



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Marcadores moleculares asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en carne de *Bos indicus* y sus cruces**

**Joel David Leal Gutiérrez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia  
Departamento de Ciencias para la Producción Animal  
Bogotá, Colombia

2013



# **Marcadores moleculares asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en carne de *Bos indicus* y sus cruces**

**Joel David Leal Gutiérrez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Salud y Producción Animal.**

Directora:

Ligia Mercedes Jiménez Robayo

Médico Veterinario, Msc., Ph.D.

Línea de Investigación:

Genética y Mejoramiento Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,

Departamento de Ciencias para la Producción Animal

Bogotá, Colombia

2013



"Si quieres conocer el pasado mira  
el presente que es su resultado.  
Si quieres conocer el futuro, mira  
el presente que es su causa"

Proverbio japonés.



## **Agradecimientos**

Agradecemos al Ministerio de Agricultura de Colombia, a ASOCEBÚ y al grupo de investigación del Dr. Manuel Fernando Ariza Botero por el proyecto de investigación titulado “Identificación de genes asociados a características de ternera de la carne e implementación preliminar de un programa de selección asistida por marcadores moleculares y su impacto económico en ganaderías de la microrregión del sur del Cesar”, bajo el cual se desarrolló el estudio fenotípico, genotípico y su asociación para la característica Capacidad de Retención de Agua. Adicionalmente, agradecemos al grupo de investigación del Dr. Manuel Fernando Ariza Botero por el suministro de los genotipos de los marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN5331, CAST1, CAST2959, CAST2870, UoGCAST, PRKAG3-1526, PRKAG3-2180, PRKAG3-3068, RYR1-13638, RYR1-26680 y RYR1-27871.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICTA y al Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, en cuyas instalaciones se desarrollo la presente investigación. Agradecemos al Fondo de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia y a al programa de Fortalecimiento de Grupos de Investigación de la DIB de la Universidad Nacional de Colombia por los recursos económicos suministrados empleados en la genotipificación de los marcadores PRKAG3-2925, PRKAG3-2961, PRKAG3-3047, PRKAG3-3078, PRKAG3-2745, PRKAG3-5898, RYR1-11195, RYR1-21643, RYR1-27970, RYR1-27982, RYR1-28046, RYR1-28068 y RYR1-20298.

Finalmente, damos gracias a los profesores Jairo Humberto López y Carlos Manrique Perdomo por su asesoría y al Dr. Carlos Alberto Martínez.



## Resumen

La Capacidad de Retención de Agua (CRA) es una de las características de la carne con mayor efecto sobre la rentabilidad del sector, al estar asociada a las mermas y a la jugosidad. Los objetivos principales son: resaltar la importancia de la CRA de la carne de bovino, evaluar el desempeño de estos parámetros según los factores tiempo de maduración y cruce de los animales y establecer polimorfismos en genes candidatos asociados al parámetro evaluado. Varios genes y sus polimorfismos han sido asociados con parámetros de calidad cárnica, entre ellos se destacan CAPN1, CAST, DES, PRAKG3 y RYR1. Algunos de los polimorfismos reportados en estos genes pueden contribuir potencialmente a la variación fenotípica en estos parámetros dado que logran modificar algunos parámetros *in-silico* de las moléculas de ARNm y/o su proteína, siendo importante recalcar que toda asociación fenotipo-genotipo debe poseer un sustento biológico y una aproximación computacional es una herramienta útil para llevar a cabo este cometido. *In-silico* se logró postular varios SNPs en estos genes candidato como potencialmente asociados. Se determinó la CRA en crudo y en cocinado, en carne madurada a 7, 14 y 21 días de los músculos *Longissimus dorsi* (LD) y *Semitendinosus* (ST) de 164 machos cruzados. Se presentó significancia de los factores Cruce y Maduración dependiendo del músculo y el parámetro evaluado. Se encontró una correlación entre CRAr y los parámetros pH, CRAc y Textura (WBSF) en ambos músculos. En esta población se determinó una consistente asociación de los parámetros de CRA evaluados con los marcadores CAST2959, RYR1-13638 y RYR1-27970, lo que los convierte en polimorfismos potencialmente útiles en procesos de selección animal y mejoramiento de este parámetro de calidad cárnica en Colombia.

**Palabras clave:** ARN mensajero, cocción, genes, *in-silico*, jugosidad, merma, proteínas



## Abstract

Water Holding Capacity (WHC) is the meat trait of bovine with the greatest effect over industrial profitability, because if loss of water is bigger, has influence over loss of weight of product and additionally lesser sensorial quality. The aims of this document are: highlight the value of the WHC in bovine meat, assess the effect of the cross, ageing and their possible interaction, and finally, find associated polymorphisms in candidate genes in WHC. Several genes and their SNPs had been associated with quality features, among themselves, CAPN1, CAST, PRKAG3, DES and RYR1. Many reported polymorphisms spanning these genes were identified how potentially associated with quality trait, because these can modify some *in-silico* feature of their RNAm and/or protein. It is great to highlight every association should be accompanied by a biological base, and a computational approximation is a useful tool to achieve this. WHC in raw meat (WHCr) and WHC in cooked meat (WHCc) were obtained in ageing meat at 7, 14 and 21 days. Muscles *Longissimus dorsi* (LD) and *Semitendinosus* (ST) of 164 cross breed males were used. Factors Cross and Ageing were significant on WHCr of LD and Ageing on WHCr of ST; in WHCc, only was significant Cross in LD. Relationships between WHCr-pH, WHCr-WHCc, WHCc-pH and WHCc-WBSF (*Warner-Bratzler Shear Force*) on both muscles were established. The polymorphisms CAST2959, RYR1-13638 and RYR1-27970 were established like associated with WHC in this population. These punctual polymorphisms can be useful in breeding programs focused on improve meat quality (WHC) in Colombia.

**Keywords:** ARNm, cooking, genes, *in-silico*, juiciness, protein, weight loss.



# Contenido

	Pág.
Resumen.....	I
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XV
Introducción.....	1
<b>1 La Capacidad de Retención de Agua (CRA) de la carne de bovino y posibles genes candidato.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. El papel de la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en calidad cárnica y productividad.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. El agua en el músculo.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Cambios en el músculo durante el PM.....</b>	<b>9</b>
1.4.1.Fase de Apoptosis.....	9
1.4.2.Fase de <i>Rigor mortis</i> .....	9
<b>1.5. Fase de tenderización.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Efectos de los cambios PM en la CRA.....</b>	<b>10</b>
1.6.1.Cambios bioquímicos.....	10
1.6.2.Cambios físicos.....	11
<b>1.7. La cocción de la carne.....</b>	<b>12</b>
<b>1.8. Genes que pueden influir sobre la CRA en la carne.....</b>	<b>14</b>
1.8.1.Genes que afectan el metabolismo muscular.....	15
1.8.1.1. Receptor de la Rianodina tipo 1 (RYR1).....	15
1.8.1.2. Subunidad Gamma 3 de la proteína kinasa AMP activada (PRKAG3).....	16
1.8.1.3. Otros genes.....	18

1.8.2. Genes que afectan la constitución física del músculo.....	18
1.8.2.1. Sistema Calpaína-Calpastatina y proteínas sustrato.....	18
1.8.2.2. Proteínas de la matriz extracelular.....	19
1.8.3. Otros genes posiblemente asociados.....	19
1.9. El mejoramiento genético como una herramienta útil.....	20
1.10. Conclusiones.....	20
2. Efecto del Cruce y la Maduración sobre la Capacidad de Retención de Agua en crudo y cocinado en carne de bovino.....	23
2.1. Introducción.....	23
2.2. Materiales y Métodos.....	24
2.2.1. Material experimental.....	24
2.2.2. Determinación del parámetro CRAr.....	25
2.2.3. Determinación del parámetro CRAc.....	25
2.2.4. Determinación de otros parámetros de calidad cárnica.....	26
2.2.5. Análisis estadístico.....	27
2.3. Resultados.....	27
2.3.1. Capacidad de Retención de Agua en carne Cruda (CRAr).....	28
2.3.2. Capacidad de Retención de Agua en carne Cocinada (CRAc).....	29
2.3.3. Correlaciones entre parámetros de calidad cárnica.....	29
2.4. Discusión.....	31
2.4.1. Los factores Cruce, Maduración y su interacción.....	32
2.4.2. Correlaciones CRAr-pH, CRAr-CRAc, CRAc-WBSF y CRAc-pH.....	35
2.5. Conclusiones.....	37
3. Análisis <i>in-silico</i> de mutaciones puntuales en el gen PRKAG3 bovino, asociado a calidad cárnica.....	39
3.1. Introducción.....	39
3.2. Materiales y métodos.....	40
3.2.1. Secuencias y SNPs empleados.....	40
3.2.2. Modelamiento del ARNm.....	40
3.2.3. Modelamiento proteico.....	40
3.3. Resultados.....	42
3.3.1. Modelos de ARNm.....	42
3.3.2. Modelo proteico.....	42
3.4. Discusión.....	48

3.4.1.	Variaciones en el ARNm.....	49
3.4.2.	La proteína PRKAG3 y las alteraciones por SNPs.....	50
3.5.	Conclusiones.....	52
4.	Modelamiento tridimensional de la proteína RYR1 bovina y análisis <i>in-silico</i> de mutaciones <i>missense</i> , enfocado a calidad cárnica.....	53
4.1.	Introducción.....	53
4.2.	Materiales y métodos.....	55
4.2.1.	Secuencias y SNPs empleados.....	55
4.2.2.	Modelamiento proteico.....	55
4.3.	Resultados.....	57
4.3.1.	Dominios predichos en la RYR1 bovina.....	57
4.3.2.	Hélices transmembranales de la RYR1 bovina.....	59
4.3.3.	Mutaciones <i>missense</i> de la RYR1.....	59
4.4.	Discusión.....	60
4.4.1.	Mutaciones <i>missense</i> y su efecto fenotípico.....	63
4.5.	Conclusiones.....	65
5.	Aproximación a la estructura 3D de la Desmina bovina y determinación del efecto de mutaciones puntuales <i>in-silico</i> .....	67
5.1.	Introducción.....	67
5.2.	Materiales y métodos.....	68
5.2.1.	Secuencias y SNPs empleados.....	68
5.2.2.	Modelamiento del ARNm.....	68
5.2.3.	Construcción de Modelos de la proteína DES .....	69
5.3.	Resultados.....	70
5.3.1.	Modelos de ARNm.....	70
5.3.2.	Modelo proteico.....	72
5.4.	Discusión.....	74
5.4.1.	Variaciones en el ARNm.....	75
5.4.2.	Efecto de mutaciones <i>missense</i> en la proteína DES.....	75
5.4.3.	Modelo tridimensional de la DES bovina.....	76
5.5.	Conclusiones.....	77
6.	Análisis computacional del efecto de mutaciones puntuales en el sistema $\mu$ -Calpaína y Calpastatina en calidad de carne bovina.....	79
6.1.	Introducción.....	79

6.2. Materiales y métodos.....	80
6.2.1.Secuencias y SNPs empleados.....	80
6.2.2.Modelamiento del ARNm.....	82
6.2.3.Modelamiento proteico.....	82
6.3. Resultados.....	82
6.3.1.SNPs y estabilidad del ARNm.....	82
6.3.2.Efecto sobre las proteínas CAPN1 y CAST.....	84
6.4. Discusión.....	87
6.4.1.ARNm y las mutaciones puntuales.....	90
6.4.2.Estructuras tridimensionales de CAPN1 y CAST bovinas.....	91
6.4.3.Polimorfismos y su efecto sobre estas moléculas.....	92
6.5. Conclusiones.....	93
7. Polimorfismos de los genes CAPN1, CAST, DES, PRKAG3 y RYR1 asociados a la Capacidad de Retención de Agua en crudo y cocinado en carne de bovino.....	95
7.1. Introducción.....	95
7.2. Materiales y métodos.....	96
7.2.1.Material experimental.....	96
7.2.2.Determinación del parámetro CRAR.....	96
7.2.3.Determinación del parámetro CRAc.....	97
7.2.4.Genotipificación de la población.....	97
7.2.5.Análisis estadístico.....	99
7.3. Resultados.....	101
7.4. Discusión.....	103
7.4.1.Gen CAPN1.....	103
7.4.2.Gen CAST.....	104
7.4.3.Gen RYR1.....	105
7.4.4.Gen PRKAG3.....	105
7.4.5.Interacciones de segundo grado.....	106
7.5. Conclusiones.....	107
8. Discusión.....	109
8.1. Polimorfismos de nucleótido simple asociados a la CRA.....	109
8.2. Alteraciones <i>in-silico</i> de los SNPs evaluados.....	111
8.3. Aplicaciones futuras.....	114
9. Conclusiones y recomendaciones.....	117

<b>A. Anexo: Valores promedio de WHSF y pH .....</b>	<b>121</b>
<b>B. Anexo: Evaluación de los modelos proteicos.....</b>	<b>122</b>
<b>C. Anexo: Posición de las mutaciones evaluadas.....</b>	<b>123</b>
<b>D. Anexo: Mutaciones importantes <i>in-silico</i> y su relación <i>in-vivo</i>.....</b>	<b>124</b>
<b>E. Anexo: Script para ubicación de polimorfismos en la secuencia del gen.....</b>	<b>125</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>127</b>



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura A:</b> La ecología alimenticia del humano y de otros primates.....	3
<b>Figura 1-1:</b> El músculo, estructura, proteínas constituyentes y su distribución del agua.....	8
<b>Figura 1-2:</b> Relación entre el pH y la CRA.....	11
<b>Figura 2-1:</b> Procedimiento de obtención de la CRAR.....	26
<b>Figura 3-1</b> Estructura y tamaño del gen, el ARNm y la proteína del PRKAG3 bovino.....	43
<b>Figura 3-2:</b> Polimorfismo conformacional del ARNm del bovino.....	44
<b>Figura 3-3</b> Polimorfismo conformacional del ARNm del cerdo. Secuencia silvestre y RN.....	45
<b>Figura 3-4:</b> Predicción de estructura bidimensional.....	45
<b>Figura 3-5:</b> Estructura cuaternaria del AMPK, se detalla el PRKAG3 bovino.....	46
<b>Figura 3-6:</b> Superficie de contacto de PRKAG3 bovina con el AMP intercambiable.....	47
<b>Figura 3-7:</b> Ubicación de los cambios aminoacídicos producidos por SNPs <i>missense</i> .....	47
<b>Figura 3-8:</b> Distribución electrostática del PRKAG3 y sus alteraciones.....	48
<b>Figura 4-1:</b> Homotetrapéptido de RYR1.....	54
<b>Figura 4-2:</b> Organización génica de la RYR1 bovina.....	56
<b>Figura 4-3:</b> Modelos tridimensionales del RYR1 bovino obtenidos.....	58
<b>Figura 4-4:</b> Cambios aminoacídicos en su respectivo modelo de RYR1 de bovino.....	60
<b>Figura 4-5:</b> Potencial electrostático y alteraciones producidas por mutaciones <i>missense</i> .....	61
<b>Figura 5-1:</b> Distribución del gen de la DES bovina.....	70
<b>Figura 5-2:</b> Polimorfismo conformacional de la DES bovina.....	71
<b>Figura 5-3:</b> Polimorfismo conformacional en la DES porcina y el silvestre del humano.....	72
<b>Figura 5-4:</b> Estructura secundaria de la DES bovina.....	73
<b>Figura 5-5:</b> Estructura terciaria de la DES bovina.....	74
<b>Figura 6-1:</b> Estructura del gen CAPN1 bovino.....	83
<b>Figura 6-2:</b> Organización del gen de la Calpastatina bovina.....	84
<b>Figura 6-3:</b> Polimorfismo conformacional del ARNm en CAPN1 y CAST.....	85
<b>Figura 6-4:</b> Estructura tridimensional de la CAPN1 y CAST bovinas y mutaciones usadas.....	86
<b>Figura 6-5:</b> Superficies de contacto entre las moléculas del sistema.....	87
<b>Figura 6-6:</b> Sitios activos de CAPN1-CAPNS-Ca <sup>2+</sup> y potencial electrostático de CAPN1.....	88
<b>Figura 6-7:</b> Alteraciones producto de mutaciones puntuales en la CAST bovina.....	89
<b>Figura 8-1:</b> Polimorfismo conformacional en RYR1.....	111
<b>Figura 8-2:</b> Efecto fisiológico de la mutación RN- porcina.....	113
<b>Figura 8-3:</b> Número y tipos descritos de ARN no codificantes.....	115



## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 2-1:</b> Valores promedio de CRAr y desviación estándar.....	28
<b>Tabla 2-2:</b> Valores promedio de CRAc y desviación estándar.....	29
<b>Tabla 2-3:</b> Coeficientes de correlación CRAr-pH y CRAr-CRAc.....	30
<b>Tabla 2-4:</b> Coeficientes de correlación para CRAc-WBSF y CRAc-pH.....	31
<b>Tabla 3-1:</b> Polimorfismos reportados empleados.....	41
<b>Tabla 3-2:</b> Efecto de mutaciones <i>missense</i> en parámetros de la proteína.....	46
<b>Tabla 4-1:</b> Secuencias empleadas y alteraciones producidas por los SNPs evaluados.....	55
<b>Tabla 4-2:</b> Aminoácidos involucrados en la región transmembranal de la RYR1 bovina.....	59
<b>Tabla 5-1:</b> SNPs empleados, posiciones alteradas y numeración de secuencias.....	69
<b>Tabla 5-2:</b> Parámetros de la proteína DES alterados.....	73
<b>Tabla 6-1:</b> SNPs empleados y cambios producidos en ARNm y proteína.....	81
<b>Tabla 6-2:</b> Parámetros de la proteína alterados por los SNPs evaluados.....	88
<b>Tabla 7-1:</b> Juegos de cebadores empleados.....	97
<b>Tabla 7-2:</b> Marcadores corridos y los SNPs determinados según técnica de genotipificación.....	98
<b>Tabla 7-3:</b> Condiciones de digestión y corrido en RFLP según marcador.....	99
<b>Tabla 7-4:</b> Condiciones de corrido en SSCP según marcador.....	99
<b>Tabla 7-5:</b> Frecuencias Alélicas y genotípicas en cada marcador.....	101
<b>Tabla 7-6:</b> Asociación según Marcador.....	102
<b>Tabla 7-7:</b> Interacciones significativas Marcador*Grupo racial y Marcador*Maduración.....	102



## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
aa	Aminoácido
ADP	Adenosina Difosfato
AM	<i>Ante-mortem</i>
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína kinasa AMP activada
ATP	Adenosina Trifosfato
BB	Brahman Blanco
BR	Brahman Rojo
°C	Grados Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CICR	proceso de liberación de Ca <sup>2+</sup> mediado por Ca <sup>2+</sup>
CRA	Capacidad de Retención de Agua
CRAr	Capacidad de Retención de Agua medida en carne cruda
CRAc	Capacidad de Retención de Agua medida en carne cocinada
CAPN1	μ Calpaína
CAST	Calpastatina
DES	Desmina
DHPR	Receptor de Dihidropiridina
EML	Energía Mínima Libre
F.p.p.	Metodología de presión sobre papel filtro
LD	<i>Longissimus dorsi</i>
PM	<i>Post-Mortem</i>
PPC	Pérdidas por cocción
PPG	Pérdidas por goteo
PRKAG3	Subunidad Gamma 3 de la proteína kinasa AMP activada
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restricción.
RS	Retículo sarcoplásmico
RYR1	Receptor de la Rianodina tipo I
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Simple
SOICR	Liberación de Ca <sup>2+</sup> mediado por sobrecarga de almacenamiento
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Nucleótido Simple
ST	<i>Semitendinosus</i>
IMCT	Tejido Conectivo Intramuscular
WBSF	<i>Warner Bratzler Shear Force</i>
ΔG	Energía Mínima Libre



## Introducción

Kaplan *et al.*, (2000) plantean una teoría referente a la dieta de los homínidos originarios del hombre moderno, la cual tuvo un gran impacto en el aprendizaje, desarrollo y tasa de mortalidad de nuestros antepasados. Todo inicia con dos cambios exógenos muy importantes, el primero, el cambio en la distribución animal y vegetal en las sabanas africanas en el Pleistoceno, el cual incrementó la abundancia de alimentos de alta calidad y el segundo, suministrado por un cambio a nivel de pre-adaptación, el desplazamiento bípedo, emergiendo como una adaptación motora. Esta adaptación permite el uso de herramientas mediante la liberación de las extremidades superiores, lo que permitió una extracción de recursos más eficiente, la cacería y el transporte de grandes cantidades de alimento que era compartido con otros individuos. Estos cambios dieron un incremento enfatizado en alimentos de alta calidad y en gran cantidad, pero de difícil consecución.

Como lo muestra la figura A, las dietas de los homínidos antiguos se basó principalmente en la caza de animales de gran tamaño, lo cual favorecía el desarrollo de habilidades mentales y físicas para su éxito, que conjuntamente con la cocción de la misma, permitió un mejor aprovechamiento de un recurso nutricionalmente inigualable, permitiendo un desarrollo cerebral más adecuado para su supervivencia. Otro aspecto que recalcan Kaplan *et al.*, (2000) es la posibilidad de transportar grandes cantidades de alimento a los primeros asentamientos, de estos grupos de homínidos, lo que permitía un desarrollo muy importante, dado que el alimento era compartido haciendo que muchos de ellos pudiesen dedicarse a otras actividades diferentes a la búsqueda de alimento, como una incipiente sociedad.

Para el hombre moderno, la carne sigue siendo la base dietaria, recordando su papel en la evolución de nuestra especie, pero su producción se ha desarrollado como una industria enfocada no solo al abastecimiento del producto y a suplir un requerimiento nutricional (Ortigues *et al.*, 2006), sino con una concepción de satisfacer sensorialmente al consumidor, mediante el ofrecimiento de carne con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y de calidad textural. Las características estructurales de los alimentos son de gran importancia para estas propiedades de textura, al afectar directamente la percepción sensorial por lo que un conocimiento básico de cómo

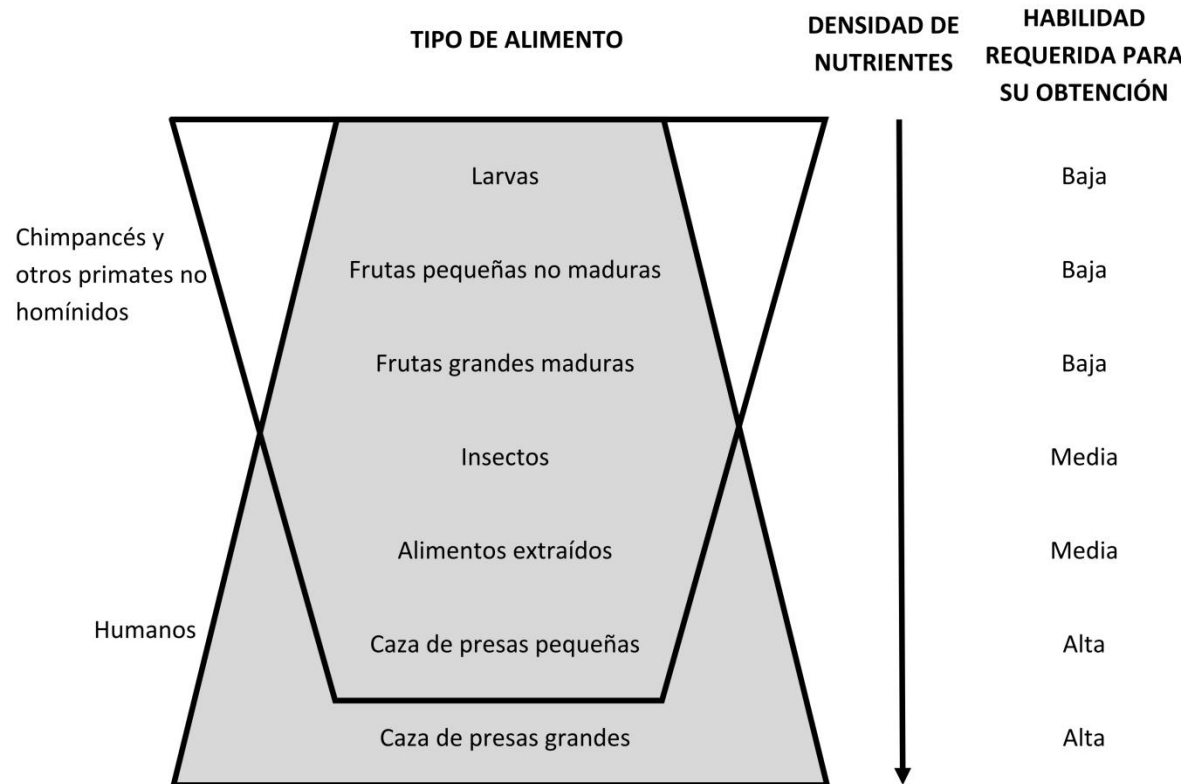
la calidad de la carne en crudo y los parámetros de procesamiento influyen sobre estas características estructurales, es vital en la optimización de la calidad del producto final (Straadt *et al.*, 2007). Varios parámetros son establecidos como propiedades de la carne, entre los que se destacan la apariencia, el color, el sabor, el contenido de grasa, la textura, la terneza (Ciobanu *et al.*, 2004) y la CRA ó Capacidad de Retención de Agua, la cual es de gran importancia, ya que no solo es un atributo de calidad, sino que también posee influencia en el rendimiento del producto, por lo que tiene implicaciones económicas importantes (Cheng y Sun, 2008). La Capacidad de Retención de Agua (CRA) es determinada por la cantidad de agua que es mantenida en la estructura de la carne al momento de efectuarse algún proceso tecnológico, como maduración, porcionado, picado, congelación y cocción (Sánchez, 1997; Zamorano 1996), pero la información disponible es limitada en relación al conocimiento de los cambios estructurales inducidos por estos procedimientos y su efecto en la distribución del agua en la carne, que es de importancia para el atributo sensorial jugosidad, el cual es conocido por ser de mayor preponderancia en la percepción global de calidad de la carne (Straadt *et al.*, 2007).

Procedimientos como la maduración de la carne, poseen como finalidad permitir el desarrollo de características de textura deseables en el producto, mediante la proteólisis autógena cuyo sustrato son los filamentos estructurales del citoesqueleto (Zhang *et al.*, 2006; Ouali *et al.*, 2006), posibilitando el desarrollo de carnes más blandas y conduciendo a la evolución del parámetro de jugosidad, dada una modificación de la relación entre las proteínas y el agua que la carne contiene (Straadt *et al.*, 2007). Durante este periodo de maduración se establece principalmente la fase de tenderización, el cual es un proceso complejo a nivel estructural y funcional, que depende de la especie, la genética del individuo, el estatus metabólico AM de los animales y factores ambientales (Ciobanu *et al.*, 2004). El proceso de ablandamiento de la carne presenta su máxima tasa a temporalidades inferiores a una semana (Campo *et al.*, 2000), por lo que teóricamente en este mismo tiempo deben darse la mayor cantidad de cambios en la distribución del agua y el mayor impacto sobre la retención de la misma. Sin embargo, en la evaluación de Straadt *et al.*, 2007 establecen cambios macroestructurales a tiempos muy superiores que son asociados a una mayor retención de agua en su estructura. Finalmente, cuando el producto va a ser consumido, se realiza la cocción, momento en el cual la carne sufre una alteración estructural tan alta que se genera una gran pérdida de peso, dada la salida de agua desde su estructura. Si se logra minimizar el impacto de estos tratamientos e incrementar al máximo la retención de agua en la carne, se logrará disminuir la pérdida de peso durante su almacenamiento y cocción (Otto *et al.*, 2007),

### 3 | Introducción

consiguiendo cumplir con los estándares de calidad percibidos por el consumidor, referentes a jugosidad y a una reducción menor en el tamaño de la pieza cárnica.

**Figura A:** La ecología alimenticia del humano y de otros primates.



Se establece la proporción de cada tipo de alimento en la dieta de ambos grupos, especificando su calidad nutricional y la destreza necesaria para su obtención. Los alimentos extraídos hacen referencia a aquellos que no son móviles, pero están relacionados con un contexto protector, del cual deben ser removidos para poder ser consumidos, como conchas o relacionados a toxinas. Modificado de Kaplan *et al.*, 2000.

Debido a la relación que tiene la percepción de la jugosidad con la CRA de la carne (Van Oeckel *et al.*, 1999), es necesario evaluar esta última mediante metodologías objetivas, con el fin de optimizar los procesos y ofrecer un producto de mejor calidad al consumidor, mediante la implementación de estrategias que permitan disminuir la pérdida de agua durante el periodo PM, lo que beneficiaría al sector productivo. A corto plazo, existen algunas estrategias, como la implementación de un tiempo determinado de maduración de la carne, que maximice el desempeño de ambos parámetros sensoriales (terneza y jugosidad) y asegure una menor pérdida de peso de la pieza cárnica, de acuerdo al tipo de músculo (Schönfeldt *et al.*, 2011), la raza o cruce del individuo y los diferentes métodos de cocción (Goñi y Salvadori, 2010), entre otros. De igual modo, existen otras estrategias a mediano y largo plazo, que permiten emplear recursos disponibles en

investigación como la disponibilidad de secuencias genómicas (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), tecnologías de punta utilizadas para evaluación genética y herramientas bioinformáticas que permiten la determinación de SNPs certificados como causales de un fenotipo determinado así como la implementación de planes de selección animal y mejoramiento genético (Otto *et al.*, 2007) conducentes a incrementar la frecuencia poblacional de alelos benéficos asociados a los parámetros zootécnicos evaluados y validados en las poblaciones objetivo. Adicionalmente, es necesaria la implementación de buenas prácticas ganaderas, prácticas de manejo de los animales pre y post-sacrificio, al igual que del producto final mediante infraestructuras más adecuadas para su almacenamiento y procesamiento (Cheng y Sun, 2008). También es necesario implementar la educación del consumidor, en lo referente a parámetros de calidad más definidos, en los cuales podría exigir un mejor desempeño, ya que la razón de ser, de cualquier tipo de producción de alimentos es la satisfacción del consumidor.

Por lo tanto, la evaluación de los parámetros asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) (en crudo, CRAr y en cocinado, CRAc) en determinado tipo racial de bovinos y bajo los procedimientos de manejo, sacrificio y obtención del producto final del modo estándar que se realiza en Colombia, es el paso inicial para un proceso de optimización en la cadena productiva de la carne bovina, mediante la formulación de lineamientos que conduzcan a hacerla más competitiva.

Los principales objetivos de este trabajo están encaminados a resaltar la importancia de la CRA de la carne de bovino, ya que este es uno de los parámetros de mayor relevancia económica para el sector cárnico colombiano, por poseer un papel preponderante en el incremento de la competitividad del mismo, al poder lograr un producto de calidad que genere una mayor satisfacción del consumidor y por consiguiente una mayor rentabilidad para los eslabones de la cadena. Igualmente, es importante poder proporcionar conocimiento del comportamiento de esta característica de acuerdo a los factores tiempo de maduración y raza o cruce de los animales de donde proviene la carne, que puede permitir el mejoramiento del producto final. De igual modo, se destaca la necesidad de identificar polimorfismos en genes candidatos asociados, que a futuro permitirán la selección de animales que le pueden conferir a la carne un mejor desempeño productivo, respecto a alimentos sustitutos como la carne de cerdo y de pollo.

# **1. La Capacidad de Retención de Agua (CRA) de la carne de bovino y posibles genes candidato**

## **1.1 Introducción**

La ganadería colombiana posee 23 millones de bovinos de diferentes razas y cruces, entre los cuales el 72% corresponde a ganado *Bos indicus* (cebuínos), el 15% a *Bos taurus* (razas Europeas) y el 13% a las razas criollas (BON, Romosinuano, Chino santandereano, Costeño con cuernos, Sanmartinero y Casanareño entre otros) y sus cruces, las cuales son descendientes de los ganados también europeos que llegaron con la conquista en el siglo XV (FEDEGAN, 2006), siendo estas últimas, fuente de posibles alternativas de cruzamientos gracias a su adaptación, y a la conversión alimenticia conforme a la calidad de las pasturas tropicales (López *et al.*, 2001; Calvo *et al.*, 2009; Martínez, 1998). De acuerdo al Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019 (2006) el consumo *per cápita* de carne en Colombia desde el año 1990 hasta el 2005, evidencia una sustitución gradual del consumo de carne de res por la de pollo, gracias al incremento de la competitividad del sector avícola y a la integración de toda la cadena productiva entre otras cosas, dando como resultado la disminución de los costos de producción. Sumado a lo anterior, existe la amenaza del ingreso de carne proveniente de países líderes en producción ganadera con mejores estándares de calidad y precio y se le adiciona la percepción relativamente baja en calidad sensorial en la carne de bovino, no solo por parte del consumidor, sino también de los demás eslabones del sector. El objetivo de este capítulo radica en resaltar la importancia de la característica Capacidad de Retención de Agua (CRA) en la carne de bovino, mencionar algunos factores que la influncian y finalmente postular varios genes candidato asociados a esta característica.

## **1.2 El papel de la CRA en calidad cárnica y la productividad**

La terneza, la jugosidad y el “*flavor*” son los principales atributos de calidad cárnica exigidos por el consumidor y aunque se han realizado grandes esfuerzos para el control y mejoramiento de estas cualidades, aún existen deficiencias en la comprensión de los mecanismos biológicos involucrados, ya que están influenciadas por múltiples factores genéticos y ambientales relacionados con

propiedades de la fibra muscular y con procesos metabólicos AM y PM (Ponsuksili *et al.*, 2008). Inmediatamente ocurre el sacrificio del animal, se inician procesos metabólicos complejos en el músculo esquelético, los cuales están estrechamente ligados al consumo de energía y su uso. Actualmente, se sabe que el metabolismo muscular tiene un control genético complejo, sin embargo se desconoce cuáles y cuántos son los genes involucrados así como su posible interacción (Ouali *et al.*, 2006).

La jugosidad de la carne, percibida por el consumidor, está determinada por la cantidad de agua que es mantenida en su estructura al momento de ser consumida, luego de cumplir un proceso de maduración, almacenamiento, porcionado y posterior cocción (Sánchez, 1997; Zamorano, 1996). La característica CRA es especialmente importante desde el punto de vista sensorial por su asociación con la denominada jugosidad (Van Oeckel *et al.*, 1999), pero también se considera como un parámetro neurálgico en la rentabilidad para el sector cárnico, ya que un incremento en las pérdidas del contenido de agua en la pieza cárnica (mermas), disminuye su peso a la venta, incrementando tanto el valor unitario para el consumidor como las pérdidas económicas del sector, lo que conlleva al detrimento de la calidad del producto. Varios estudios han permitido establecer que esta característica se encuentra influenciada por múltiples factores genéticos y ambientales durante el período de maduración, convirtiéndolo su mejoramiento en uno de los principales objetivos a ser tenidos en cuenta en los sistemas de producción de carne, a lo que podría contribuir la selección de alelos benéficos de genes que influyan sobre los procesos biológicos que ocurren durante el periodo PM (Laville *et al.*, 2009; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007; Enfält *et al.*, 2006; Lindahl *et al.*, 2004). Esta situación se hizo evidente en evaluaciones realizadas en carne de cerdo, en las que se demostró una pérdida significativa de peso por la salida de agua (varió entre 4,35% y 10,2% durante la primera hora PM), lo que se considera de gran importancia en la cadena cárnica porcina. En este trabajo se pudo demostrar su asociación con la presencia de una mutación en el gen del Receptor de Rianodina tipo 1 (RYR1) (Lahucky *et al.*, 1997), que influye directamente en las cualidades de la carne durante el periodo de maduración y almacenamiento, generando pérdidas económicas en el sector cárnico. Otro procedimiento importante en la percepción de la calidad del producto es la cocción, ya que se encontró una relación directa entre las PPC y las PPG a 24 horas PM, con un incremento que va desde 25,7% en carnes con PPG de 2,7%, hasta 28,4% en carnes con PPG de 6,5%. Cabe destacar que el incremento en la pérdida de agua en la carne al ser sometida a cocción, fácilmente afecta la calidad sensorial (menor jugosidad)

y la satisfacción del consumidor, al reducirse extremadamente el tamaño de la pieza cárnica (Aaslyng *et al.*, 2003).

Por todo lo anterior, la CRA de la carne, representa tanto un componente en la percepción de calidad para el consumidor, como de rentabilidad para la cadena cárnica, por lo que puede ser importante en el mejoramiento de la competitividad del producto, respecto a sustitutos como la carne de pollo, cerdo y carne importada de bovino con elevados estándares de calidad.

### 1.3 El agua en el músculo

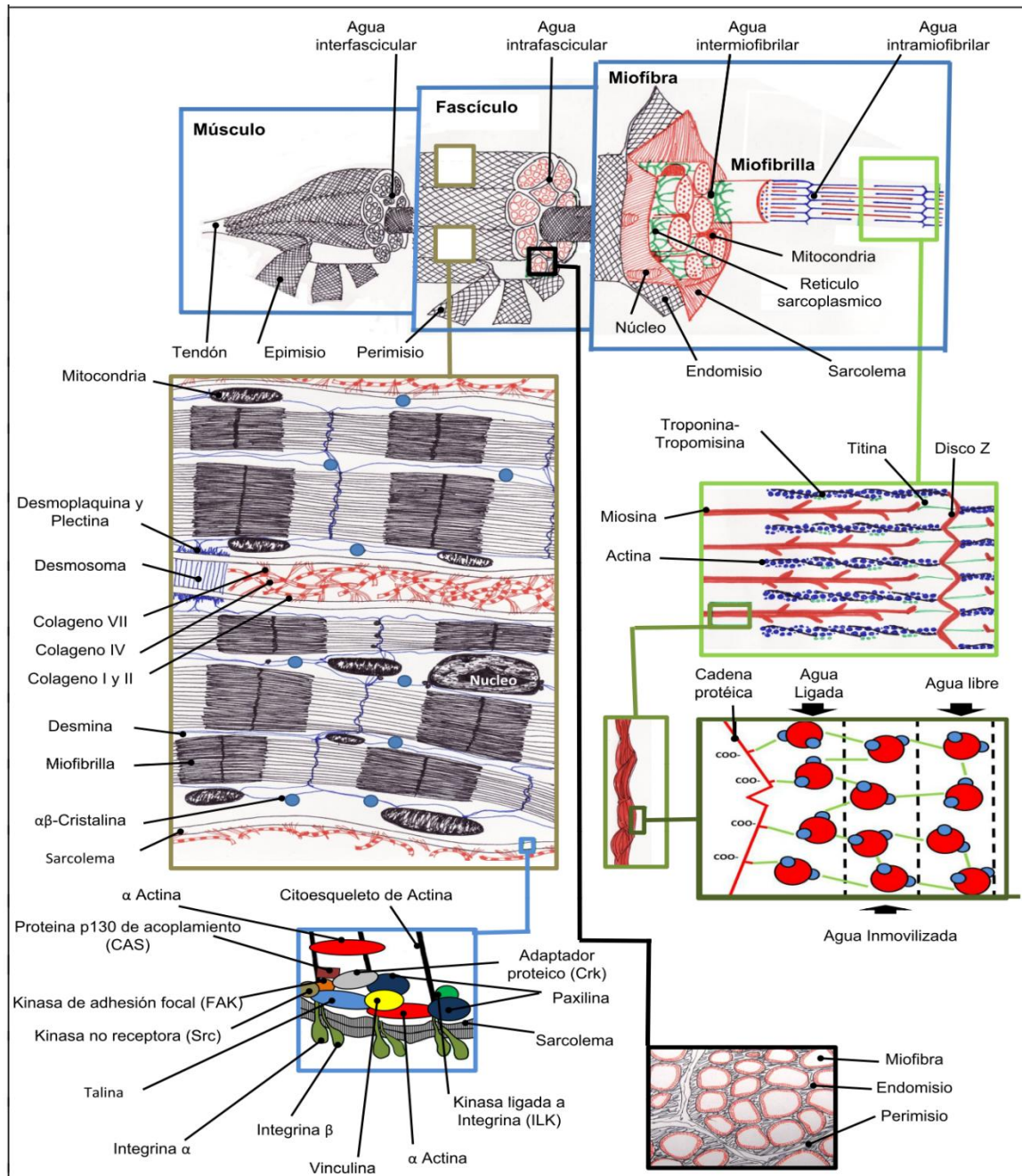
El músculo está constituido por agua, proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, siendo el agua el mayor componente del músculo. En tejidos magros el contenido de agua es cercano al 75% de su peso, de la cual casi el 80-85% está localizada dentro de la matriz proteica, en el interior de los filamentos del sarcómero y es llamada agua intramiofibrilar, (ver figura I; Huff-Lonergan y Lonergan, 2005 y Tornberg, 2005). El segundo componente es la proteína, con cerca del 22% del peso total, siendo la relación agua: proteína cercana a 3,5:1 (Te Pas *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de interacciones en la matriz proteica y acuosa en el músculo-carne (figura 1-1), la primera de tipo proteína-agua (o llamada “agua ligada”, que varía entre 7 a 8% del total del agua según Kolczak *et al.*, 2007) y la segunda de tipo agua-agua (con dos tipos de asociación diferentes, la primera llamada “agua inmovilizada” y la segunda “agua libre” –variando de 74 a 75% y 16,6 a 17,6% respectivamente, según Kolczak *et al.*, 2007). La interacción proteína-agua está dada por regiones de las proteínas con una capacidad potencial de producir interacciones débiles no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas electroestáticas, van der Waals e interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas que sumadas pueden ser muy estables) con las moléculas de agua. La segunda, generada por la atracción electroestática entre el átomo de oxígeno de una molécula de agua, con los átomos de hidrógeno de otras dos moléculas, lo que genera una gran cohesión interna en el líquido (Nelson y Cox, 2005). Otro tipo de asociación está dada por la distancia entre los filamentos de actina-miosina, la cual se asemeja a un capilar y es destacado por Huff-Lonergan y Lonergan, (2005) como la fuerza de capilaridad (figura 1-1), la cual puede mantener un número determinado de moléculas de agua. Debido a su asociación con el agua, el componente proteico del músculo es muy importante y se puede clasificar en tres categorías (Tornberg, 2005):

- Miofibrilares (50-55%): dividida en fibrosas (como actina y miosina), reguladoras (como tropomiosina y Troponina) y de sostén (como Titina y Desmina).

