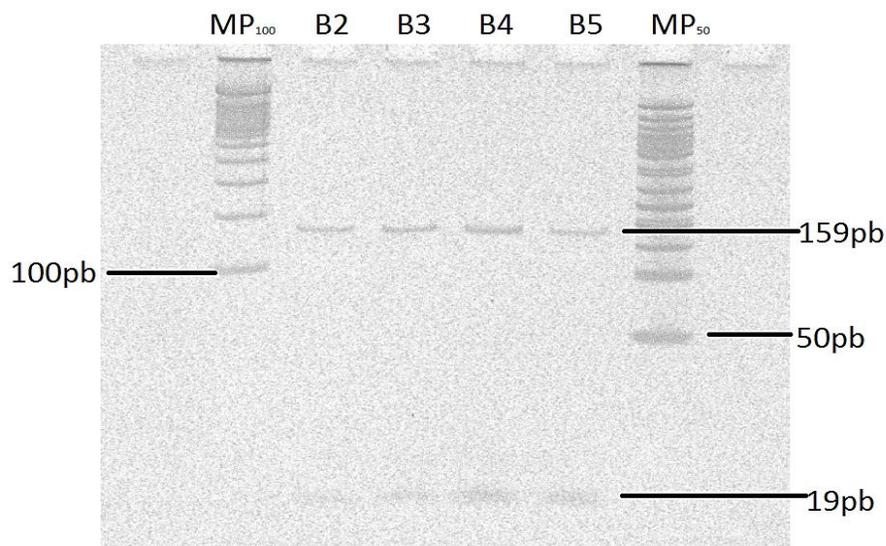


Fig. 25. Resultados de RFLP para las muestra B2, B3, B4 y B5.

En el segundo gel (Fig. 28), se aprecia que las muestras B1, B6, B7, B8, B9 y B10, tuvieron ausencia del polimorfismo estudiado. De esta manera es importante resaltar que todas las muestras de la especie *Bos taurus* estudiadas carecen del polimorfismo 1892T>C en el intron 9.

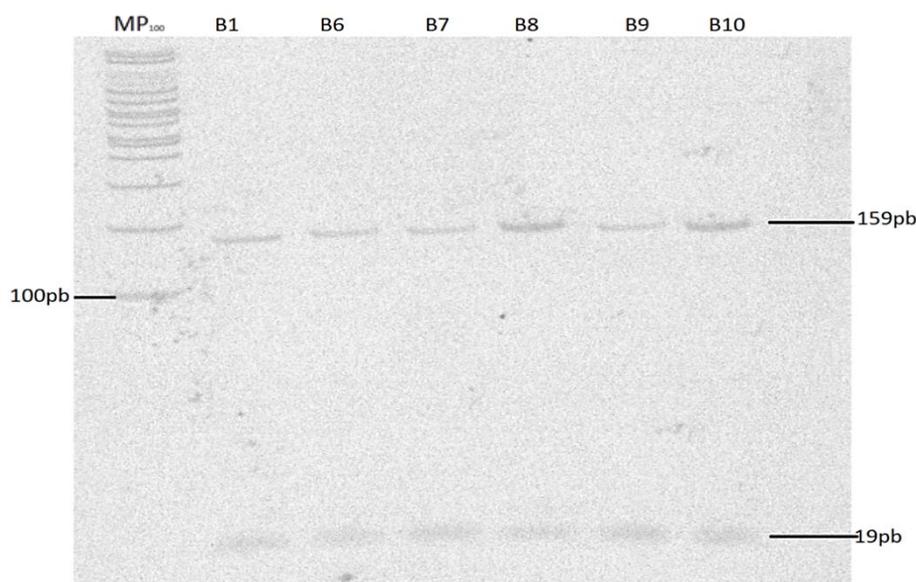


Fig. 26. Resultados de RFLP para las muestras B1, B6, B7, B8, B9 y B10.

Geles de las muestras *Bos indicus*:

Las muestras BI1, BI2, BI4 Y BI5 mostraron corte, lo que indica la ausencia del polimorfismo, mientras que por otra parte, la muestra BI3 reporto la ausencia del polimorfismo debido al corte de 19pb y su restante de 159pb y al mismo tiempo otra banda con 178pb que indica la presencia del polimorfismo, lo que indica que este ejemplar es heterocigoto (Fig. 29), es decir, que tiene alelos distintos para este gen (Lodish, 2006).

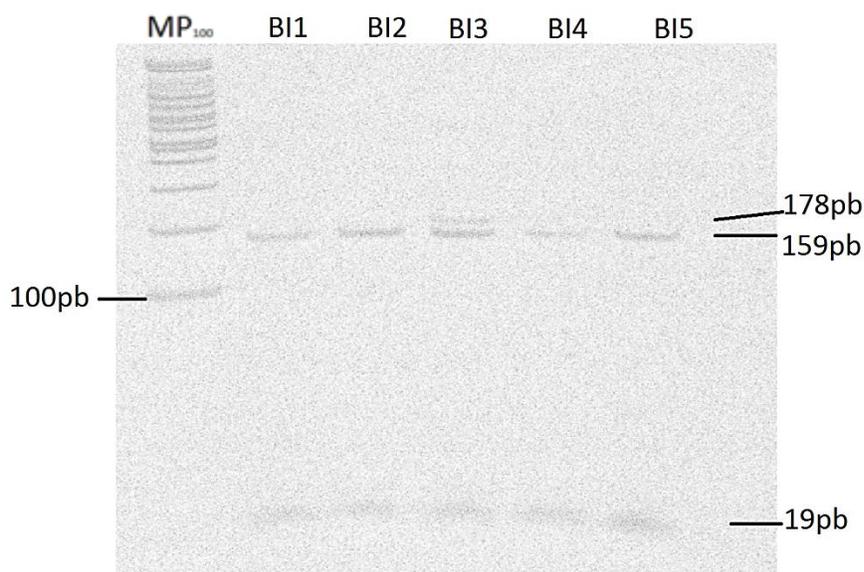


Fig. 27. Resultados de RFLP para las muestras BI1, BI2, BI3, BI4 y BI5.