- Sarcoplásmicas (30-34%): proteínas solubles (como CreatinKinasa y Mioglobina), que contribuyen poco a la retención de agua, sobre todo luego del proceso de cocción de la carne.
- Proteínas del tejido Conectivo (10-15%), como el Colágeno.

**Figura 1-1:** El músculo, estructura, proteínas constituyentes y su distribución del agua.



Modificado de Palka y Daun (1999), Puolanne y Halonen (2010), Straadt *et al.* (2007), Lawson (2004) y Pearce *et al.* (2011).

## 1.4 Cambios en el músculo durante el PM

Cabe destacar que además del contenido, localización y movilidad del agua existen factores AM (raza, músculo, estrés pre-sacrificio, el genotipo, dieta, entre otros) y PM (procedimiento de sacrificio, tiempo y temperatura de maduración) que pueden afectar la calidad de la carne (Harper, 1999; Pearce *et al.*, 2011). Una vez se realiza el sacrificio del animal se desencadenan una serie de cambios que modulan la conversión del músculo en carne, los cuales se pueden dividir en tres fases: fase de apoptosis o muerte celular programada, fase de *rigor mortis* y fase de tenderización.

### 1.4.1 Fase de Apoptosis

Al detenerse la circulación sanguínea, se inician en el tejido muscular una serie de cambios muy complejos. Los diferentes tejidos continúan su actividad metabólica bajo control local, consumiendo sus reservas energéticas para tratar de mantener la temperatura e integridad estructural de sus células, frente a la tendencia espontánea a la degradación (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, pronto se inicia la apoptosis o muerte programada de las células musculares al perder el suministro de nutrientes y oxígeno. Este proceso es modulado por las Caspasas, siendo estas enzimas un elemento fundamental que facilita la acción de otros sistemas proteolíticos como Catepsinas y Calpaínas (Ouali *et al.*, 2006). Con el fallo en el aporte de oxígeno por la sangre al músculo y la subsecuente caída del potencial de oxidación, el sistema enzimático citocromo es incapaz de actuar, imposibilitando la re-síntesis de ATP por este mecanismo. Debido a la actividad constante de las ATPasas sarcoplasmáticas, desciende el nivel de ATP produciendo simultáneamente fósforo inorgánico que estimula la degradación del glucógeno a ácido láctico. La re-síntesis de ATP por glucólisis anaeróbica es incapaz de mantener el nivel de ATP debido a que es un proceso poco eficaz y a medida que desciende este nivel energético, se forman los complejos de acto-miosina causando la inextensibilidad propia del músculo en *rigor mortis* (Zhang *et al.*, 2006).

### 1.4.2 Fase de *Rigor mortis*

A medida que discurre la glucólisis PM, el músculo se hace inextensible, estado que se conoce como *rigor mortis*. Cuando los músculos entran en esta fase (hallándose en estado de contracción) los filamentos de actina y miosina se superponen completamente, formándose muchos enlaces cruzados y si se realiza la cocción en esta fase, el resultado es una carne de mayor dureza (Zhang *et al.*, 2006).

## **1.5 Fase de tenderización**

Antes de que se alcance el pH final se inician otros cambios degradativos cuya intensidad afectan la naturaleza y la cantidad de las proteínas; estos cambios se detienen por la cocción (Zhang *et al.*, 2006). La dureza final de la carne depende del grado de alteración de los componentes estructurales del músculo y de las proteínas asociadas, durante y subsecuente al *rigor mortis*. La proteólisis contribuye a esta alteración a través de la degradación de proteínas, lo que ha sido observado en músculos mantenidos a temperaturas de refrigeración. Sin embargo, algunos factores físicos como el grado de acortamiento del músculo también contribuyen a la dureza final (Te Pas *et al.*, 2004). En el estudio de Straadt *et al.* (2007) se evaluó el efecto del período de maduración sobre las estructuras de la carne. A los 7 y 14 días de maduración se pudo observar el hinchamiento de varias fibras como consecuencia benéfica de la proteólisis, ya que en esta condición el músculo puede retener más agua, pero como lo reportan Campo *et al.* (2000) la máxima tenderización (99.76%) de la carne se realiza durante la primera semana de maduración, presentándose el mayor grado de proteólisis en la carne y teóricamente un mayor número de fibras que exhiben hinchamiento, el cual está asociado a una mayor CRA. Posiblemente, esto es debido a que el hinchamiento permite una mejor interacción entre las proteínas lisadas enzimáticamente y el agua, generando una fase más estable (Lonergan y Lonergan, 2005).

## **1.6 Efectos de los cambios PM en la CRA**

Aunque Kolczak *et al.* (2007) al evaluar los músculos ST y *Psoas major* concluyeron que las proporciones de agua ligada, inmovilizada y libre se mantienen casi invariables a través del período de maduración, es claro que los cambios PM que ocurren en el metabolismo celular inmediatamente después del sacrificio, ocasionan cambios bioquímicos y físicos que pueden afectar la CRA del músculo y por consiguiente de la carne.

### **1.6.1 Cambios bioquímicos**

- Consumo gradual de la energía disponible.
- Paso desde un metabolismo aeróbico a anaeróbico, favoreciendo la producción y acumulación de ácido láctico, resultando en una disminución del pH desde valores cercanos a la neutralidad hasta 5.4-5.8.
- Incremento en la fuerza iónica, en parte, causada por la inhabilidad de las bombas dependientes de ATP.

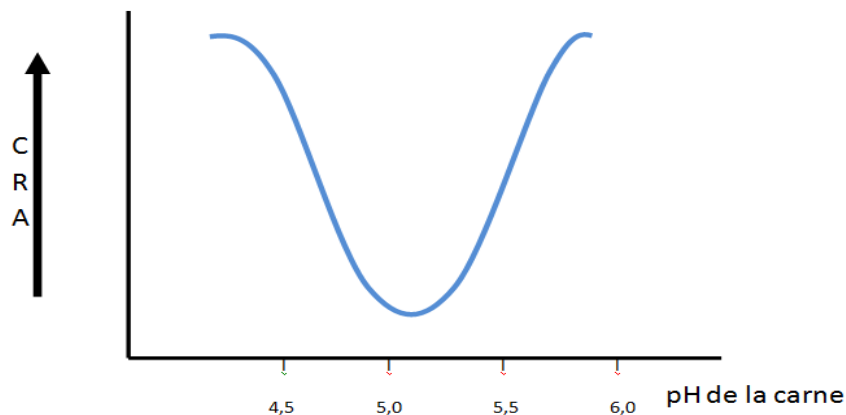
- Incremento en la inhabilidad de la célula para mantener las condiciones de reducción, pasando a condiciones oxidativas.

Todos estos cambios pueden tener efectos profundos en numerosas proteínas de la célula muscular, especialmente en los sistemas enzimáticos proteolíticos, considerados como cruciales en la tenderización PM (Huff-Lonergan y Lonergan, 2008). El descenso del pH durante el PM hace que muchas proteínas de la carne alcancen su punto isoeléctrico, por modificarse la configuración de los aminoácidos que las constituyen (paso de la configuración aniónica a zwitterión). Bajo la forma anión (-) y catión (+) los aminoácidos tienden a retener más agua (figura 1-2), mientras que bajo la forma zwitterión (equilibrio de cargas) su retención es mínima (Sánchez, 1997).

### 1.6.2 Cambios físicos

Algunas de las proteínas estructurales constituyentes de la costámera, proteínas de membrana y conexiones inter-miofibrilares, poseen correlación con la terneza de la carne y por ende con la CRA, según el grado de desnaturalización. Farouk *et al.* (2012) postulan el “efecto esponja” determinado por una progresiva desintegración de la estructura de la célula y la disrupción de proteínas estructurales como Desmina, Vinculina, Talina, Titina, Nebulina y Filamina, sumado a un incremento en la viscosidad del fluido celular dado por la gelificación y agregación proteica.

**Figura 1-2:** Relación entre el pH y la CRA.



Tomado de Sánchez (1997).

El proceso de proteólisis de filamentos clave y su asociación con un incremento en la CRA, está dada por permitir el hinchamiento de las miofibrillas, haciendo que la estructura de la carne retenga más agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Straadt *et al.* (2007) evaluaron el efecto del

período de maduración de la carne sobre la CRA y observaron una disminución progresiva durante las primeras 48 horas PM, valor que permaneció constante hasta el día 4, y mejoró significativamente al día 14. Las PPC mostraron un comportamiento similar ya que presentaron un incremento inicial y una posterior estabilización entre los días 7 y 14. Lo anterior confirma el papel que desempeña la proteólisis sobre la CRA (Bee *et al.*, 2007) y las PPC y su asociación con la ternura. De igual modo, en otro trabajo se encontró una elevada correlación entre las PPG y la cantidad de Desmina sin proteólisis enzimática entre los días 1 y 7 de maduración. Cuando las cantidades de Desmina con proteólisis son bajas se produce el acortamiento de las miofibrillas, lo que finalmente se va a traducir en la contracción de todo el músculo, induciendo la salida de agua desde su interior hacia el espacio extracelular (Zhang *et al.*, 2006). En contraste con lo anterior, la proteólisis de la subunidad  $\beta 1$  de la Integrina puede afectar negativamente la CRA de la carne, ya que ha sido sugerida como responsable del incremento en la formación de los canales de goteo en la membrana celular (Straadt *et al.*, 2008; Lawson, 2004), lo que está respaldado con la disminución de las PPG y una cantidad elevada de Integrina sin proteólisis durante el periodo de maduración PM en carne de cerdo, reportado por Zhang *et al.* (2008).

## **1.7 La cocción de la carne**

La cocción tiene un efecto importante sobre las proteínas de la célula muscular y del tejido conectivo (Bouhrara *et al.*, 2011) desintegrando su estructura y modificando la organización del agua (Bertram *et al.*, 2003). La proporción total de agua en la carne disminuye en un 15-17% cuando es sometida a cocción a 75°C, si se compara con el contenido de agua en carne cruda. Estas pérdidas de agua pueden variar dependiendo del método (en agua, asado o frito Kolczak *et al.*, 2007), el tiempo y la temperatura de cocción (Christensen *et al.*, 2011). La reducción en el contenido total de agua en la carne después de la cocción genera una interacción más fuerte de esta con las proteínas (Bouhrara *et al.*, 2012), lo que se refuerza con el pico de solubilidad del colágeno (70°C) (Palka, 1999).

La cocción ocasiona una disminución del volumen mediante la contracción de la pieza cárnica, que según Bouhrara *et al.* (2012) es en mayor medida una contracción de tipo transversal (35%), respecto a la contracción de tipo longitudinal, que fue estimada hasta del 3%, cuando compararon temperaturas entre 20°C y 75°C. Cabe destacar que la contracción de tipo transversal es la responsable de la expulsión de la mayor parte del agua hacia la superficie de la carne, lo que se traduciría en una disminución del área superficial de la pieza cárnica que puede llegar hasta un 27%

(Bouhrara *et al.*, 2011). En el estudio de Christensen *et al.* (2011) se obtuvieron resultados similares, ya que cuando la carne fue sometida a cocción se produjo una contracción transversal, producido por una disminución de los espacios intermiofibrilares, lo que se pudo correlacionar con piezas cárnicas con elevada expulsión de agua. De modo similar, Li *et al.* (2010) reportaron una reducción hasta del 63,1% en el diámetro de la fibra cuando compararon temperaturas de cocción entre 40°C y 90°C, lo que permitió observar que la salida de agua se inicia a partir de los 40°C y se incrementa cuando alcanza los 53°C. En otro estudio encontraron una reducción de hasta el 48% en la masa miofibrilar cuando se sometieron las piezas cárnicas a cocción a una temperatura de 100°C durante 15` y adicionalmente se pudo observar, un incremento (19%) en el espacio entre miofibras (Astruc *et al.*, 2010), lo que concuerda con la contracción de tipo transversal observada por Bouhrara *et al.* (2011) y la reducción en el diámetro de la fibra muscular reportada por Li *et al.* (2010).

En estudios previos se ha podido confirmar que a la temperatura de denaturación del endomisio (50°C) se produce la contracción de la fibra muscular, lo que facilita la salida de agua (Li *et al.*, 2010). Cabe destacar que se ha podido ratificar que cuando la pieza cárnica alcanza la temperatura de cocción a la cual se produce la denaturación de las proteínas de la matriz extracelular se favorece la expulsión de agua desde el espacio interfascicular del músculo (Bouhrara *et al.*, 2011).

La denaturación térmica de las proteínas desencadena cambios importantes en la pieza cárnica durante la cocción. Entre los cambios estructurales de este componente se destacan:

- Despliegue: daño en la estructura helicoidal y exposición de regiones hidrofóbicas proteicas que originan modificaciones de la interacción proteína-agua (Tornberg, 2005; Christensen *et al.*, 2011).
- Interacciones proteína-proteína: agregación, formación de geles, granulación y modificación o disminución de la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas (Tornberg, 2005; Astruc *et al.*, 2010).
- Contracción de las proteínas fibrosas: incremento de la “fuerza elástica” que obliga a la salida de agua (Tornberg, 2005).

Entre las modificaciones químicas que ocurren en las proteínas cuando la pieza cárnica es sometida a la cocción Promeyrat *et al.* (2010) mencionan la formación de los puentes de ditirosina (por la oxidación de la tirosina), puentes disulfuro (por la oxidación de cisteínas) y puentes amida (por oxidación de aminoácidos básicos), las cuales contribuyen al proceso de agregación proteica.

Todos los cambios ocurridos a las piezas cárnicas durante la cocción, la contracción de tipo transversal de la fibra muscular (Bouhrara *et al.*, 2011), la reducción en el diámetro de la fibra muscular (Li *et al.*, 2010), el incremento en el espacio entre miofibras (Astruc *et al.*, 2010) y la disminución en el diámetro del sarcómero (Christensen *et al.*, 2011) conducen a incrementar la movilización o salida de agua celular, facilitada por la denaturación térmica de las proteínas que ocasiona la deformación de la pieza cárnica.

## **1.8 Genes que pueden influir sobre la CRA en la carne**

Los genes con relevancia fisiológica sobre la CRA, deben ser considerados como candidatos primarios y deben expresarse preferencialmente en los órganos relacionados con la característica y durante determinados estados del desarrollo (Ron y Weller, 2007). La postulación de este tipo de genes también se puede basar en estudios previos en otras especies de animales domésticos, como es el caso del cerdo, especie en la que se han realizado estudios previos de asociación entre mutaciones identificadas en genes candidato y características organolépticas de la carne. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los procesos que ocurren durante el periodo de maduración PM, dando el paso de “músculo” a “carne” son modulados por genes que se expresan *in-vivo* en el animal, llegando a ejercer gran influencia sobre la calidad del producto final, la carne. Por lo tanto, es de crucial importancia incluir en la evaluación, genes que codifican enzimas que intervienen tanto en el metabolismo celular, como enzimas proteolíticas que afectan la estructura de los miofilamentos y proteínas estructurales del sarcolema. Por consiguiente, debido a que trabajos previos han demostrado que la CRA es influenciada por el metabolismo PM y el grado de alteración de la estructura celular durante la conversión músculo-carne, los genes candidato postulados deben intervenir en al menos uno de estos dos procesos.

Un estudio previo en quince razas europeas cuyo objetivo era caracterizar y validar 206 genes considerados como candidatos posiblemente asociados con producción y calidad de carne, permitió identificar 672 SNP, los cuales pueden contribuir a evaluar el papel de los genes en el control genético del desarrollo muscular y la calidad cárnica (Williams *et al.*, 2009). Dentro de los genes candidato validados en ese estudio, se incluyeron el Receptor de la Rianodina tipo 1 (RYR1) y la Subunidad Gamma 3 de la proteína kinasa AMP activada (PRKAG3), los cuales en trabajos previos se han encontrado asociados a calidad cárnica en el cerdo (Laville *et al.*, 2009; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007; Enfält *et al.*, 2006; Lindahl *et al.*, 2004), algunos genes codificantes de enzimas proteolíticas con efecto sobre la terneza de la carne como la  $\mu$ -Calpaína (CAPN-1) y la

Calpastatina (CAST) y proteínas estructurales como la Desmina (DES) (Bee *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2004).

## 1.8.1 Genes que afectan el metabolismo muscular

### 1.8.1.1 Receptor de la Rianodina tipo 1 (RYR1).

La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  durante el proceso de excitación-contracción en las fibras musculares esqueléticas se inicia por la interacción funcional de la membrana exterior del sarcolema a través de los Túbulos T, en los que se localiza el receptor Dihidropiridina (DHPR) que es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L de membrana exterior, con el RS, que contiene el receptor de la Rianodina tipo I, que es el canal responsable de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Felder *et al.*, 2002). Ikemoto *et al.*, (1997) pudieron demostrar la expresión de los genes RYR1 y RYR3 en fibras del músculo esquelético cuando analizaron ratones *knock-out* para ambos genes. Los resultados permitieron concluir que aunque las fibras musculares mantenían la capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$ , el mecanismo de liberación del mismo se encontraba bloqueado (Ikemoto *et al.*, 1997). En otro estudio con embriones de ratón *knock-out* para RYR1 las miofibrillas revelaron una apariencia desorganizada, lo que permitió demostrar su importancia durante la miogénesis, en contraste con el desarrollo normal de las miofibrillas de los ratones *knock-out* para RYR3. Cuando se evaluó la respuesta contráctil de las fibras musculares durante la activación directa con  $\text{Ca}^{2+}$   $\mu\text{molar}$  en ratones RYR1<sup>-/-</sup>; RYR3<sup>+/+</sup>, el desarrollo de la fuerza fue del 14%, en contraste con los ratones RYR1<sup>-/-</sup>; RYR3<sup>-/-</sup> en los que fue del 7%, respecto del control RYR1<sup>+/+</sup>; RYR3<sup>+/+</sup>. Lo anterior, pudo demostrar que la ausencia de expresión del gen RYR3 no tiene efecto sobre el desarrollo de la fuerza muscular a diferencia de la respuesta evidenciada en ratones *knock-out* para RYR1 (Barone *et al.*, 1998). El gen RYR1 se ha encontrado asociado a parámetros de calidad cárnica en estudios previos en cerdos (Laville *et al.*, 2009; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007). Cuando se produce una alteración en la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en las fibras musculares esqueléticas del animal, se ha observado un efecto directo sobre la contracción muscular, que durante el PM se manifiesta en un consumo incrementado de ATP vía glicolítica lo que lleva al descenso del pH final de la carne, ocasionando una menor CRA.

Desde el año 2007 se demostró que los cerdos portadores del polimorfismo R615C (denominado alelo n) del gen RYR1 (Ta, *et al.*, 2007) presentan un mayor descenso del pH muscular durante el periodo PM y en trabajos posteriores se ha demostrado que el músculo *Longissimus lumborum* de

cerdos con genotipo nn presenta un pH más bajo a los 45 minutos PM (Laville *et al.*, 2009) y una menor CRA (Lahucky *et al.*, 1999). Otto *et al.* (2007) encontraron diferencias significativas para el pH a los 45 minutos PM, cuando compararon lomos de individuos con genotipos Nn y NN, sin embargo, esta significancia no fue observada a las 24 horas PM. Cabe destacar que los cerdos heterocigotos (Nn) mostraron un incremento de 43% de PPG en contraste con los cerdos NN. El gen RYR1 del bovino está ubicado en el cromosoma BTA18 y posee 107 exones ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **1.8.1.2 Subunidad Gamma 3 de la proteína kinasa AMP activada (PRKAG3)**

La proteína kinasa AMP activada (AMPK) se considera un sensor de la energía celular y es sensible al incremento de la concentración de AMP en respuesta a una disminución en el nivel energético de la célula o a estrés. Las concentraciones elevadas de ATP también producen un efecto antagónico sobre la activación por AMP, lo que hace que el sistema sea sensible no solo a un aumento en la concentración de AMP, sino también a un incremento en la tasa AMP:ATP (Grahame *et al.*, 2005), a través de uno de los tres constituyentes de la molécula AMPK, la proteína PRKAG3. Este gen se ha encontrado ampliamente asociado a alteraciones en el metabolismo del glucógeno en humanos y cerdos. En el estudio de Barnes *et al.* (2005) empleando una línea genética de ratones transgénicos portadores de la mutación R225Q de este gen, reportaron un incremento en el contenido de glucógeno muscular dado un cambio en la utilización de la glucosa, pasando de una finalidad catalítica a anabólica. La mutación R225Q se establece como *missense* al generar una pérdida de la función molecular eliminando la regulación alostérica por AMP:ATP, causando un incremento en la actividad basal del AMPK.

La proteína PRKAG3 es la encargada de la activación de la molécula AMPK, por lo que se encuentra involucrada en la regulación de su actividad en el músculo esquelético y por tanto en el metabolismo del glucógeno, por lo que los estudios de asociación entre polimorfismos de este gen y la calidad cárnica, se basan en alteraciones en la deposición de glucógeno en el músculo antes del sacrificio del animal y su conversión en ácido láctico durante el período PM, lo que influye en el pH y la CRA (figura 1-2), influyendo en la calidad de la carne (Ouali *et al.*, 2006). En cerdos se ha podido identificar el alelo silvestre, rn+ (199V-200R) así como dos mutaciones RN- (199V-200Q) y rn\* (199I-200R) que poseen asociación con la CRA. En el estudio de Enfält *et al.* (2009) se pudo demostrar que los animales portadores del genotipo RN-/- poseían un mayor contenido de

glucógeno muscular, humedad y rendimiento en carne, pero por el contrario el contenido de proteína era el más bajo, cuando se comparó con los no portadores de al menos una copia del alelo RN-.

Lindahl *et al.*, (2004) reportaron en el músculo LD de cerdos, un efecto negativo del alelo RN- sobre el pH final y la CRAr y CRAc, al ser comparado con los alelos rn+ y rn\*, estableciendo la siguiente jerarquía para la característica pH final: genotipos RN-/- < rn+/rn+ < rn+/rn\* = rn\*/rn\*. Se pudo concluir que la carne de cerdos cuyo genotipo poseía al menos una copia del alelo RN- presentaba un pH más bajo y mayores valores de PPG y PPC. Sin embargo, Scheffler *et al.* (2011) indicaron que el cambio en la deposición de glucógeno es solo una de las modificaciones que presentan los animales con la variante RN- respecto a los que expresan la proteína normal, por lo que sugieren la necesidad de establecer diferencias tanto en las propiedades como en la cantidad y la actividad de la enzima, el tipo de fibra muscular y su estatus energético. El gen de la proteína PRKAG3 ha sido reportado con una alta variabilidad en diferentes razas de bovinos lo que incrementa la posibilidad de que posea una alta influencia en las cualidades sensoriales de la carne. Yu *et al.* (2005) caracterizaron el gen de la proteína PRKAG3 en una raza coreana y pudieron identificar tres mutaciones funcionales y un *splicing* alternativo en el exón 2 de este gen y Roux *et al.* (2006) en las razas bovinas Charolais, Limousin y Holstein identificaron 32 SNPs adicionales, cinco de los cuales son funcionales, porque producen cambios de un aminoácido en la secuencia proteica, lo que podría tener un efecto directo sobre el funcionamiento de la proteína. Cabe destacar las diferencias encontradas en las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados en las razas analizadas, hallando algunas mutaciones exclusivas de una raza, lo que puede ser el resultado de los lineamientos de selección a los que han sido sometidas durante décadas. El gen PRKAG3 está ubicado en el BTA2, posee 14 exones y hay 101 SNPs reportados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Según Otto *et al.* (2007) el polimorfismo R615C del gen RYR1 seguido por el marcador I199V identificado en el gen PRKAG3, convierte a estos dos genes, como los de mayor influencia sobre la calidad cárnica en cerdo, aunque de modo independiente. Para el caso de bovino, estos genes han sido poco estudiados en investigaciones de asociación con parámetros de calidad cárnica.

### **1.8.1.3 Otros genes**

Los genes PGAM2 y PKM2 son mencionados por Fontanesi *et al.* (2008) como candidatos posiblemente asociados, ya que están involucrados en vías energéticas celulares y Ponsuksili *et al.* (2008) reportan la existencia de otro grupo de genes involucrados en la producción de ATP mediante la vía de fosforilación oxidativa, que al disminuir su expresión favorecen el incremento de las PPG, dada la utilización de la vía glucolítica en la fibra muscular, según la limitada disponibilidad de O<sub>2</sub> y por lo tanto poseen un efecto potencial sobre los parámetros de calidad de la carne.

## **1.8.2 Genes que afectan la constitución física del músculo**

### **1.8.2.1 Sistema Calpaína-Calpastatina y proteínas sustrato.**

Los filamentos estructurales que son sustrato de los sistemas proteolíticos pueden jugar un papel importante en la CRA, ya que al sufrir proteólisis enzimática permiten la formación de una fase más estable de agua-proteína, disminuyendo la pérdida de agua mediante el efecto esponja mencionado por Farouk *et al.* (2012). Pero al no ser objeto de proteólisis, pueden inducir el encogimiento de la miofibra, desplazando el agua intracelular hacia el espacio exterior. Por esta razón los genes que codifican los sistemas proteolíticos y las proteínas estructurales pueden ser de gran importancia en esta característica. Ponsuksili *et al.* (2008) establecen que varios genes responsables de la estructura celular, como es el caso de filamentos citoesqueléticos, incrementan su expresión en carne con mayores PPG.

El sistema Calpaína-Calpastatina posee un importante rol biológico *in-vivo*, pero su asociación con la calidad de la carne se da gracias al papel que desempeña durante el PM (Pomponio *et al.*, 2008). La Calpaína posee actividad proteolítica sobre diversos filamentos del costámero, el citoesqueleto y el disco Z, incluyendo filamentos como la Vinculina, la Desmina, la  $\alpha$ -Actina (Bond y Warner, 2007) y Anquirina 1 (Aslan *et al.*, 2012), siendo la Calpastatina su inhibidor (Motter *et al.*, 2009). Varios marcadores de este sistema han sido asociados por Pinto *et al.* (2010) en bovino con la característica terneza, estableciendo una relación epistática para ambos genes, basado en que una mayor acción de la  $\mu$ -Calpaína durante el periodo PM puede dar como resultado una menor pérdida de agua desde la estructura celular, debido a la proteólisis de una mayor cantidad de filamentos proteicos (Bond y Warner, 2007).

Bee *et al.* (2007) establecieron que en carne de cerdo la abundancia de la Desmina y la Talina sin sufrir lisis a 2, 3 y 5 días PM, fueron positivamente correlacionadas con las PPG después de 1, 2 y 4 días de almacenamiento, indicando que cuando hay una elevada cantidad de proteínas citoesqueléticas sin sufrir proteólisis, se presentan mayores PPG. También establecieron que el pH temprano en el PM se relaciona con la degradación de proteínas citoesqueléticas, ocurriendo más rápido en carcasas que presentaban pH inferiores a 5,7 a las 3 horas PM. De tal modo que la caída del pH puede influir en la disrupción proteica y por lo tanto en el acortamiento del sarcómero, obligando a la expulsión de agua desde la matriz celular. Pero la proteólisis de otro grupo de proteínas, como es el caso de la subunidad  $\beta 1$  de la Integrina (proteína de membrana) ha sido reportada como negativa para la CRA, fundamento empleado por McBryan *et al.* (2010) como la responsable de haber encontrado en su estudio una mayor PPG en carne de cerdo con menor actividad de Calpastatina PM (ya que permite una mayor acción de la Calpaína). El gen de la  $\mu$ -Calpaína se ubica en el BTA29 bovino y el gen de la Calpastatina en el BTA7 del bovino, Este último posee cuatro variantes diferentes según la región codificada. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 1.8.2.2 Proteínas de la matriz extracelular

El IMCT está compuesto principalmente por fibras de Colágeno y Elastina rodeadas por una matriz de proteoglicanos (ej. Decorina), siendo el Colágeno tipo I y III las fibras más abundantes en el endomisio, perimisio y epimisio, mientras que el Colágeno Tipo IV es el principal componente no fibrilar de la membrana basal que liga la capa fibrilar (retículo) del endomisio y la membrana celular ó sarcolema (Purslow, 2005). En el estudio de McBryan *et al.* (2010) se observó que piezas cárnicas (*Longissimus toraxis lumborum* porcino) con valores elevados de PPG poseían una expresión superior de Colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1). De modo similar, Ponsuksili *et al.* (2008) reportaron el incremento de la expresión de varios genes (Laminina alfa 4 -LAMA4 y gamma 1 -LAMC1, Fibronectina 1 -FN1, Septina 5 -PNUTL1, Colágeno tipo IV alfa 1 -COL4A1, tipo I alfa 1 -COL1A1 y tipo VI alfa 3 -COL6A3) en carne de cerdo con PPG elevadas.

### 1.8.3 Otros genes posiblemente asociados

Actualmente existen varios grupos de investigación que han postulado nuevos genes asociados a características de calidad cárnica en cerdo. En el estudio de Lee *et al.* (2011) se pudo identificar la asociación de mutaciones puntuales en varios genes con algunos parámetros de calidad cárnica, aunque no establecen claramente un sustento biológico. Ponsuksili *et al.* (2008) correlacionaron el

nivel de expresión génica con el parámetro PPG y establecieron varios genes involucrados en procesos como: 1. Actividades transductora y receptora de señales; 2. Citoesqueleto; 3. Membrana plasmática; 4. Comunicación y señalización celular; 5. Vías de señalización del Calcio; 6. Matriz extracelular; 7. Genes mitocondriales; 8. Metabolismo de proteínas entre otros, los cuales pueden ser establecidos como potenciales genes candidato en bovino.

## **1.9 El mejoramiento genético como una herramienta útil**

Durante las últimas décadas, los avances en genética molecular han permitido la identificación de múltiples genes o marcadores genéticos asociados con estos, que afectan características de interés en ganado, incluyendo genes para características monogénicas y QTL (*Quantitative Traits Loci*) o regiones genómicas que afectan características cuantitativas (Malek *et al.*, 2001), las cuales han permitido el incremento de la respuesta a la selección, en particular para parámetros que son difíciles de mejorar con la selección convencional, tales como aquellas de baja heredabilidad o características cuya medición fenotípica sea difícil, costosa o que solo pueden ser evaluadas en animales adultos o en estado PM (Dekkers, 2004), como las características de calidad cárnica. La aplicación de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético radica en la posibilidad de genotipificar los individuos en loci específicos y posiblemente uno de los ejemplos más exitosos fue la determinación de un QTN a partir de un QTL asociado previamente a calidad y producción láctea (Olsen *et al.*, 2007). Para cumplir con el propósito de mejorar el desempeño productivo de los animales de granja, existen tres tipos de loci genéticos polimórficos observables: 1) Marcadores directos: loci que codifican para una mutación funcional; 2) Marcadores DL: loci que están en desequilibrio de ligamiento con la mutación funcional; 3) Marcadores EL: loci que están en equilibrio de ligamiento con la mutación funcional en poblaciones cruzadas. La selección según el tipo de marcador utilizado, es referida como, selección asistida por genes (GAS), selección asistida por marcadores DL (LD-MAS) y selección asistida por marcadores EL (LE-MAS) (Dekkers, 2004 y Corva, 2010).

## **1.10 Conclusiones**

La Capacidad de Retención de Agua (CRA) de la carne no solo presenta asociación con la percepción sensorial de la jugosidad, sino también con las mermas o pérdida de peso de las piezas cárnicas, durante el proceso de maduración y/o cocción al que debe ser sometida la carne con el fin de garantizar su calidad. Por todo lo anterior, se destaca la importancia de esta característica, la

CRA, en el sector cárnico mundial, lo que hace indispensable el desarrollo de estrategias que permitan aclarar y mejorar su comportamiento.

Durante el proceso de conversión músculo-carne se desencadenan una serie de eventos muy complejos, que culminan en la presentación de unas determinadas características del producto final. La modulación y/o control de esos caracteres en condiciones normales esta comandada por la presencia de polimorfismos genéticos de múltiples genes, que pueden originar variaciones de la CRA. La identificación de mutaciones con un efecto sobre la capacidad de retención de agua en la estructura celular, permitirá desarrollar planes de selección y mejora más eficientes, dadas las condiciones de medición de estos parámetros. Finalmente, algunos de los genes con mayor influencia según revisión de literatura sobre el parámetro CRA en carne son PRKAG3, RYR1, CAPN1, CAST y DES.



## **2. Efecto del Cruce y la Maduración sobre la Capacidad de Retención de Agua en crudo y cocinado en carne de bovino**

### **2.1 Introducción**

En el trópico colombiano, los sistemas productivos ganaderos cuentan con un recurso genético muy importante, constituido por las denominadas “razas criollas”, que son el resultado de la multiplicación de ganado abandonado o perdido a partir de los cuales se crearon rebaños salvajes o cimarrones, cuya progresiva adaptación al medio, originó animales cada vez más resistentes y ágiles (Beteta, 1997). En este grupo de razas se encuentran el Romosinuano y el BON (Blanco Orejinegro) radicando su importancia en la variabilidad genética responsable de su adaptación. Sánchez *et al.* (2005) demostraron que estas dos razas poseen una mayor riqueza alélica cuando se compararon con otras poblaciones de ganado bovino criollo de Sudamérica. Cabe destacar la necesidad de utilizar sistemas productivos adaptados al medio que se beneficien de esta variabilidad genética, seleccionando individuos con un potencial genético superior (Renand *et al.* 2001) que se verá reflejado en la productividad del sistema (cantidad, calidad y bienestar), siendo indispensable, realizar estudios que evalúen parámetros productivos de estas razas con el fin de establecer su potencialidad y de esta manera contribuir al desarrollo del sector agropecuario, el cual posee un rol fundamental en el desarrollo rural sostenible del país, al generar empleo descentralizado, divisas y satisfacer las necesidades de consumo de las familias rurales y urbanas (Anzola, 2005).

Las razas criollas han cumplido un proceso de adaptación de aproximadamente 500 años, lo que les ha proporcionado la habilidad de aprovechar forrajes de mala calidad, así como la adquisición de características como docilidad, habilidad materna, precocidad, fertilidad y resistencia. Debido a que son portadoras de información genética única e importante (López *et al.*, 2001) poseen

ventajas indispensables en los sistemas productivos que se desarrollan en estas regiones, cuando se comparan con razas especializadas de carne que han sido seleccionadas por grandes periodos de tiempo (Muchenje *et al.*, 2008) en otras regiones del mundo y que no cuentan con la adaptación necesaria para hacerle frente a los ambientes hostiles del trópico sudamericano. La inclusión de razas criollas en programas de mejora y selección por medio de su cruce con razas convencionalmente utilizadas en producción de carne es una forma de incrementar la competitividad del sector cárnico colombiano y de impedir la pérdida de este recurso genético.

Uno de los principales objetivos del mejoramiento genético en bovinos está relacionado con los atributos de calidad cárnica, que se subdividen en un grupo amplio de cualidades, como son la ternera, la jugosidad y el “*flavour*”. La segunda, estrechamente ligada a la CRA, definida por Zamorano (1996) como la propiedad que tienen los tejidos de la carne entera o picada para ligar y/o retener sus propios líquidos, sufriendo la menor merma en su peso cuando es procesada, cocinada o congelada y descongelada, ya sea a nivel industrial o doméstico. El objetivo de este estudio fue establecer el efecto del Cruce racial y la Maduración sobre la Capacidad de Retención de Agua en carne cruda (CRAr) y cocinada (CRAc) y establecer correlaciones entre ellas y los parámetros pH y ternera.

## **2.2 Materiales y Métodos.**

### **2.2.1 Material experimental**

Fueron evaluados 164 bovinos F1 castrados, provenientes del cruce de hembras de la raza Brahman Blanco (BB) con machos de cada una de las siguientes razas: Limousin, Normando, Braunvieh, Simental (*Bos taurus* especializado), BON (Blanco Oregínero), Romosinuano (*Bos taurus* criollo colombiano) y Guzerat, BR y BB (*Bos indicus*) mantenidos en el sur del Cesar Colombiano. La población analizada está compuesta de la siguiente manera: Limousin-BB: 20; Normando-BB: 17; Braunvieh-BB: 8; Simental-BB: 18; BON-BB: 18; Romosinuano-BB: 12; Guzerat-BB: 17; BR-BB: 10; BB puro: 44 animales. Los individuos F1 fueron alimentados con una dieta a base de los forrajes Brachiopará (*Brachiaria plantaginea*), Guinea (*Panicum maximum*) y Ángleton (*Dichantium aristatum*) y sacrificados a un peso promedio de  $492 \pm 38.5$  kg y una edad de  $30.9 \pm 4.15$  meses en una planta de beneficio (La Dorada, Caldas, Colombia) mediante procedimientos estándares. Los músculos LD y ST fueron extraídos de la canal izquierda, empacados al vacío y transportados a las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de

Alimentos ICTA, (Universidad Nacional de Colombia). Cada músculo fue dividido en tres porciones (para los tiempos 7, 14 y 21 de maduración) y posteriormente cada porción fue dividida en dos piezas cárnicas (la pieza 1 fue utilizada para la medición de parámetros en carne cruda y la 2 para cualidades de la carne en cocinado) las cuales fueron sometidas al proceso de maduración en refrigeración (4°C). Cumplidos los tiempos de maduración cada pieza cárnica fue dividida en tres lonchas de 2.54 cm de grosor en las cuales se realizó la medición de los parámetros cárnicos a evaluar. En cada loncha proveniente de la pieza 1 se midieron los parámetros CRAr y pH y en cada loncha de la pieza 2, los parámetros CRAc y WBSF. La pieza 2 al cumplir el respectivo tiempo de maduración fue sometida a congelación (-20°C) hasta el procesamiento, realizando el loncheado con sierra eléctrica.

### 2.2.2 Determinación del parámetro CRAr

Se usó la metodología de Presión sobre papel filtro (F.p.p.) de Grau y Hamm (1953) modificado (Van Oeckel *et al.*, 1999); cada loncha obtenida de la pieza 1 fue molida mediante un procesador de alimentos electrónico, se tomó una muestra de  $0.4 \pm 0.02$  gr y se colocó con un molde sobre un papel Walkman número 5 y mediante el texturómetro TA.TX plus (*Stable Micro Systems*) se aplicó una fuerza de 2.2 kg por 5 minutos. Se extrajo el papel, donde se observan dos áreas, la primera formada por la carne aplanada y la segunda correspondiente al agua liberada por la carne, ver figura 2-1. Los papeles con las dos áreas, son fotografiados y mediante el programa “Pdf-change viewer” (disponible en [pdf-xchange-viewer.softonic.com](http://pdf-xchange-viewer.softonic.com)) se realizó la medición de las áreas (Zamorano y Gambaruto, 1997). El valor de la CRAr está dada por la relación entre estas dos áreas, aplicando la formula:

$$\text{CRA en carne cruda} = (M / T) * 100 \quad (2.1)$$

Donde el área M es la formada por la masa de carne y el área T por el agua liberada; bajo este procedimiento las muestras con un mayor porcentaje de CRAc serán aquellas con un mejor desempeño (figura 2-1).

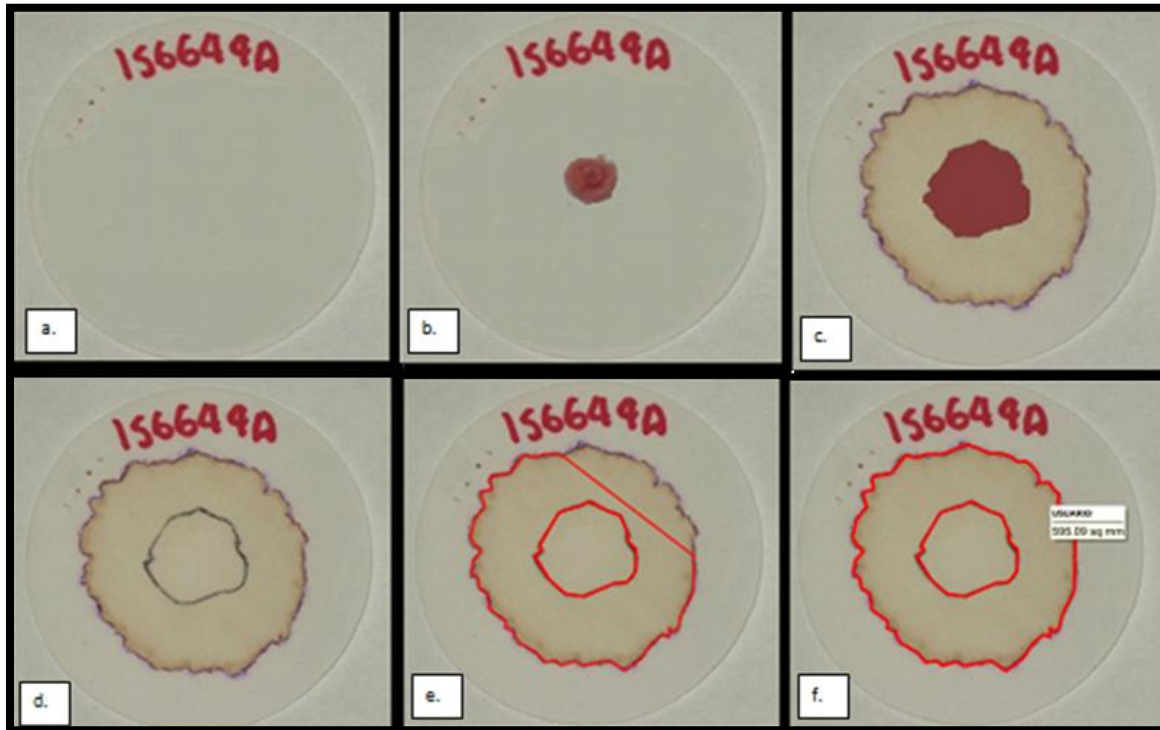
### 2.2.3 Determinación del parámetro CRAc.

La pieza cárnica 2 se descongeló durante 24 horas a 4 °C y se cocinaron las lonchas en plancha de contacto inferior y superior hasta que el centro térmico alcanzó los 70°C (medida por medio de una termocupla). El porcentaje de CRAc se obtuvo según la fórmula:

$$\text{CRA en carne cocinada} = 100 * ((\text{peso1} - \text{peso2}) / \text{peso1}) \quad (2.2)$$

Esta fórmula fue sugerida por Bertram *et al.* (2003), donde el peso1 corresponde al valor de la carne cruda y el peso2 al valor obtenido al cocinar la carne, con pesaje inmediatamente la pieza cárnica obtiene 70°C en el centro térmico.

**Figura 2-1:** Procedimiento de obtención de la CRAr



a. Papel marcado con el número del animal y la loncha correspondiente, b. Muestra de carne molida (0.4 gr) sobre el papel, c. Papel luego de la aplicación de la fuerza, presenta dos áreas diferentes, la interior formada por la carne aplanada (M) y la exterior por el agua expulsada de la masa (T), d. marcateje del perímetro de las dos áreas mencionadas, e y f. proceso de medición de las áreas.

#### 2.2.4 Determinación de otros parámetros de calidad cárnica.

El pH fue medido simultáneamente a la CRAr con un potenciómetro Handylab pH11/set en cada una de las tres lonchas provenientes de la pieza cárnica 1, realizando medición directa en carne molida. A partir de la pieza cárnica 2, se obtuvieron tres lonchas, cada una con un grosor de 2.54 cm, cortadas en dirección perpendicular a las fibras. En cada loncha se realizó la medición de la textura mediante la técnica WBSF (*Warner-bratzler Shear Force*) con un texturómetro TA.TX plus (*Stable Micro Systems*), utilizando su respectiva célula. El parámetro de textura de WBSF se obtuvo a partir del valor de fuerza de corte (en kg) ajustado con el área bajo la curva (medida en kg/seg).

### 2.2.5 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLM del paquete SAS. Los Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros CRAR-pH y CRAC-WBSF (relación loncha-loncha) y CRAR-CRAC CRAC-pH (en relación pieza cárnica-pieza) fueron calculados utilizando el procedimiento PROC CORR. El modelo aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + M_j + C_i * M_j + G_k + Al(G_k) + e_{ijklm} \quad (2.3)$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable CRA

$\mu$  = Media poblacional.

$C_i$  = Efecto del Cruce i-ésimo.

$M_j$  = Efecto del tiempo de Maduración j-ésimo.

$C_i * M_j$  = interacción Cruce\*Maduración

$G_k$  = Efecto del Grupo contemporáneo k-ésimo (animales de igual procedencia y día de sacrificio).

$Al(G_k)$  = Animal l-ésimo anidado dentro del Grupo del grupo contemporáneo k-ésimo.

$e_{ijkl}$  = Error aleatorio.

De manera independiente, fueron incluidas como covariables la edad de los animales y el peso al sacrificio de los mismos, pero ninguna de las dos se comportó como una, por lo que no fueron incluidas en el modelo final. Para comprobar la significancia de los factores Cruce, Maduración y su interacción se empleó el anidamiento  $Al(G_k)$  y se aplicaron comparaciones de Tukey-Kramer a los promedios ajustados.

## 2.3 Resultados

El material experimental utilizado fue homogéneo ya que se seleccionaron los 164 primeros animales nacidos, manejados bajo condiciones similares en cada finca, dieta, peso y edad de sacrificio establecido, al igual que las condiciones de beneficio, manejo de los músculos PM y metodología para la obtención de los valores de CRAR, CRAC, pH y WBSF. El modelo presentó varianzas homogéneas, pequeñas y media del error cero, se cumple normalidad del Error. Los valores de  $R^2$  del modelo para ambos músculos fueron bajos; para CRAR 0.35 en LD y 0.29 en ST y para CRAC, 0.29 en LD y 0.33 en ST, indicando que el modelo explica en estos porcentajes la variación de la CRAR y la CRAC. Los Coeficientes de variación fueron para CRAR 0.18 en LD y 0.18 en ST y para CRAC, 0.31 en LD y 0.31 en ST.

### 2.3.1 Capacidad de Retención de Agua en carne Cruda (CRAr)

Para el parámetro CRAr en LD, los factores principales, Cruce, Maduración fueron significativos pero su interacción no; para ST se presentó significancia para el factor Maduración. En LD, los cruces con las razas Braunvieh y Limousin ( $36.0\% \pm 6.21$  y  $35.9\% \pm 8.69$  respectivamente) presentaron diferencias significativas con los cruces con BON, BB y Guzerat. Para LD se establecieron como ideales periodos cortos de almacenamiento (7-14 días PM). Para el músculo ST, el día 7 de maduración presentó el mejor valor de CRAr de los tres periodos (Tabla 2-1).

**Tabla 2-1:** Valores promedio de CRAr y desviación estándar.

Significancia de factores en CRAr								
Factor		LD		Factor		ST		
Cruce		<0.0001		Cruce		ns		
Maduración		0.0005		Maduración		<.0001		
Cruce*Maduración		Ns		Cruce*Maduración		ns		
Valores promedio de CRAr								
		n	Promedio	SE			Promedio	SE
LD	BON	18	31.2 <sup>b</sup>	6.10	ST	BON	29.8	5.90
	BB	44	31.3 <sup>b</sup>	6.21		BB	28.4	6.34
	BR	10	31.4 <sup>ab</sup>	7.42		BR	28.0	7.72
	Braunvieh	8	36.0 <sup>a</sup>	6.21		Braunvieh	28.6	4.76
	Guzerat	17	30.7 <sup>b</sup>	7.08		Guzerat	26.9	5.26
	Limousin	20	35.9 <sup>a</sup>	8.69		Limousin	30.4	7.61
	Normando	17	33.3 <sup>ab</sup>	6.97		Normando	29.8	5.25
	Romosinuano	12	33.0 <sup>ab</sup>	5.80		Romosinuano	30.1	5.32
	Simental	18	31.9 <sup>ab</sup>	7.41		Simental	29.8	5.67
	7 días	164	33.7 <sup>x</sup>	7.22		7 días	31.9 <sup>x</sup>	6.24
	14 días	164	33.3 <sup>x</sup>	6.62		14 días	27.7 <sup>y</sup>	5.88
	21 días	164	31.2 <sup>y</sup>	7.12		21 días	27.7 <sup>y</sup>	5.56

Superíndices diferentes indican significancia ( $P < 0.05$ ); a b, comparación dentro de Cruces. Superíndices x y, comparación dentro de Maduración.

### 2.3.2 Capacidad de Retención de Agua en carne Cocinada (CRAc)

Para el parámetro CRAc, el factor principal Cruce fue significativo en LD, existiendo diferencias significativas entre los cruces con Limousin (18.1%  $\pm$ 6.28) y con Braunvieh siendo este último el que presentó el mayor valor en pérdidas por cocción (22.9%  $\pm$ 9.45). Para ST ninguno de los factores analizados fue significativo (Tabla 2-2).

**Tabla 2-2:** Valores promedio de CRAc y desviación estándar.

Significancia de factores en CRAc; n = 164								
Factor		LD	Factor		ST			
Cruce		0.0365	Cruce		ns			
Maduración		Ns	Maduración		ns			
Cruce*Maduración		Ns	Cruce*Maduración		ns			
Valores promedio de CRAc								
		n	Promedio	SE			Promedio	SE
LD	BON	18	19.4 <sup>ab</sup>	5.76	ST	BON	23.8	9.35
	BB	44	20.0 <sup>ab</sup>	7.36		BB	22.7	7.96
	BR	10	19.3 <sup>ab</sup>	7.99		BR	24.3	8.90
	Braunvieh	8	22.9 <sup>a</sup>	9.45		Braunvieh	25.9	7.18
	Guzerat	17	21.4 <sup>ab</sup>	7.52		Guzerat	24.4	8.96
	Limousin	20	18.1 <sup>b</sup>	6.28		Limousin	23.8	8.44
	Normando	17	19.9 <sup>ab</sup>	6.10		Normando	23.2	8.21
	Romosinuano	12	22.4 <sup>ab</sup>	8.45		Romosinuano	25.2	7.24
	Simental	18	18.5 <sup>ab</sup>	7.38		Simental	23.8	8.76
	7 días	164	20.4	6.95		7 días	24.9	7.75
	14 días	164	19.4	7.40		14 días	24.3	7.77
	21 días	164	20.8	7.56		21 días	23.2	9.69

Superíndices diferentes indican significancia ( $P < 0.05$ ); a b, comparación dentro de Cruces.

### 2.3.3 Correlaciones entre parámetros de calidad cárnica

En el músculo LD la correlación entre CRAr-pH mostró un  $r_{xy}$  total de 0.21. También fueron establecidas correlaciones significativas para los tiempos de maduración y en los cruces con BON, BB, Limousin y Normando (Tabla 2-3). La correlación CRAr-CRAc presentó un  $r_{xy}$  total de -0.17.

Se estableció una correlación baja total para CRAc-pH en ambos músculos. La correlación entre CRAc y WBSF total fue de 0.12 (Tabla 2-4). Para ST se estableció un  $r_{xy}$  total de 0.24 entre la CRAr y el pH. Los  $r_{xy}$  por cruce presentaron significancia en valores medios para todos los cruces, menos con Braunvieh, Romosinuano y Simental. La correlación CRAr-CRAc presentó un  $r_{xy}$  total de -0.23. Cuando se discriminó por cruce, las correlaciones significativas se presentaron en los cruces con BON, BB, Braunvieh, Guzerat y Limousin, con valores negativos medios-altos (Tabla 2-3).

**Tabla 2-3:** Coeficientes de correlación CRAr-pH y CRAr-CRAc

	CRAr-pH					CRAr-CRAc
		7	14	21	Cruce	Cruce
<b>LD</b>	BON	0.37*	0.45*	0.11	0.33***	-0.10
	BB	0.04	0.36***	0.45***	0.27***	-0.20*
	BR	-0.40+	0.41+	0.45+	0.27	-0.07
	Braunvieh	-0.15	-0.06	0.26	0.20	-0.4+
	Guzerat	-0.10	-0.19	0.21	0.08	0.04
	Limousin	0.14	0.48***	0.36***	0.26***	-0.15
	Normando	0.34*	0.28	0.44*	0.42***	0.11
	Romosinuano	-0.21	-0.16	0.21	-0.01	-0.36*
	Simental	0.28+	-0.10	0.30*	0.10	-0.31*
	Maduración	0.13***	0.25***	0.29***	<b>0.21***</b>	<b>-0.17***</b>
<b>ST</b>	BON	0.42*	0.29+	0.62***	0.38***	-0.35*
	BB	0.09	0.23*	0.55***	0.32***	-0.19*
	BR	-0.01	0.13	0.77***	0.37***	-0.09
	Braunvieh	-0.43+	-0.28	0.37+	0.07	-0.67***
	Guzerat	0.43***	0.58***	0.35*	0.39***	-0.32*
	Limousin	-0.25*	-0.28*	0.64***	0.16*	-0.30*
	Normando	-0.01	0.26	0.34*	0.28***	-0.27+
	Romosinuano	-0.28	-0.15	0.26	-0.06	0.08
	Simental	-0.26	0.28	0.50***	0.14	0.05
	Maduración	0.02	0.12*	0.49***	<b>0.24***</b>	<b>-0.23***</b>

Coeficientes de correlaciones CRAr-pH total (ignorando Cruce y tiempos de maduración, en negrilla),  $r_{xy}$  por Cruce, por Maduración y para la interacción Cruce\*Maduración y coeficientes de correlaciones CRAr-CRAc total (ignorando Cruce y Maduración, en negrilla), y por Cruce. (+P<0.1; \* P<0.05; \*\*\*P<0.001); ver anexo A.

La correlación CRAc-pH total mostró un valor de -0.09. La correlación entre CRAc y el valor de terneza (WBSF) mostró un  $r_{xy}$  total de -0.08. Los cruces con BON, Limousin y Romosinuano presentaron  $r_{xy}$  medios-altos y por periodos de maduración se establecieron correlaciones bajas (Tabla 2-4).

**Tabla 2-4:** Coeficientes de correlación para CRAc-WBSF y CRAc-pH.

		CRAc-WBSF				CRAc-pH
		7	14	21	Cruce	Cruce
LD	BON	-0.17	0.10	0.00	-0.03	-0.07
	BB	0.06	0.01	0.30**	0.12+	-0.08
	BR	-0.39+	-0.35	-0.48*	-0.38***	0.13
	Braunvieh	-0.05	-0.02	0.45+	0.09	-0.21
	Guzerat	0.25	0.03	0.24	0.19+	-0.03
	Limousin	0.38**	0.43**	0.49***	0.42***	0.09
	Normando	-0.13	0.39+	0.15	0.16	-0.05
	Romosinuano	0.40*	0.28	0.19	0.26*	0.07
	Simental	0.06	0.04	0.14	0.08	-0.22
	Maduración	0.07	0.10+	0.19***	<b>0.12***</b>	<b>-0.30</b>
ST	BON	-0.78***	-0.65***	-0.36	-0.65***	-0.20
	BB	0.17+	0.01	0.00	0.17**	0.05
	BR	0.02	0.11	0.07	0.17	-0.12
	Braunvieh	0.26	0.21	0.47+	0.22	-0.15
	Guzerat	0.04	0.10	0.41*	0.11	-0.03
	Limousin	-0.52***	-0.54***	-0.37*	-0.45***	-0.35***
	Normando	-0.07	-0.15	0.27	0.00	-0.23
	Romosinuano	-0.43*	-0.48**	0.06	-0.41***	-0.22
	Simental	0.07	-0.08	0.04	0.03	0.09
	Maduración	-0.11*	-0.18***	0.09+	<b>-0.08*</b>	<b>-0.09*</b>

Coeficientes de correlaciones CRAc-WBSF total (ignorando Cruce y tiempo de maduración, en negrilla),  $r_{xy}$  por Cruce, por Maduración y para la interacción Cruce\*Maduración y coeficientes de correlaciones CRAc-pH total (ignorando Cruce y Maduración, en negrilla), y por Cruce. (+P<0.1; \* P<0.05; \*\*\*P<0.001); ver anexo A.

## 2.4 Discusión

Los valores de  $R^2$  son bajos, pero los factores analizados fueron significativos en ambos músculos excepto para la CRAc en ST; de modo similar, otros estudios de evaluación de características de calidad cárnica presentan valores bajos de  $R^2$  (desde 14%) estando relacionado a los múltiples factores que pueden influenciar los parámetros de calidad cárnica, entre los que se encuentran por ejemplo la temperatura de almacenamiento en el PM o la temperatura en el centro térmico de la

pieza cárnica durante la cocción (Aaslyng *et al.*, 2003). De igual manera, Schönfeldt y Strydom (2011) obtuvieron valores bajos de  $R^2$  (29% en LD y 11% en ST) cuando evaluaron el efecto de la edad y el corte sobre parámetros asociados a CRA, indicando que los factores y variables incluidas en el modelo explican en estos porcentajes la variación de la CRA.

No se encontró una relación entre la edad de los individuos y la característica CRA y algunos resultados con un comportamiento similar son reportados por Gill *et al.*, (2010) y Schönfeldt y Strydom (2011). Estos últimos autores no encontraron un efecto de la edad sobre la CRAR (determinada como PPG) para los músculos ST y *Longissimus lumborum* cuando utilizaron la edad fisiológica (estructura dental). Sin embargo, es interesante destacar que Sañudo *et al.*, (2004) pudieron establecer que la edad del animal si afecta las características musculares (dureza, compresión) y es probablemente más notorio en razas más precoces y de bajas tasas de crecimiento diario, cuando se compararon con razas de mayor peso adulto y edad fisiológica más tardía. La inexistencia de linealidad entre la edad de los animales con la CRAR y con la CRAc, se puede sustentar en que la CRA es determinada principalmente por el agua intracelular y los componentes celulares que la retienen ya que aproximadamente el 80% del agua muscular corresponde a aquella retenida por las miofibrillas (Tornberg, 2005). Sin embargo otras investigaciones (Christensen *et al.* 2011; Palka *et al.* 1999) destacan el papel desempeñado por el tejido conectivo durante la cocción, dada su contracción durante el sometimiento de la pieza cárnica al calor, por lo cual la edad del animal puede influenciar la CRAc debido a la mayor estabilidad que posee este componente a medida que se incrementa la edad del individuo.

#### **2.4.1 Los factores Cruce, Maduración y su interacción**

El factor Cruce fue significativo para el músculo LD en el parámetro CRAR y en CRAc y algunos resultados con un comportamiento similar fueron reportados por Zea *et al.* (2007) en Holstein, Rubio Gallego y su cruce, estableciendo un efecto del cruce sobre la CRA (pérdidas por goteo, presión y cocción). En el análisis realizado por Mariño *et al.* (2005) hallaron un efecto de la Raza sobre el valor de pH en animales Nelore (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*). Sin embargo, en el estudio de Strydom *et al.* (2000) reportan el efecto de la Raza como no significativo sobre parámetros como jugosidad y terneza, utilizando las razas Afrikaner, Nguni, Bonsmara, Santa Gertrudis, Pardo Suizo y Pinzgauer. En el estudio de Sañudo *et al.* (1998) no se encontró efecto alguno del factor Raza (Rubia Gallega y Parda Alpina, entre otras) sobre la CRAc al analizar el músculo LD madurado a 7 días, de modo similar al reporte de Zea *et al.* (2008) cuando evaluaron

esta misma característica en las razas Rubia Gallega, Holstein y su cruce. De lo anterior, se puede deducir que el efecto de la raza y/o cruce sobre estas características, está sujeto al tipo de grupos raciales que son evaluados en cada investigación. Estas diferencias en características de calidad cárnica han sido encontradas tanto en razas nativas como en razas especializadas de bovinos (Sañudo *et al.*, 1998; Campo *et al.*, 2000; Muchenje *et al.*, 2008; Sañudo *et al.*, 2004; Monsón *et al.*, 2005), lo que está relacionado con las diferencias fisiológicas existentes entre ellas y por ende con variaciones en la composición muscular (contenido de proteína, minerales y humedad - Muchenje *et al.*, 2008) lo que puede tener un efecto importante sobre características como la CRA. De forma notoria, en el estudio de Chambaz *et al.* (2003) pudieron detectar una jerarquización de tipo sensorial para la jugosidad cuando evaluaron el músculo LD a los 14 días PM, así: Angus < Simental < Charolais < Limousin. Cuando se evaluaron las PPC (CRAc en el presente estudio) para las mismas razas se observó una jerarquización inversa. Lo anterior está en concordancia con los resultados del presente estudio, en el que el cruce con Limousin fue el que presentó un mejor comportamiento de ambas características CRAr y CRAc en el músculo LD cuando se comparó con los demás cruces.

Las diferencias raciales establecidas en este estudio son generadas por el efecto de polimorfismos en genes mayores o la suma de pequeños efectos de un grupo muy grande de ellos y su interacción, los cuales presentan diferentes frecuencias alélicas para cada raza, como resultado de la selección a la que han sido sometidas (natural o artificial). Se han identificado en cerdos algunos genes mayores con polimorfismos asociados a un efecto importante sobre la característica CRAr, entre los cuales están PRKAG3 y RYR1. En el gen PRKAG3 se identificó la mutación RN- (199V–200Q) presente solamente en la raza Hampshire (Enfält *et al.* 2006; Lindahl *et al.* 2004; Bertram *et al.* 2003) la cual tiene un efecto negativo importante sobre parámetros de textura cárnica. Este efecto fue demostrado en el estudio de Jeremiah *et al.* (1999), quienes pudieron establecer una jerarquización para el parámetro CRAc en el siguiente sentido: Duroc < Yorkshire < Landrace < Hampshire, siendo la presencia del alelo RN- (199V–200Q) determinante sobre el comportamiento de este parámetro de calidad cárnica en la última raza. Cabe destacar el trabajo realizado por Lindahl *et al.* (2004) quienes encontraron los mayores valores de PPG en el músculo LD de cerdos Hampshire portadores de la mutación RN- (199V–200Q) cuando fueron comparados con cerdos normales, ya que en este estudio no se hallaron animales dimutados en la población analizada. Otra mutación que fue identificada en este mismo gen, es la denominada rn\* (199I–200R) que tiene un efecto positivo sobre la CRA (Lindahl *et al.*, 2004) y mostró una elevada frecuencia alélica en poblaciones cruzadas de las razas Hampshire y Landrace utilizadas en el estudio de Enfält *et al.*,

(2006). Roux *et al.* (2006) cuando realizaron una caracterización de este mismo gen en bovinos de las razas Limousin, Charolais y Holstein identificaron 21 SNPs y al determinar las diferencias de las frecuencias alélicas por raza para cada mutación encontraron además que algunas mutaciones eran exclusivas de las razas, por lo que se podría considerar que estas diferencias genéticas son las responsables de variaciones en las características de calidad cárnica por raza. El segundo gen relacionado es RYR, en el que se identificó la mutación R615C en porcinos, la cual tiene un efecto que incrementa las PPG a 24 horas PM (Otto *et al.* 2007), aunque cabe destacar que esta mutación ha sido identificada en varias razas de cerdos (Laville *et al.*, 2009; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007).

El factor Maduración fue significativo para la CRAr únicamente, indicando que los valores de esta característica presentan una evolución a través de los tres tiempos de maduración evaluados, pero al someter la pieza cárnica a la cocción, los valores de CRAc se hacen estables independientemente del tiempo de maduración PM de la carne. Cabe destacar que en el presente trabajo se estableció un mejor comportamiento para CRAr a tiempos cortos de maduración PM (al día 7 de maduración en LD y a los 7 y 14 días en ST), aunque existen varios trabajos que han reportado una tendencia al incremento de la retención de agua a medida que transcurre el tiempo de maduración (Straadt *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Bond y Warner, 2007; Bee *et al.*, 2007; Monsón *et al.*, 2005; Oliete *et al.*, 2007). Sin embargo, una tendencia similar a la encontrada en este artículo fue reportada por Silva *et al.* (1999) cuando evaluaron jugosidad. Es necesario destacar que las diferencias anteriormente citadas, pueden ser explicadas por las diferentes metodologías utilizadas en los estudios de Straadt *et al.* (2007) y Zhang *et al.* (2006) entre otros, ya que la técnica de PPG según el estudio de Van Oeckel *et al.* (1999) no presenta asociación con el parámetro sensorial de jugosidad. Sin embargo, en el presente estudio se utilizó la metodología de F.p.p. para la determinación del parámetro CRAr, que es la única técnica correlacionada con la jugosidad (0.27 con  $P \geq 0.01$ ) en el trabajo de Van Oeckel *et al.* (1999), lo que podría explicar el por qué en este estudio se halló una tendencia similar a la reportada en Silva *et al.* (1999).

Aunque en el caso del parámetro CRAc no se presentó significancia, algunos investigadores reportan un mejor comportamiento para otros caracteres organolépticos de la carne al incrementar el tiempo de maduración (WBSF y compresión, Sañudo *et al.* 2004 y Monsón *et al.* 2005). De modo similar, Campo *et al.* (2000) reportaron que la máxima tenderización (99.76%) de la carne ocurre durante la primera semana de maduración, lo que podría explicar el efecto benéfico de la

proteólisis sobre características como la CRAr y CRAc. En general, en el presente trabajo se pudo establecer que el factor Maduración presenta un efecto importante sobre el parámetro CRAr pero no sobre la CRAc, siendo esta última principalmente afectada por factores involucrados con el procedimiento de cocción. Lo anterior concuerda con los resultados de otros grupos de investigación que reportan que el período de maduración no tiene efecto sobre la CRAc (Oliete *et al.*, 2006; Straadt *et al.*, 2007).

En el presente trabajo la interacción Cruce\*Maduración no fue significativa para ninguno de los dos músculos evaluados en CRAr ni en CRAc, estableciendo que no existe un comportamiento diferencial de alguno de los cruces en los tres tiempos de maduración analizados. A diferencia del presente trabajo, esta interacción ha sido reportada por Monsón *et al.* (2005) para terneza en carne bovina y por Bee *et al.* (2007) para la CRA en cerdo. Cabe destacar que los estudios de Monsón *et al.* (2004 y 2005) y Sañudo *et al.* (2004) concluyen que las diferencias entre razas se hacen menos notorias a medida que se incrementa el tiempo de maduración, principalmente para características asociadas a terneza.

Según la significancia de los factores evaluados, se podría establecer que la evolución de la característica CRAr PM presenta un comportamiento complejo en ambos tipos de músculos, blandos (LD) y duros (ST), ya que poseen diferencias tales como el contenido de colágeno (Morón *et al.*, 2004), diferencias en actividad enzimática, grasa y tipo de fibras (Monsón *et al.*, 2004), características estructurales del músculo y fisiología de la carne (Sañudo *et al.*, 2004) que son debidas a diferencias inherentes de la raza o cruce y al proceso de maduración *per se* (proteólisis y pH - Lonergan y Lonergan, 2005; Ouali *et al.*, 2006; Bee *et al.*, 2007; Lonergan y Lonergan, 2008). Para la característica CRAc existen algunas diferencias entre los dos músculos analizados y adicionalmente se debe resaltar que se incrementan los factores que pueden influenciar la variable respuesta, dado el sometimiento a la cocción de la carne, como lo son la temperatura, el procedimiento (Aaslyng *et al.*, 2003; Palka y Daun, 1999) y el tiempo de cocción (Barbanti y Pasquini, 2005).

#### 2.4.2 Correlaciones CRAr-pH, CRAr-CRAc, CRAc-WBSF y CRAc-pH

En el presente trabajo se encontró una correlación media directa entre la CRAr y el valor de pH, medidas simultáneamente, evidenciando la existencia de una relación importante entre estas dos características. Adicionalmente se estableció una tendencia al incremento de esta correlación a

medida que avanzó la maduración para ambos músculos a diferencia del estudio de Serra *et al.* (2004) quienes no encontraron una correlación significativa entre el pH y la CRAr. No obstante, el trabajo de Muchenje *et al.* (2008) encontró la misma correlación entre el pH y la retención de agua (PPG), solamente en la raza Bonsmara. La relación entre la CRA y el pH puede radicar en el punto isoeléctrico de las proteínas y su efecto sobre la relación de los aminoácidos y las moléculas de agua, la activación de enzimas autógenas y la degradación de proteínas a valores de pH más altos dado el importante efecto de la lisis proteica sobre la CRA (Zhang *et al.*, 2006; Bond J y Warner, 2007).

La correlación de CRAr-CRAc mostró un valor bajo-medio inverso en ambos músculos, evidenciando una relación entre la calidad de la carne cruda y cocinada, sumado a la existencia de una correlación baja inversa CRAc-pH solamente en el músculo ST es decir que a mayor pH en crudo habrá mayor retención de agua en carne cruda (CRAr) y una menor pérdida de agua en carne cocinada (CRAc). Cabe destacar que una correlación similar fue encontrada por Aaslyng *et al.* (2003) y Jeremiah *et al.* (1999) cuando evaluaron los mismos parámetros, a diferencia de otros estudios (Sañudo *et al.*, 1998; Bertram *et al.*, 2003) que no reportan esta misma correlación, sin embargo es necesario destacar la importancia de la temperatura interna de la pieza cárnica como un factor determinante para la evaluación de esta asociación (Aaslyng *et al.*, 2003; Palka y Daun, 1999).

La correlación CRAc-WBSF presentó un valor bajo, directa en el músculo LD (0.12) e inversa en el ST (-0.08) causada por las diferencias inherentes a cada músculo. En reportes previos se ha podido determinar la existencia de una correlación entre la CRAc y la terneza medida subjetivamente (panel sensorial) (Chambaz *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2004; Schönfeldt y Strydom, 2011). Es importante resaltar la correlación significativa media para ambos músculos en determinados cruces como es el caso del Limousin. Sin embargo, Chambaz *et al.* (2003) no encontraron correlación alguna entre CRAc y la terneza medida con panel sensorial en LD de Limousin y Simental (entre otras razas), lo que puede ser debido posiblemente al efecto de las técnicas de evaluación. Una importante apreciación de los resultados del presente trabajo radica en una tendencia observada, al incrementarse el tiempo de maduración las correlaciones se hacen más significativas y el valor de  $r_{xy}$  se incrementa, lo que estaría en desacuerdo con Renand *et al.* (2001) quienes afirmaron que el número de correlaciones significativas disminuye al incrementar la maduración.

## 2.5 Conclusiones

Es necesario tener en cuenta los cruces más adecuados para ser empleados en los programas de reproducción en finca con el fin de optimizar las condiciones de manejo de la carne proveniente del músculo LD, de acuerdo al comportamiento de los parámetros asociados a capacidad de retención de agua evaluados. La carne proveniente de los músculos LD y ST debe ser sometida a tiempos cortos (7 días) de maduración con el fin de minimizar las pérdidas de peso durante el almacenamiento. Es importante recalcar la asociación existente entre la calidad en crudo de la carne (retención de agua en carne cruda) y la obtenida posteriormente a la cocción, es decir la cantidad de agua perdida durante este proceso, indicando que el parámetro CRAr presenta cierto grado de relación con el agua perdida desde el interior de la carne cuando el consumidor final realice su cocción, así como con la percepción de la terneza debido a la asociación entre la cantidad de agua pérdida por la cocción y la terneza (WBSF).



### **3. Análisis *in-silico* de mutaciones puntuales en el gen PRKAG3 bovino, asociado a calidad cárnica**

#### **3.1 Introducción**

Una de las moléculas más importantes en estudios de asociación entre polimorfismos genéticos y atributos de calidad cárnica en cerdo corresponde al PRKAG3, el cual es una de las moléculas constituyentes del AMPK. La proteína kinasa AMP activada (AMPK) se considera un sensor de la energía celular y es sensible al incremento de la concentración de AMP en respuesta a una disminución en el nivel energético de la célula o a estrés, siendo sensible también a un incremento en la tasa AMP:ATP (Grahame *et al.*, 2005), existiendo siete genes constituyen la familia génica del AMPK que son clasificadas como miembros de una de las tres subunidades que la constituyen (McKay *et al.*, 2003). La proteína PRKAG3 es la subunidad encargada de la activación de la molécula AMPK (Xiao *et al.*, 2011), por lo que se encuentra involucrada con su regulación en el músculo esquelético y por tanto en el metabolismo del glucógeno. Los estudios de asociación de polimorfismos del gen PRKAG3 y la calidad cárnica, se basan en alteraciones en la deposición de glucógeno en el músculo antes del sacrificio del animal y su conversión en ácido Láctico durante el período PM, influyendo directamente sobre varios atributos de calidad de la carne (Ouali *et al.*, 2006).

El gen de la proteína PRKAG3 ha sido reportado con una alta variabilidad en diferentes razas de bovinos, siendo considerado un gen candidato asociado a alteraciones fisiológicas con influencia sobre la calidad del producto final, en el caso del cerdo son más reducidas las mutaciones puntuales depositadas en bancos de datos ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), pero según múltiples estudios de asociación en cerdos se han podido identificar varias mutaciones, el rn\* (199I–200R) y el RN- (199V–200Q) que poseen asociación con variaciones en calidad y el denominado como alelo silvestre, rn+ (199V-200R) (Laville *et al.*, 2009; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007). De lo anterior se establece la existencia de un efecto fenotípico preponderante, causado por las mutaciones que van a modificar la constitución del ARNm y/o la proteína y por lo tanto sus funciones biológicas. Como lo mencionan Duan *et al.* (2003), en los estudios de asociación con

genes candidato es ideal emplear SNPs y otras mutaciones funcionales, donde la identificación de sustituciones nucleotídicas puede tener implicaciones importantes para el diseño e interpretación de estudios de asociación con características fenotípicas, como es el caso de la calidad cárnica. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es establecer alteraciones en parámetros físico-químicos, generadas por mutaciones puntuales reportadas en el gen PRKAG3 bovino a nivel del ARNm y proteico mediante análisis computacional y establecer cuáles son probablemente los SNPs con una mayor capacidad de alterar funcionalmente estas moléculas y por lo tanto a nivel fenotípico en bovino.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Secuencias y SNPs empleados**

Las secuencias de ARNm empleadas fueron: NM\_001030302.2 y NM\_214077.1 (bovino y porcino respectivamente); para proteína: DAA32407.1 y AAP12533.1 (bovina y porcina respectivamente), en este artículo, estas secuencias son denominadas como el alelo silvestre. Las mutaciones puntuales evaluadas se listan en la tabla 3-1 y fueron ubicadas manualmente, se utilizaron los SNPs de las regiones exónicas del gen PRKAG3 bovino y los tres alelos (rn+, rn\* y RN-) reportados en estudios de asociación genotipo-fenotipo en cerdo (en este caso el alelo rn+ es denominado silvestre).

### **3.2.2 Modelamiento del ARNm**

Para la determinación de la estructura secundaria más probablemente adoptada por las secuencias del ARNm y la determinación del valor de Energía Mínima Libre ( $\Delta G$ ) se empleó el software MFold (Zuker, 2003) a temperatura fisiológica.

### **3.2.3 Modelamiento proteico**

Se determinó la estructura secundaria de las secuencias proteicas mediante el servidor Quick2d (toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\_d) y las regiones desordenadas con DISOPRED (Ward *et al.*

Tabla 3-1: Polimorfismos reportados empleados.

Secuencia	Número de Accesión	ARNm			Proteína			Valor de ΔG
		Posición	Silvestre	Cambio	Posición	Silvestre	Cambio	
Silvestre bovino	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-885.04
1	<a href="#">rs109995479</a>	389	G	T	127	A	S	-882.90
2	<a href="#">rs111024758</a>	468	G	C	153	W	S	-881.31
3	<a href="#">rs43316209</a>	472	A	C	154	G	G	-888.74
4	<a href="#">rs43316214</a>	742	T	A	244	F	L	-885.04
5	<a href="#">rs110730865</a>	793	C	T	261	Y	Y	-886.14
6	<a href="#">rs109510654</a>	844	C	G	278	T	T	-882.64
7	<a href="#">rs134238119</a>	945	T	C	312	I	T	-883.95
8	<a href="#">rs110146930</a>	1432	C	T	474	G	G	-889.25
9	<a href="#">rs109437532</a>	1435	G	A	475	V	V	-881.54
10	<a href="#">rs111024144</a>	1495	C	T	495	L	L	-882.74
11	<a href="#">rs109665777</a>	1512	G	A	NA	NA	NA	-885.74
12	<a href="#">rs43315207</a>	1527	G	A	NA	NA	NA	-884.34
13	<a href="#">rs110658325</a>	1601	A	G	NA	NA	NA	-885.73
14	<a href="#">rs43315203</a>	1640	T	C	NA	NA	NA	-885.04
15	<a href="#">rs43315202</a>	1732	C	T	NA	NA	NA	-879.91
16	<a href="#">rs43315201</a>	1796	T	C	NA	NA	NA	-871.60
17	<a href="#">rs43315200</a>	1804	T	C	NA	NA	NA	-876.48
18	<a href="#">rs43315199</a>	1897	A	G	NA	NA	NA	-885.74
19	<a href="#">rs43315198</a>	1991	C	T	NA	NA	NA	-887.74
20	<a href="#">rs43315197</a>	2024	T	C	NA	NA	NA	-885.89
21	<a href="#">rs110316264</a>	2070	C	T	NA	NA	NA	-887.79
22	<a href="#">rs43315196</a>	2123	C	G	NA	NA	NA	-884.58
23	<a href="#">rs43315195</a>	2197	A	G	NA	NA	NA	-893.35
24	<a href="#">rs43315194</a>	2213	G	C	NA	NA	NA	-885.04
25	<a href="#">rs43315193</a>	2257	C	T	NA	NA	NA	-885.04
26	<a href="#">rs43315192</a>	2265	T	C	NA	NA	NA	-886.62
27	<a href="#">rs43315191</a>	2302	G	A	NA	NA	NA	-884.64
28	<a href="#">rs43315190</a>	2338	C	T	NA	NA	NA	-899.17
29	<a href="#">rs43315189</a>	2359	G	A	NA	NA	NA	-883.34
30	<a href="#">rs43315188</a>	2386	C	T	NA	NA	NA	-885.04
31	<a href="#">rs43315187</a>	2388	T	C	NA	NA	NA	-884.70

Se especifica su ubicación en ARNm y proteína y número asignado para su evaluación.

2004), adicionalmente se detectaron los dominios constituyentes de la proteína mediante el servidor CD-Search (Marchler y Bryant, 2004) de NCBI. El modelamiento por homología fue empleado para la determinación de la estructura terciaria (PRKAG3) empleando el servidor SwissModel y el Software Deep Viewer (Guex y Peitsch, 1997; [www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)), efectuando la minimización energética de cada proteína mediante Gromos96. Se incluyó la proteína PRKAG3 bovina modelada, en la estructura cuaternaria adoptada por la molécula AMPK depositada en PDB, la estructura cristal 2Y94 (Xiao *et al.*, 2011) con la composición molecular

$\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ , que según Birk y Wojtaszewski (2006) es la más frecuente en el músculo esquelético, mediante el Software Deep Viewer (Guex y Peitsch, 1997 <http://www.expasy.org/spdbv/>),. Se determinaron parámetros físico-químicos mediante el servidor Protparam ([www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)) y el Software Deep Viewer (Guex y Peitsch, 1997 <http://www.expasy.org/spdbv/>).

### 3.3 Resultados

En la figura 3-1 se presenta la estructura y tamaño del gen, el ARNm y la proteína del PRKAG3 bovino. En bases de datos (NCBI) existen reportados un total de 111 SNPs, de los cuales aproximadamente 31 modifican un nucleótido de la región exónica alterando la secuencia del ARNm, de estas, 10 mutaciones hacen parte de los exones del gen PRKAG3 que van a decodificar la proteína y cuatro de ellas son *missence* (Tabla 3-1).

#### 3.3.1 Modelos de ARNm

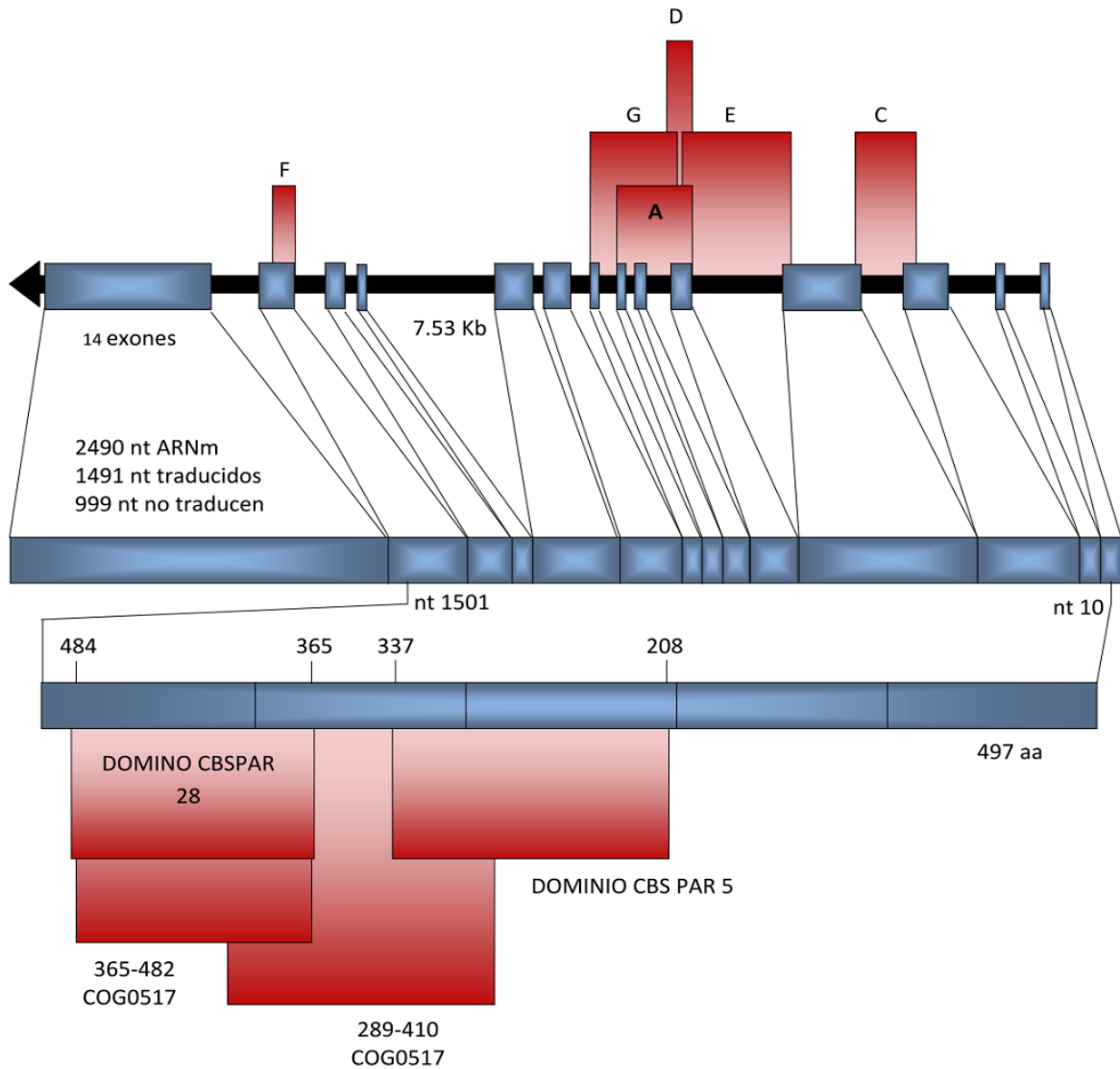
En la figura 3-2 se presenta la estructura secundaria adoptada por el ARNm silvestre del PRKAG3 bovino y las cinco modificaciones estructurales más importantes, producidas por las mutaciones puntuales evaluadas. La figura 3-3 presenta las respectivas estructuras de ARNm del gen PRKAG3 porcino silvestre (codones GTCCGA en la posición 745 del ARNm) y la configuración adquirida por la mutación RN- (codones GTCCAA). El alelo m\* (codones ATCCGA) no alteró esta estructura secundaria. A nivel de estabilidad molecular, el valor de energía libre del ARNm en el alelo silvestre del PRKAG3 bovino, obtuvo un valor de -885.04 kcal/mol. En orden descendente las mutaciones que desestabilizan en mayor medida a esta molécula son, el SNP 16, 17 y 15 con valores de  $\Delta G$  de -871.60, -876.48 y -879.91 kcal/mol respectivamente y el SNP con el mayor carácter estabilizante, fue el 28 con -899.17 kcal/mol. Los modelos del ARNm de los tres alelos del cerdo presentaron un valor en  $\Delta G$  de -821.86, -820.03 y -821.86 kcal/mol para el alelo silvestre, RN- y m\* respectivamente.