En la Figura 30 están los resultados de las muestra BI4 y BI6, en ambas se observa la ausencia del polimorfismo debido a la banda presente de 19pb. La muestra BI4, se analizó en dos ocasiones para descartar que fuese un individuo heterocigoto.

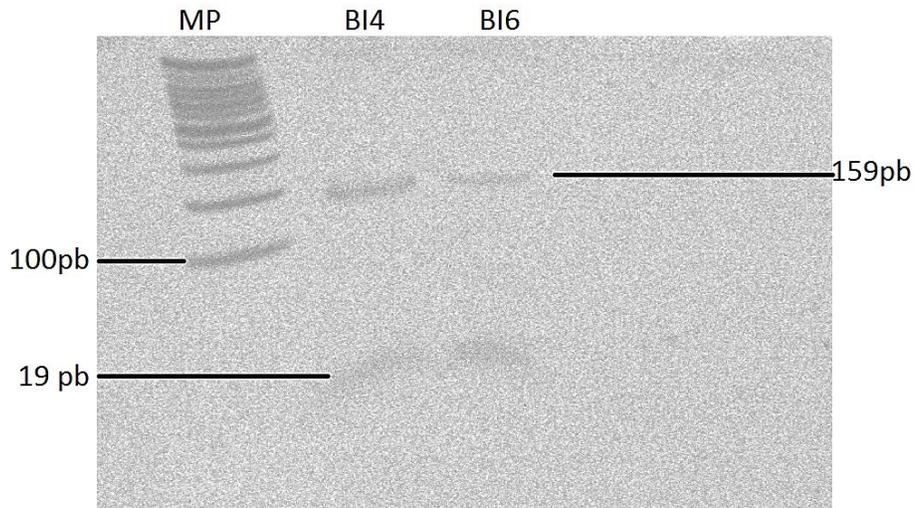


Fig. 28. Resultados de RFLP para las muestras BI4 y BI6.

Finalmente en la Figura 31 se observa que las ultimas muestra analizadas de la especie *Bos indicus* también carecen del polimorfismo estudiado en este trabajo. Por todo lo anterior, podemos decir que 19 de las muestras analizadas carecen del polimorfismo 1892T>C en el intron 9, mientras que solo una de ellas resulto ser un individuo heterocigoto.

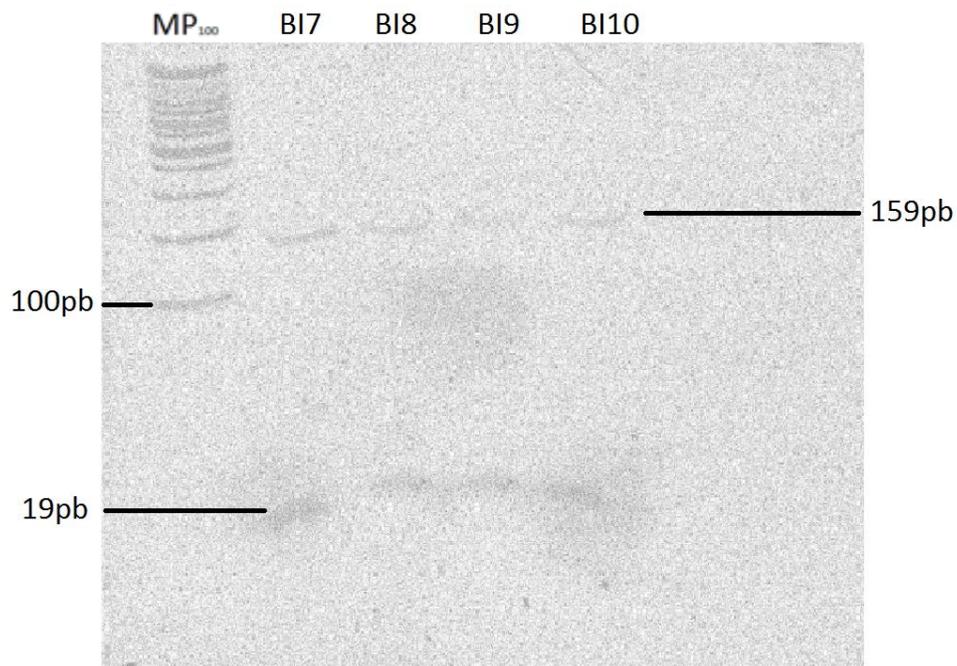


Fig. 29. Resultados de RFLP para las muestra BI7, BI8, BI9 y BI10.

Objetivo particular 4

Comparar el genotipado y sus respectivas frecuencias en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* que permitan establecer su posible asociación.

En los Cuadros 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos en la identificación del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A para cada individuo analizado.

Cuadro 10. Resultados para la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en *Bos taurus*.

Muestra	T/T (Polimorfismo)	C/C (Normal)	T/C o C/T (heterocigoto)
B1		✓	
B2		✓	
B3		✓	
B4		✓	
B5		✓	
B6		✓	
B7		✓	
B8		✓	
B9		✓	
B10		✓	

Cuadro 11. Resultados para la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en *Bos indicus*.