#### 3.3.2 Modelo proteico

En la figura 3-4 se presenta la estructura secundaria predicha y en la figura 3-1 los dominios constituyentes de la molécula PRKAG3 bovino. En la tabla 3-2 se muestran los parámetros fisicoquímicos determinados para los cinco alelos del bovino y los tres alelos reportados del cerdo. Para el modelamiento en 3D de la molécula, el servidor Swiss Model empleó el templete 2v8qE

(posee como ligando dos moléculas de AMP) con una identidad del 64.78%, logrando modelar desde el aminoácido 188 hasta el 488 de la secuencia problema, por lo que no todas las cuatro mutaciones que modifican un aminoácido en la cadena proteica pudieron ser modeladas, únicamente las mutaciones 4 (aa 244) y 7 (aa 312) del bovino.

**Figura 3-1** Estructura y tamaño del gen, el ARNm y la proteína del PRKAG3 bovino

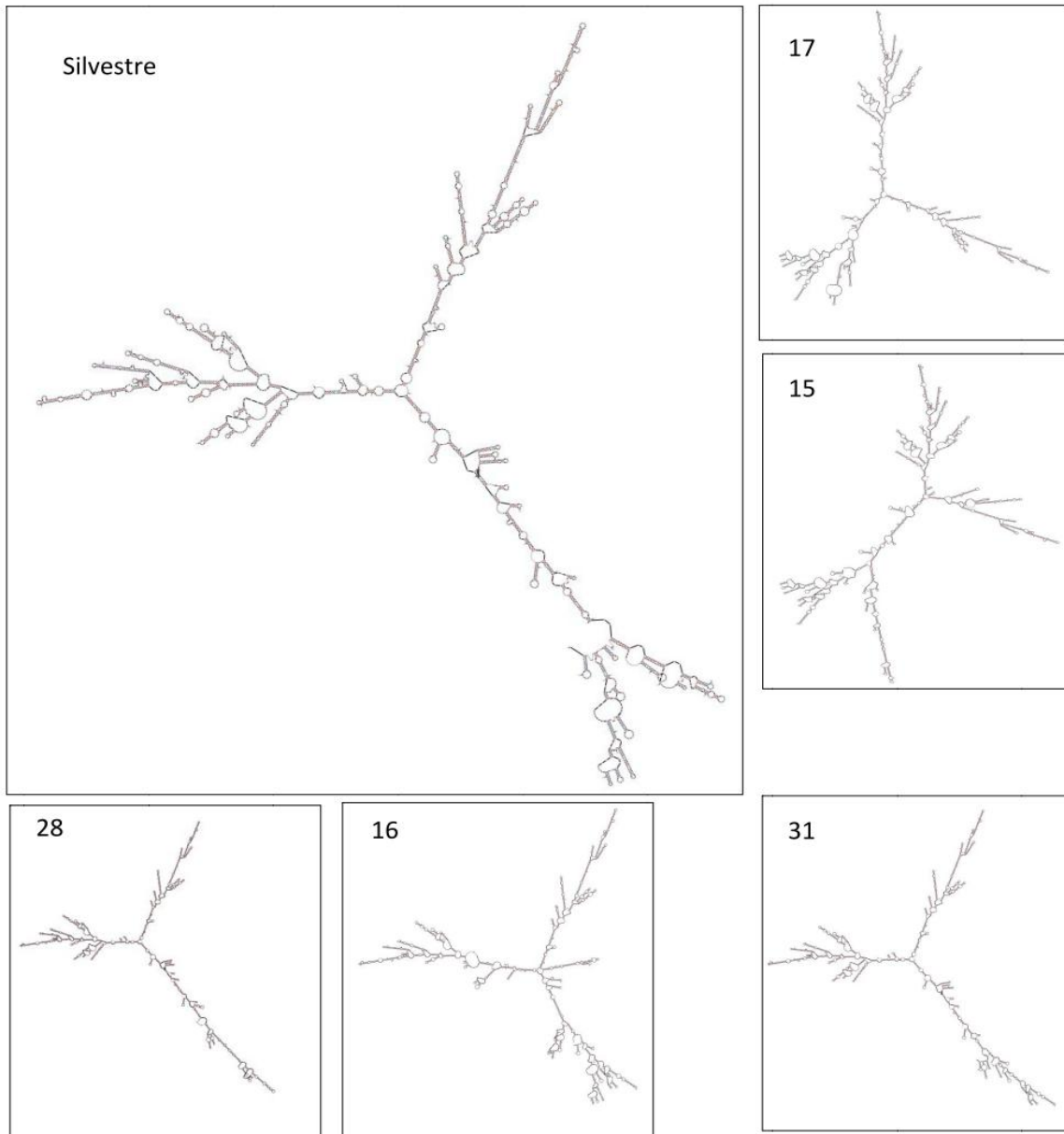


Se presentan adicionalmente los dominios predichos en la proteína lineal y las regiones amplificadas por cada uno de los juegos de cebadores empleados en el estudio de asociación fenotipo-genotipo.

Las mutaciones rn\* y RN- modifican respectivamente el aminoácido 199 y 200, por lo que si se lograron modelar. En la figura 3-5 se presenta la estructura cuaternaria del AMPK con el modelo obtenido para la proteína PRKAG3 bovina, en la figura 3-6 se presenta el sitio activo (unión de las

dos moléculas de AMP intercambiables, Xiao *et al.*, 2011) de la proteína PRKAG3 en área de contacto y más detalladamente los puentes de Hidrógeno entre estas moléculas y los aminoácidos involucrados en su fijación. En la figura 3-7 se ubican las posiciones 244, 312 en la proteína bovina y 199 y 200 en la proteína del cerdo sujetas a cambio según el SNP evaluado.

**Figura 3-2:** Polimorfismo conformacional del ARNm del bovino.



Se destacan los cinco SNPs más importantes en lo referente a modificar la estructura secundaria del ARNm.

En la figura 3-8 se ilustra la distribución del campo electromagnético de las secuencias silvestres bovina y porcina y la mutación RN- como la única, que altera notablemente este parámetro.

Figura 3-3 Polimorfismo conformacional del ARNm del cerdo. Secuencia silvestre y RN-.

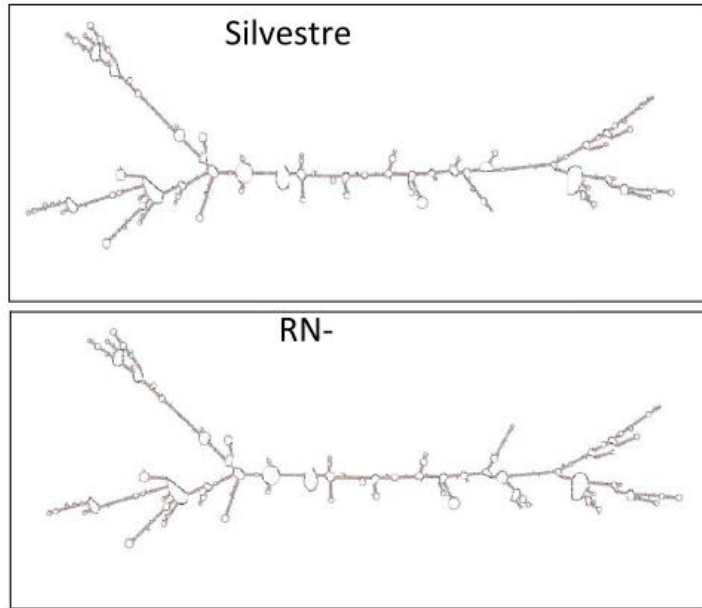
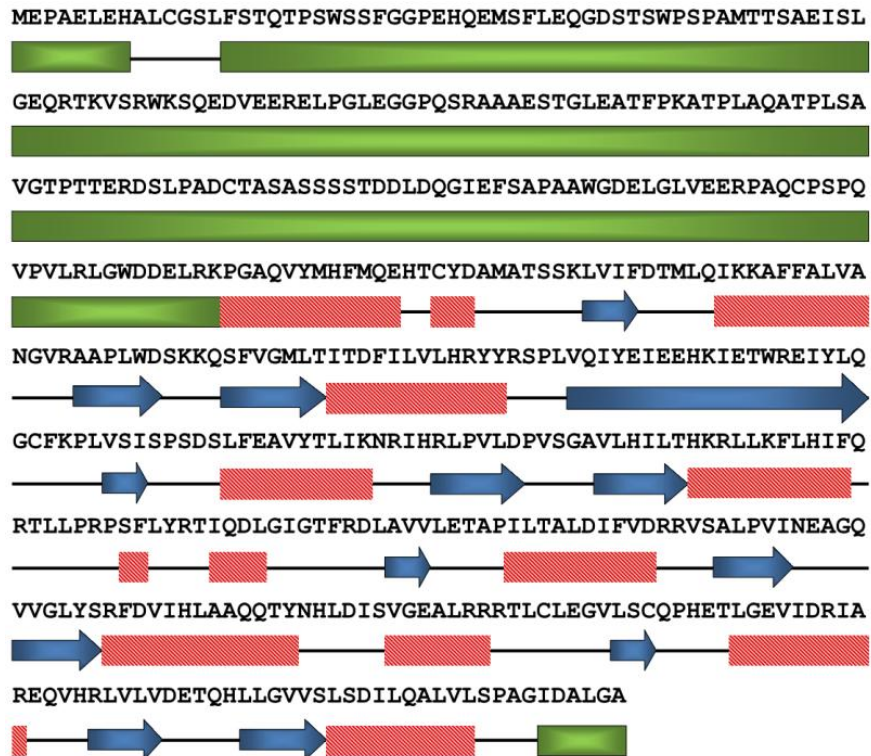


Figura 3-4: Predicción de estructura bidimensional.

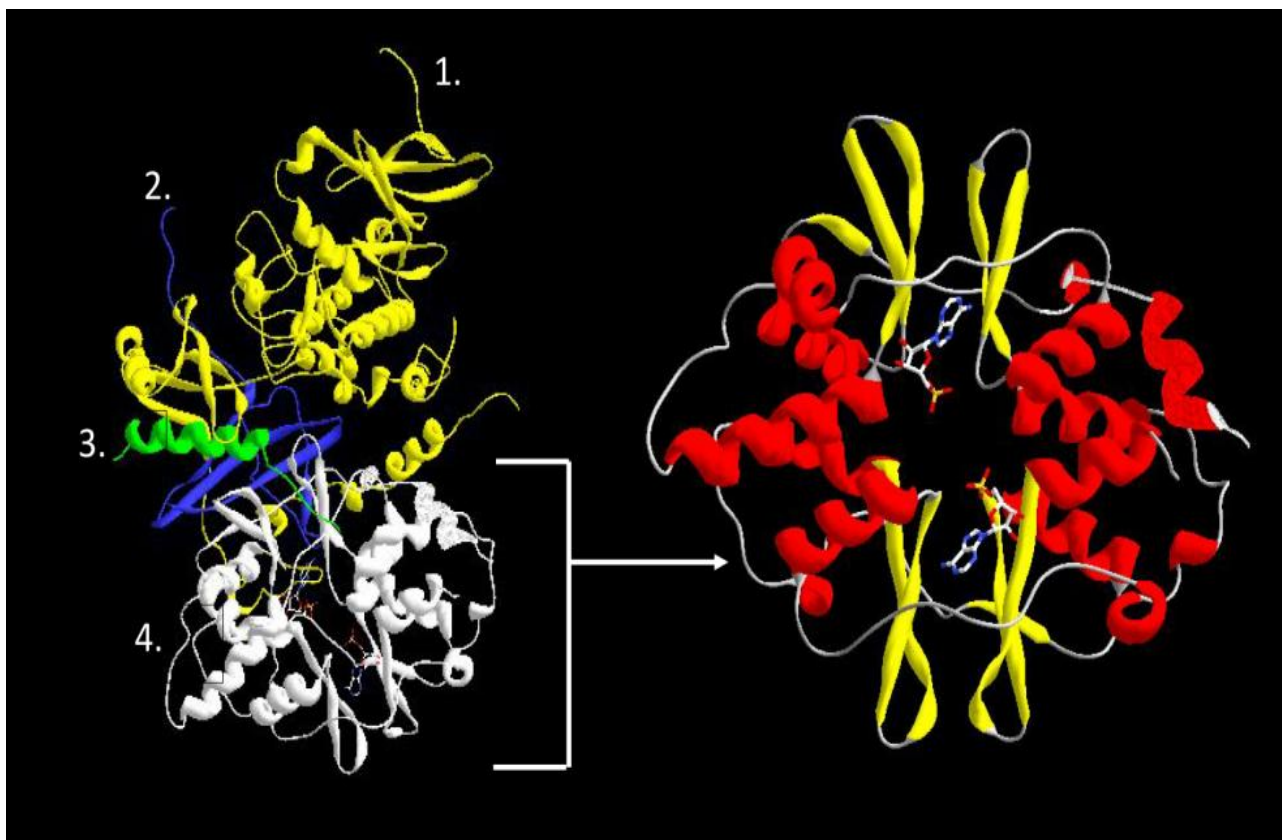


Recuadros verdes indican regiones desordenadas, flechas azules representan hojas  $\beta$  y recuadro rojos  $\alpha$  hélices, líneas negras son otra distribución.

**Tabla 3-2:** Efecto de mutaciones *missense* en parámetros de la proteína.

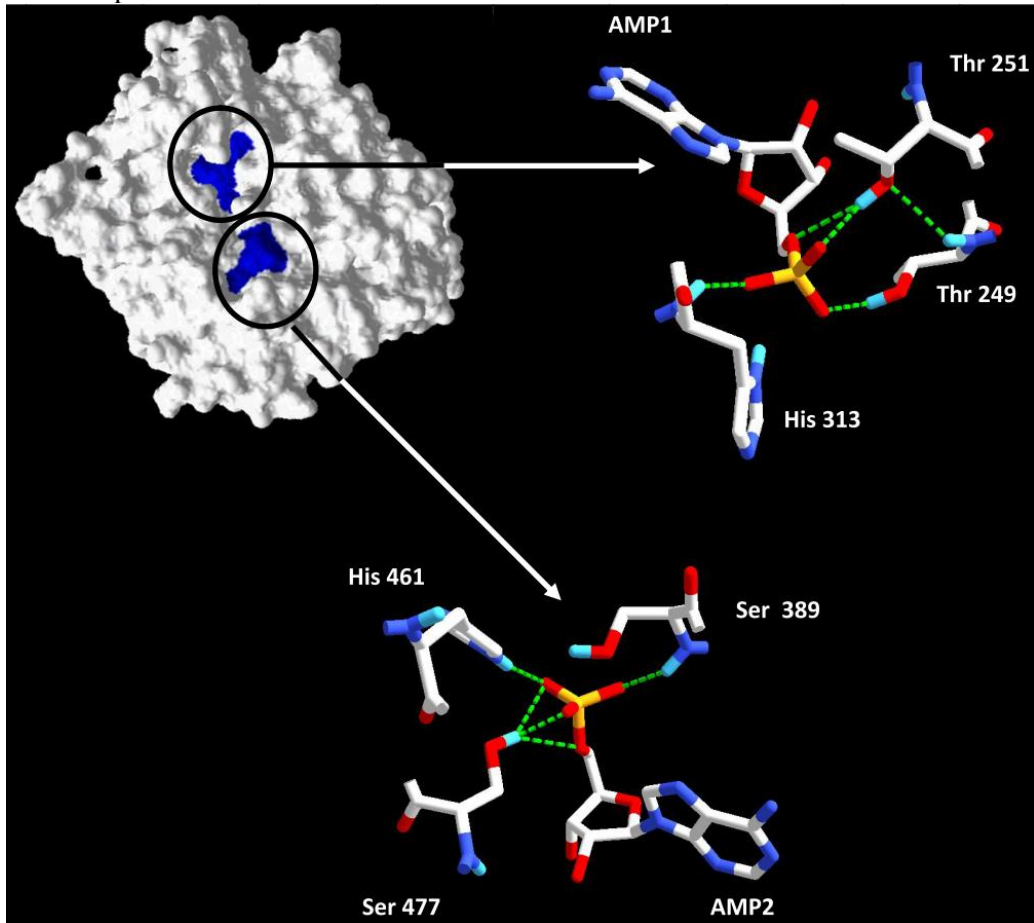
Secuencia	Parámetro		
	Peso Molecular	Punto isoeléctrico	Índice de inestabilidad
Silvestre bovino	54919.7	5.20	55.68
1	54976.8	5.26	55.46
2	54820.5	5.20	55.89
4	54885.7	5.20	55.68
7	54907.6	5.20	55.43
Silvestre porcino	51308.5	5.24	54.30
RN-	51280.5	5.18	54.30
rn*	51322.6	5.24	54.12

**Figura 3-5:** Estructura cuaternaria del AMPK, se detalla el PRKAG3 bovino.



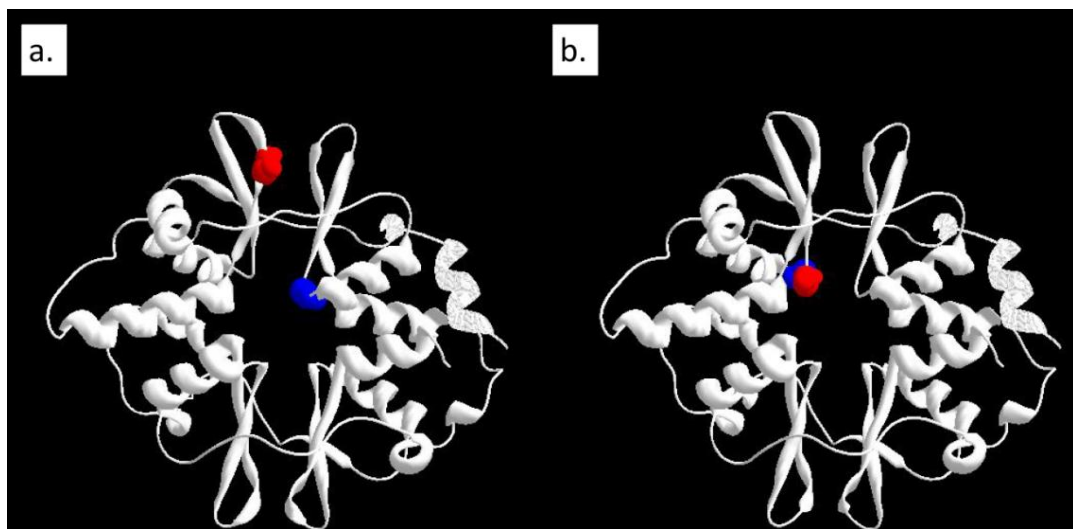
En AMPK; 1 y 3 son PRKAA, 2 es PRKAB y 4 es PRKAG3, se detalla el PRAKG3, imagen de la cinta, segmentos rojos corresponden a  $\alpha$  hélices y en amarillo las hojas  $\beta$ . También se presenta la ubicación de las dos moléculas de AMP intercambiables; ver Anexo B.

**Figura 3-6:** Superficie de contacto de PRKAG3 bovina con el AMP intercambiable.



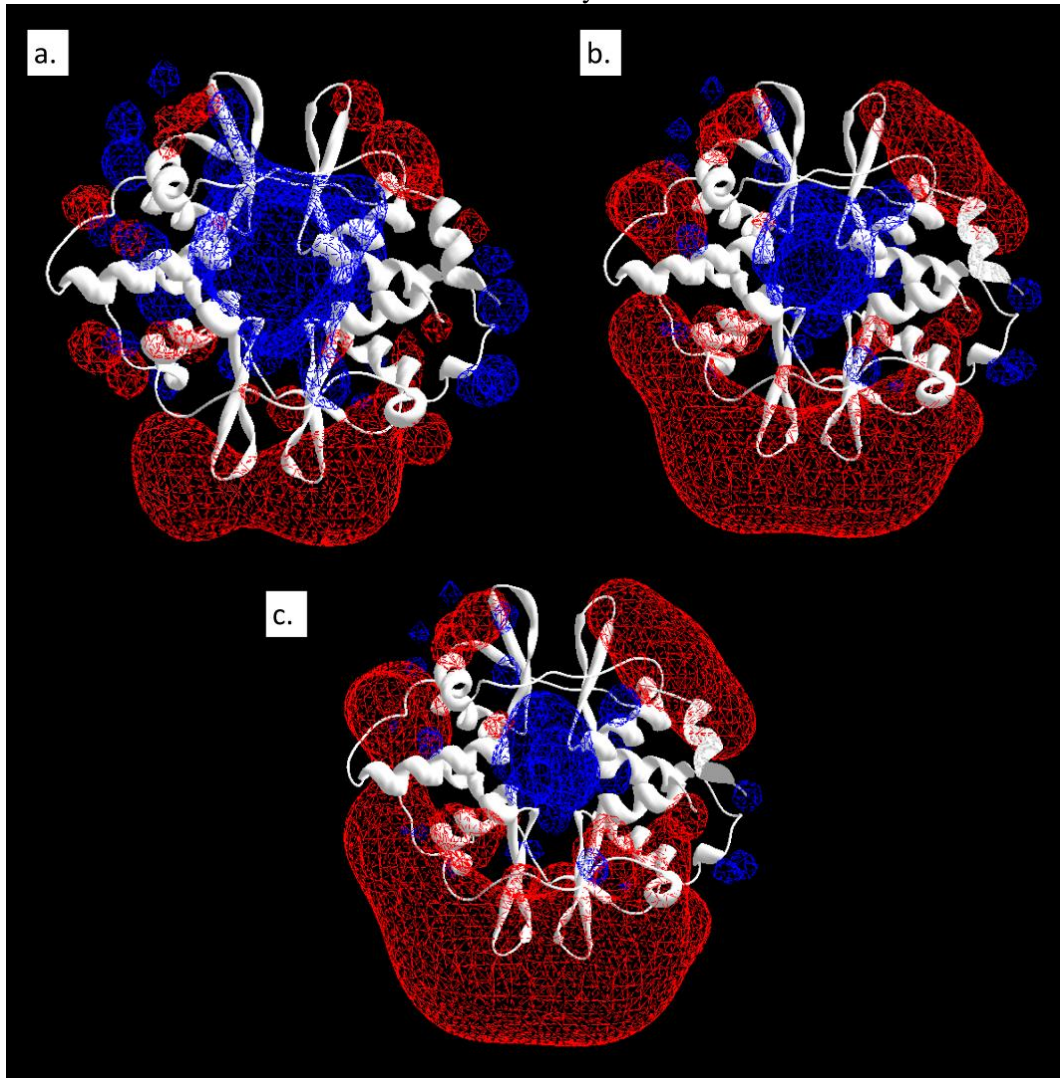
Se detallan los aminoácidos involucrados en la fijación del AMP.

**Figura 3-7:** Ubicación de los cambios aminoacídicos producidos por SNPs *missense*.



a. PRKAG3 bovino, posiciones 244 en rojo y 312 en azul; b. molécula porcina, posición 199 en rojo y 200 en azul.

**Figura 3-8:** Distribución electrostática del PRKAG3 y sus alteraciones.



a. PRKAG3 bovino silvestre; b. silvestre porcino; c. mutación RN- del cerdo.

### 3.4 Discusión

Según la base de datos consultada, es importante denotar la alta variabilidad del gen PRKAG3 bovino, superior al total de SNPs reportados para el cerdo (13, pero ninguna corresponde a las dos mutaciones empleadas para el análisis en este artículo), lo que da pie a establecer a este gen como un potencial candidato en estudios de asociación fenotipo-genotipo, en el área de calidad cárnica en bovino dada su función biológica y el rol que desempeña durante el PM en la conversión del músculo a carne. Otras investigaciones pueden soportar la alta variabilidad de este gen, entre los que se citan a McKay *et al.* (2003) y a Yu *et al.* (2005) quienes identificaron varias mutaciones

funcionales y un *splicing* alternativo en el exón 2 y Roux *et al.* (2006) con 32 SNPs adicionales, cinco de los cuales son funcionales.

Barnes *et al.* (2005) lograron establecer una mutación en el gen PRKAG3 humano (R225Q), que altera la deposición *in-vivo* a nivel muscular del glucógeno, dada una pérdida de la función de la proteína al eliminar la regulación realizada por la relación AMP:ATP, incrementando la actividad basal del AMPK. El principio anterior, es igualmente denotado por varios investigadores (por ejemplo Enfält *et al.*, 2009; Lindahl *et al.*, 2004) como el responsable de alterar la calidad cárnica en el cerdo (asociado al alelo RN-) al existir una mayor deposición de glucógeno AM que conduce a una caída de pH más acelerada en el PM, dada su conversión a ácido Láctico. Sin embargo, Scheffler *et al.* (2011) indicaron que el cambio en la deposición de glucógeno es solo una de las modificaciones que presentan los animales con la variante RN- respecto a los que expresan la proteína normal, por lo que sugieren la necesidad de establecer diferencias tanto en las propiedades como en la cantidad y actividad de la enzima, el tipo de fibra muscular y su estatus energético.

#### 3.4.1 Variaciones en el ARNm.

La importancia del ARNm no se basa únicamente en la información contenida en ella, que aparece formando un texto que se lee linealmente ó la denominada información “digital”, sino también a la concepción “análoga” del ARNm explicada por Andrade (2011). La distinción análogo-digital es crucial si se quiere entender los fundamentos fisicoquímicos de la información genética, puesto que la primera hace posible la aparición de la segunda, donde la actividad biológica depende de enzimas cuya estructura tridimensional les permite reconocer sus sustratos y por tanto actuar en consecuencia. La funcionalidad y el mantenimiento de la actividad metabólica requieren de enzimas que oscilan entre configuraciones estructurales muy precisas y la importancia de los reconocimientos específicos entre aminoácidos, enzimas aminoacil-RNA-sintetasas y los respectivos RNAs de transferencia, lo que pone de relieve la importancia de la información analógica que posibilita la existencia y el funcionamiento de la digital Andrade (2011). Por lo tanto la estructura tridimensional (o en este caso la aproximación mediante la estructura secundaria adoptada por el ARNm) y su modificación por mutaciones puntuales puede ser una fuente de variación fenotípica, al alterar por ejemplo la tasa de traducción (Johnson *et al.*, 2011). Algo relacionado a lo anterior, lo reportan Duan *et al.* (2003) al poder establecer que aunque una mutación (C957T) del gen del Receptor de la Dopamina D2 (DRD2) humano es sinónima, modifica la estructura análoga adoptada por el ARNm (evaluando su estructura secundaria),

disminuyendo su estabilidad (vida media del ARNm silvestre de 8 horas a 4 horas en el mutante 957T) y por lo tanto su eficiencia en traducción *in-vitro* hasta en un 50%, cambiando dramáticamente la expresión del DRD2. Para el caso del ARNm del gen PRKAG3 bovino, cinco mutaciones modifican notoriamente la estructura predicha (figura 3-2), por lo que potencialmente pueden afectar la expresión del gen. Adicionalmente la estabilidad de esta molécula es claramente afectada por cuatro de ellas (valores de  $\Delta G$ ), donde la mutación 16 (1796C) aunque no modifica un aminoácido en la proteína, disminuye la estabilidad del modelo de ARNm. Teóricamente la mutación con el mayor efecto estabilizante de la molécula de ARNm corresponde a la número 28 (2338T), la cual tampoco hace parte de un codón de traducción. Siendo una explicación al porqué mutaciones que no afectan la proteína pero si el ARNm se pueden asociar a variaciones en el fenotipo, tal como lo mencionan Johnson *et al.* (2011) al establecer que los polimorfismos conformacionales del ARNm producidos por SNPs funcionales, en genes ya asociados con fenotipos humanos, contribuyen sustancialmente a su variabilidad fenotípica.

### **3.4.2 La proteína PRKAG3 y las alteraciones por SNPs**

Es interesante resaltar la predicción de varias regiones desordenadas en la secuencia lineal de la proteína (figura 3-4) hasta el aminoácido 185, concordando con el segmento que se logró modelar a nivel terciario, indicando que este fragmento puede no hacer parte de la molécula activa, estando comprendida entre los aminoácidos 188 y 488, en donde se distribuyen los dominios CBS Par 28 y CBS Par 5, que generalmente forman un par de dominios CBS intramolecular como un sitio potencial de fijación a un ligando, por lo que desempeñan una función generalmente reguladora (información suministrada por CD-Search, Marchler y Bryant, 2004). Lo anterior está en concordancia con la estructura terciaria obtenida, dada una configuración globular (figura 3-5) y en su interior una región en donde se ligan dos moléculas de AMP intercambiables (Xiao *et al.*, 2011). Las cuatro mutaciones del bovino que modifican un aminoácido en la secuencia proteica alteran su peso molecular (tabla 3-2), pero uno de los parámetros que en mayor medida es modificado por las mutaciones *missense* es el valor del punto isoeléctrico (PI). Bee *et al.* (2007) establecieron que el pH en las primeras horas PM se relaciona con la degradación de proteínas citoesqueléticas, ocurriendo más rápido en carcasas que presentaban pH inferiores a 5,7 a las 3 horas. De tal modo que la caída del pH puede influir en la disrupción proteica, al permitir la activación de enzimas proteolíticas como el sistema Calpaína-Calpastatina, pero en este mismo sentido, la disminución gradual del pH en la carne generará la inactivación de estos sistemas enzimáticos. Si una mutación permite que enzimas como el AMPK sea inactivado (por ejemplo incrementando el valor del PI en

la proteína reguladora PRKAG3) los procesos mediados por esta enzima serán limitados en el PM y viceversa, si la mutación le confiere una actividad más prolongada al disminuir su valor de PI. Por lo anterior, en el caso del bovino únicamente una de las cuatro mutaciones genera una modificación en este parámetro, la mutación 1, cambiando su valor de PI de 5.20 a 5.26, lo que podría ocasionar que la enzima presente una menor actividad en el PM y según su función biológica, una menor conversión de glucógeno a ácido láctico, teniendo como resultado un mayor pH final en la carne o un descenso más gradual, aunque cabe recordar que la posición de esta mutación en la proteína es en la región desordenada inicial de la misma, que posiblemente no hace parte de la proteína activa.

Un hallazgo que puede sustentar la afirmación anterior, es revelado por el valor de PI conferido por la mutación RN- a la proteína del cerdo, pasando de 5.24 a 5.18, es decir esta molécula podría conferirle una mayor actividad a la molécula AMPK, traduciéndose en un valor de pH final mucho más bajo de lo normal, algo totalmente en concordancia con la calidad cárnica atribuida a animales con esta mutación. Como es el caso de Lindahl *et al.* (2004), que empleando los músculos LD de cerdos, reportaron un efecto negativo del alelo RN- sobre el pH final en carne cruda, al ser comparado con los alelos rn+ y rn\*, estableciendo la siguiente jerarquía para la característica pH final: genotipos RN-/- < rn+/rn+ < rn+/rn\* = rn\*/rn\*, concluyendo que los cerdos cuyo genotipo poseía al menos una copia del alelo RN- presentaban un pH más bajo en su carne. Pero lo anterior no es aplicable para el alelo rn\*, ya que este SNP no modifica el valor de PI, pero según Lindahl *et al.* (2004) si se presenta una diferencia significativa en el valor de pH final de la carne respecto al alelo rn+. Cabe resaltar la gran complejidad de eventos que conducen a la conversión del músculo a carne (genes que intervienen en este proceso, efecto de sus mutaciones e interacciones entre ellos).

De las figuras 3-5 y 3-6 se resalta la ubicación de las dos moléculas de AMP en el interior de la proteína PRKAG3 (según Xiao *et al.*, 2011 existe una tercer molécula de AMP fijada, pero no es intercambiable) y en la figura 3-6 se ilustra la fijación de ambas moléculas a la proteína mediante enlaces de Hidrógeno (AMP1 mediante cuatro y AMP2 por cinco enlaces). Ninguna de las mutaciones evaluadas modifica estos enlaces de Hidrógeno.

En el caso del cerdo la mutación RN- logra modificar el potencial electrostático de la proteína (figura 3-8) incrementando el potencial negativo (rojo) de la molécula y disminuyendo el potencial

positivo existente al interior (lugar de fijación a AMP), lo que podría modificar su asociación a su ligando y/o su ensamblaje a la molécula final de AMPK. Ninguna de las dos mutaciones modeladas modificaron el potencial electrostático del PRKAG3 bovino y en el caso del porcino, la mutación rn\* mantiene la misma distribución que el alelo silvestre, por lo que no explicaría las diferencias fenotípicas que le confiere a la carne.

### **3.5 Conclusiones.**

Las mutaciones del gen PRKAG3 bovino con un mayor potencial de causar una variación fenotípica en los parámetros de calidad cárnica se pueden dividir en dos grupos según los resultados obtenidos, el primero, como aquellos que pueden alterar la estructura conformacional del ARNm y modificar su energía libre alterando su estabilidad y el segundo como aquellas que pueden modificar algún parámetro físico-químico de la proteína funcional. En el primer grupo se pueden ubicar el polimorfismo 16 (1796C, como desestabilizante) y el 28 (2338T como estabilizante) y en el segundo grupo, la mutación 1 (389T) dado su efecto sobre el PI de la molécula, posiblemente asociado a una mejor calidad cárnica. De igual manera la mutación RN- del cerdo modifica teóricamente varios parámetros de la proteína (menor PI y altera el potencial electrostático molecular), lo que puede dar luces a su efecto biológico.

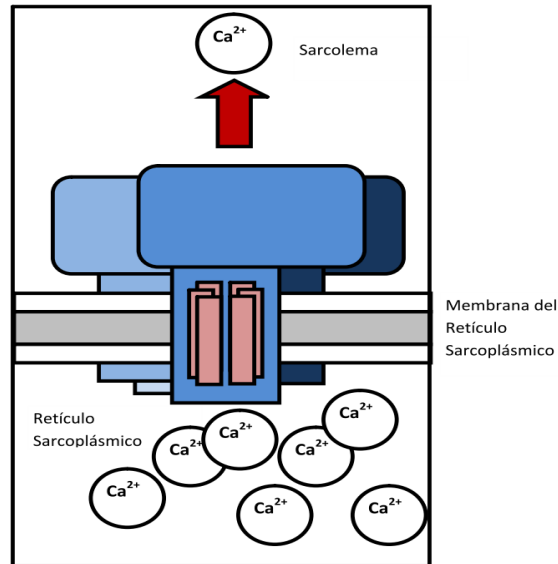
## **4. Modelamiento tridimensional de la proteína RYR1 bovina y análisis *in-silico* de mutaciones *missense*, enfocado a calidad cárnica**

### **4.1 Introducción**

El calcio es uno de los mensajeros celulares más importantes y media una variedad de funciones a nivel celular, entre las que se incluye la contracción muscular, la cual se traduce en la capacidad de la célula para mantener bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\approx 10^{-7}$  M) en el sarcolema en condiciones de reposo. Cuando el músculo se contrae, eleva rápidamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\approx 10^{-6}$  M) a través de su paso por la membrana plasmática y/o desde organelas de almacenamiento como el RS (Serysheva *et al.*, 2008), mediado por el canal iónico de liberación más grande ( $\approx 2.2$  MDa) (Lobo y Van Petegem, 2009; Serysheva *et al.*, 2005), conocido como Rianodina (RYR) (Ludtke *et al.*, 2005).

El canal de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ , RYR1 es un homotetrámero que regula la salida de este ión desde el RS para iniciar la contracción muscular (Serysheva *et al.*, 2008) durante el proceso de excitación-contracción en las células del músculo esquelético. La interacción funcional de la membrana exterior y el RS es iniciada mediante el acople mecánico del Receptor de Rianodina (RYR) y el Receptor de Dihidropiridina (DHPR), siendo este último un canal de calcio tipo L de membrana exterior que actúa como un sensor de voltaje para el proceso de excitación-contracción (Felder *et al.*, 2002; Marks *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 1989). Aunque de los tres tipos de RYR, únicamente se expresan RYR1 y RYR3 en el músculo esquelético, es RYR1 el que interviene principalmente en el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR por las siglas en inglés *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*), mecanismo similar al inducido por la Cafeína y la estimulación eléctrica (Ikemoto *et al.*, 1997). Adicionalmente RYR1 posee un papel importante durante el proceso de miogénesis y organización de la miofibrilla (Barone *et al.*, 1998). En la figura 4-1 se ilustra su ubicación en el RS y la macroestructura del homotetrapéptido RYR1, determinada como una estructura de pies (Marks *et al.*, 1991).

**Figura 4-1:** Homotetrapéptido de RYR1.



Fuente propia

La expresión de la RYR1 en el músculo esquelético es regulada por dos factores de transcripción conocidos como RYREF-1 y RYREF-2 y en células no musculares se realiza represión transcripcional mediante el reconocimiento de secuencias moduladoras ubicadas en el primer intrón del gen RYR1 (Schmoelzl *et al.*, 1996). Actualmente se han identificado varias mutaciones *missense* que se encuentran asociadas con enfermedades genéticas en humano (Lobo y Van Petegem, 2009; Hamilton, 2005; Hwang *et al.*, 2012).

En cerdos se han identificado varias mutaciones y una en especial, asociada a calidad cárnica, la mutación R615C, responsable de una variación importante en algunos parámetros y de la presentación del Síndrome de Estrés Porcino (Lahucky *et al.*, 1997). Por ello se destaca como el polimorfismo con mayor efecto sobre la variación de múltiples parámetros de calidad cárnica, incluso más que otros genes como el PRKAG3, por lo que se considera importante su uso en programas de selección y mejoramiento animal (Otto *et al.*, 2007).

El objetivo de este documento es evaluar el efecto a nivel computacional de mutaciones *missense* en el gen RYR1 bovino mediante el uso de modelos tridimensionales, con el fin de postular aquellas mutaciones que potencialmente pueden tener un efecto importante en la calidad cárnica en bovinos.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Secuencias y SNPs empleados.

La secuencia de la proteína RYR1 bovina y porcina empleadas fueron la NP\_001193706.1 y NP\_001001534.1 respectivamente, las cuales en este artículo son denominadas como los alelos silvestres en cada especie. Las mutaciones puntuales evaluadas se listan en la tabla 4-1 y fueron ubicadas manualmente. Se utilizaron las mutaciones *missense* reportadas en el gen RYR1 bovino y el alelo n del cerdo (Halotano, polimorfismo R615C) reportado en estudios de asociación genotipo-fenotipo (Ta, *et al.*, 2007).