Muestra	T/T (Polimorfismo)	C/C (Normal)	T/C o C/T (heterocigoto)
BI1		✓	
BI2		✓	
BI3			✓
BI4		✓	
BI5		✓	
BI6		✓	
BI7		✓	
BI8		✓	
BI9		✓	
BI10		✓	

El polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A se ausento en todas las muestras y el individuo BI3 indicó ser heterocigoto. Esto quiere decir que el polimorfismo no se encuentra de manera significativa en las muestras analizadas. En el Cuadro 12 se encuentra la comparación de la presencia del polimorfismo en todas las muestras.

Cuadro 12. Comparación de la presencia del polimorfismo 1892T>C en las muestras *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Presencia del polimorfismo 1892T>C		
	No. muestras <i>Bos taurus</i>	No. Muestras <i>Bos indicus</i>
Presencia del polimorfismo T/T: 19pb, 159pb.	0	0
Ausencia del polimorfismo C/C: 178pb.	10	9
Individuo heterocigoto T/C o C/T: 19pb, 159pb y 178pb.	0	1
Total	10	10

Contrastación de hipótesis

La hipótesis planteada fue la siguiente:

El polimorfismo 1892T>C presente en el intron 9 del gen PPARGC1A puede tener diferente presencia entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* que tienen diferente perfil en las características de su carne.

Los resultados demuestran que el polimorfismo 1892T>C presente en el intron 9 del gen PPARGC1A no tuvo presencia en las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* pues todas las muestras de *Bos taurus* carecieron del polimorfismo, mientras que de las muestras de *Bos indicus* solo un individuo fue heterocigoto y las demás mostraron ausencia del polimorfismo. Por lo tanto, se puede afirmar que en esta investigación el polimorfismo 1892T>C presente en el intron 9 del gen PPARGC1A no tiene presencia diferente entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Dicho de esta manera, con los resultados obtenidos se puede decir que, el polimorfismo 1892T>C presente en el intron 9 del gen PPARGC1A no tiene relación alguna con el perfil de características de la carne de cada especie, ya que como se mencionó con anterioridad hay diferencias entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus* que afectan a la calidad de la carne de cada una de ellas, sin embargo, al carecer todos los individuos del polimorfismo, se comprueba que dicho polimorfismo no tiene relación entre las características que dan diferente perfil en la carne de cada especie.

Conclusiones

La técnica de PCR- RFLP llevada a cabo con los primers específicos de la especie y la enzima Hae III respectivamente, permiten detectar la presencia del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A en *Bos taurus* y *Bos indicus* de manera satisfactoria, ya que en la electroforesis se observaron las bandas correspondientes de 159pb y 19pb que indican la ausencia del polimorfismo y la banda de 178pb que indica la presencia del polimorfismo en el caso de la muestra que resultó ser un individuo heterocigoto.

La ausencia del polimorfismo 1892T>C fue determinante en 19 de las 20 muestras analizadas, por lo que el polimorfismo estudiado en el presente trabajo no tiene presencia diferente entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Al carecer ambas especies del polimorfismo, se descarta la participación del polimorfismo 1892T>C en el intron 9 del gen PPARGC1A como un factor que determine el perfil en las características de la carne entre dichas especies.

En este estudio el polimorfismo estudiado no tiene presencia significativa entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, sin embargo como se mostró con anterioridad, existen otros polimorfismos que deben ser estudiados para comprender mejor su impacto y así obtener en el futuro cruza de ganado con las características genéticas más óptimas para su uso en la industria alimentaria

Los resultados obtenidos en este trabajo son confiables, sin embargo se sugiere la ampliación del proyecto llevándolo a cabo con un número mayor de muestras para obtener resultados concluyentes en cuanto a la condición del polimorfismo 1892T>C en el gen PPARGC1A en las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Bibliografía

- 1) Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K., *et al.* (2006). *Introducción a la biología celular* (2ºed.). México: Editorial Médica Panamericana.
- 2) Aldridge, S. (1999). *El hilo de la vida, de los genes a la ingeniería genética*. España: Cambridge University Press.
- 3) Alonso, A. (2004). *Monografías SER, técnicas de diagnóstico y tratamiento en reumatología*. España: Editorial Médica Panamericana.
- 4) Amo, A. (1980). *Industria de la carne*. España: Editorial Aedos.
- 5) Audesirk, T.; Audesirk, G., y Byers, B. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. México: Prentice Hall.
- 6) Audesirk, T.; Audesirk, G., y Byers, B. (2004). *Biología, ciencia y naturaleza*. México: Pearson Educación.
- 7) Bartrés, D., y Faz, D. (2008). *Bases genéticas de la conducta*. España: Editorial UOC.
- 8) Beauchemin, V. R.; Thomas, M.G.; Franke, D. E., *et al.* (2006). Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. En: *Genet and Molecular Research*, 5(3), pp.438-47.
- 9) Blandino, L. (2005). *La industria de la carne bovina en Centro América: Situación y perspectivas*. Costa Rica: SIDE.
- 10) Boleman, S.; Boleman, S.; Miller, R., *et al.* (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. En: *Journal of Animal Science*, 75, pp.1521-1524.
- 11) Brown, T. (2008). *Genomas*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 12) Campbell, N., y Reece, J. (2005). *Biología* (7º ed.). España: Editorial Médica Panamericana.
- 13) Castro, A. (1999). *Producción bovina*. Costa rica: Editorial universidad estatal a distancia.
- 14) Castro, A. (2002). *Ganadería de carne, tomo II*. Costa rica: Gestión empresarial.
- 15) FAO (Food and Agriculture Organization). (2013). Informe Perspectivas Alimentarias: Análisis de los mercados mundiales. En: *FAO*. Consultado el 29 de septiembre de 2013. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/014/al978s/al978s00.pdf>.
- 16) Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España: Editorial Reverté.

- 17) Financiera rural (2012). Monografía de carne de bovino. En *financiera rural*. Consultado el 30 de agosto de 2013. Disponible en [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino\(feb2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino(feb2012).pdf).
- 18) Gandolfi, G.; Cinar, M.; Ponsuksili, S., *et al.* (2011). Association of PPARGC1A and CAPNS1 gene polymorphisms and expression with meat quality traits in pigs. En: *Meat Science*, 89, pp. 478 – 485.
- 19) Gill, J.; Bishop, C.; McCorquodale, C., *et al.* (2010). Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. En: *Meat Science*, 86, pp. 985-993.
- 20) Giusti, J.; Castan, E.; Dal, P. M., *et al.* (2013). Expression of genes related to quality of *Longissimus dorsi* muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. En: *Meat Science*, 94, pp. 247-252.
- 21) Guerrero, I. (2006). *Ciencia y tecnología de carnes*. México: Editorial Limusa.
- 22) Herraéz, A. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en la ciencia de la salud* (2° ed.). España: Elsevier Science.
- 23) INEGI (2011). Ganadería. En *INEGI*. Consultado el 13 de septiembre de 2013. Disponible en <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/gana/default.aspx?tema=E>
- 24) Jacobs, K.; Rohrer, G.; Van, P. M., *et al.* (2006). Porcine PPARGC1A (peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1A): coding sequence, genomic organization, polymorphisms and mapping. En: *Cytogenet and Genome Research*, 112 (1-2), pp. 106-13.
- 25) Jiménez, A. (2003). *Manual de neurogenética*. España: Díaz de Santos.
- 26) Khatib, H.; Zaitoun, I.; Wiebelhaus, F. J., *et al.* (2007). The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. En: *Meat Science*, 4 (89), pp. 2966–2970.
- 27) Lehninger, A.; Nelson, D., y Cox, M. (1991). *Principios de bioquímica*. España: Ediciones Omega.
- 28) Lodish, H. (2006). *Biología celular y molecular* (5° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

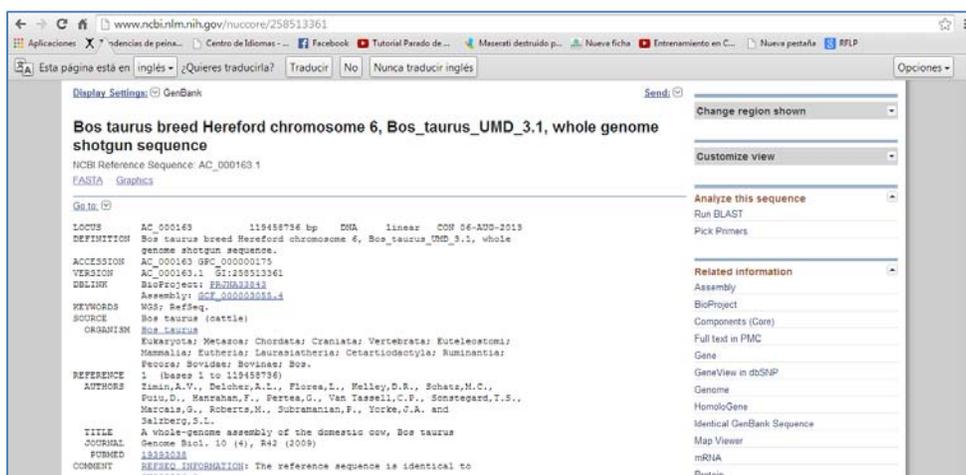
- 29) López, G. (1991). *Manual de bioquímica y tecnología de la carne*. España: Madrid Vicente Ediciones.
- 30) Luque, J., y Herraéz, A. (2002). *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones*. España: Elsevier Science.
- 31) Maldonado, R., y Jiménez, E. (1998). *Biología molecular en medicina*. México: Editorial Limusa.
- 32) Medina, F.; Alemán, T.; Ferguson, B., et al. (2007). *Ganadería, desarrollo y ambiente: una visión para Chiapas*. México: Fundación Produce Chiapas.
- 33) Moreno, B. (2006). *Higiene e inspección de carne*. España: Díaz de Santos.
- 34) Oliva, R., y Vidal, J. M. (2006). *Genoma humano: Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Barcelona, España: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona.
- 35) Pardo, J.; Pérez, J.; Parra, V., et al. (1998). *La industria cárnica, el sistema de análisis de riesgos y puntos críticos*. España: Ediciones de la Universidad.
- 36) Passarge, E. (2004). *Genética, texto y atlas* (2° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 37) Pierce, B. (2010). *Genética, un enfoque conceptual* (3° ed.). España: Editorial Médica Panamericana.
- 38) Pond, K. (2006). *Introducción a la ciencia animal*. España: Acribia.
- 39) Prandl, O. (1994). *Tecnología e higiene de la carne*. Alemania: Acribia.
- 40) Ruheena, J.; Sanjeev, K.; Ramesh, K., et al. (2011). Characterization of PRLR and PPARGC1A genes in buffalo (*Bubalus bubalis*). En: *Genetics and Molecular Biology*, 34, (4), pp. 592-594.
- 41) Sambrook, J., y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual* (3° ed.). E. U. A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 42) Sica, B.; Soria, L.; Corva, P., et al. (2011). Variantes en dos genes candidatos para características e calidad de carne bovina en Argentina. En: *Arch zootec*, 60, pp. 521-532.
- 43) Smith, T.; Casas, E.; Rexroad, C., et al. (2000). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. En: *Journal of Animal Science*, 78, pp. 2589-2594.