**Tabla 4-1:** Secuencias empleadas y alteraciones producidas por los SNPs evaluados.

Nombre de la Secuencia	Accesión	Proteína			Punto isoeléctrico
		Posición	Silvestre	Cambio	
Silvestre bovino	NA	NA	NA	NA	5.16
1	<a href="#">ss267582874</a>	44	N	H	5.16
2	<a href="#">ss267582941</a>	762	C	W	5.16
3	<a href="#">ss414337672</a>	827	K	E	5.15
4	<a href="#">ss267582943</a>	832	E	G	5.16
5	<a href="#">ss267583055</a>	1724	C	R	5.16
6	<a href="#">ss267583056</a>	1726	S	R	5.16
7	<a href="#">ss267583057</a>	1726	S	T	5.16
8	<a href="#">ss62464423</a>	4286	E	K	5.17
Silvestre cerdo	NA	NA	NA	NA	5.17
615C	NA	615	R	C	5.17

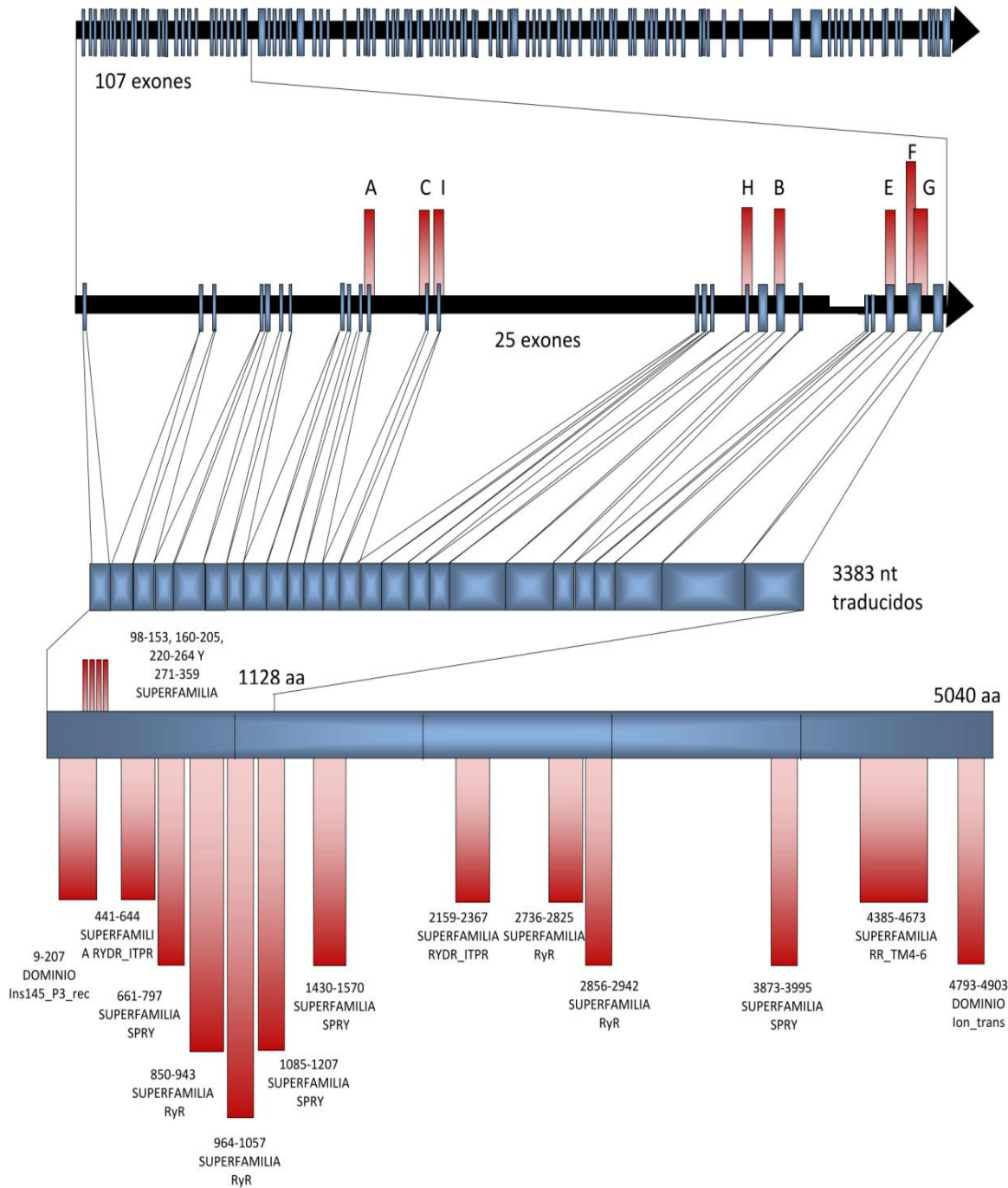
NA; no aplica

### 4.2.2 Modelamiento proteico

Los motivos constituyentes de la proteína y su función biológica se detectaron mediante el servidor CD-Search (Marchler y Bryant, 2004) de NCBI. El número y la ubicación de las hélices transmembranales de la proteína se determinaron mediante el servidor TMHMM (Krogh *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2001). El modelamiento por homología para el único segmento resuelto (aminoácidos 12 al 532) se realizó empleando el servidor SwissModel (Bordoli *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2006; Guex y Peitsch, 1997; Xiang, 2006) y para los aminoácidos restantes se empleó el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010). Dado el tamaño de la proteína (5040 aa) los restantes 4508 aminoácidos fueron divididos en segmentos de 120 residuos solapantes en 5 aa, para permitir su ensamblaje (Duque *et al.*, 2009) en 9 modelos de 500 residuos aproximadamente. Los 10 modelos fueron visualizados mediante el Software Deep Viewer (Guex

y Peitsch, 1997; [www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)), efectuando la minimización energética de cada modelo mediante Gromos96.

**Figura 4-2:** Organización génica de la RYR1 bovina.



Se presentan adicionalmente los dominios predichos en la proteína lineal. Se detallan los primeros 25 exones del gen, en los cuales se realizó la selección de las regiones amplificadas por cada uno de los juegos de cebadores, empleados en el estudio de asociación fenotipo-genotipo.

El modelamiento del segmento 533-1000 del cerdo y su mutación 615C se realizó empleando el modelo 2 del bovino resuelto por I-TASSER como template en el servidor Swiss Model. El mismo procedimiento fue realizado con cada una de las ocho mutaciones evaluadas en el bovino, usando su respectivo modelo tridimensional. Se determinó el valor del Punto isoeléctrico (PI) mediante el servidor ProtParam ([www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)) y el potencial electrostático y la estructura superficial con el Software Deep Viewer (Guex y Peitsch, 1997; <http://www.expasy.org/spdbv/>) en las dos secuencias silvestres (bovino y porcino) y las respectivas mutaciones analizadas.

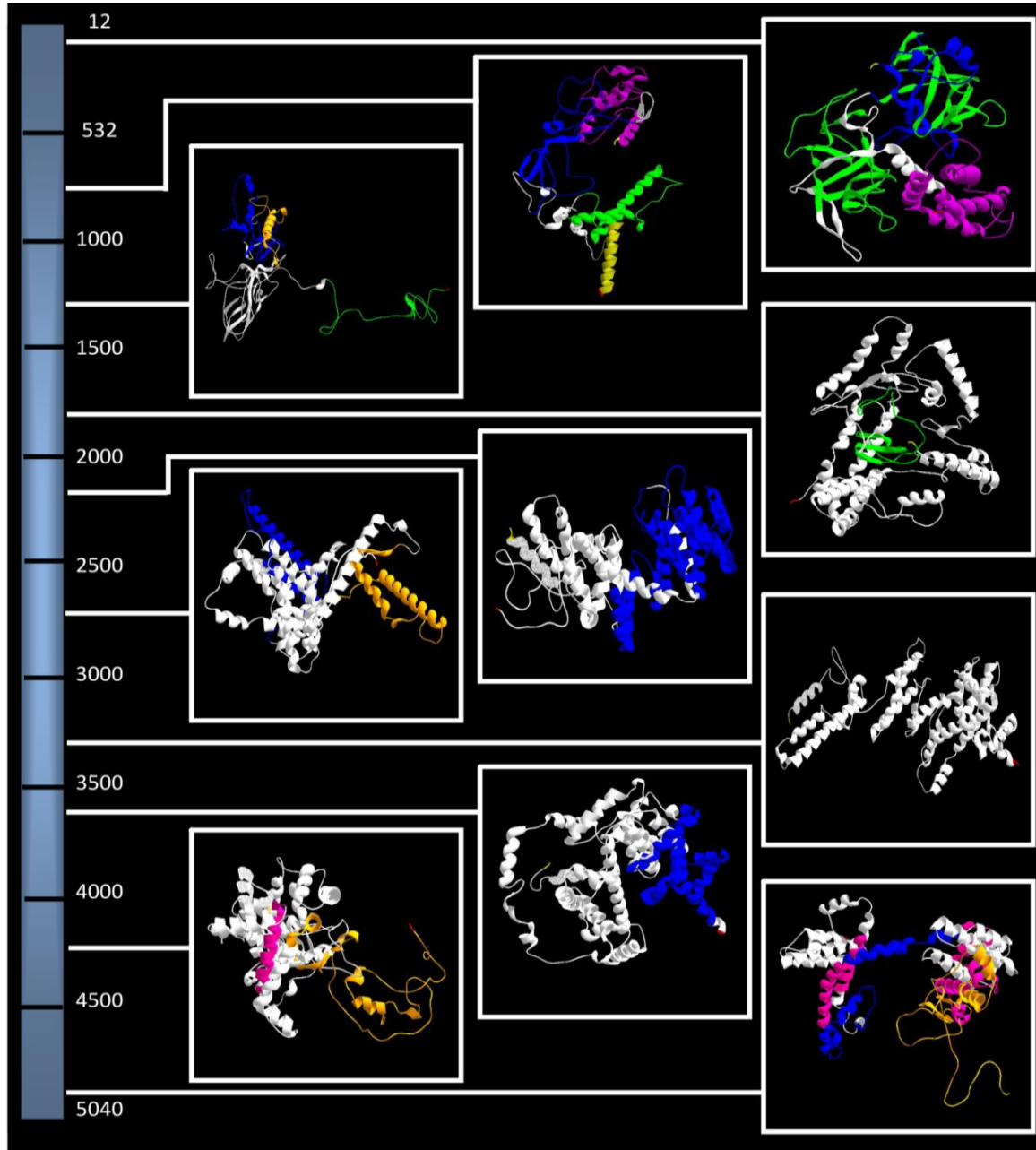
### 4.3 Resultados.

En la figura 4-2 se presenta la organización génica del ARNm y la distribución lineal de dominios, familias y superfamilias en la proteína RYR1 bovina y en la figura 4-3 su ubicación en cada uno de los diez modelos tridimensionales obtenidos.

#### 4.3.1 Dominios predichos en la RYR1 bovina.

El primer dominio establecido en la secuencia de 5040 aa constituyentes de la proteína RYR1, corresponde al Ins145\_P3\_rec (pfam08709; Receptor Inositol 1, 4, 5-trifosfato/ Rianodina), localizado en la porción N-terminal que está ubicado en el sarcoplasma y es responsable de la capacidad del RS para discriminar entre diferentes tipos de actividad neuronal. Conjuntamente se identificó la Superfamilia MIR (cl02624) compartiendo varios residuos en su secuencia con el dominio anterior. Se predijeron dos regiones en donde existe una secuencia homóloga a la Superfamilia RYDR\_ITPR (cl03182) involucrada en la apertura de los canales de calcio, cada una de las cuales crea un sitio de unión a inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Otras Superfamilias reconocidas fueron la SPRY (cl02614) y la RyR (cl03409) en cuatro regiones diferentes cada una, pero de las cuales no se conoce una función determinada aún. La penúltima Superfamilia identificada fue la RR\_TM4-6 (cl05786), en la cual se disponen entre 4 y 6 regiones transmembranales. Finalmente, la familia establecida en la región C-terminal fue la Ion\_trans (pfam00520), la cual está presente en canales de calcio, sodio y potasio y generalmente está compuesta por seis hélices transmembranales, de las cuales las dos últimas flanquean un *loop* que modula la selectividad de iones.

**Figura 4-3:** Modelos tridimensionales de la proteína RYR1 del bovino obtenidos.



En cada modelo, el extremo N es presentado coloreando el primer aa de amarillo y el extremo C en rojo. Se encuentran resaltados los dominios, familias y superfamilias predichas. **Modelo 12-532**, azul: 9-207 DOMINIO Ins145\_P3\_rec; verde: 98-153, 160-205, 220-264 y 271-359 SUPERFAMILIA MIR y fucsia: 441-532 SUPERFAMILIA RYDR\_ITPR; **Modelo 533-1000**, fucsia: 533-644 SUPERFAMILIA RYDR\_ITPR; azul: 661-797 SUPERFAMILIA SPRY; verde: 850-943 SUPERFAMILIA RyR; dorado: 964-1000 SUPERFAMILIA RyR; **Modelo 1001-1500**, dorado: 1001-1057 SUPERFAMILIA RyR; azul: 1085-1207 SUPERFAMILIA SPRY; verde: 1430-1500 SUPERFAMILIA SPRY; **Modelo 1501-2000**, verde: 1501-1570 SUPERFAMILIA SPRY; **Modelo 2001-2500**, azul: 2159-2367 SUPERFAMILIA RYDR\_ITPR; **Modelo 2501-3000**, dorado: 2736-2825 SUPERFAMILIA RyR; azul: 2856-2942 SUPERFAMILIA RyR; **Modelo 3001-3500**; **Modelo 3501-4000**, azul: 3873-3995 SUPERFAMILIA SPRY; **Modelo 4001-4500**, dorado: 4385-4500 SUPERFAMILIA RR\_TM4-6; **Modelo 4501-5040**, dorado: 4501-4673 SUPERFAMILIA RR\_TM4-6; azul: 4793-4903 FAMILIA Ion\_trans. En el **Modelo 4001-4500** y **Modelo 4501-5040** se ubican las seis regiones transmembranales (por molécula) predichas en fucsia; ver Anexo B.

En algunas proteínas existen cuatro repeticiones de esta familia y en otras (que debe ser el caso de los canales de RYRs) la conformación activa de la molécula está dada por un tetrámero, existiendo en total cuatro familias de Ion\_trans y de RR\_TM4-6 involucradas en el anclaje del canal de Ca<sup>2+</sup> en la membrana de RS y de la selectividad de iones desde el interior del mismo.

### 4.3.2 Hélices transmembranales de la RYR1 bovina.

Aunque la constitución de motivos en la proteína establece entre 4 y 6 hélices en la superfamilia RR\_TM4-6 y de 6 en la familia Ion\_trans, se predijeron únicamente seis  $\alpha$ -hélices por monómero y no todas se ubican dentro de uno de estos dos motivos (Tabla 4-2 y modelos 4001-4500 y 4501-5040 de la figura 4-3).

**Tabla 4-2:** Aminoácidos involucrados en la región transmembranal de la RYR1 bovina.

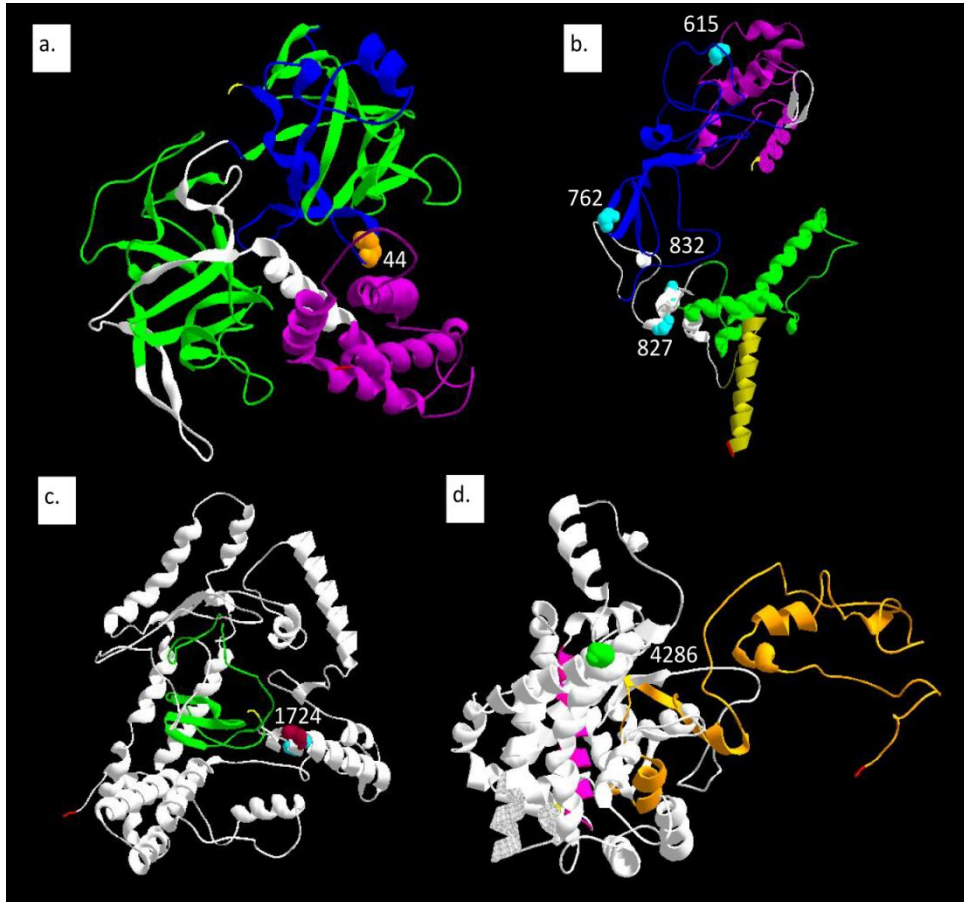
Ubicación respecto al RS	Aminoácidos		Tamaño del segmento
Exterior	1	4330	4329
Hélice	4331	4353	22
Interior	4354	4560	206
Hélice	4561	4583	22
Exterior	4584	4650	66
Hélice	4651	4673	22
Interior	4674	4791	117
Hélice	4792	4814	22
Exterior	4815	4839	24
Hélice	4840	4862	22
Interior	4863	4920	57
Hélice	4921	4940	19
Exterior	4941	5040	99

### 4.3.3 Mutaciones *missense* de la RYR1.

En la figura 4-4 se ubican los 8 polimorfismos evaluados del bovino y la posición homóloga a la 615 del cerdo sobre sus respectivos modelos de RYR1. De las ocho mutaciones bovinas evaluadas únicamente las mutaciones N44H, C762W y la R615C del cerdo se ubican en uno de los motivos, en Ins145\_P3\_rec, SPRY (N44H) y RYDR\_ITPR. En la tabla 4-1 se presenta el cálculo del parámetro PI de cada una de las variantes evaluadas y en la figura 4-5 se ilustra la distribución del potencial electrostático de la secuencia silvestre del cerdo y su mutación 615C (a y b respectivamente), como el único parámetro evaluado que fue modificado por esta mutación en el análisis *in-silico* y la secuencia silvestre del bovino (modelo 533-1000), junto con los

polimorfismos C762W, K827E y E832G (los cuales también modifican la distribución electrostática de la molécula en el segmento 533-1000). Ninguno de los 5 polimorfismos restantes modifica este parámetro, ni tampoco se estableció una alteración notoria en la estructura superficial de los modelos obtenidos producida por alguna de las mutaciones evaluadas.

**Figura 4-4:** Cambios aminoacídicos en su respectivo modelo de RYR1 de bovino.



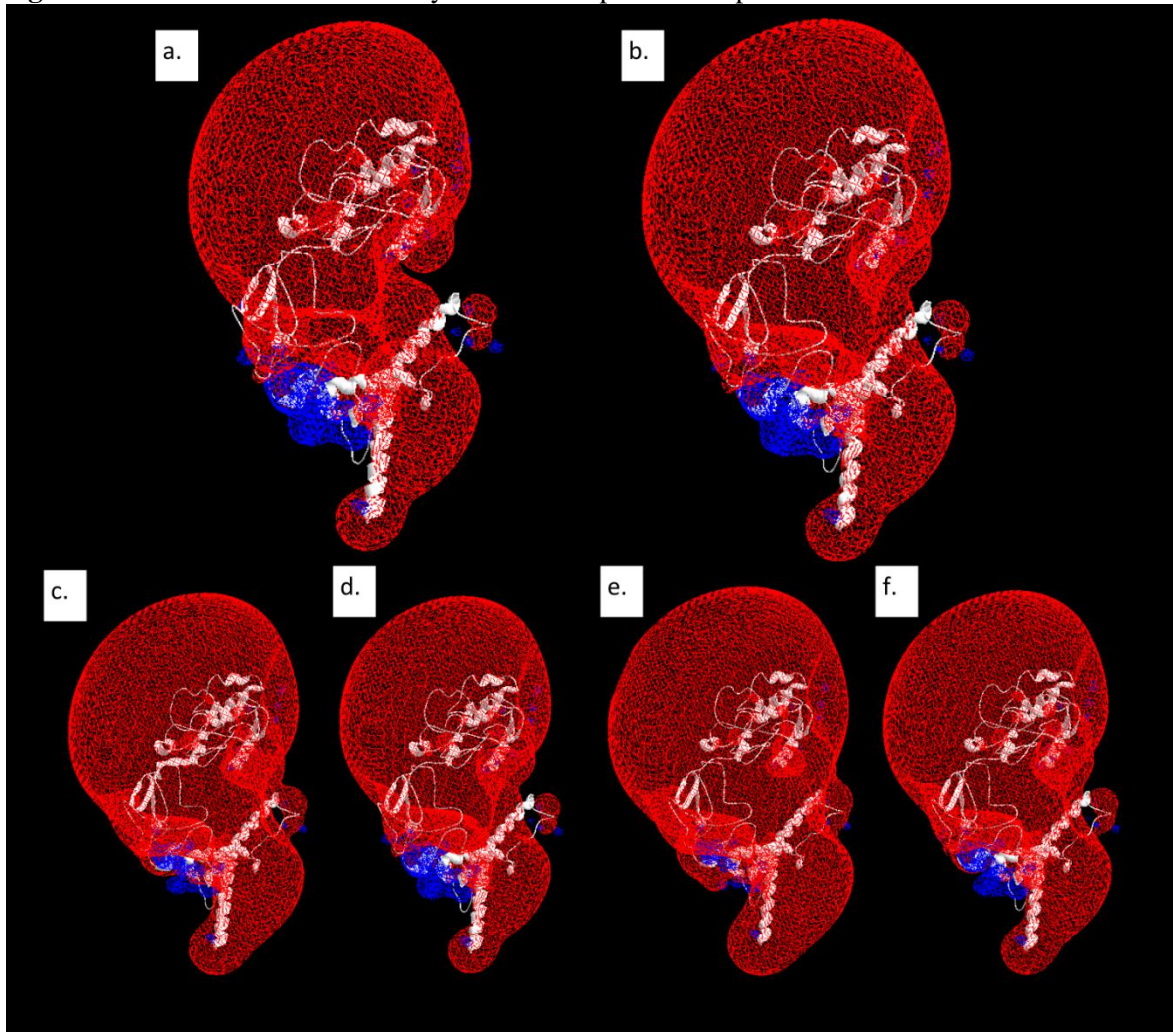
En cada modelo, el extremo N es presentado coloreando el primer aa de amarillo y el extremo C en rojo, se mantiene la ubicación de los motivos detectados en cada segmento y se destacan las posiciones donde se ubican las mutaciones *missense* evaluadas en el bovino y la posición homóloga a la mutación 615 del cerdo. a. **Modelo 12-532** con la mutación en la posición 44 en el DOMINIO Ins145\_P3\_rec (9-207). b. **Modelo 533-1000**, en la posición homóloga de la mutación 615 del porcino en la SUPERFAMILIA RYDR\_ITPR (533-644); posición 762 ubicada en la SUPERFAMILIA SPRY (661-797) y las mutaciones 827 y 832. c. **Modelo 1501-2000**, donde se ubica la mutación 1724. d. **Modelo 4001-4500** con la ubicación del aminoácido 4286.

## 4.4 Discusión

Como lo mencionan Serysheva *et al.* (2008) según el enorme tamaño de la proteína RYR1 y la compleja regulación alostérica que posee, se espera la existencia de múltiples dominios

estructurales y funcionales, distribuidos tanto en la región citoplasmática (aminoácidos 1 al 4330) como en la transmembranal (aminoácidos 4331 al 5040).

**Figura 4-5:** Potencial electrostático y alteraciones producidas por mutaciones *missense*.



En el modelo 533-1000 a. porcino silvestre, b. alteración producida por la mutación 615C, c. silvestre bovino, d. secuencia 2 (762W), e. secuencia 3 (827E) y f. secuencia 4 (832G), como las únicas mutaciones que logran modificar este parámetro respecto a la distribución normal en el alelo silvestre.

La región citoplasmática es la que posee un carácter regulador en el proceso de apertura del canal mediante su interacción con una amplia variedad de mensajeros intracelulares, entre los que se citan, Inmunofilina, Calmodulina (activa la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones de nM del catión y la inhibe al alcanzar valores de  $\mu\text{M}$ ; Xiong *et al.*, 2002), ATP, iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (por lo que es necesaria la existencia de sensores en RYR1 involucrados en su regulación, pero aún no es muy clara su ubicación -Fessenden *et al.*, 2004; Hamilton, 2005),  $\text{Mg}^{2+}$  (Serysheva *et al.*, 2008) y

FKBP12, la cual es una proteína reguladora de RYR1 (Cornea *et al.*, 2010). Teóricamente de acuerdo a la predicción realizada también se postula una regulación por IP<sub>3</sub>, dado que los RYRs poseen una alta similitud en los residuos  $\approx 220-600$  con una región de alta homología de la proteína IP<sub>3</sub>Rs, presentando posiblemente una interacción dominio-dominio similar (Lobo y Van Petegem, 2009; Serysheva *et al.*, 2005). Adicionalmente, es posible que exista una actividad enzimática, la cual fue mencionada por Baker *et al.* (2002), quienes establecen un dominio con actividad óxido-reductasa en la región N-terminal de RYR1, lo que le podría conferir este tipo de actividad a esta bomba de iones, ligando un cofactor como NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>.

En el caso de la regulación realizada por DHPR, Sencer *et al.* (2001) establecen la región comprendida entre los aminoácidos 3609-3643 como su sitio de unión a la región citoplasmática de RYR1, generando posiblemente un contacto más estable entre estas dos proteínas. Sin embargo, según la predicción realizada por CD-Search en el segmento homólogo del bovino no se identificó un dominio potencial involucrado en este proceso. Adicionalmente, Wu *et al.* (1997) establecieron una interacción entre DHPR y la región N-terminal de RYR1 y de esta última con un dominio central de Rianodina demostrando la existencia de una interacción entre subdominios de este tetramero. Algo similar ocurre con otra región establecida por Proenza *et al.* (2002) (1837-2168, determinada como facilitadora, pero no esencial) que se postula como involucrada en el proceso de acople de ambas proteínas. Una de las incertidumbres más grandes corresponde a la predicción de ocho regiones pertenecientes a dos motivos identificados, sin función atribuida, pero en el caso de la superfamilia SPRY, Hwang *et al.* (2012) la involucran en interacciones proteína-proteína, constituyendo regiones alostéricas de RYR1.

Para el segundo segmento, la porción transmembranal del monómero de RYR1 (~15% del total de la molécula -Wagenknecht y Radermacher, 1997) se postulan seis  $\alpha$ -hélices, que al constituir el homotetramero permiten la formación del poro encargado de la conducción del Ca<sup>2+</sup> (Serysheva *et al.*, 2008). Sin embargo, tal como lo afirman Serysheva *et al.* (2005) es una pregunta que únicamente podrá ser resuelta definitivamente cuando se logre una estructura de la molécula a una resolución de 8 a 10 Å, ya que existe la posibilidad de que tenga un arreglo mucho más complejo, en donde no intervengan únicamente estructuras como hélices, dado el gran tamaño que posee la molécula (Ludtke *et al.*, 2005).

Adicionalmente, Ludtke *et al.* (2005) identificaron al residuo G4934 en la hélice1 transmembranal (I4918-E4948; 30 residuos) como el “*hinge*” o bisagra del proceso de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior del RS. En la última hélice predicha (tabla 4-2) en la secuencia del bovino, esta región se ubica en un segmento homólogo, entre los residuos I4921-I4940 (solo 19 residuos). De acuerdo a los resultados de Ludtke *et al.* (2005), el segmento I4921-E4951 debe ser el correspondiente a la hélice1 y el residuo G4937 al “*hinge*” o bisagra en la proteína del bovino. En otros trabajos se establece el denominado filtro selectivo de iones, correspondiente a un *loop* luminal entre las hélice1 y hélice2 de la secuencia G4894GGIGD4899, cuya secuencia homóloga en el bovino se encuentra en las posiciones G4897GGIGD4902, el cual debe estar involucrado en la alta carga negativa existente en la boca interna del poro, responsable de la selección de cationes y repulsión de aniones de la proximidad (Hamilton, 2005; Wagenknecht y Radermacher, 1997), una facultad similar a la que han descrito estos mismos investigadores en la boca externa del homotetrámero.

#### 4.4.1 Mutaciones *missense* y su efecto fenotípico.

En el humano se han identificado tres regiones denominadas como “puntos calientes” en donde se ubican varias mutaciones asociadas a enfermedades, el primero en la región N-terminal entre los residuos 35 y 614 (homólogo del 615 porcino), el segundo entre el 2163 y 2458 y el tercero en la región transmembranal C-terminal comprendida entre el aa 4643 y 4898 (Yang *et al.*, 2003).

En el estudio de Yang *et al.* (2003) empleando la expresión de algunas de las mutaciones del RYR1 humano más comunes asociadas con Hipertermia Maligna, R163C, G341R, R614C (homóloga a la R615C del cerdo), R2163C, V2168M, R2458H y T4826I concluyeron que todos estos polimorfismos incrementaban la sensibilidad a la Cafeína (entre otros activadores) y tal como lo determinaron Ta y Pessah (2007), hay una inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  disminuida, que se le atribuye a una modificación de la interacción entre el DHPR y la RYR1 (Yang *et al.*, 2003) ya que el nivel de expresión de la proteína RYR1 silvestre y la mutada R615C es similar (Ta y Pessah, 2007). En el estudio de Lobo y Van Petegem (2009) evaluando las mutaciones A77V y V186M, establecen que estas logran modificar la superficie de la proteína RYR2 mediante el uso de una estructura cristal (residuos 1-217).

Dado el enorme tamaño de esta proteína, todavía se desconocen varios componentes estructurales de la misma, requeridos como datos de alta resolución (Lobo y Van Petegem, 2009) (básicamente por la existencia de solo un fragmento resuelto en estructura cristal de los primeros 532 residuos).

Tal como lo mencionan Ludtke *et al.* (2005), el mecanismo molecular que permite la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ , aún es desconocido y muy complejo ya que se postula la existencia de múltiples regiones involucradas en el proceso de liberación del catión inducida por despolarización (Perez *et al.*, 2003). Algo similar ocurre con regiones de unión a Calmodulina (Xiong *et al.*, 2002) reflejando una compleja modulación alostérica en la apertura del canal, produciendo una gran variabilidad conformacional y de reacciones (Serysheva *et al.*, 2005), lo que dificulta evaluar el efecto biológico de las mutaciones sobre el funcionamiento de la proteína *in-silico*. Actualmente hay herramientas disponibles para el modelamiento de proteínas que emplean una metodología diferente al de la homología, permitiendo la obtención de un modelo aproximado que puede ser empleado para simular el efecto de estos polimorfismos sobre algunos parámetros físico-químicos de la molécula, estableciendo un posible sustento biológico a lo hallado en estudios de asociación fenotipo-genotipo, como es el caso del denominado gen “Halotano” en cerdo.

Diferentes estudios de cerdos con el fenotipo gen “Halotano” han permitido confirmar su asociación con la presencia de alelos mutados del gen RYR1, postulándolo como uno de los genes candidato más importantes en relación con la calidad cárnica y otros parámetros productivos. Se han reportado valores extremos en parámetros de calidad cárnica como pH bajos en el periodo PM, exudación excesiva de agua alterando la jugosidad y el peso de la pieza cárnica, color pálido y una percepción indeseable de la terneza, entre otros. Estas características se agravan en los individuos dimutados (nn) mientras que los portadores expresan un fenotipo intermedio respecto a los individuos normales (Lahucky *et al.*, 1997; Laville *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2007; Jeremiah *et al.*, 1999), debido a un incremento en la respuesta metabólica de los individuos nn luego del sacrificio (Laville *et al.*, 2009). Esta respuesta metabólica es el resultado del incremento en la sensibilidad del canal RYR1 a activadores que durante eventos estresantes permiten la salida incontrolada de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS de la célula muscular del cerdo, permitiendo el consumo inmediato del glucógeno existente en el miocito y su conversión a ácido láctico, lo que produce una caída rápida del pH que es lo que altera la calidad cárnica. El único parámetro físico químico del modelo de la RYR1 del cerdo evaluado en el presente trabajo que mostró modificación fue el potencial electrostático del polimorfismo R615C.

En el caso del bovino la mutación K827E presenta un efecto importante sobre el parámetro potencial electrostático, con un incremento en la carga negativa y por consiguiente, una reducción de la carga positiva que es incluso superior a la observada para la mutación R615C del porcino. De

igual modo, la mutación K827E logra modificar también el valor de PI en la molécula de RYR1 del bovino ya que el cambio de un único aminoácido en la posición 827 logra disminuir en 0.01 el valor de PI, en el monómero de 5040 aminoácidos. En el caso de las mutaciones C762W y E832G, también modifican el potencial electrostático del segmento 533-1000 del silvestre, pero por el contrario se genera una reducción importante en la carga negativa. Estas alteraciones en el potencial electrostático de una molécula, como el homotetrámero del canal de RYR1 bovino, pueden ser las responsables de modificar algún tipo de interacción entre los dominios de la misma proteína o el ensamblaje de la misma, interacciones necesarias para la formación de la estructura cuaternaria funcional. Adicionalmente, esta alteración en el potencial electrostático puede perturbar la relación entre el canal y alguna de las numerosas moléculas reguladoras en el proceso de liberación del anión desde el RS (como la DHPR, por ejemplo) o inclusive alterar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante su paso desde la boca interna hasta la boca externa de la bomba, generando una alteración en el proceso de liberación del anión, ya que ella misma interviene en el proceso de selección del calcio existente en el interior del RS, como se mencionó anteriormente.

## 4.5 Conclusiones.

El análisis *in-silico* actualmente es una herramienta útil para postular polimorfismos potencialmente involucrados en alteraciones fenotípicas, puesto que permiten modelar modificaciones en parámetros físico-químicos de la proteína funcional respecto a la proteína silvestre. Este tipo de análisis permitió establecer al potencial electrostático como uno de los parámetros más importantes en estudios de asociación fenotipo-genotipo.

El gen RYR1 ha sido postulado como uno de los genes candidato más importantes en relación a calidad cárnica en bovino. En el caso de las ocho mutaciones missense reportadas en el gen RYR1 bovino y evaluadas en este análisis *in-silico*, tres modifican el parámetro potencial electrostático. De estos tres SNPs sobresale el polimorfismo K827E por presentar un incremento sustancial de la distribución negativa en la molécula y por alterar el valor de PI de toda la proteína RYR1, por lo que se convierte en un SNP que puede estar asociado a alteraciones en parámetros de calidad cárnica en esta especie. La mutación K827E podría ser responsable en una alteración de la regulación alostérica o de la interacción inter/intra-molecular del homotetrámero de RYR1, modificando el proceso de liberación del catión desde el RS en respuesta a estímulos como es el estrés durante el transporte y el sacrificio de los animales. Lo anterior, se vería reflejado en

alteraciones en la tasa de conversión glicógeno-ácido láctico, modificando el proceso de conversión músculo-carne y las características sensoriales del producto final.

# **5. Aproximación a la estructura 3D de la Desmina bovina y determinación del efecto de mutaciones puntuales *in-silico***

## **5.1 Introducción**

La Desmina (DES) es el mayor filamento proteico intermedio del músculo y su gen se considera altamente conservado desde el tiburón hasta el humano (Bar *et al.*, 2004; Goldfarb *et al.*, 2004). Se encuentra localizado principalmente en la periferia del Disco-Z de los sarcómeros (Paulin y Li, 2004) y los conecta con la membrana plasmática y la lámina nuclear en las células musculares estriadas, cardíacas y lisas (Goldfarb *et al.*, 2004). Zhang *et al.*, (2006), Huff-Lonergan y Lonergan, (2005) y Ouali *et al.*, (2006) determinaron que la degradación de proteínas estructurales como la DES durante el *post-mortem* tiene varias consecuencias a nivel estructural, que modifican atributos de músculo permitiendo su conversión a carne (Campo *et al.*, 2000; Monsón *et al.*, 2004; Sañudo *et al.*, 2004; Monsón *et al.*, 2005; Kolczak *et al.*, 2005). Esta proteína juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la estructura celular (Paulin y Li, 2004) por ser uno de los filamentos intermedios mayores involucrado en la conservación del alineamiento lateral de las miofibrillas adyacentes que une la capa periférica de estas a la membrana celular (Zhang *et al.*, 2006). Varias investigaciones han podido establecer que la Desmina tiene un rol importante en varios parámetros de calidad cárnica, al ser uno de los sustratos del sistema proteolítico de la Calpaína-Calpastatina (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Se han identificado varios polimorfismos en genes de este sistema proteolítico en bovinos y porcinos, asociados con variaciones en la calidad cárnica para parámetros como la terneza (Pinto *et al.*, 2010; Iwanowska *et al.*, 2011; Motter *et al.*, 2009; Curi *et al.*, 2010) y la Capacidad de Retención de Agua (CRA) (Zhang *et al.*, 2006; Bond y Warner, 2007). En el estudio de Chang *et al.* (2003) empleando un microsatélite ubicado en la región 3'UTR del gen de la Desmina del cerdo, lograron determinar su asociación con el valor de pH a 45 minutos y a 24 horas *post-mortem*, dada la co-segregación de

este marcador neutro con el polimorfismo responsable. Sin embargo, es posible que la asociación pueda ser producida por una mutación en el gen PRKAG3, gen que yace muy próximo a la Desmina tanto en porcinos como en bovinos.

Es posible que las mutaciones en el gen de la Desmina puedan contribuir a alteraciones fenotípicas en parámetros cárnicos asociados, como la terneza y la CRA en especies como el bovino y el cerdo, por lo que es considerado como uno de los genes candidato asociados a parámetros de calidad cárnica (Williams *et al.*, 2009). A esto contribuye la alta variabilidad reportada en otros mamíferos como el humano (Goldfarb *et al.*, 2004), en el cual se han detectado múltiples variaciones que van desde cambios nucleotídicos, hasta *indels* y *splicings* alternativos, lo que incrementa su valor en estudios de asociación fenotipo-genotipo. El objetivo de este estudio fue determinar la estructura 3D de la proteína Desmina en bovinos y los SNPs con una mayor probabilidad de producir alteraciones funcionales en el ARNm y en la proteína mediante análisis computacional.

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Secuencias y SNPs empleados**

Se emplearon las secuencias de ARNm NM\_001081575.1 y NM\_001001535.1 (bovino y porcino respectivamente) y para la proteína: DAA32384.1 y AAD46492.1 (bovina y porcina respectivamente), las cuales serán denominadas en este artículo como el alelo silvestre. Las mutaciones puntuales de las regiones exónicas evaluadas se listan en la tabla 5-1 y fueron ubicadas manualmente. También se emplearon las secuencias NM\_001927.3 y NP\_001918.3 correspondientes al ARNm y la proteína de la Desmina humana así como las 11 mutaciones *missense* que se han reportado asociadas con miopatías en humanos (van Spaendonck *et al.*, 2011).

### **5.2.2 Construcción de modelos de ARNm.**

Para el modelamiento del ARNm de la DES bovina fueron seleccionados 7 SNPs (secuencias 1-7, tabla 5-1) de los 25 reportados en la base de datos de NCBI, debido a que son los que producen una modificación de un nucleótido de la región exónica y que por consiguiente alteran la secuencia del ARNm. Para el modelamiento del ARNm del gen de DES porcino se utilizaron las 5 mutaciones reportadas en la base de datos de NCBI, las cuales afectan regiones exónicas traducidas

(secuencias 8-12) (tabla 5-1). Se realizó el modelamiento del ARNm de la DES humana normal y se designó como humano silvestre. (Ver procedimiento en el numeral 3.2.2)

**Tabla 5-1:** SNPs empleados, posiciones alteradas y numeración de secuencias.

Secuencia	Número de Accesión	ARNm			Proteína			Valor de AG
		Silvestre	Cambio	Posición	Silvestre	Cambio	Posición	
<b>Bovino</b>								
Bovino silvestre	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-919.81
1	<a href="#">rs135943644</a>	A	C	45	NA	NA	NA	-911.83
2	<a href="#">rs136748725</a>	T	C	49	NA	NA	NA	-911.07
3	<a href="#">rs110342944</a>	G	A	177	A	T	38	-914.41
4	<a href="#">rs134655764</a>	A	C	213	T	P	50	-926.91
5	<a href="#">rs132973368</a>	T	C	1588	NA	NA	NA	-917.97
6	<a href="#">rs110633827</a>	C	T	1723	NA	NA	NA	-917.11
7	<a href="#">rs209238371</a>	C	T	1965	NA	NA	NA	-919.81
<b>Cerdo</b>								
Porcino silvestre	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-891.36
1	<a href="#">rs81494989</a>	A	G	305	A	A	86	-897.90
2	<a href="#">ss86225527</a>	C	T	384	L	L	113	-891.36
3	<a href="#">rs81213204</a>	T	G	719	I	M	224	-891.43
4	<a href="#">rs81213205</a>	G	A	920	S	S	291	-890.26
5	<a href="#">ss86225530</a>	T	G	933	W	G	296	-895.86

NA; no aplica.

### 5.2.3 Construcción de Modelos de la proteína DES.

Para el modelamiento de la proteína DES bovina fueron seleccionadas 2 mutaciones (secuencias 3 y 4) debido a que son del tipo *missense* que codifican aminoácidos (aa) de la proteína (tabla 5-1). Para realizar una comparación con el modelo obtenido de la proteína DES bovina se ubicaron las mutaciones *missense* reportadas que alteran la proteína DES porcina (secuencias 10 y 12) (tabla 5-1) y las 11 mutaciones *missense* reportadas para la proteína DES humana (van Spaendonck *et al.*, 2011).