- 44) Soria, L.; Corva, P.; Sica, B., *et al.* (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. En: *Molecular and Cellular Probes*, 23, pp. 304-308.
- 45) Tatti, S. (2008). *Colposcopia y patologías del tracto genital inferior, en la era de la vacunación*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 46) Voet, D., y Voet, J. (2006). *Bioquímica* (3° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 47) Walker, J., y Gingold, E. (1997). *Biología molecular y biotecnología* (2° ed.). España: Editorial Acribia.
- 48) Weikard, R.; Kühn, C.; Goldammer, T., *et al.* (2005). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. En: *Physiol Genomics*, 21, pp. 1-13.
- 49) Yen, S.; Jaffe, R., y Barbieri, L. (2001). *Endocrinología de la reproducción, Fisiología, patología y manejo clínico*. (4° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 50) Yongfeng, L.; Linsen, Z.; Linqiang, L., *et al.* (2013). Proopiomelanocortin gene polymorphisms and its association with meat quality traits by ultrasound measurement in Chinese cattle. En: *Gene*, 529, pp.138–143.

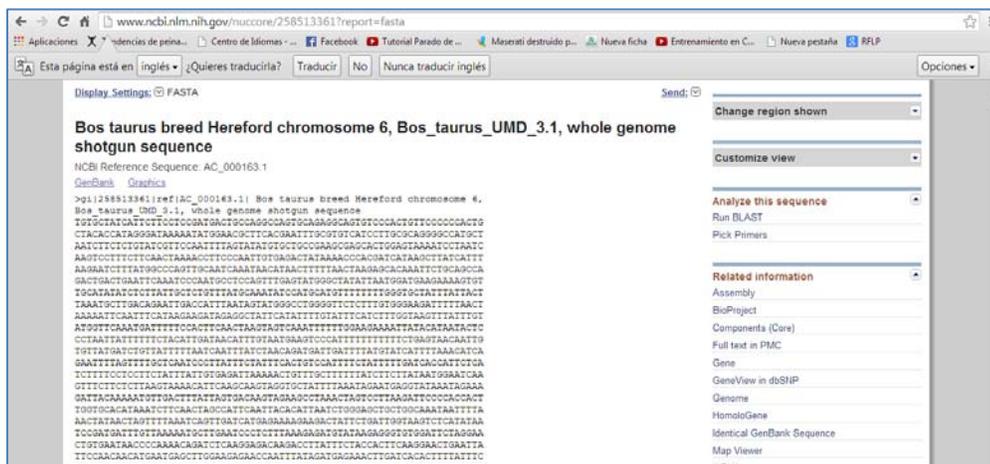
Anexos

Anexo 1. Metodología para la evaluación de la secuencia de amplificación.

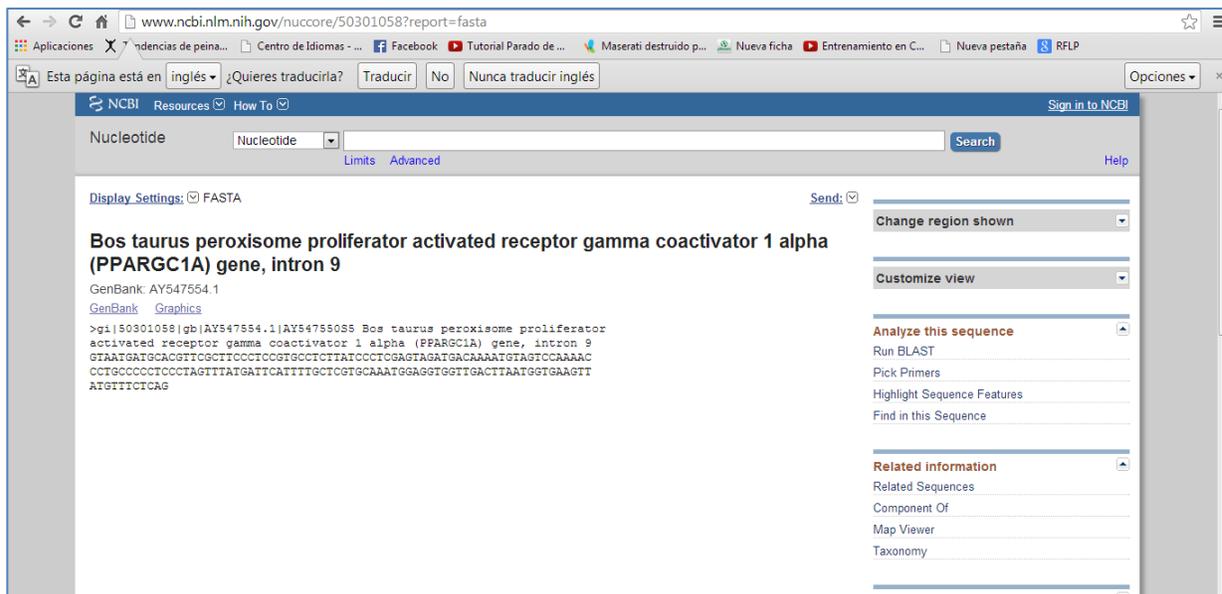
Para evaluar los primers propuestos en el trabajo “The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis” (Weikard et al., 2005), se consultó la secuencia de nucleótidos en www.ncbi.nlm.nih.gov, del cromosoma 6 del bovino.



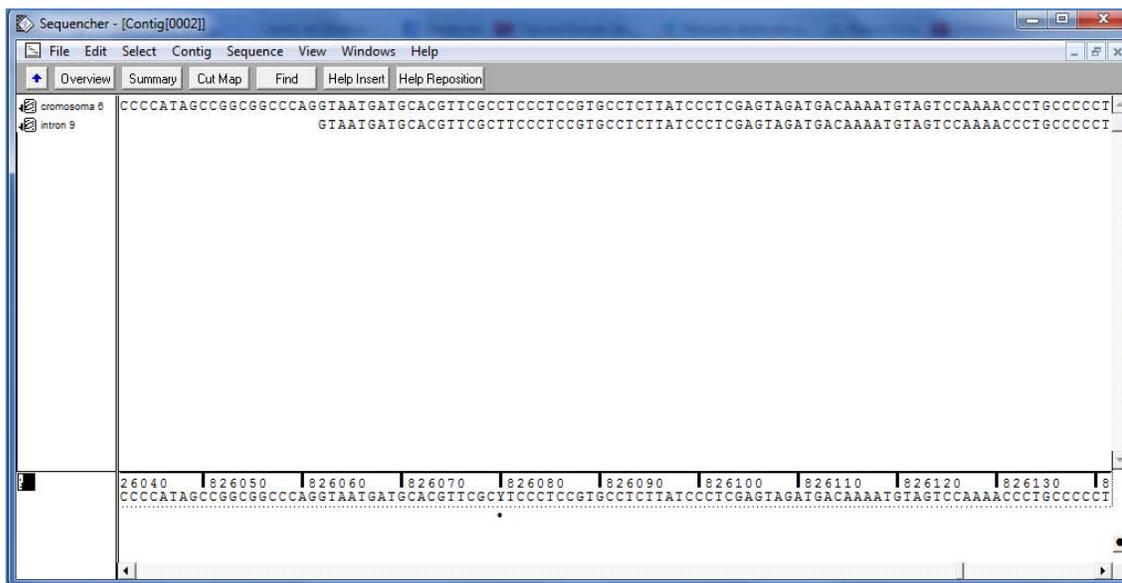
Después se consultó la secuencia en formato fasta y se copió en el programa sequencher.



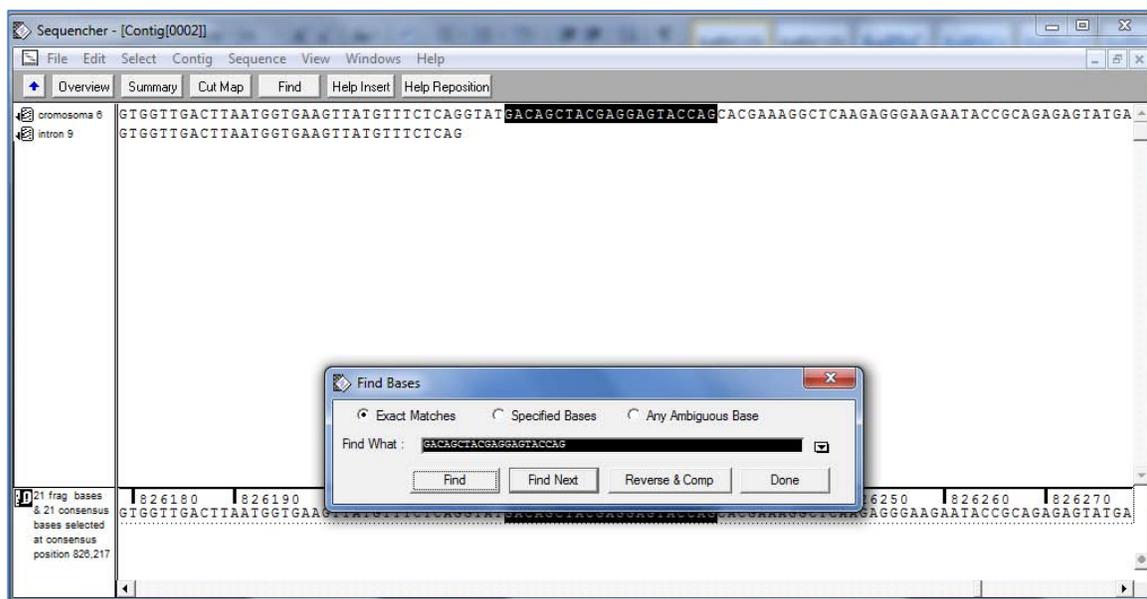
Se realizó en mismo procedimiento para la secuencia del intro 9 del gen PPARGC1A del bovino.



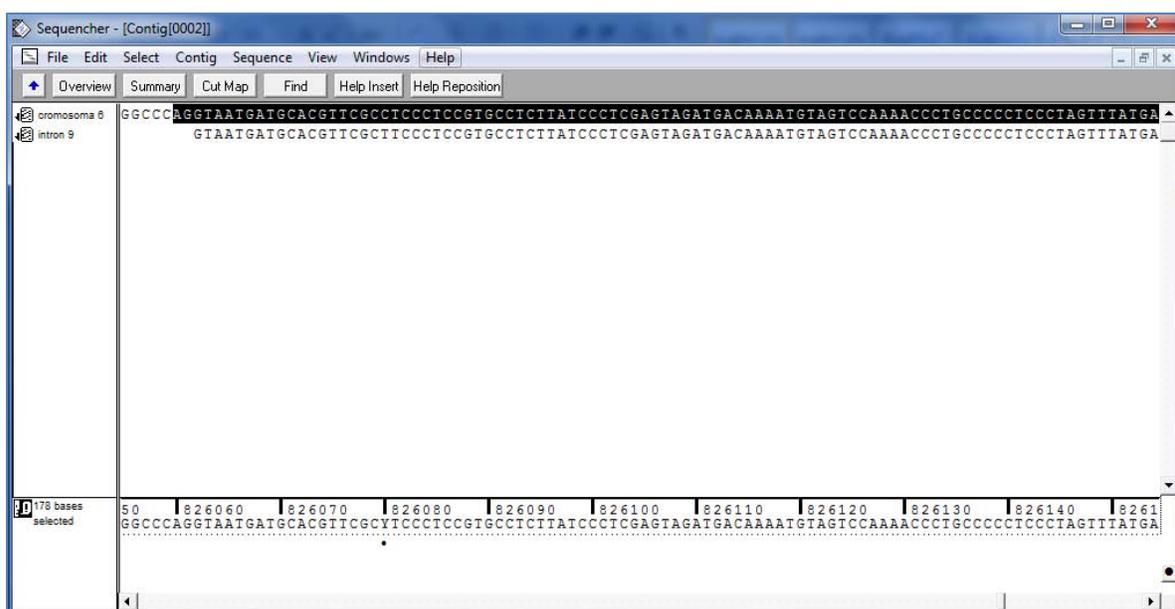
Una vez obtenidas ambas secuencias, estas se alinearon para determinar la posición del intron 9 en el cromosoma 6.