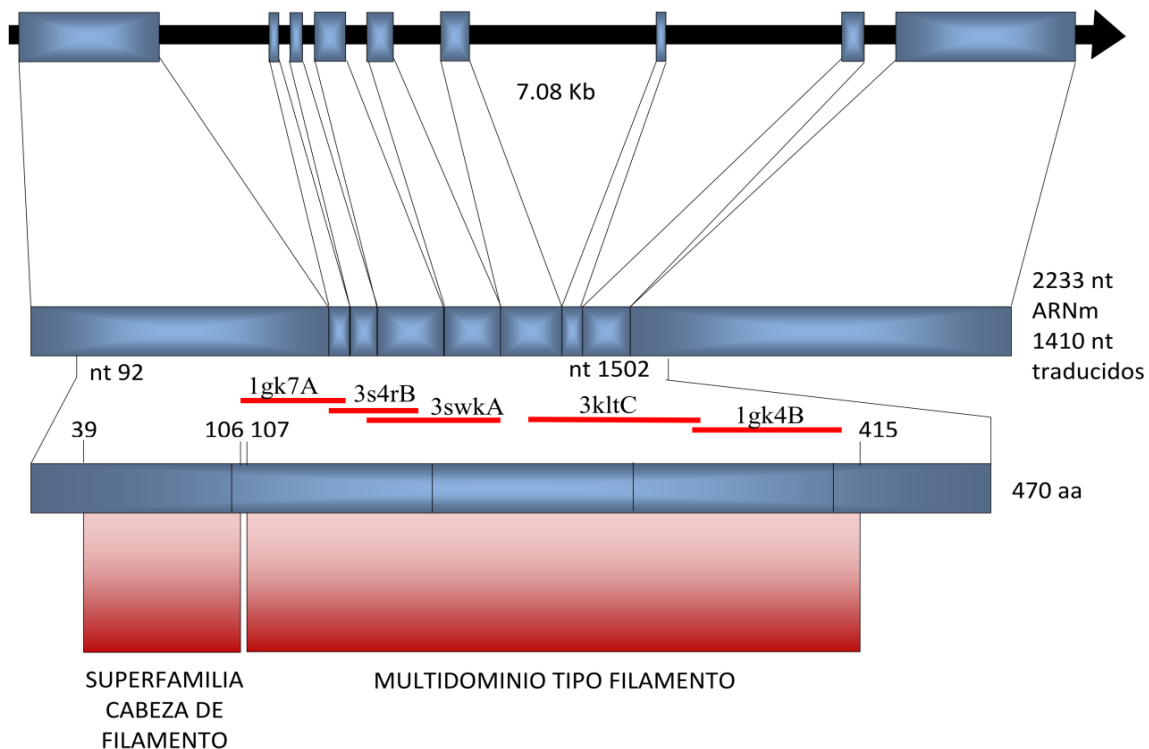
Para determinar la estructura secundaria de las secuencias proteicas, las regiones desordenadas y la detección de los dominios constituyentes de la proteína se empleó el procedimiento descrito en el numeral 3.2.3. El modelamiento por homología fue empleado para la determinación de la estructura terciaria del Multidominio Tipo Filamento mediante el servidor SwissModel y el Software Deep Viewer (Guex y Peitsch, 1997, [www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)) y para el modelamiento de la Superfamilia Cabeza de Filamento (aminoácidos 38 al 110) y los segmentos 240-271 y 407-470 se empleó el servidor I-TASSER y se realizó el posterior ensamblaje de cada uno de los

segmentos obtenido. El punto isoeléctrico (PI) y peso molecular se determinaron mediante el servidor Protparam ([www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)).

### 5.3 Resultados

En la figura 5-1 se presenta la estructura y tamaño del gen, el ARNm y los dominios constituyentes de la proteína de la DES bovina.

**Figura 5-1:** Distribución del gen de la DES bovina.



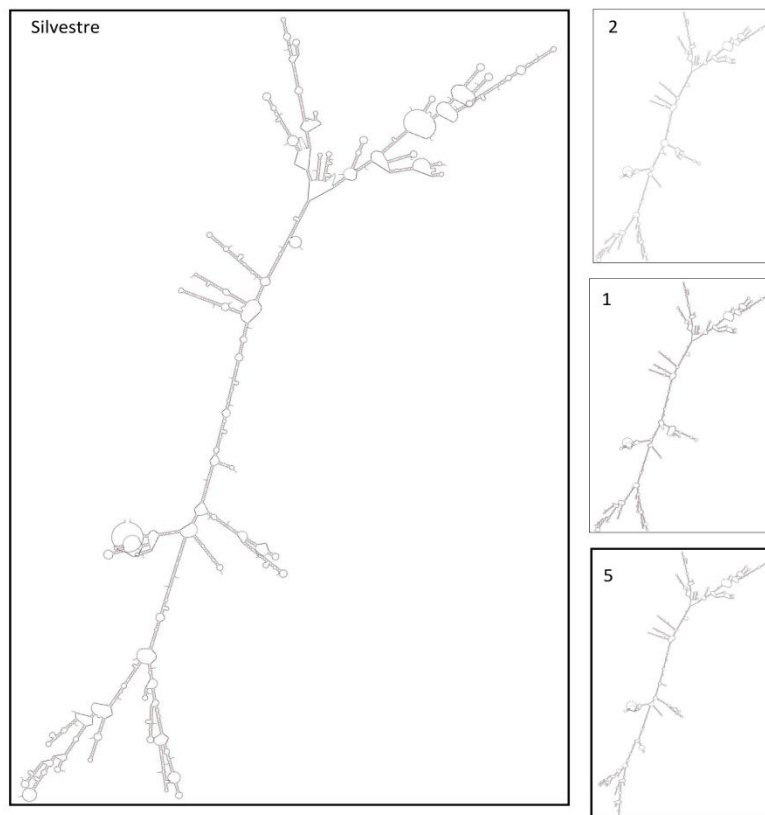
Se presentan adicionalmente, los dominios predichos en la proteína lineal y las regiones amplificadas por cada uno de los juegos de cebadores, empleados en el estudio de asociación fenotipo-genotipo. De igual forma se ilustran las regiones modeladas por con el servidor Swiss Model; empleó los templates 1gk7A con una identidad de 78.95% (entre los aa 106-143), 3s4rB con una identidad del 69.23% (entre los aa 139 - 194), 3swkA con una identidad del 68.61% (aa 158-243), 3kltC con 76.06% de identidad (aa 268 - 338) y 1gk4B con 77.22% de identidad modelando los aminoácidos 333 al 411.

#### 5.3.1 Modelos de ARNm.

En la figura 5-2 se presenta la estructura secundaria adoptada por el ARNm silvestre del gen de la DES bovina (*Bovino silvestre*) y las tres modificaciones estructurales que producían los mayores cambios visibles en el plegamiento del ARNm (en orden descendente: secuencias 2,1 y 5). La figura 5-3 muestra las respectivas estructuras de ARNm del gen DES porcino silvestre y el modelo

de la secuencia 1 debido a que fue la que tuvo el mayor impacto sobre el modelo bidimensional y adicionalmente la estructura del ARNm del gen DES silvestre del humano.

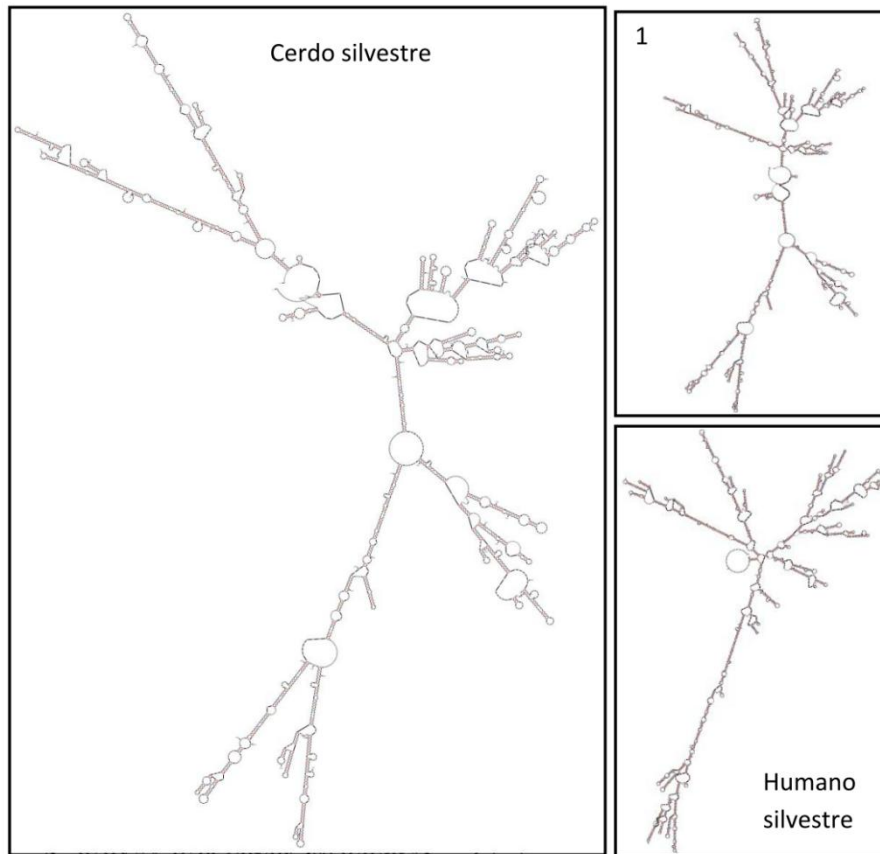
**Figura 5-2:** Polimorfismo conformacional de la DES bovina.



Se presenta la Desmina silvestre y las estructuras adquiridas por las secuencias 1, 2 y 5, como las más importantes.

A nivel de estabilidad molecular, el ARNm del alelo silvestre de la DES bovina, mostró un valor de Energía Mínima Libre ( $\Delta G$ ) de -919.81 kcal/mol. En orden descendente las mutaciones de la DES bovina que desestabilizan en mayor medida a esta molécula son el SNP 2, 1 y 3 con valores de  $\Delta G$  de -911.07, -911.83 y -914.41 kcal/mol respectivamente. Se destaca el SNP 4 cuyo valor de  $\Delta G$  -926.91 kcal/mol, le puede conferir un mayor carácter estabilizante a esta molécula. El alelo silvestre del cerdo presentó un valor de  $\Delta G$  de -891.36 mientras que sus secuencias 4 y 1 mostraron un valor de -890.26 y -897.90 kcal/mol, respectivamente. Para el alelo silvestre humano se encontró un valor de  $\Delta G$  de -916.94 kcal/mol.

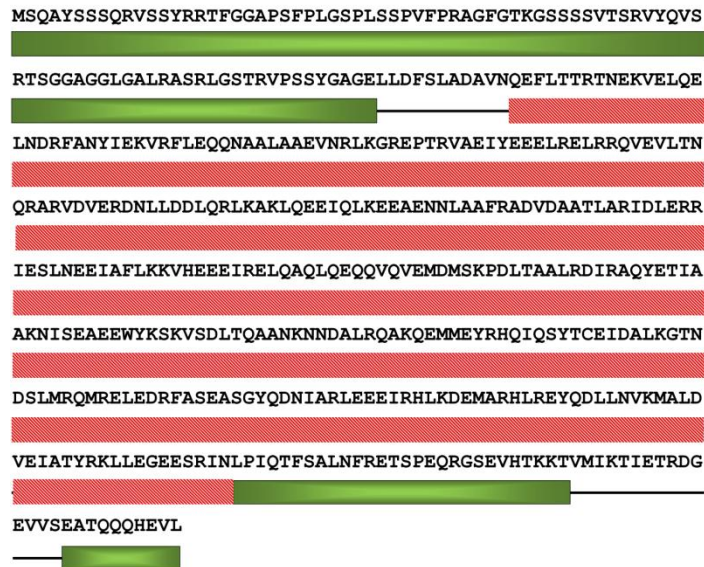
**Figura 5-3:** Polimorfismo conformacional en la DES porcina y el silvestre del humano.



### 5.3.2 Modelo proteico

En la figura 5-4 se presenta la estructura secundaria predicha de la proteína DES bovina. En la tabla 5-2 se muestran los parámetros PI y peso molecular para las secuencias seleccionadas. Se debe tener en cuenta que para la predicción final del modelo el segmento anterior al aminoácido 39 fue eliminado debido a que la predicción realizada por CD-Search no la establece como constituyente de la Superfamilia Cabeza de Filamento. Los ocho segmentos modelados de la proteína DES bovina (5 resueltos por SwissModel y 3 por I-TASSER) tenían fragmentos solapados ( $\approx 5$  aminoácidos) por lo que pudieron ser ensamblados con el programa Deep Viewer. En la figura 5-5a se presenta el modelo final de la proteína Desmina bovina comprendida entre los aminoácidos 39 y 470 de la secuencia problema DAA32384.1. Se señala la presencia de los segmentos constituyentes de la “Rod”: PCD, 1A, L1, 1B, L12, 2A, L2 y 2B, dentro de este último se ubica el denominado “Stutter” que corresponde a 10 aminoácidos (350-359) altamente conservados en las proteínas de los filamentos intermedios celulares (Bar *et al.*, 2004).

**Figura 5-4:** Estructura secundaria de la DES bovina.



En verde se presentan las regiones desordenadas, en rojo la predicción de  $\alpha$ -hélices.

**Tabla 5-2:** Parámetros de la proteína DES alterados

Secuencia	Parámetro		Secuencia	Parámetro	
	Peso molecular	Punto isoeléctrico		Peso molecular	Punto isoeléctrico
Bovino silvestre	53531.8	5.21	N342D	53536.7	5.17
3	53561.8	5.21	L345P	53519.7	5.21
4	53527.8	5.21	A357P	53561.8	5.21
Cerdo silvestre	53628.9	5.21	A360P	53561.8	5.21
10	53646.9	5.21	L370P	53519.7	5.21
12	53499.8	5.21	L385P	53519.7	5.21
Humano Silvestre	53535.7	5.21	Q389P	53504.7	5.21
A213V	53563.8	5.21	R406W	53565.8	5.17
A337P	53561.8	5.21	K449T	53508.7	5.17

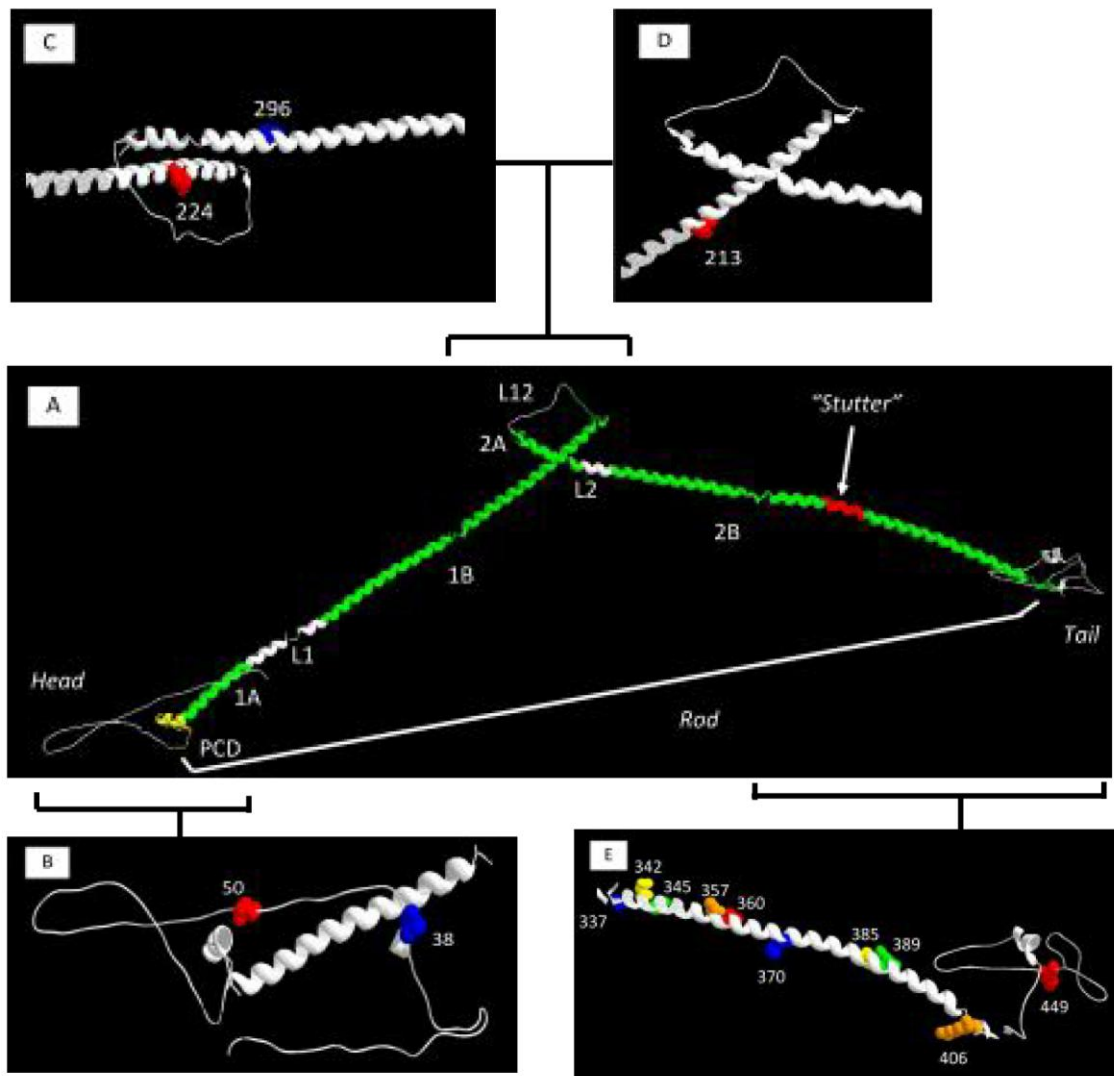
Se presentan las secuencias silvestres del bovino, porcino y humano. Se emplearon 11 de las mutaciones más frecuentes reportadas en el humano.

En el modelo obtenido de la proteína DES bovina se indican las posiciones 38 y 50 correspondientes a las secuencias *missense* 3 y 4 (figura 5-5b). Sobre este modelo se señalan también las posiciones homólogas a los aminoácidos 224 y 296 del cerdo de las secuencias 10 y 12 respectivamente (figura 5-5c) y las posiciones 213, 337, 342, 345, 357, 360, 370, 385, 389, 406 y 449 correspondientes a las 11 mutaciones *missense* reportadas para la proteína DES humana (figura 5-5d y 5-5e).

## 5.4 Discusión

El gen de la Desmina es considerado como uno de los genes candidato asociados a fenotipos como los parámetros de calidad cárnica, por lo que se puede considerar que la existencia de un bajo número de mutaciones reportadas en bases de datos (25 SNPs en bovino y cinco en porcino), sea posiblemente debida a una reducida cantidad de estudios lo que permite sugerir la necesidad de implementar análisis que contribuyan a la caracterización de su estructura y funcionamiento fisiológico.

**Figura 5-5:** Estructura terciaria de la DES bovina.



a. Se detallan los segmentos constituyentes de la proteína DES, b. c. d. y e. presentan la ubicación de los aminoácidos modificados por los polimorfismos evaluados. En la figura b, se incluyó el segmento 1-39 para mostrar la posición 38; ver anexo B.

#### 5.4.1 Variaciones en el ARNm.

Las configuraciones análogas adoptadas por la molécula de ARNm (secuencias 2, 1, 5 y 4) (figura 5-2), debida a las mutaciones T49C, A45C, T177A y A213C pueden tener un efecto a nivel de regulación en la expresión de la proteína (Andrade, 2001). Adicionalmente a las variaciones en la estructura tridimensional adoptada por esta molécula, varias de estas mutaciones modifican su valor de Energía Mínima Libre, haciéndola *in-silico* más o menos estable. Las mutaciones T49C y A45C modifican tanto la estructura conformacional como la Energía Mínima Libre, lo que hace menos estable a las moléculas de ARNm de la DES bovina.

Estudios previos utilizando estos mismos parámetros (configuración bidimensional y  $\Delta G$ ) han permitido confirmar que mutaciones sinónimas o mutaciones ubicadas en las regiones no traducidas del ARNm de genes candidato son causantes de variaciones fenotípicas en humanos (Johnson *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 1999; Duan *et al.*, 2003). Halvorsen *et al.* (2010) examinando SNPs asociados a enfermedades en el genoma humano que alteran significativamente la conformación de las regiones reguladoras UTR, definieron los “*RiboSNitches*” que inducen cambios conformacionales permanentes de la estructura del ARNm, actuando como interruptores moleculares (*molecular switch*) que apagan o encienden la expresión del gen. Este se puede contrastar con los polimorfismos T49C y A45C, los cuales están ubicados en la región 5'UTR del ARNm de la DES y por lo tanto pueden tener un efecto fenotípico en los parámetros de calidad cárnica CRA y terneza entre otras.

#### 5.4.2 Efecto de mutaciones *missense* en la proteína DES.

De las mutaciones *missense* evaluadas en las tres especies analizadas, únicamente se presentó modificación del PI en 3 de las 11 de la DES humana (N342D, K449T y R406W) (van Spaendonck *et al.*, 2011) siendo la R406W la que presenta el cuadro clínico más severo que incluso puede conducir a la muerte (Park *et al.*, 2000). El PI se modifica desde 5.21 para la DES humana silvestre hasta 5.17 en los 3 casos citados anteriormente. En el caso de la DES del bovino o la del cerdo el PI no se presentó variación alguna que permita postular a estas mutaciones como candidatas para una evaluación *in-vivo*.

Es interesante resaltar la ubicación de diez de las once mutaciones humanas con efecto fenotípico en la región comprendida entre la región 2B del *Rod* (figura 5e) y la parte terminal de la proteína, lo que podría sugerir a este segmento como importante en estudios de asociación fenotipo-genotipo en especies como el bovino y porcino, con el fin de establecer su posible efecto en parámetros de calidad cárnica dada la función de sostén, generación y transmisión de fuerza activa y pasiva desempeñada por la Desmina (Paulin y Li, 2004).

### 5.4.3 Modelo tridimensional de la DES bovina

En el modelo de estructura bidimensional de la DES bovina se predijo la existencia de una alfa hélice continua desde el aminoácido 99 al 417, sin embargo Bar *et al.* (2004) y van Spaendonck *et al.* (2011) mencionan en esta misma ubicación la existencia de una estructura de  $\alpha$ -hélice interrumpida por tres enlaces o *linkers* L1, L12 y L2, lo que permite la formación de cuatro segmentos separados en  $\alpha$ -hélice denominados como 1A, 1B, 2A y 2B (figura 5-5a).

El desarrollo de cardiomiopatías se asocia a la agregación proteica de la Desmina y en menor proporción Alfa- $\beta$ -cristalina, Distrofina y Miotilina, generando la inhabilidad de la Desmina para interactuar con otras estructuras celulares (van Spaendonck *et al.*, 2011). Lo anterior evidencia una susceptibilidad del gen DES a sufrir mutaciones principalmente en el segmento 2B (Park *et al.*, 2000; van Spaendonck *et al.*, 2011) estableciendo al exón 6 de este gen como un *Hot-spot* (Goldfarb *et al.*, 2004).

El bajo número de mutaciones reportadas en el gen del bovino y en el del cerdo indican la falta de conocimiento que aun existe de la estructura y funcionamiento de este gen, sin embargo se puede sugerir la existencia de una gran variabilidad del gen con posibles efectos fenotípicos. Difícilmente en especies domésticas como el bovino se encontrarán mutaciones con un efecto tan evidente como en el humano, dados los mecanismos de selección artificial a los que vienen siendo sometidos para la producción animal, pero sin descartar que se pueden hallar mutaciones que contribuyan a la variabilidad fenotípica (Goldfarb *et al.*, 2004) y que relacione la estructura y funcionalidad del miocito con parámetros de calidad de productos como la carne, como la CRA y la terneza. En relación con lo anterior, Goldfarb *et al.* (2004) destacan que los filamentos de Desmina que poseen un plegamiento diferente al normal, presentan una mayor resistencia al remodelamiento *in-vitro* producido por los sistemas enzimáticos responsables. Cabe destacar que uno de esos sistemas de remodelamiento *in-vivo* a nivel celular, el sistema Calpaína-Calpastatina,

es el responsable del proceso de tenderización *post-mortem* en el paso de músculo a carne, por lo que una mutación en el gen de la Desmina podría modificar este proceso, alterando su proteólisis *post-mortem*, lo que afectaría por consiguiente los parámetros de calidad de la carne como la CRA y la terneza de la carne (Zhang *et al.*, 2006; Campo *et al.*, 2000; Monsón *et al.*, 2004; Sañudo *et al.*, 2004; Monsón *et al.* 2005; Kolczak *et al.*, 2005).

## 5.5 Conclusiones

Se logró modelar toda la proteína DES del bovino y se pudo confirmar la presencia de los segmentos característicos de los filamentos intermedios del miocito de los mamíferos, reportados previamente. La Desmina es uno de los genes candidato con un posible efecto sobre parámetros de calidad cárnica en bovinos y en porcinos, sin embargo aún existe un número reducido de polimorfismos identificados en ambas especies, en comparación con los reportados para la DES humana en la que se ha podido determinar una amplia variabilidad de la región 2B del Multidominio Tipo Filamento. A través de la evaluación del polimorfismo conformacional del ARNm de la DES del bovino se logró determinar que las mutaciones T49C y A45C pueden ser reconocidas como las más importantes, ya que al incrementar el valor de Energía Mínima Libre de la molécula, se hace menos estable, teóricamente disminuyendo la tasa de traducción dada una menor cantidad de ARNm disponible para este proceso. La menor traducción se reflejaría en un menor contenido de la proteína cumpliendo su función biológica de sostén en el miocito, haciendo a la carne menos resistente en procesos de masticación luego de la cocción y alterando la relación agua-proteína y por lo tanto la pérdida de agua desde su estructura.



## **6. Análisis computacional del efecto de mutaciones puntuales en el sistema $\mu$ -Calpaína y Calpastatina en calidad de carne bovina**

### **6.1 Introducción**

Posterior a la exanginación de los animales, las células musculares son obligadas a ingresar en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (Ouali *et al.*, 2006) dando lugar posteriormente a la etapa denominada *rigor mortis* y a la fase de tenderización. En esta última, se establece la maduración PM, gracias a los procesos proteolíticos internos que inducen cambios en la microestructura de la carne del bovino (entre otros), lo que permite su ablandamiento e induce la movilización del agua que esta contiene (Straadt *et al.*, 2007) mediante la disrupción de conexiones costaméricas e inter-miofibrilares (Bee *et al.*, 2007) Entre las proteínas susceptibles a estos procesos proteolíticos internos desencadenados en las células musculares se incluyen Desmina, Actina, Miosina de cadena pesada, Miosina de cadena ligera I, Troponina T, Tropomiosina  $\alpha 1$ , Tropomiosina  $\alpha 4$ , Tioredoxina, CapZ (Lametsch *et al.*, 2004) y Talina (Bee *et al.*, 2007). La tenderización es dependiente de la arquitectura y la integridad de la célula muscular y además de la actividad de las proteasas endógenas (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005; Koohmaraie y Geesink, 2006), las cuales son muy susceptibles a factores microambientales como el pH y su descenso (Bee *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 1999; Pomponio *et al.*, 2010) y la tasa de oxidación así como también de la condición genética (establecida como el efecto racial -Monsón *et al.*, 2004; Chambaz *et al.*, 2003; Strydom *et al.*, 2000; Sañudo *et al.*, 2004; Monsón *et al.*, 2005- o el efecto de mutaciones puntuales asociadas -Pinto *et al.*, 2010; Iwanowska *et al.*, 2011; Chung y Davis, 2011; Page *et al.*, 2002; Soria *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2006; Ciobanu *et al.*, 2004) incluyendo una posible interacción entre todos estos que modulan la tasa de degradación de proteínas.

La tasa de tenderización ocurrida en el PM de la carne posee un periodo neurálgico, durante la primera semana, tiempo en el cual las enzimas encargadas de la proteólisis juegan un papel

relevante. Un reporte previo evaluado en esta etapa mostró tasas de tenderización superiores al 88% del total (Campo *et al.*, 2000). El sistema proteolítico endógeno más destacado en la evaluación de parámetros asociación a calidad cárnica, corresponde al de los genes de la  $\mu$ -Calpaína (CAPN1) y la Calpastatina (CAST), el primero es la proteína encargada de realizar la lisis enzimática de varias proteínas sustrato (Casas *et al.*, 2006) que conjuntamente con la m-Calpaína (CAPN2) poseen expresión ubicua (Hanna *et al.*, 2008) y actividad enzimática dependiente de calcio (Kapprell *et al.*, 1989) y la CAST que corresponde a su inhibidor específico, codificado desde un gen de única copia, que posee como característica estructural cuatro promotores (Motter *et al.*, 2009), permitiendo la producción de las variantes I, II, III y IV, siendo esta última específica del testículo (Raynaud *et al.*, 2005). Adicionalmente existe un tercer componente del sistema, conformado por una subunidad pequeña de la Calpaína (CAPNS) común para ambas enzimas (Hanna *et al.*, 2008), siendo la enzima Calpaína a nivel cuaternario un heterodímero (Moldoveanu *et al.*, 2008).

En los estudios de asociación a SNPs, es importante establecer un sustento biológico del efecto de este último sobre el comportamiento del gen (a nivel de regulación transcripcional), del ARNm (estabilidad, e información análoga y digital que contiene -Andrade, 2011) y de la proteína (alteraciones en parámetros físico-químicos) responsables de un efecto fenotípico concluyente, dada la posibilidad de establecer “falsos positivos” (Hoggart *et al.*, 2008) con las consecuencias que esto acarrearía si son incluidos en programas de selección animal.

El objetivo de este documento es determinar el efecto *in-silico* de mutaciones exónicas reportadas en bases de datos, en parámetros físico-químicos del ARNm y la proteína en la  $\mu$ -Calpaína y la Calpastatina bovina.

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Secuencias y SNPs empleados.**

Para Calpaína (CAPN1) se obtuvieron las secuencias del ARNm y proteína bovinas de NCBI identificadas NM\_174259.2 y NP\_776684.1 y para Calpastatina (CAST) NM\_174003.2 (ARNm) y AAA19643.1 (proteína), las cuales en este artículo son denominadas como los alelos silvestres y

Tabla 6-1: SNPs empleados y cambios producidos en ARNm y proteína.

Secuencia No	Número de acceso	ARNm			Proteína		
		Posición	Silvestre	Cambio	Posición	Silvestre	Cambio
CN1	<a href="#">ss269202866</a>	543	T	G	156	F	V
CN2	<a href="#">ss28452420</a>	656	A	G	193	K	K
CN3	<a href="#">ss28451369</a>	665	C	T	196	A	A
CN4	<a href="#">ss86317594</a>	707	A	G	210	T	T
CN5	<a href="#">ss28452434</a>	734	C	T	219	G	G
CN6	<a href="#">ss28450971</a>	917	A	G	280	K	K
CN7	<a href="#">ss28452341</a>	1024	G	C	316	G	A
CN8	<a href="#">ss77832255</a>	1088	A	C	337	S	S
CN9	<a href="#">ss269202884</a>	1190	T	C	371	Y	Y
CN10	<a href="#">ss28451391</a>	1661	C	T	528	D	D
CN11	<a href="#">ss28451392</a>	1665	G	A	530	V	I
CN12	<a href="#">ss269202966</a>	2225	G	A	716	A	A
CS1	<a href="#">ss140795116</a>	271	G	A	48	D	G
CS2	<a href="#">ss265255855</a>	283	C	T	52	L	P
CS3	<a href="#">ss117962530</a>	596	T	C	156	S	S
CS4	<a href="#">ss423036926</a>	672	A	G	182	T	A
CS5	<a href="#">ss77832279</a>	872	C	T	248	T	T
CS6	<a href="#">ss77832274</a>	878	G	A	250	P	P
CS7	<a href="#">ss140795256</a>	1448	C	T	440	I	I
CS8	<a href="#">ss115456737</a>	1529	A	G	467	P	P
CS9	<a href="#">ss115456738</a>	1544	G	A	472	V	V
CS10	<a href="#">ss115456739</a>	1574	T	C	482	S	S
CS11	<a href="#">ss115456740</a>	1615	C	T	496	V	A
CS12	<a href="#">ss115456748</a>	1643	C	T	505	E	E
CS13	<a href="#">ss115456750</a>	1721	G	A	531	E	E
CS14	<a href="#">ss115456769</a>	2074	G	C	649	S	T
CS15	<a href="#">ss46527044</a>	2870	A	G	NA	NA	NA
CS16	<a href="#">ss77831764</a>	2959	A	G	NA	NA	NA
CS17	<a href="#">ss430490950</a>	2987	T	C	NA	NA	NA
CS18	<a href="#">ss77832273</a>	3016	A	T	NA	NA	NA
CS19	<a href="#">ss430490951</a>	3138	G	A	NA	NA	NA
CS20	<a href="#">ss140795309</a>	3148	C	T	NA	NA	NA
CS21	<a href="#">ss140795310</a>	3160	C	G	NA	NA	NA
CS22	<a href="#">ss430490954</a>	3254	C	A	NA	NA	NA
CS23	<a href="#">ss430490955</a>	3272	G	A	NA	NA	NA
CS24	<a href="#">ss265256266</a>	3320	G	C	NA	NA	NA
CS25	<a href="#">ss423036988</a>	3350	C	T	NA	NA	NA
CS26	<a href="#">ss430490956</a>	3351	G	T	NA	NA	NA
CS27	<a href="#">ss423036989</a>	3697	C	A	NA	NA	NA
CS28	<a href="#">ss423036990</a>	3698	G	A	NA	NA	NA
CS29	<a href="#">ss77831765</a>	4333	G	A	NA	NA	NA

CN polimorfismos evaluados del gen CAPN1; CS polimorfismos evaluados del gen CAST. Se presentan la decodificación de cada una de los polimorfismos empleados en el análisis. NA, no aplica.

corresponden a la variante II de CAST que es la más abundante en el músculo esquelético bovino (Raynaud *et al.*, 2005). Las mutaciones puntuales de los exones que fueron usadas se listan en la tabla 6-1 y se ubicaron manualmente.

### 6.2.2 Modelamiento del ARNm.

El mismo procedimiento fue realizado para cada una de las mutaciones evaluadas en ambos genes. (Ver numeral 3.2.2.)

### 6.2.3 Modelamiento proteico.

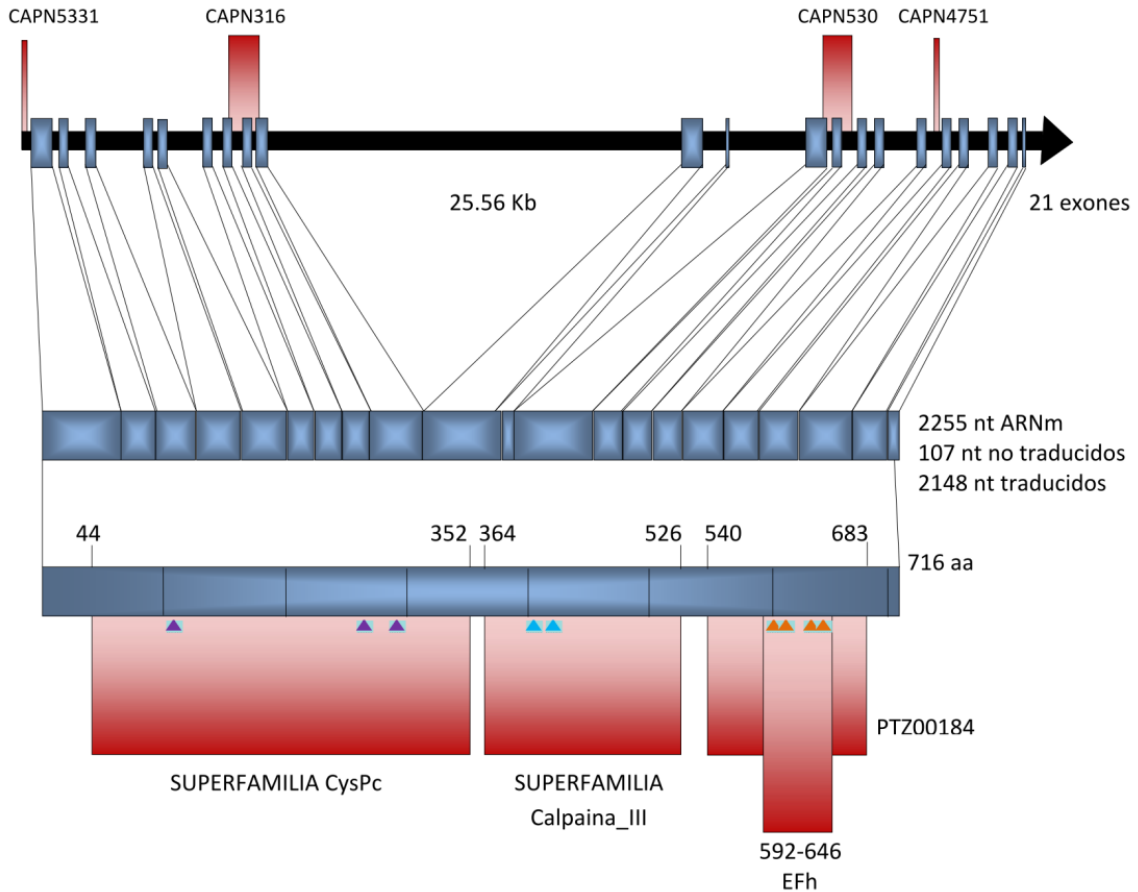
Se detectaron los dominios constituyentes de la proteína (ver numeral 3.2.3.). El modelamiento por homología fue empleado para la determinación de la estructura terciaria de CAPN1 y cuaternaria (CAPN1-CAPNS-Ca<sup>2+</sup>) empleando el mismo procedimiento descrito en el numeral 3.2.3.; para el modelamiento de la proteína CAST se empleó el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010) y se efectuó la minimización energética de cada proteína mediante Gromos96. Adicionalmente se realizó modelamiento del complejo CAPN1-CAPNS-Ca<sup>2+</sup>-CAST con el servidor SwissModel (Arnold *et al.*, 2006; Xiang, 2006). Para la determinación de los parámetros físico-químicos de estas moléculas se empleó el mismo procedimiento descrito en 3.2.3.

## 6.3 Resultados

En la figura 6-1 y 6-2 se presenta la estructura de los genes CAPN1 y CAST bovino. De las mutaciones reportadas en NCBI, se emplearon 12 polimorfismos en el gen CAPN1 y 29 para el caso del gen CAST. Del gen CAPN1 solo 3 polimorfismos modifican un aminoácido en la secuencia y del gen CAST solamente 5 SNPs (tabla 6-1).

### 6.3.1 SNPs y estabilidad del ARNm

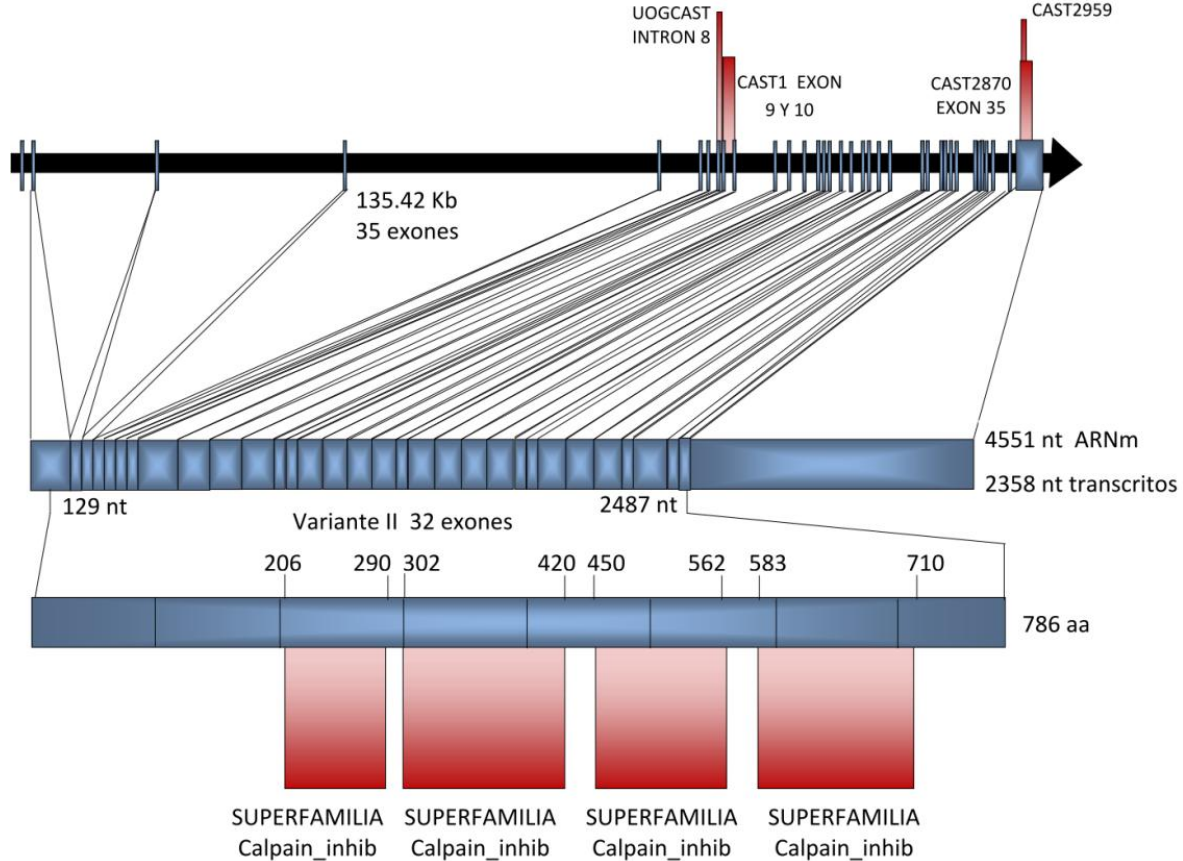
En el caso del gen de la Calpaína el valor de Energía Mínima Libre de la secuencia silvestre obtuvo un valor de -1154.77 kcal/mol. Las secuencias que presentaron un incremento en su estabilidad fueron CN2, CN5, CN12 y CN11 con valores de -1159.73, -1159.17, -1158.59 y -1157.45 kcal/mol, respectivamente. Cabe destacar que en la secuencia CN6 la presencia del SNP desestabiliza la molécula, ya que se incrementó su valor de  $\Delta G$  a -1150.82 kcal/mol.