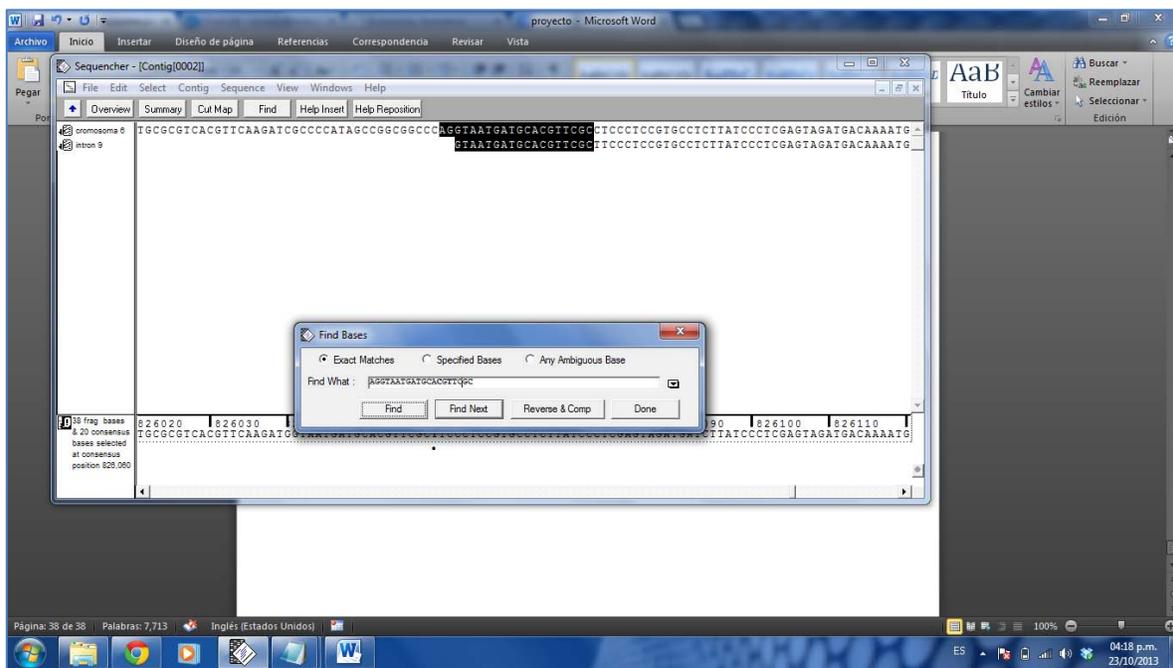
Posteriormente se identificó la secuencia de nucleótidos del primer reverso reportado en el artículo.



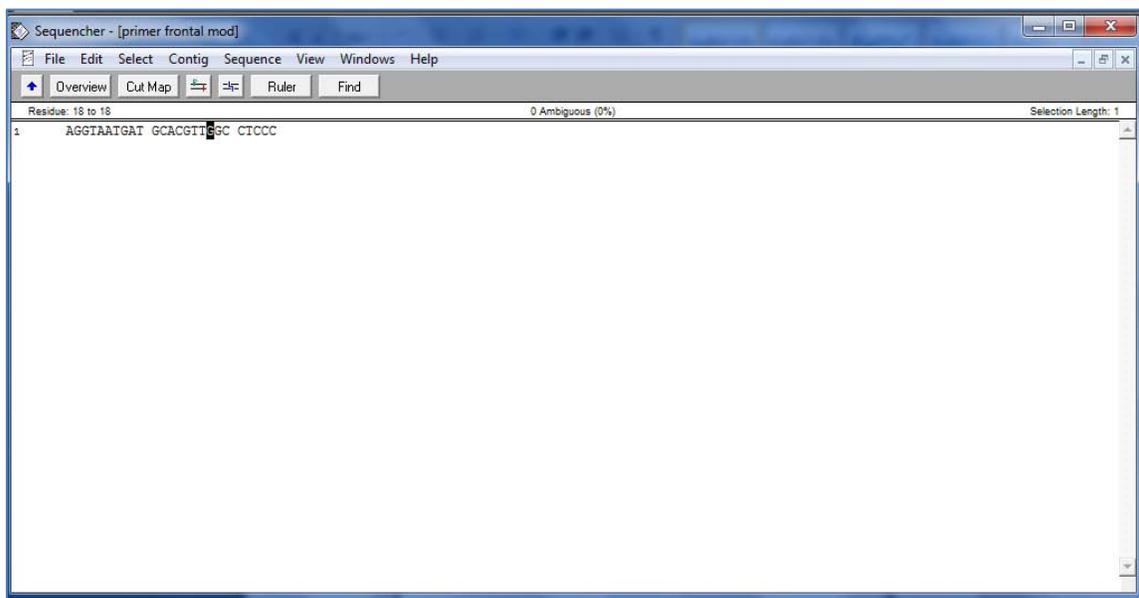
Una vez detectado este primer, se contaron 178pb que es el amplificado reportado en el artículo, de hizo de esta manera debido a que no se encontraba el primer frontal.



Después se comparó la secuencia del primer frontal reportado en el artículo, con la secuencia real y se detectó un error en el artículo. El primer reportado tenía ausencia de un nucleótido.