**Figura 6-1:** Estructura del gen CAPN1 bovino.

Se presentan adicionalmente los dominios predichos en la proteína lineal y en triángulos, los aminoácidos constituyentes de los sitios activos de la molécula, en morado: el sitio catalítico; en azul: formación de un *loop* ácido involucrado en la activación de la molécula durante su unión al Ca<sup>2+</sup>; en naranja: sitio de unión al Ca<sup>2+</sup>. Se ilustran las regiones amplificadas por cada uno de los juegos de cebadores, empleados en el estudio de asociación fenotipo-genotipo. Según Casas *et al.* (2005), el marcador CAPN5331 amplifica en intrón 1, existiendo un exón inicial, no incluido en ENSEMBL.

En el caso del gen CAST la secuencia silvestre obtuvo un valor de -1084.57 kcal/mol y se encontró un incremento en la estabilidad de la molécula para las secuencias CS5 (-1097.57), CS17 (-1091.6) y CS29 (-1090.7). Se encontró una pérdida en estabilidad *in-silico* de las secuencias CS28 (-1079.12) y CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26, las cuales comparten el mismo valor de  $\Delta G$  -1079.42 kcal/mol. En la figura 6-3 se presentan las secuencias silvestres de ambos genes y aquellas que diferencialmente presentaron un plegamiento bidimensional importante.

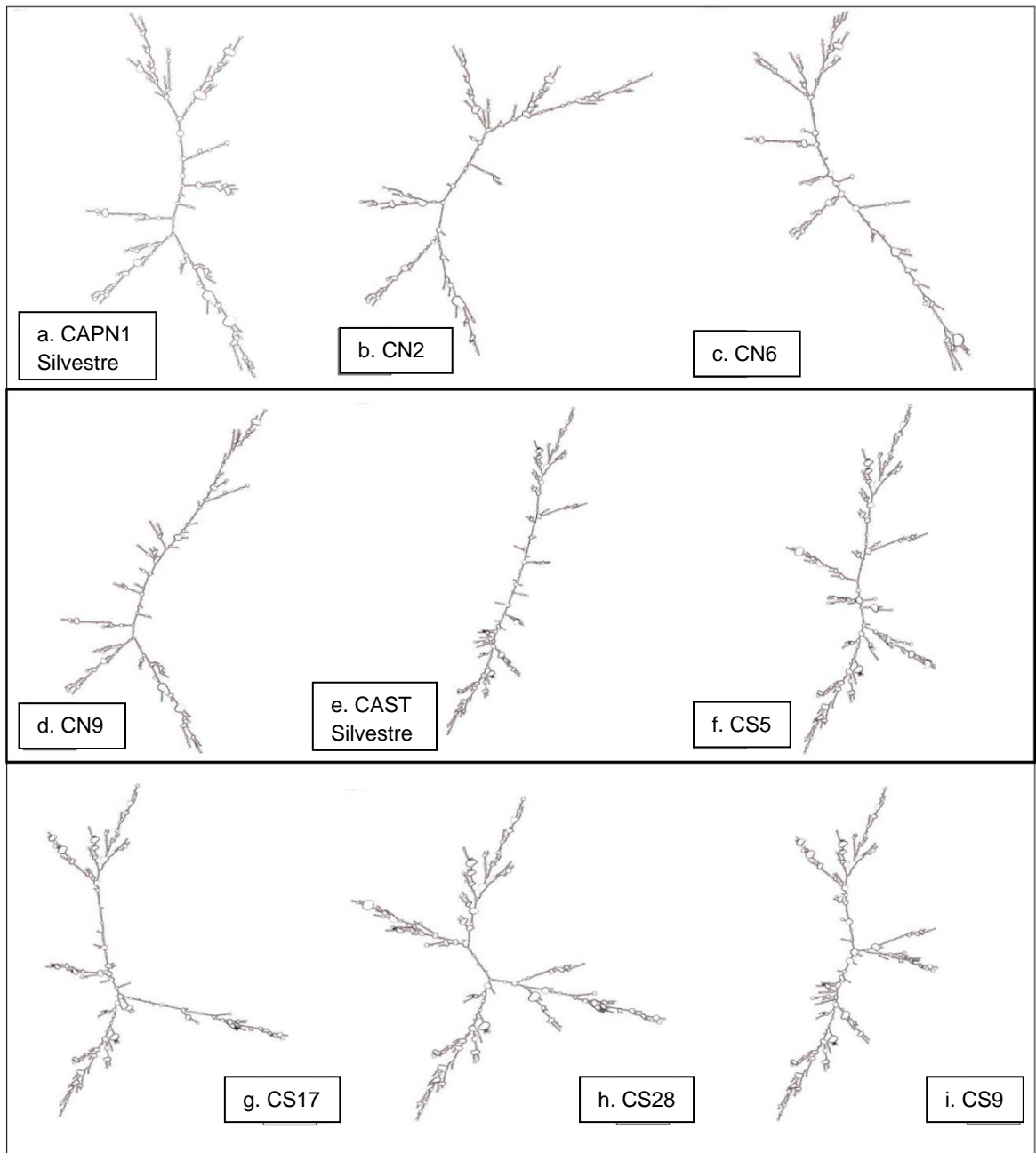
**Figura 6-2:** Organización del gen de la Calpastatina bovina.



Se presentan los dominios predichos en la proteína lineal producto de la variante II de la CAST bovina y las regiones amplificadas por cada uno de los juegos de cebadores, empleados en el estudio de asociación fenotipo-genotipo.

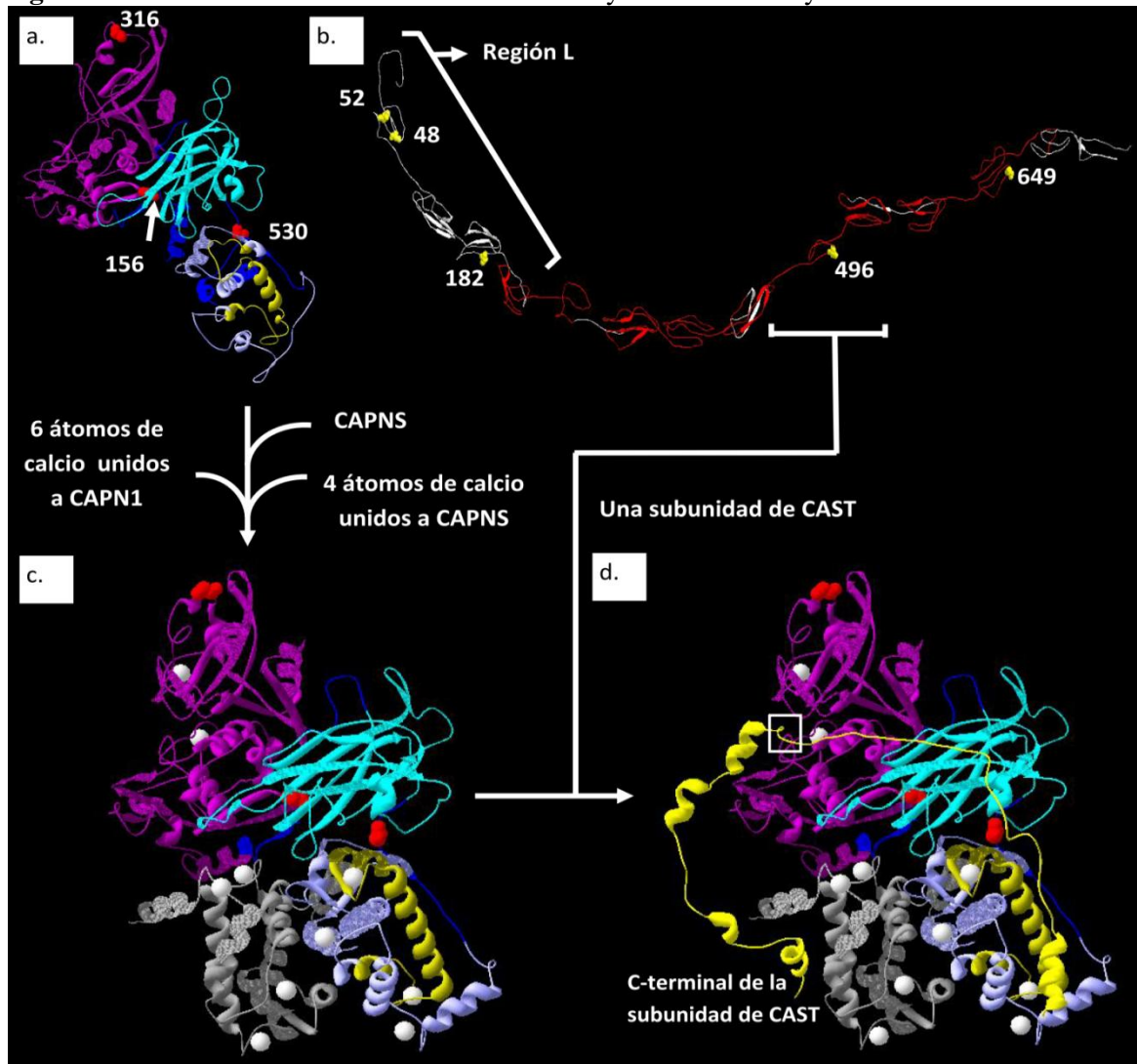
### 6.3.2 Efecto sobre las proteínas CAPN1 y CAST

En la figura 6-1 y 6-2 se presenta la ubicación lineal de los dominios establecidos en ambos genes y en la figura 6-4 su ubicación tridimensional en CAPN1 (Swiss Model empleó el template 1qxpB, con una identidad del 75.81% y una cobertura entre los residuos 13 al 715) y CAST. En esta última imagen se representa el proceso de activación de la proteína terciaria CAPN1 bovina mediante su unión a la proteína CAPNS y un total de 10 átomos de Calcio, la cual posteriormente presenta inactivación mediante su unión a uno de los cuatro dominios de CAST. Para realizar este modelo (figura 6-4d), se empleó el template 3bow de PDB modelando el complejo de la enzima Calpaína activa (con la respectiva proteína CAPN1 bovina) unida al segmento D502-T591 (tercer dominio y ocho residuos del cuarto) de la proteína CAST bovina.

**Figura 6-3:** Polimorfismo conformacional del ARNm en CAPN1 y CAST.

a. silvestre de CAPN1, b. CN2 (más estable), c. CN6 (menos estable), d. CN9 con una estructura alterna, e. silvestre CAST, f. CS5 y g. CS17, incrementan su estabilidad, h. CS28 e i. CS9 como las más inestables. CS9 adquirió el mismo valor de  $\Delta G$  que CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26.

**Figura 6-4:** Estructura tridimensional de la CAPN1 y CAST bovinas y mutaciones usadas



Se presenta la ubicación tridimensional de los motivos predichos. a. en morado: SUPERFAMILIA CysPc; en azul claro SUPERFAMILIA Calpaína\_III; lila: PTZ00184; dorado: EFh. b. ubicación de las cuatro SUPERFAMILIAS Calpain\_inhib de la CAST bovina. c. proceso de activación de la CAPN1 mediante su unión a la CAPNS y un total de 10 átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  (esferas blancas). d. proceso de inactivación de la CAPN1-CAPNS- $\text{Ca}^{2+}$ , mediante su unión a uno de los cuatro dominios de CAST (cinta amarilla). En un recuadro blanco se presenta un loop de CAST involucrado en la inactivación del sitio catalítico de la Calpaína; ver anexo B.

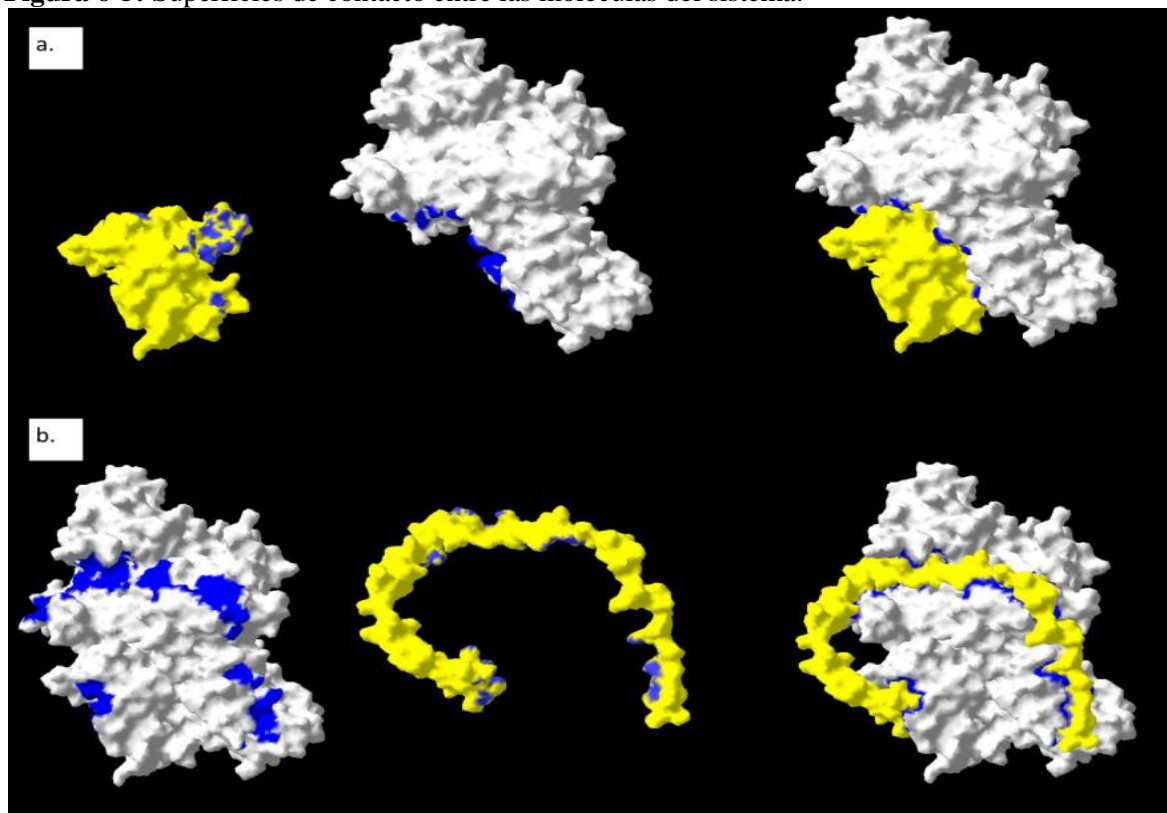
En la figura 6-5 se muestran las superficies de contacto entre las tres proteínas y en la figura 6-6 se detallan los sitios activos de los tres dominios de CAPN1, detectados por CD-Search y su distribución electroestática (figura 6-6b), siendo uno de los parámetros evaluados que no fue afectado por alguna de las 3 mutaciones *missense* evaluadas en esta proteína. En el caso de la CAST se presentó una alteración en la superficie de la proteína para los SNPs CS4, CS11 y CS14 (figura 6-7). En la tabla 6-2 se presenta el parámetro PI en las secuencias silvestres y sus

mutaciones, estableciendo que el único SNP que logra modificar este parámetro en los genes del sistema  $\mu$ -Calpaína Calpastatina fue el SNP CS1, pasando de 5.42 a 5.45.

## 6.4 Discusión

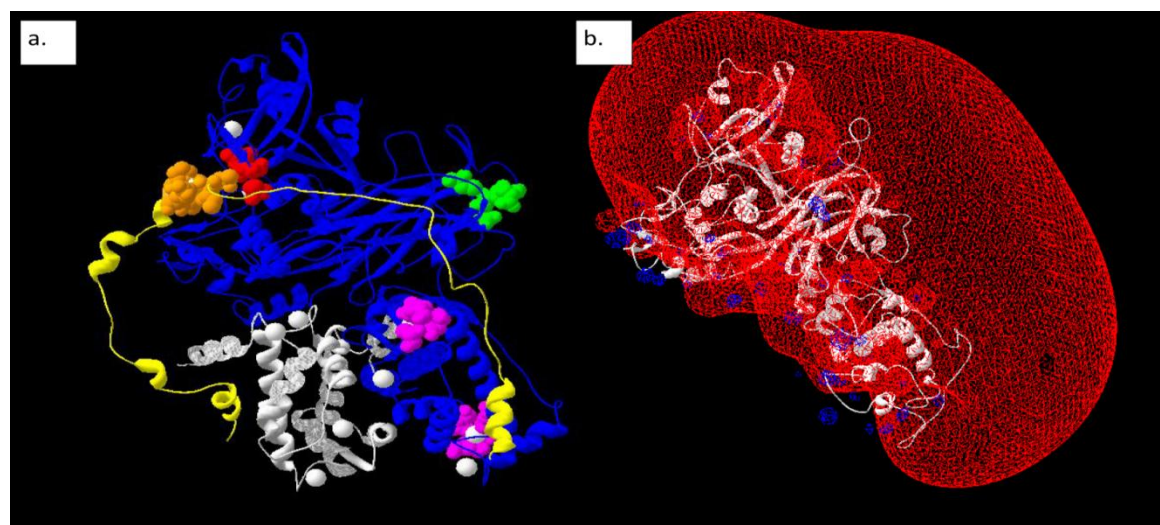
Varios marcadores de los genes  $\mu$ -Calpaína y Calpastatina, han sido asociados a terneza, este es el caso de marcadores ubicados en regiones intrónicas como CAPN4751, CAPN4753, UOGCAST1 (Pinto *et al.*, 2010; White *et al.*, 2005; Curi *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2006) y exónicas como CAPN316 y CAPN530 (CN7 y CN11 en este documento) (Pinto *et al.*, 2010). Para el caso del polimorfismo CAPN4751, Pinto *et al.* (2010) reportan una disminución en el valor de *Slice Shear Force* en 0.30, 0.27 y 0.34 kg para los días 7, 14 y 21 de maduración comparando los genotipos CC-TT, algo similar a lo reportado por Papaleo *et al.* (2010). Este mismo grupo de investigadores reportan una reducción en 0.17, 0.21 y 0.25 kg comparando los genotipos CC-GG en el marcador UOGCAST1 para los días 7, 14 y 21 de maduración en LD de animales Nelore.

**Figura 6-5:** Superficies de contacto entre las moléculas del sistema.



Superficie de contacto (azul) a. entre CAPN1 (gris) y CAPNS (amarillo) y b. entre CAPN1-CAPNs (gris) y un dominio de CAST (amarillo).

**Figura 6-6:** Sitios activos de CAPN1-CAPNS-Ca<sup>2+</sup> y potencial electrostático de CAPN1.



a. En CAPN1, en rojo: el sitio catalítico; en verde: formación de un *loop* ácido involucrado en la activación de la molécula durante su unión al Ca<sup>2+</sup>; en morado: sitio de unión al Ca<sup>2+</sup> y en CAST se detalla en naranja el segmento TIPPEYR reportado por Hanna *et al.* (2008) y Moldoveanu *et al.* (2008). b. potencial electrostático del CAPN1.

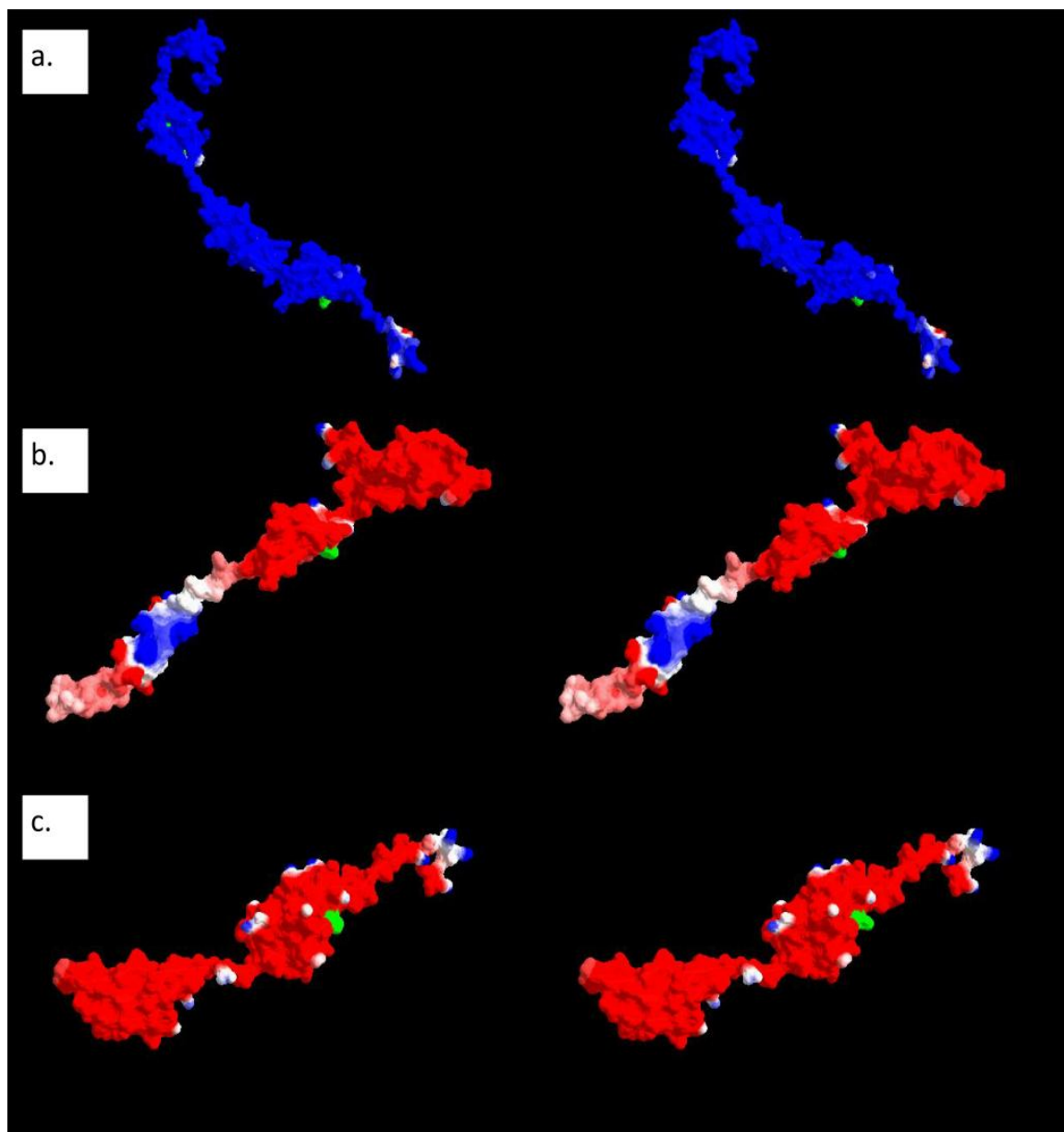
**Tabla 6-2:** Parámetros de la proteína alterados por los SNPs evaluados.

Secuencia	Parámetro	
	Peso molecular	Punto isoelectrico
CAPN1 Silvestre	82207,3	5,42
CN1	82159,3	5,42
CN6	82221,3	5,42
CN9	82221,3	5,42
CAST Silvestre	84220,4	5,42
CS1	84162,4	5,45
CS2	84204,4	5,42
CS4	84190,4	5,42
CS13	84192,4	5,42
CS16	84234,5	5,42

Aunque existe una amplia discusión de cuál de las dos enzimas de la CAPN (Boehm *et al.*, 1998; Pomponio *et al.*, 2008) está realmente involucrada en el proceso de tenderización dada su actividad PM (Kristensen *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2011) o si la intervención de otros sistemas proteolíticos es primordial (Bergh *et al.*, 2008), grandes hallazgos como el establecido en el reporte de Geesink *et al.* (2006) empleando ratones *knock-out* para CAPN1, indicaron que la degradación de proteínas sustrato como Nebulina, Metavinculina, Vinculina, Desmina y Troponina T fue inhibida hasta el día 3 PM, aunque si existió autólisis de la m-Calpaína, confirmando que la  $\mu$ -Calpaína es la enzima encargada de realizar este proceso y no otro sistema proteolítico. Adicionalmente Koohmaraie y Geesink (2006) establecen la inexistencia de autólisis de la m-Calpaína en el bovino como una de las razones para no incluirla como importante en procesos de tenderización. Algo similar ocurre

con la CAPN3 (o p94), que aunque Geesin *et al.* (2005) establecieron mediante el uso de ratones *knock-out* que no estaba involucrada en la proteólisis PM, ha sido empleada en estudios de asociación con parámetros productivos, de calidad de la carcasa y calidad cárnica (Café *et al.*, 2010 a y b).

**Figura 6-7:** Alteraciones producto de mutaciones puntuales en la CAST bovina.



Se comparan las superficies moleculares del alelo silvestre y su correspondiente mutación; a. 182A, b. 496A, c. 649T de la CAST bovina en un segmento contenedor de la proteína. El aminoácido sustituido se presenta en verde. El color rojo representa aminoácidos con potencial electrostático negativo y en azul aquellos de potencial positivo.

#### 6.4.1 ARNm y las mutaciones puntuales

Los motivos producidos en las secuencias de ARNm involucrados en regulación post-transcripcional génica, tales como las secuencias Shine-Dalgarno (con un homólogo en eucariotas, denominado secuencias Kozak) o las señales de poliadenilación, fueron caracterizadas hace varios años, pero solo recientemente se ha esclarecido que las secuencias motivo deben ser expuestas para interactuar con estructuras adyacentes específicas (como lo establecen Shen *et al.*, 1999 en su reporte) y que las estructuras secundarias y terciarias adoptadas por esta molécula (definido por Andrade, 2011 como la información análoga del ARNm) son más críticas para la función regulatoria *per se*, mediante su interacción con factores proteicos o con otros ARNs (Klaff *et al.*, 1996), mediando procesos de síntesis, maduración, transporte, traducción o degradación (Shen *et al.*, 1999). En el estudio de Johnson *et al.* (2011) empleando un total de 153.397 SNPs en regiones exónicas del humano determinaron que 65.9% de ellos, modificaron el valor de  $\Delta G$  y el 93.6% lograron alterar las estructuras bidimensionales nativas, produciendo el denominado polimorfismo conformacional del ARNm, siendo una fuente de variación fenotípica importante, al afectar la estabilidad de la molécula, producir ARNm alternativos, modificar el procesamiento proteico o la eficiencia transcripcional (Mansoori *et al.*, 2012). El trabajo de Duan *et al.* (2003) fue concluyente, cuando empleando polimorfismos de regiones exónicas del gen del receptor D2 de la Dopamina humana, establecieron el por qué mutaciones sinónimas (Parmley y Hurst, 2007) o mutaciones en las regiones UTR (Halvorsen *et al.*, 2010) pueden estar asociadas a un efecto fenotípico tan complejo como es el caso de muchas enfermedades humanas, como la hipertensión.

Adicionalmente, en el estudio de Allais *et al.* (2011) emplearon dos polimorfismos establecidos en la región 3'UTR de CAST que según la ubicación de los cebadores reportados, corresponden a los denominados CS16 y CS29 en este trabajo (CAST-2 y CAST-3 en Allais *et al.*, 2011 respectivamente) estableciendo que el alelo G de CS16 está asociado a carnes más duras (WBSF y panel sensorial en Charolais y en Blonde d'Aquitaine solo para panel sensorial), coincidiendo con el reporte de Casas *et al.* (2006). Lo anterior puede ser causado por un incremento en la estabilidad de la molécula de ARNm de CAST, conferido por el alelo G (con -1088.08 kcal/mol y para el alelo A un valor de -1084.57 kcal/mol), lo que teóricamente puede conferirle a la molécula de ARNm mayor estabilidad, permitiendo una mayor expresión de la proteína CAST y por lo tanto una mayor tasa de inhibición de la CAPN1, dando como resultado carnes más duras. El alelo A de CS29 en el trabajo de Allais *et al.* (2011) se encontró asociado con un incremento en la terneza medida por WBSF, únicamente en la raza Charolais, pero no es aplicable la teoría anterior,

dado que el alelo A le confiere un mayor valor de  $\Delta G$  y no modifica considerablemente la estructura bidimensional del ARNm. Se pudo establecer el polimorfismo A2959G (CS16) como el más consistente de los dos mencionados dada su asociación reportada previamente con carnes más duras y la mayor estabilidad de la molécula de ARNm, confirmada en el presente trabajo.

De ser correcta esta teoría, los SNPs que producen polimorfismos conformacionales en el ARNm, CN2, CN5, CN12 y CN11 (más estables de CAPN1) en conjunto con CS28, CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26 (menos estables de CAST) conducirían a carnes más blandas, al existir una mayor actividad de la primera molécula y una tasa de inhibición menor.

#### 6.4.2 Estructuras tridimensionales de CAPN1 y CAST bovinas

La CAPN1 bovina como se presenta en la figura 6-4 posee una disposición de dominios diferentes al heterodímero activo mediado por su unión a la proteína CAPNS y varios cationes de calcio que permiten la constitución de una molécula más compacta. Hanna *et al.* (2008) resaltan a los aminoácidos Cys105, His262 y Asn286 en la secuencia del humano como la triada de la catálisis, correspondientes en la estructura del bovino a los aminoácidos Cys115 His272 Asn296 (figura 6-6a), sitio ocupado por la CAST en su proceso inhibitorio (figuras 6-4b y 6-5a). En cuanto a la proteína CAST al no compartir homología con alguna proteína conocida hasta ahora (Todd *et al.*, 2003) no es posible su modelamiento por homología y posee como característica no ser estructurada tridimensionalmente (figura 6-3), pero con la capacidad de adquirir orden al unirse a la Calpaína, sin embargo no es claro cómo logra inhibir a la Calpaína sin sufrir autólisis (Hanna *et al.*, 2008). Hanna *et al.* (2007) determinaron que una proteína CAST logra interactuar con cuatro moléculas de Calpaína, coincidiendo con la predicción de cuatro dominios en la secuencia del bovino (figuras 6-2 y 6-4b), pero plantea la posibilidad de que cada dominio de CAST tenga una afinidad específica por la Calpaína dependiendo del tejido en el que se encuentre.

Como lo reportan Hanna *et al.* (2008), la CAST logra inhibir a la Calpaína ocupando el sitio activo de clivaje mediante un *loop* que ocupa la hendidura o sitio activo, ya que los dominios inhibidores de la CAST reconocen múltiples sitios de baja afinidad presentes en la forma asociada al calcio de la Calpaína, resultando en una interacción fuerte, específica y dependiente de este catión, donde dos regiones del segmento de CAST se involucran en el acople con una molécula de CAPN1-CAPNS-Ca<sup>2+</sup> interactuando con los dominios contenedores de las cinco manos-EF (cuatro involucradas en la fijación del Ca<sup>2+</sup> y una relacionada con la formación del heterodímero de

CAPN1 con CAPNS -Todd *et al.*, 2003) y una tercera región que interactúa con el sitio de clivaje (Moldoveanu *et al.*, 2008). Todd *et al.*, (2003) mencionan la posibilidad de una sexta mano-EF, existente, próxima a la región de la triada de la catálisis (figura 6-4c).

Hanna *et al.* (2008) y Moldoveanu *et al.* (2008) establecen siete residuos altamente conservados en el humano como cruciales para el contacto entre CAST y el sitio activo de CAPN1, la secuencia TIPPEYR. En la proteína del bovino se lograron establecer regiones homólogas en tres de los cuatro dominios predichos, conformadas así: T270LPPKYK276, T547IPPDYR553 (única representada en la figura 6-6a) y T685IPPKYQ691.

### **6.4.3 Polimorfismos y su efecto sobre estas moléculas**

En relación con el polimorfismo CAPN316 (CN7), Pinto *et al.* (2010) reportan una reducción de 0.71, 1.1 y 0.69 kg fuerza cuando compararon los genotipos CG-GG a 7, 14 y 21 días de maduración, lo que coincide con lo establecido por Costello *et al.* (2007), Papaleo *et al.* (2010) y Allais *et al.* (2011), sin embargo difiere de lo encontrado por Page *et al.*, (2002) quienes no lo reportan como asociado. Allais *et al.*, (2011) encontraron que el alelo G está asociado a un incremento en la dureza de la carne (medida por WBSF y panel sensorial para Charolais y solo en WBSF para Limousin). En el presente análisis el alelo G no modifica ninguno de los parámetros analizados ni del ARNm ni de la proteína. Una de las mayores problemáticas que posee el marcador CN7 es el uso en estudio de asociación con frecuencias alélicas muy bajas (0.08 para el alelo C de CAPN316 en Pinto *et al.* -2010- y de 0.009 en Curi *et al.* -2010- en animales Nelore). El hecho de que este polimorfismo presente una frecuencia alélica tan baja en animales *Bos indicus* revela la dificultad de emplearlo como un marcador en programas de asociación (Curi *et al.*, 2010).

En el caso del marcador CAPN530 (CN11), Allais *et al.* (2011), no encontraron asociación con los parámetros fenotípicos evaluados, pero Page *et al.*, (2002) reportan al alelo I (con una frecuencia del 30%) como asociado a un incremento en la dureza de la carne a los 14 días PM. Sin embargo, ninguno de los dos polimorfismos logró modificar los parámetros evaluados en el presente trabajo, ni se ubican en proximidad al sitio de unión con CAPNS o CAST. Para el caso de CAST, muy pocos reportes involucran mutaciones *missense*, pero Barendse *et al.* (2007) empleando un gráfico de hidrofobicidad establecen al polimorfismo CS2 modifica de modo importante la hidrofobicidad, por lo que sería uno de los candidatos postulados, en conjunto con CS11 y CS14, ya que altera la estructura superficial de dos de los dominios inhibidores de la CAST bovina, partiendo del hecho

que la inhibición que media es producida netamente por superficies de contacto. Adicionalmente, la mutación CS1 es la única que logra modificar el valor de PI de la proteína, siendo el valor de pH en el microambiente celular de la carne de extrema importancia dado que puede dictaminar la actividad inhibitoria de la CAST. Adicionalmente, es importante resaltar el reporte de relaciones epistáticas entre algunos marcadores de los genes CAPN1 y CAST, los fenotipos asociados a haplotipos (Allais *et al.*, 2011; Barendse *et al.*, 2007), los polimorfismos en CAPNS posiblemente modificadores de la actividad enzimática (Iwanowska *et al.*, 2011), la existencia de tres variantes según su 5'UTR en CAST con la posibilidad de ser expresada en el músculo bovino y adicionalmente tres diferentes terminaciones 3'UTR para la variante III (Raynaud *et al.*, 2005), dejando al descubierto mecanismos de control de la expresión específicos en este gen y la posible dependencia según el tejido y especie evaluada (Parr *et al.*, 2004), la dependencia del  $Ca^{2+}$  para ser activo, y el dinámico ambiente intracelular (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005), entre otros agentes, lo que complica aún más el establecimiento de cambios en los procesos biológicos en los que intervienen los genes de este sistema proteolítico en la alteración de la calidad de la carne de bovino. El análisis *in-silico* de este tipo de mutaciones puede ser una herramienta útil para postular SNPs potencialmente asociados al fenotipo en producción animal, siendo necesario enfocar esfuerzos en el desarrollo de métodos de alto rendimiento para validar experimentalmente modelos, comprender las estructuras biológicamente relevantes y los mecanismos funcionales que alteran, además de emplear su asociación en poblaciones (Johnson *et al.*, 2011).

## 6.5 Conclusiones

Mediante el análisis *in-silico* de las diferentes secuencias de  $\mu$ -Calpaína y Calpastatina evaluadas se logró postular que los polimorfismos CN2, CN5, CN12 y CN11 (más estables de CAPN1), y CS28, CS9, CS12, CS13, CS22, CS23 y CS26 (menos estables de CAST) modifican la estabilidad o estructura del ARNm, lo que podría conducir a carnes más blandas, al existir una mayor actividad de la primera molécula y una tasa de inhibición menor. Los polimorfismos CS11 y CS14 modifican la estructura superficial de la proteína mientras que el polimorfismo CS1 es el único que modifica el parámetro PI. Cabe destacar, que el polimorfismo A2959G de la CAST (CS16) es el único al que se le pudo determinar un posible sustento biológico, que concuerda con la asociación reportada previamente en la literatura con el fenotipo de carnes más duras, ya que al modificar el valor de Energía Mínima Libre del ARNm, suministra teóricamente una mayor estabilidad de la molécula de ARNm y por lo tanto una mayor cantidad de esta molécula, disponible para el proceso

de traducción. La mayor cantidad de la proteína CAST en el miocito tendrá como consecuencia una mayor tasa de inhibición de la enzima CANP1, dando como resultado carnes más duras.

Es posible que la inexistencia de un soporte *in-silico* para el caso de CAPN316 y 530, sea solo el resultado del número limitado de parámetros evaluados en el presente documento, por lo que es necesario continuar analizando otro tipo de alteraciones de parámetros físico-químicos del ARNm y la proteína producidas por estas mutaciones. Adicionalmente, es importante indicar que estas postulaciones obedecen a resultados computacionales que deben ser comprobados *in-vitro* y obligatoriamente *in-vivo*.

## **7. Polimorfismos de los genes CAPN1, CAST, DES, PRKAG3 y RYR1 asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en crudo y cocinado en carne de bovino**

### **7.1 Introducción**

A pesar de la influencia poligénica sobre parámetros asociados al contenido de grasa y agua en el músculo esquelético, en producción animal se han podido identificar mutaciones en genes mayores que afectan ampliamente estas características (Enfält *et al.*, 2006) así como a parámetros de calidad del producto final, la carne (Škrlep *et al.*, 2010; Lindahl *et al.*, 2004; Lahucky *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 2007). En el caso de los alelos *rn+*, *rn\** y *RN-* del gen PRKAG3 del porcino, son considerados como marcadores que han contribuido a definir los criterios de selección en razas de esta especie doméstica. Es claro que los parámetros asociados a la CRA de la carne no escapan al control genético y al efecto de los polimorfismos identificados en genes mayores asociados (Lindahl *et al.* 2004). La característica de calidad cárnica, CRA se considera de elevada importancia productiva dado que influye de modo importante en la pérdida de peso de la carne durante el almacenamiento y/o la cocción. Lo anterior ha sido demostrado en algunos trabajos como el de Palka y Daun (1999) quienes reportaron una pérdida de 27,8% del peso inicial de la pieza cárnica procedente del músculo ST de bovino, al someterla a cocción a 70°C, lo que influye de modo importante en la percepción de la calidad por parte del consumidor final. El primer parámetro a tener en cuenta es la CRAR, la cual evoluciona de acuerdo al desarrollo de una relación agua-proteína más homogénea y estable durante la maduración de la carne en el PM, parámetro que es favorecido por el incremento de la degradación de proteínas de la estructura como la Desmina y la Talina (Straadt *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Bee *et al.*, 2007) del miocito, lo que conduce a una interacción más estable con

el agua y como consecuencia se disminuyen las pérdidas de líquido de la carne, favorecida por la lisis de proteínas como la Desmina y la Talina (Zhang *et al.*, 2006; Bee *et al.*, 2007).

El segundo parámetro se denomina CRAc (Capacidad de retención de agua en carne cocinada), que se presenta por la expulsión del agua propia de la carne (sumado a la fusión de grasas y pérdida de proteínas solubles, Barbanti y Pasquini -2005) como resultado de la contracción de las miofibrillas (Yarmand y Homayouni, 2010; Barbera y Tassone, 2006). Lo anterior puede ser la respuesta a la denaturación proteica generada por la temperatura y a la exposición de regiones hidrofóbicas de la estructura miofibrilar, las cuales permiten nuevas interacciones intra- e inter-moléculas que resultan en una estructura proteica más densa (Straadt *et al.*, 2007). Esta característica posee influencia de varios factores externos que dependen del procedimiento de cocción, tales como la temperatura (Chiavaro *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2000) y el tiempo de cocinado, siendo posiblemente esta última la más influyente (Barbanti y Pasquini. 2005).

El objetivo de este estudio fue determinar la existencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes CANP1, CAST, PRKAG3 y RYR1, evaluar la asociación de estas mutaciones con los parámetros Capacidad de Retención de Agua en carne cruda (CRAr) y cocinada (CRAc) y establecer si existe interacción entre estos genotipos y el grupo racial de los animales o el tiempo de maduración al que es sometida la carne de 164 machos castrados durante el periodo *post-mortem*.

## **7.2 Materiales y métodos**

### **7.2.1 Población analizada**

Ver numeral 2.2.1. Los 164 animales fueron agrupados según el grupo racial al que pertenecen, de la siguiente manera: *Bos indicus*-*Bos taurus*: 93 (Limousin-BB, Normando-BB, Braunvieh-BB, Simental-BB, BON-BB y Romosinuano-BB) y *Bos indicus*-*Bos taurus*: 71 (Guzerat-BB, BR-BB y BB puro).

### **7.2.2 Determinación del parámetro CRAr**

Ver numeral 2.2.2.