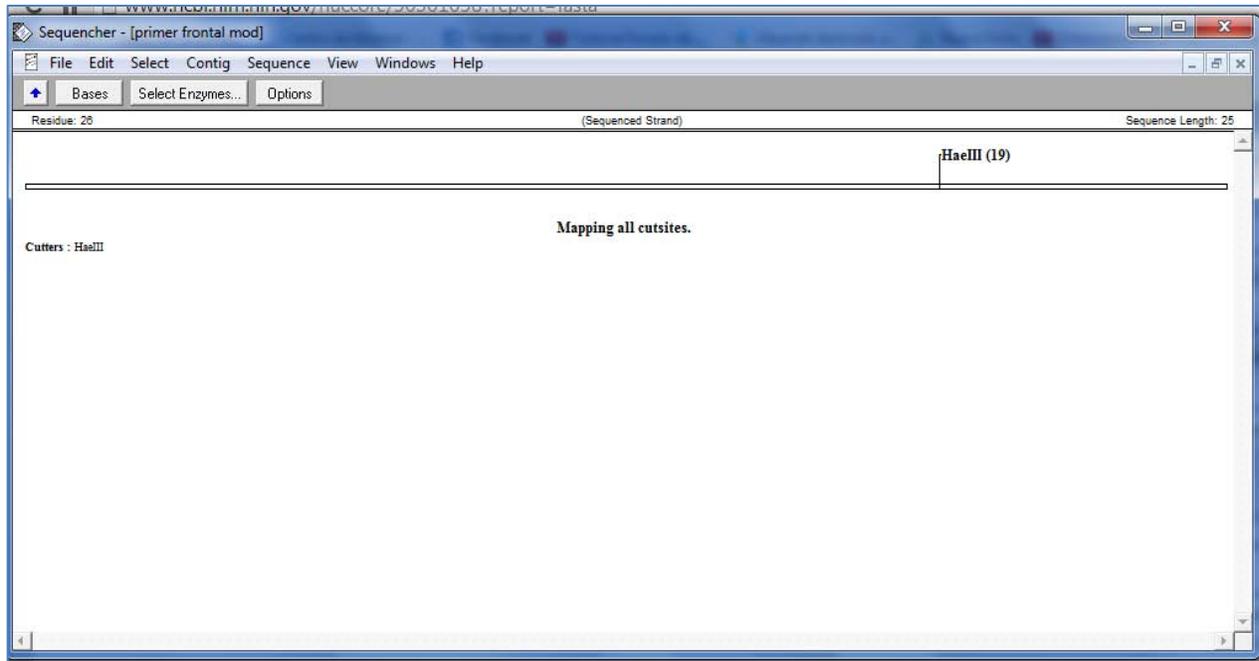


Una vez definido el primer frontal, se le modifico una C por una G en la posición 18.



Ingeniería en Alimentos

Como siguiente paso, se selecciono la opción cut map para verificar si la enzima BsuR1 cortaba en el sitio del polimorfismo. Se encontro una enzima analoga a la enzima BsuR1, la enzima HaeIII, que es la que se utilizó en la experimentación.



Anexo 2. Cálculo de la temperatura de hibridación.

Para definir la estrategia de amplificación se realizó el cálculo de la temperatura de hibridación (T_m):

Primer	Secuencia	Número de T	Número de G	Número de C	Número de A
Frontal	AGGTAATGATGCACGTTGGC	5	7	3	5
Reverso	CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC	7	5	7	2

Se utilizó la fórmula:

$$T_m = (G + C)4 + (A + T)2$$

Dónde:

G = número de G

C = número de G

A = número de A

T = número de T

Nota: al valor obtenido se le restaron 5 unidades

Sustituyendo para el primer frontal nos queda:

$$\text{PF: } T_m = (7 + 3)4 + (5 + 5)2 = 60^\circ\text{C} - 5 = 55^\circ\text{C}$$

Y para el primer reverso:

$$\text{PR: } T_m = (5 + 7)4 + (2 + 7)2 = 66^\circ\text{C} - 5 = 61^\circ\text{C}$$

Haciendo el promedio de ambos valores nos queda que el resultado final de la temperatura de hibridación es:

$$\overline{T_m} = 58^\circ\text{C}$$

Anexo 3. Hidratación de primers.

Tenemos que:

$$U = \frac{\mu m}{250}$$

Dónde:

U = μ L de agua libre de nucleasas necesaria para hidratar los primers

Primer Bovino F

n moles = 44.0, los cuales se convierten a micro moles mediante la siguiente fórmula:

$$\mu m = \frac{n \text{ moles}}{1000}$$

Sustituyendo tenemos:

$$\frac{44.0n \text{ moles}}{1000} = 0.044\mu m$$

Y los micro moles se convierten en litros mediante la siguiente formula:

$$L = \frac{\mu m}{250}$$

Sustituyendo:

$$\frac{0.044\mu m}{250} = 1.76 \times 10^{-4} L$$

A continuación los litros se convierten en micro litros mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{L}{10^{-6}} = \mu L$$

Dando como resultado:

$$\frac{1.76 \times 10^{-4} L}{10^{-6}} = 176 \mu L \text{ de } H_2O \text{ libre de nucleasas} = U$$

Primer bovino R

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para el primer reverso:

n moles = 33.6

Sustituyendo tenemos:

$$\frac{33.6n \text{ moles}}{1000} = 0.0336\mu m$$

Pasando los μm en L:

$$\frac{0.0336\mu m}{250} = 1.344 \times 10^{-4} L$$

A continuación los litros se convierten en micro litros:

$$\frac{1.344 \times 10^{-4} L}{10^{-6}} = 134.4 \mu L \text{ de } H_2O \text{ libre de nucleasas} = U$$