**Tabla 7-1:** Juegos de cebadores empleados.

Marcador	Cebador forward	Cebador reverso (5' a 3')	Región	Tamaño	Temp
CAPN 316	gggccagatggtgaacctga	ttgcggaacctctggctctt	E8 - E10	736 pb	60.0
CAPN 530	gagcccaacaaggaaggt	aatacagcccaatgatgagg	E13 - I14	568 pb	57.3
CAPN 4751	aagggacagatgtggacagg	gaggggtgttctctgagtc	I17	550 pb	60.0
CAPN 5331	gggccgaggagataacctgaa	gctccccgggtggcaactg	E1 - I1	215 pb	61.0
CAST 1	agcagccaccatcagagaaa	tcagctggttcggcagat	E9 - E10	1552 pb	60.0
CAST 2959	aatatatgcgcttctgctgtccag	aatatatctccccacagtgcctgtaa	E32	269 pb	60.0
CAST 2870	aatttttaaaattgccttcagttgggag	aagaacatcaaacacagtcacaa	E32	400 pb	60.0
UoGCAST	agtaaagccaaaggaacacac	aggctttttgctgaaacaa	E8 - E9	432 pb	53.0
PRKAG3-A	gcaccttatgggacagcaagaagc	cagccctttgcagagaccctt	E6 - I8	502 pb	56.9
PRKAG3-C	aaggagacagcacttcattg	tctctccaccaggccgagctc	E3 - E4	712 pb	62.4
PRKAG3-D	tcctgtggctcagatcaagaaggcc	cctgccccagagccccagccagaa	E5	160 pb	66.9
PRKAG3-E	acttcagcaggagcacacc	gctctgcttctgctgccc	E4 - E5	1018 pb	61.0
PRKAG3-F	cgccccctactgagcctctgtgga	ccgaggcgtcgtatgccagagggc	E13	150 pb	66.9
PRKAG3-G	gcaccttatgggacagcaa	ggagagatggagaccagagg	E5 - E8	714 pb	60.5
RYRA	aggagaaactggatagcctccaa	ccttttcttgagcacaccaagtc	E11	172 pb	56.9
RYRB	gccacgcctgtcacttacctggg	agccgagaagctgacaacagggaag	E19	187 pb	66.9
RYRC	acagatggagaggatggtg	gccggcagtagctgatca	I11 - E12	248 pb	55.9
RYRE	gaggggaggctagggacag	accactccagctctcgtatca	E23	245 pb	61.5
RYRF	agtagtgaggcggaggtct	cttggtggcctcatccag	E24	274 pb	61.5
RYRG	ctaccgcctgctggatgag	ttcaggctcaggacagagt	E24 - I24	247 pb	56.0
RYRH	aggtgctggatgtgctatgttcct	ctggtgacatagttgatgagtt	E17	137 pb	54.9
RYRI	gggcctggacagcttcagcggaaag	gtgctgtagctcctcggaggcggc	E13	138 pb	57.8
DESA	tacaatatgtcggacggccggggg	ggtcggcggtaggacgacaccgc	E13	138 pb	57.8

E = exón, I = intrón. RYRH amplifica la región homóloga en donde se ubica la mutación n (R615C) y los cebadores PRKAG3-D el segmento de los polimorfismos RN- y rn\* (aminoácidos 199 y 200) del cerdo.

### 7.2.3 Determinación del parámetro CRAc.

Ver numeral 2.2.3.

### 7.2.4 Genotipificación de la población

Las reacciones de las PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 µl, consistentes en 8.26 µl de agua ultrapura para PCR; 2.5 µl de MgCl<sup>2</sup> (25 mM); 5 µl of dNTP (a una concentración de 2.5 µmoles de cada desoxiribonucleótido en buffer 5X); 2 µl de cada primer (10 pmoles/µl como); 0.24

μl de TaqDNA polimerasa (5U/μl) y 5 μl de template de ADN extraído de sangre o tejido muscular (concentración de 50 ng). En la tabla 7-1 se presentan todas las regiones polimórficas reportadas en literatura y en bases de datos de los genes CAPN1 (figura 6-1), CAST (figura 6-2), DES (figura 5-1), PRKAG3 (figura 3-1) y RYR1 (figura 4-2) bovinos, con los cebadores empleados para su

**Tabla 7-2:** Marcadores corridos y los SNPs determinados según técnica de genotipificación.

Técnica	Marcador	Nombre	Nucleótido	Ubicación	Reporte
RFLP	CAPN5331	CAPN5331	161	I 1	Casas <i>et al.</i> 2005
RFLP	CAPN316	CAPN316	5544	E 9	Page <i>et al.</i> 2002
RFLP	CAPN530	CAPN530	22128	E 14	Page <i>et al.</i> 2002
RFLP	CAPN4751	CAPN4751	24114	I 17	White <i>et al.</i> , 2005
RFLP	UoGCAST	UoGCAST	84719	I 8	Schenkel <i>et al.</i> , 2006
RFLP	CAST1	CAST1	85930	I 9	Chung <i>et al.</i> , 2001
RFLP	CAST2870	CAST2870	134877	E 32	Corva <i>et al.</i> , 2007
RFLP	CAST2959	CAST2959	134966	E 32	Barendse <i>et al.</i> , 2007
RFLP	PRKAG3-C	PRKAG3-1526	1526	E 4	Yu <i>et al.</i> , 2005
RFLP	PRKAG3-E	PRKAG3-2180	2180	I 4	Yu <i>et al.</i> , 2005
SSCP	PRKAG3-D	PRKAG3-2745	2745	E 5	NCBI
SSCP	PRKAG3-A	PRKAG3-2925	2925	I 5	NCBI
		PRKAG3-2961	2961	I 5	NCBI
		PRKAG3-3047	3047	I 6	NCBI
		PRKAG3-3078	3078	I 6	NCBI
RFLP	PRKAG3-G	PRKAG3-3068	3068	I 6	Yu <i>et al.</i> , 2005
SSCP	PRKAG3-F	PRKAG3-5898	5898	E 13	NCBI
SSCP	RYR1-A	RYR1-11195	11195	E 11	NCBI
RFLP	RYR1-C	RYR1-13638	13638	E 12	NCBI
SSCP	RYR1-H	RYR1-20298	20298	E 17	NCBI
SSCP	RYR1-B	RYR1-21643	21643	E 19	NCBI
RFLP	RYR1-E	RYR1-26680	26680	E 23	NCBI
RFLP	RYR1-F	RYR1-27871	27871	E 24	NCBI
SSCP	RYR1-G	RYR1-27970	27970	E 24	NCBI
		RYR1-27982	27982	E 24	NCBI
		RYR1-28046	28046	I 24	NCBI
		RYR1-28068	28068	I 24	NCBI
SSCP	RYR1-I	MONOMORFICO		E 13	NCBI
SSCP	DES-A	MONOMORFICO		E 1	NCBI

E = exón, I = intrón; ver anexos C y D.

amplificación. En la tabla 7-2 se presentan los SNPs establecidos en cada una de las regiones génicas evaluadas así como su técnica de determinación. En las tablas 7-3 (RFLP) y 7-4 (SSCP - Bastos *et al.*, 2001; Sunnucks *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2006) se presentan los parámetros técnicos de

laboratorio usados para la genotipificación. Posterior a la genotipificación de los marcadores, se realizó su secuenciación, lectura de electroferogramas y determinación de la posición polimórfica.

**Tabla 7-3:** Condiciones de digestión y corrido en RFLP según marcador.

Marcador	Buffer 10X/ $\mu$ l	Enzima/ $\mu$ l	Amplicón/ $\mu$ l	Agua/ $\mu$ l	Temperatura	Tiempo	Gel
CAPN316	BUFFER R / 2,0	BtgI / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
CAPN530	BUFFER R / 2,0	Avall / 0,3	8,0	6,0	37°C	5	Agarosa 2%
CAPN4751	NeBuffer 4/ 2,0	BsajI / 0,3	11,0	7,0	60°C	5	Poliacrilamida 29:1 10X
CAPN5331	Green / 2,0 y SAM / 0,4	BpII / 0,3	11,0	7,0	37°C	2	Poliacrilamida 29:1 10X
CAST1	Tango / 2,0	XmnI / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
CAST2870	Tango / 2,0	Tsp509I / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
CAST2959	Tango / 2,0	DdeI / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
UoGCAST	NeBuffer 4/ 2,0	RsaI / 0, 3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
PRKAG3-C	NeBuffer 3/ 2,0	AciI / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Poliacrilamida 29:1 10X
PRKAG3-E	NeBuffer 4/ 2,0	RsaI / 0, 3	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
PRKAG3-G	Buffer EcoRI / 2,0	EcoRI / 1,0	11,0	7,0	37°C	5	Agarosa 2%
RYR1-C	Buffer 4 / 2,0 y BSA / 0,4	Hpy99I / 0,3	10,0	7,0	37°C	2	Poliacrilamida 29:1 10X
RYR1-E	NeBuffer 3/ 2,0	AciI / 0,3	11,0	7,0	37°C	5	Poliacrilamida 29:1 10X
RYR1-F	NeBuffer 4/ 2,0	Hpy188I / 0,3	11,0	7,0	37°C	4	Poliacrilamida 29:1 10X

**Tabla 7-4:** Condiciones de corrido en SSCP según marcador.

Marcador	Poliacrilamida	Glicerol	horas	Wattios
PRKAG3-A	59:1 6X	-	14	30
PRKAG3-D	59:1 6X	0,05	7	25
PRKAG3-F	59:1 6X	-	6	20
DES-A	MONOMÓRFICO			
RYR1-A	59:1 10X	-	10	25
RYR1-B	59:1 6X	0,05	7	25
RYR1-G	59:1 6X	-	6	20
RYR1-I	MONOMÓRFICO			
RYR1-H	59:1 10X	-	10	25

### 7.2.5 Análisis estadístico

Se establecieron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos mediante el procedimiento PROC FREQ de SAS y únicamente fueron incluidos en el análisis de asociación genotipo-fenotipo aquellos marcadores cuyo alelo menor, tenía una frecuencia superior al 10%

(Lee *et al.*, 2011; Curi *et al.*, 2010). Adicionalmente, los genotipos con número reducido de animales fueron excluidos para prevenir una influencia negativa en la estimación de medias (Café *et al.*, 2010b; Corva *et al.*, 2007) por lo que los genotipos con menos de 8 individuos fueron eliminados. Para el análisis asociación genotipo-fenotipo se utilizó el procedimiento GLM de este mismo paquete estadístico (Reardon *et al.*, 2010; Otto *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010). El modelo aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ijklmn} = \mu + P_i + S_j + M_k + P_i*S_j + P_i*M_k + S_j*M_k + P_i*S_j*M_k + G_l + Am(G_l) + e_{ijklm} \quad (7.3)$$

Donde:

$Y_{ijklmn}$  = Variable CRA

$\mu$  = Medía poblacional.

$P_i$  = Efecto del Genotipo  $i$ -ésimo del marcador analizado

$S_j$  = Efecto del Grupo racial  $j$ -ésimo.

$M_k$  = Efecto del tiempo de Maduración  $k$ -ésimo.

$P_i*S_j$  = interacción Genotipo\*Grupo racial

$P_i*M_k$  = interacción Genotipo\*tiempo de Maduración.

$S_j*M_k$  = interacción Grupo racial\*Maduración.

$P_i*S_j*M_k$  = interacción Marcador\*Grupo racial\*tiempo de Maduración

$G_l$  = Efecto del Grupo contemporáneo  $l$ -ésimo (animales de igual procedencia y día de sacrificio).

$Am(G_l)$  = Animal  $m$ -ésimo anidado dentro del Grupo de contemporáneo  $l$ -ésimo.

$e_{ijklmn}$  = Error aleatorio.

Se realizó la corrida del modelo estadístico por cada marcador analizado (Otto *et al.*, 2007; Brunner *et al.*, 2012) incluido como un efecto fijo (Škrlep *et al.*, 2010; Lindahl *et al.*, 2004a y b; Otto *et al.*, 2007; Brunner *et al.*, 2012; Srikanthai *et al.*, 2010; Chung y Davis, 2011; Curi *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2006; Café *et al.*, 2010b; Allais *et al.*, 2011; Papaleo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Schenkel *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2006; Casas *et al.*, 2005).

Los animales fueron distribuidos en dos Grupos raciales, los individuos *Bos taurus*\**Bos indicus* y los *Bos indicus*\**Bos indicus*, dadas las diferencias genéticas existentes entre subespecies (Chan *et al.*, 2010). Para comprobar la significancia de los factores Genotipo y su interacción con el Grupo racial y/o el tiempo de Maduración se empleó el anidamiento  $Am(G_l)$  y se realizaron comparaciones de Tukey-Kramer a los promedios ajustados.

**Tabla 7-5:** Frecuencias Alélicas y genotípicas en cada marcador.

Marcador	Alelos		Genotipos			Marcador	Alelos		Genotipos		
CAPN316*	C	G	CC	GC	GG	PRKAG3-3068	A	G	AA	AG	GG
	0,05	0,95	0	0,09	0,91		0,22	0,78	0,03	0,38	0,59
CAPN530	A	G	AA	GA	GG	PRKAG3-3078	A	G	AA	AG	GG
	0,20	0,80	0	0,40	0,60		0,25	0,75	0	0,50	0,50
CAPN4751	C	T	CC	CT	TT	PRKAG3-5898	A	G	AA	GA	GG
	0,12	0,88	0,02	0,20	0,78		0,39	0,61	0,09	0,59	0,32
CAPN5331	A	T	AA	AT	TT	RYR1-11195	A	G	AA	AG	GG
	0,28	0,72	0,01	0,53	0,46		0,49	0,51	0,43	0,11	0,46
CAST1	C	T	CC	CT	TT	RYR1-13638	C	T	CC	CT	TT
	0,63	0,37	0,46	0,34	0,20		0,59	0,41	0,24	0,70	0,06
CAST2870	A	G	AA	AG	GG	RYR1-20298	A	G	AA	AG	GG
	0,40	0,60	0,13	0,53	0,34		0,56	0,44	0,34	0,46	0,21
CAST2959	A	G	AA	AG	GG	RYR1-21643*	C	T	CC	CT	TT
	0,65	0,35	0,45	0,41	0,14		0,94	0,06	0,87	0,13	0
UoGCAST	C	G	CC	GC	GG	RYR1-26680	A	C	AA	AC	CC
	0,68	0,32	0,43	0,50	0,07		0,87	0,13	0,73	0,27	0
PRKAG3-1526*	G	T	GG	TG	TT	RYR1-27871	C	T	CC	CT	TT
	0,93	0,07	0,88	0,11	0,01		0,76	0,24	0,74	0,05	0,21
PRKAG3-2180	C	T	CC	TC	TT	RYR1-27970	C	T	CC	CT	TT
	0,16	0,84	0,01	0,32	0,68		0,90	0,10	0,80	0,18	0,01
PRKAG3-2745	C	T	CC	CT	TT	RYR1-27982	C	T	CC	CT	TT
	0,36	0,64	0,15	0,41	0,44		0,86	0,14	0,74	0,24	0,02
PRKAG3-2925	A	G	AA	AG	GG	RYR1-28046*	C	G	CC	CG	GG
	0,53	0,47	0,32	0,41	0,26		0,99	0,01	0,99	0,01	0
PRKAG3-2961	A	G	AA	AG	GG	RYR1-28068*	C	T	CC	CT	TT
	0,62	0,38	0,32	0,59	0,09		1,00	0,00	0,99	0,01	0
PRKAG3-3047	A	G	AA	AG	GG						
	0,38	0,62	0,09	0,59	0,32						

\* Marcadores eliminados de la asociación fenotipo-genotipo.

### 7.3 Resultados

Para la región evaluada del gen de la Desmina (DES-A) y la región RYR1-I no se identificaron mutaciones. En la tabla 7-5 se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores evaluados en la población analizada. En la tabla 7-6 se muestran los marcadores significativos en la asociación fenotipo-genotipo. Para el parámetro CRAr en LD se presentó asociación con varios marcadores evaluados en todos los genes excepto con PRKAG3 y para el músculo ST, ninguno de los marcadores incluidos en la asociación obtuvo el nivel de significancia. El marcador CAPN5331 solo alcanzó valor de tendencia. En la característica CRAc en LD y ST los genes CAST, PRKAG3

y RYR1 presentaron al menos uno de sus marcadores asociados significativamente. Adicionalmente, cabe destacar que tres marcadores de Rianodina, presentaron interacción con el grupo racial en el parámetro CRAc para LD y el polimorfismo CAPN5331 con el tiempo de maduración en CRAr de LD (tabla 7-7).

**Tabla 7-6:** Asociación según Marcador

Marcador	Parámetro	Músculo	Comparaciones								
				Promedio	SE		Promedio	SE		Promedio	SE
CAPN530	CRAr	LD				GA	<b>33.07<sup>a</sup></b>	6,45	GG	31.79 <sup>b</sup>	7,49
CAST1	CRAr	LD	CC	<b>32.94<sup>a</sup></b>	7,52	CT	31.46 <sup>b</sup>	6,79	TT	32.14 <sup>ab</sup>	6,29
CAST2870	CRAc	ST	GG	<b>23.99<sup>a</sup></b>	7,96	GA	<b>22.63<sup>a</sup></b>	8,45	AA	25.71 <sup>b</sup>	9,08
<b>CAST2959</b>	CRAr	LD	AA	<b>33.03<sup>a</sup></b>	7,49	AG	31.56 <sup>b</sup>	6,67	GG	31.46 <sup>b</sup>	6,2
<b>CAST2959</b>	CRAc	ST	AA	<b>22.61<sup>a</sup></b>	8,06	AG	23.11 <sup>b</sup>	8,36	GG	26.36 <sup>b</sup>	9,22
RYR1-11195	CRAc	LD	AA	<b>18.18<sup>a</sup></b>	6,55	AG	21.98 <sup>b</sup>	6,89	GG	22.34 <sup>b</sup>	7,86
<b>RYR1-13638</b>	CRAr	LD	CC	<b>33.41<sup>a</sup></b>	7,16	CT	32.06 <sup>b</sup>	7,03	TT	32.82 <sup>ab</sup>	6,52
<b>RYR1-13638</b>	CRAc	LD	CC	<b>19.81<sup>a</sup></b>	6,39	CT	20.74 <sup>b</sup>	7,49	TT	20.92 <sup>b</sup>	7,42
<b>RYR1-13638</b>	CRAc	ST	CC	<b>22.94<sup>a</sup></b>	8,32	CT	<b>23.32<sup>a</sup></b>	8,37	TT	27.1 <sup>b</sup>	8,37
RYR1-26680	CRAr	LD	AA	<b>32.62<sup>a</sup></b>	7,18	AC	31.89 <sup>b</sup>	6,69			
RYR1-27871	CRAc	LD	CC	<b>20.51<sup>a</sup></b>	7,29	CT	22.94 <sup>b</sup>	7,82	TT	<b>20.18<sup>a</sup></b>	7,11
<b>RYR1-27970</b>	CRAr	LD	CC	<b>32.55<sup>a</sup></b>	7,05	CT	30.29 <sup>b</sup>	7,18			
<b>RYR1-27970</b>	CRAc	ST	CC	<b>22.91<sup>a</sup></b>	8,43	CT	24.82 <sup>b</sup>	8,35			
PRKAG3-2180	CRAc	ST				TC	<b>22.36<sup>a</sup></b>	7,96	TT	23.99 <sup>b</sup>	8,6

Valores promedio en negrita, indican el valor deseable según el parámetro de CRA, marcadores en negrita representan los marcadores más consistentes en la asociación fenotipo-genotipo. Valores con diferente superíndice indican significancia.

**Tabla 7-7:** Interacciones significativas Marcador\*Grupo racial y Marcador\*Maduración.

Marcador	Parámetro	Músculo	Comparaciones					
				<i>Bos taurus- Bos Indicus</i>		<i>Bos indicus- Bos indicus</i>		
				Promedio	SE	Promedio	SE	
RYR1-26680	CRAc	LD	AC	21.8 <sup>b</sup>	8,18	<b>16.63<sup>a</sup></b>	8,2	
			AA	19.55 <sup>b</sup>	6,27	21.25 <sup>b</sup>	7,39	
<b>RYR1-27970</b>	CRAc	LD	CA	21.31 <sup>b</sup>	7,98	<b>16.38<sup>a</sup></b>	5,44	
			CC	19.83 <sup>ab</sup>	6,08	21.04 <sup>b</sup>	7,5	
RYR1-27982	CRAc	LD	TC	20.99 <sup>b</sup>	8,27	<b>17.52<sup>a</sup></b>	4,99	
			CC	19.59 <sup>ab</sup>	6,31	20.97 <sup>b</sup>	7,52	
				<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>		
				Promedio	SE	Promedio	SE	
CAPN5331	CRAr	LD	AT	<b>34.74<sup>a</sup></b>	7,55	33.33 <sup>ab</sup>	6,41	
			TT	32.33 <sup>ab</sup>	6,13	32.07 <sup>ab</sup>	6,93	
						<b>30.39<sup>b</sup></b>	6,97	
						31.36 <sup>ab</sup>	7,34	

Valores promedio en negrita, indican el valor deseable según el parámetro de CRA, marcadores en negrita representan los marcadores más consistentes en la asociación fenotipo-genotipo. Valores con diferente superíndice indican significancia.

## 7.4 Discusión

### 7.4.1 Gen CAPN1

El único polimorfismo de este gen que se encontró asociado al parámetro CRAr de LD en el presente estudio fue el polimorfismo CAPN530, siendo el genotipo GA superior en retención de agua respecto al GG. En el presente estudio el alelo A presentó una menor frecuencia (20%) que el alelo G, de modo similar al estudio de Page *et al.* (2002), quienes determinaron que este alelo estaba asociado a un incremento en la dureza de la carne a los 14 días PM. Esta asociación también fue reportada por Corva *et al.* (2007), con un incremento del 11.5% del valor de WBSF para animales GA respecto de individuos GG.

En relación con el marcador CAPN5331 no se encontró una asociación significativa con los parámetros asociados a CRA que fueron evaluados en el presente estudio, lo que concuerda con lo reportado por Casas *et al.* (2005), quienes no lo hallaron asociado a terneza a 14 días PM en animales Brahman.

El marcador 316 de CAPN1 presentó una baja frecuencia para el alelo C (5%) en la población analizada en el presente estudio, por lo que este polimorfismo no fue incluido en el estudio de asociación fenotipo-genotipo. Sin embargo, este polimorfismo ha sido previamente asociado a parámetros de terneza. Curi *et al.* (2010), Costello *et al.* (2007) y Casas *et al.* (2005) reportaron una asociación significativa al parámetro de terneza, a pesar de la baja frecuencia alélica del alelo C (~1%) (Curi *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2005), en contraste con el reporte de Café *et al.* (2010a) que aun cuando encontraron una frecuencia alélica para C del 3,4%, no lo hallaron asociado a parámetros como *Shear force*, compresión ni CRAc. La discusión se mantiene con lo señalado por Papaleo *et al.* (2010) y Corva *et al.* (2007), quienes encontraron una frecuencia más alta (27% y 39% respectivamente) para el alelo benéfico en este marcador y una asociación significativa con el parámetro de *Shear force* en lomo.

En relación con el marcador CAPN4751, en el presente estudio no se encontró una asociación significativa con alguno de los parámetros evaluados, de modo similar a lo reportado por Café *et al.* (2010b), cuando evaluaron el parámetro de CRAc en *Longissimus lumborum* y ST. En estudios previos se ha reportado que los animales con genotipos CC y CT de este marcador presentan un incremento en la terneza respecto a individuos con genotipo TT en poblaciones *Bos indicus*, *Bos*

*indicus*\**Bos taurus* y *Bos taurus*, resultados que presentan una amplia consistencia al haber sido evaluados en poblaciones no relacionadas (Pinto *et al.*, 2010; Casas *et al.*, 2006).

#### 7.4.2 Gen CAST

En el caso del marcador CAST2959 (Barendse *et al.* 2002) se estableció que los individuos AA presentan un mejor desempeño en relación con los parámetros CRAr en LD y CRAc en ST. De modo similar, Casas *et al.* (2006), Van Eenennaam *et al.* (2007) y Li *et al.* (2010) encontraron que los individuos con genotipo AA presentaban carne más blanda medida por WBSF respecto a animales AG y GG. Lo anterior evidencia la relación existente entre la proteólisis autógena del músculo y la retención del agua en la carne, incluso luego de someterla a la cocción y postula a este marcador como el más consistentemente asociado a parámetros relacionados a la CRA de la carne de bovino, de los incluidos en el presente estudio para el sistema  $\mu$ -Calpaína y Calpastatina.

En el presente estudio no se encontró asociación entre el marcador UoGCAST (Schenkel *et al.*, 2006) y alguno de los parámetros de CRA evaluados, de modo similar al trabajo de Curi *et al.* (2010) quienes no lo encontraron asociado a terneza. Sin embargo en el estudio de Reardon *et al.* (2010) lo encontraron asociado al valor de pH a 24 horas y de manera similar Pinto *et al.* (2010), Schenkel *et al.* (2006) y Van Eenennaam *et al.* (2007) lo reportan asociado a la terneza de la carne. Es importante resaltar la existencia de diferencias entre poblaciones, lo que puede limitar la validación de un mismo marcador y su asociación a un fenotipo determinado, dados los efectos ambientales e inclusive genéticos diferenciales, lo que destaca la importancia de realizar la validación de ellos en nuevas poblaciones objetivo.

En el presente estudio, los polimorfismos CAST1 y CAST2870 presentaron asociación con los parámetros CRAr de LD y CRAc en ST respectivamente. En CAST1 se estableció al genotipo CC como asociado al fenotipo ideal. Este marcador fue evaluado mediante RFLP y genotificado en las investigaciones de Majidi *et al.* (2009), Chung *et al.* (2000) y Aranguren *et al.* (2011), sin embargo cabe destacar que estos trabajos no señalan cual es el cambio nucleotídico responsable ya que solo reportan el patrón de corte en geles de agarosa, denominándolos como alelos A y B.

En cuanto al genotipo AA del polimorfismo CAST2870, se destaca como un genotipo que le confiere a la carne un mayor valor en CRAc (fenotipo indeseable) en ST, siendo este genotipo según Li *et al.* (2010), el asociado con la presentación de carnes más duras en lomo. En el estudio de Corva *et al.* (2007) no se reporta a este marcador como asociado a WBSF. Varios de los polimorfismos del sistema CAPN1 y CAST previamente reportados como asociados a carnes más

blandas, coinciden con los mismos genotipos que se han encontrado asociados a mejor CRA en el presente estudio, lo que permite destacar nuevamente, la importancia de la asociación entre la proteólisis post mortem y las pérdidas de agua ocurridas después de algún tipo de procesamiento de la carne de bovino.

### 7.4.3 Gen RYR1

En el presente estudio se encontró asociación de dos polimorfismos de este gen con los parámetros CRAc y CRAr simultáneamente, el primero es el marcador RYR1-13638, para el cual se estableció al genotipo CC como benéfico para los parámetros CRAr en LD y CRAc en ambos músculos evaluados y el segundo corresponde al RYR1-27970 siendo el genotipo CC benéfico para la característica CRAr en LD y CRAc en ST. Otros polimorfismos analizados presentaron también asociación pero en uno solo de los parámetros o músculos (tabla 7-6). La importancia de este gen radica en el rol fundamental que desempeña la proteína RYR1 como mediadora de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS, lo que es indispensable para realizar la contracción muscular. Este proceso es mediado por múltiples proteínas que interactúan (Xiong *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003; Fessenden *et al.*, 2004; Hamilton, 2005; Serysheva *et al.*, 2008; Cornea *et al.*, 2010; Lobo y Van Petegem, 2009; Serysheva *et al.*, 2005) con el enorme homotetrámero de RYR1, por lo que una mutación en el gen puede modificar este tipo de interacciones inter e intramoleculares y alterar significativamente la liberación del calcio, dada su sensibilidad para ser activada y/o regulada por cationes (Ta y Pessah, 2007; Yang *et al.*, 2003) de acuerdo a estímulos como el estrés durante el sacrificio lo que puede alterar la calidad del producto final, la carne.

El juego de cebadores que fueron diseñados para amplificar la región homóloga del bovino a la mutación R615C del cerdo permitió hallar la mutación RYR1-20298, la cual se ubica a 57 nucleótidos de la posición exacta responsable de la alteración en el porcino.

### 7.4.4 Gen PRKAG3

El marcador PRKAG3-2180 fue el único de los polimorfismos evaluados en el presente estudio que fue asociado con el parámetro CRAc en ST, siendo el genotipo TC el ideal al ser comparado con animales de genotipo TT, pero no existen reportes en literatura que lo hayan evaluado en asociación a algún parámetro de calidad cárnica en bovino.

El marcador PRKAG3-2951 en este estudio no se determinó como asociado con alguno de los parámetros asociados a CRA evaluados, pero en el estudio de Reardon *et al.* (2010) se estableció como asociado con el parámetro pH a 24 horas y con la CRAc en lomo, ya que los animales GG presentaron un 1% menos de pérdida de agua respecto a AG y AA. La variación genética de este gen, lo ha convertido en el segundo en importancia según su efecto sobre parámetros de calidad cárnica en el cerdo (Otto *et al.*, 2007) dado que se ha demostrado en ratones que varias mutaciones en este gen logran modificar hasta en un 60% la deposición del glucógeno *in-vivo* en el tejido muscular, esquelético (Barnes *et al.* (2005). Lo anterior se debe a la existencia de un *feed-back* negativo entre el contenido de glucógeno en el músculo y la actividad de la molécula AMPK, mediado por la subunidad Gamma3 (Barnes *et al.*, 2005) y a un papel fundamental que desempeña en la activación e inactivación transcripcional de varios genes involucrados en la producción de energía celular (Long *et al.*, 2005).

El juego de cebadores PRKAG3-D, fueron diseñados para la amplificación de la región homóloga en el bovino a la mutación causante de la modificación en las posiciones 199 y 200 de la proteína del cerdo. Esta región permitió establecer a la mutación PRKAG3-2745, ubicada a 39 nucleótidos de los dos codones homólogos GTCCGG en el bovino.

#### **7.4.5 Interacciones de segundo grado**

En el presente trabajo se encontró una interacción Marcador\*Grupo racial en los marcadores RYR1-26680, RYR1-27970 y RYR1-27982 en la característica CRAc de LD. Lo anterior evidencia un potencial importante de los animales heterocigotos del grupo racial *Bos indicus* para estos marcadores, los cuales mostrarían menores pérdidas de agua en la carne procedente de LD después de la cocción (tabla 7-7).

El marcador CAPN5331 mostró interacción con el tiempo de maduración PM de la carne en el parámetro CRAr de LD, evidenciando que si la carne de un animal con genotipo AT es madurada hasta los 21 días, esta presentará una pérdida importante de la capacidad de retener agua, en comparación con la carne que solo es madurada hasta los 7 días. La investigación de Papaleo *et al.* (2010) es el único reporte de la literatura citada que evaluó este tipo de interacciones, empleando el parámetro *Shear force*, sin embargo no encontraron interacción del tiempo de maduración con los marcadores CAPN316 y CAPN4751 en una población Brangus.

## 7.5 Conclusiones

Se establecieron como informativos varios marcadores de los genes CAPN1, CAST, PRKAG3 y RYR1, evidenciando la amplia variabilidad que poseen estos genes en la población analizada. Se determinó la asociación de los marcadores CAST2959, RYR1-13638 y RYR1-27970 (los genotipos benéficos fueron AA, CC y CC, respectivamente) con los parámetros CRAr y CRAc. Adicionalmente se estableció la existencia de la interacción Marcador\*Grupo racial en los polimorfismos RYR1-26680, RYR1-27970 y RYR1-27982 para la característica CRAc en el músculo LD, mostrando la gran potencialidad de animales *Bos indicus-Bos indicus*.

Se encontró interacción del polimorfismo CAPN5331 con el tiempo de Maduración, lo que puede representar una potencialidad a nivel tecnológico en la carne, mediante el uso de los tiempos de maduración *post-mortem* indicados, según el genotipo de los animales.

Se destaca que los polimorfismos CAST2959, RYR1-13638 y RYR1-27970 son potencialmente útiles en procesos de selección animal (tabla 7-6) y mejoramiento de la calidad cárnica, específicamente con el parámetro CRA en carne madurada de bovino.

Se hace necesario evaluar estos polimorfismos en poblaciones más grandes, no relacionadas, en un proceso de validación de los mismos en Colombia, para poder ser empleados en programas de selección animal que tenga como finalidad mejorar parámetros sensoriales de la carne asociados a la CRA.



## 8. Discusión

### 8.1 Polimorfismos de nucleótido simple asociados a la CRA

El único polimorfismo asociado en el presente estudio en el gen CAPN1, correspondió al polimorfismo CAPN530, estableciendo al genotipo GA como superior al GG en el parámetro CRAr de LD, en concordancia con lo reportado por Corva *et al.* (2007). Sin embargo al momento de evaluar alguna modificación en el ARNm (polimorfismo conformacional y estabilidad medida por  $\Delta G$ ) o proteína (PI, superficie molecular y potencial electrostático), no se evidenció modificación alguna en estas propiedades, por lo que es requerido el uso de otras metodologías o procedimientos *in-silico*, para poder establecer alguna alteración a este nivel (secuencia CN11 en el capítulo 6) y establecer un sustento biológico que respalde su asociación a un fenotipo diferencial.

En el presente estudio los individuos con genotipos AA del marcador CAST2959 (Barendse *et al.*, 2002) (CS16 del capítulo 6) presentaron un mejor desempeño en los parámetros CRAr en LD y CRAc en ST. Este mismo polimorfismo fue reportado previamente por Casas *et al.* (2006), Hanna *et al.* (2008) y Li *et al.* (2010) como asociado al parámetro WBSF, estableciendo a este mismo genotipo (AA) como asociado a carnes más blanda respecto a animales AG y GG. Lo anterior puede estar relacionado con un incremento en la estabilidad de la molécula de ARNm de CAST, conferido por el alelo G (con -1088.08 kcal/mol y para el alelo A un valor de -1084.57 kcal/mol), lo que teóricamente puede conferirle a la molécula de ARNm mayor estabilidad, permitiendo una mayor expresión de la proteína CAST y por lo tanto una mayor tasa de inhibición a nivel proteico de la CAPN1, dando como resultado carnes más duras. Por lo tanto, se postula al marcador CAST2959 como el más consistentemente asociado a parámetros relacionados a la CRA de la carne de bovino, de los incluidos en el presente estudio para el sistema  $\mu$ -Calpaína y Calpastatina. Cabe destacar que varios polimorfismos de la CAST bovina citados en el capítulo 6, logran alterar en mayor medida la estabilidad del ARNm y la información análoga de la misma, por lo que podrían ser de importancia productiva. Este tipo de polimorfismos actúan como elementos génicos reguladores en *Cis*, al afectar el nivel de expresión del gen, el procesamiento del ARNm y su

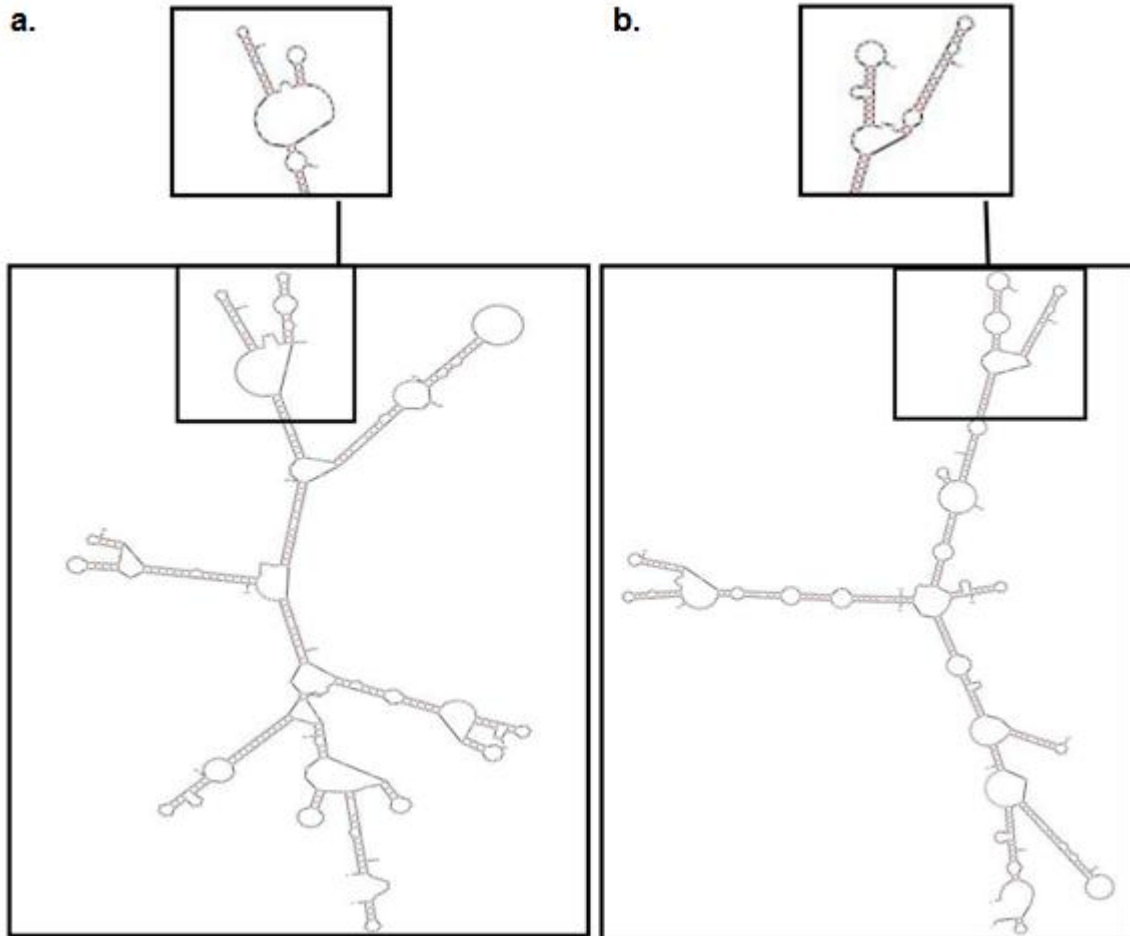
traducción, sin embargo el conocimiento de estos elementos aun están lejos de ser claramente comprendidos para muchos genes (Wang y Sadée, 2006). Wang y Sadée (2006) establecen este efecto sobre el nivel de expresión del ARNm producido en un alelo específico con respecto a otro como, imbalance de expresión génica (AEI).

En el gen PRKAG3 se estableció únicamente la asociación del polimorfismo 2180, en CRAC de ST, indicando que ninguno de los polimorfismos evaluados en el presente trabajo alcanzan el efecto atribuido a los polimorfismos RN- y m\* del cerdo ya que estos han sido asociados con alteraciones tanto en CRAr como en CRAr. Adicionalmente cabe destacar que de los SNPs reportados, evaluados *in-silico* del bovino (capítulo 3), ninguno logra equiparar el efecto de la mutación RN- porcina (Škrlep *et al.*, 2010) sobre la proteína PRKAG3, por lo que hasta el momento no se puede postular una mutación con un efecto tan importante, haciendo que posiblemente este gen no sea tan preponderante en lo referente a parámetros de calidad cárnica en el vacuno.

Para RYR1 se halló la asociación de dos de sus polimorfismos con los parámetros CRAC y CRAR simultáneamente, el primero es el marcador RYR1-13638, para el cual se estableció al genotipo CC como benéfico para los parámetros CRAr en LD y CRAC en ambos músculos evaluados y el segundo corresponde al RYR1-27970 siendo el genotipo CC benéfico para la característica CRAR en LD y CRAC en ST. Ambas mutaciones evaluadas son sinónimas, al no alterar la secuencia de la proteína, por lo que no podrían modificar alguno de los parámetros físico-químicos de la misma. Se recurrió al análisis *in-silico* del ARNm (figura 8-1), en el cual se evidencia un polimorfismo conformacional en ambos casos (el valor de  $\Delta G$  no fue alterado de manera importante), lo que podría explicar la asociación de estos SNPs con los parámetros de CRA, ya que no solo SNPs que se ubiquen en regiones promotoras de un gen (Dziedziejko *et al.*, 2012) o mutaciones *missense* pueden contribuir a la variación fenotípica, sino que algunos polimorfismos que afectan únicamente el ARNm, como lo son las mutaciones sinónimas o en las regiones UTR, pueden estar asociadas a este tipo de efectos. Como lo mencionan Johnson *et al.* (2011) al establecer que los polimorfismos conformacionales del ARNm producidos por SNPs en genes previamente asociados con fenotipos humanos, contribuyen sustancialmente a su variabilidad fenotípica, al mediar procesos de síntesis, maduración, transporte, traducción o degradación (Shen *et al.*, 1999; Bartoszewski *et al.*, 2010). Wang y Sadée, (2006) en un análisis *in-vitro* establecieron a un SNP sinónimo, el C3435T del gen ABCB1 (gen de resistencia a multidroga, MDR1), como el principal

polimorfismo asociado a un incremento en la producción de ARNm en un 1.5 a 2 veces, resultado de un polimorfismo conformacional de esta molécula (determinado previamente *in-silico*).

**Figura 8-1:** Polimorfismo conformacional en RYR1



a. Marcador RYR1-13638 alelo C y se detalla la región modificada por el alelo T; b. Marcador RYR1-27970 alelo C y se detalla la región alterada por el alelo T. Bajo la metodología empleada en 6.3.2, se realizó el modelamiento de un fragmento contenedor del SNP en la región central de 540 nt en ambos casos.

## 8.2 Alteraciones *in-silico* de los SNPs evaluados

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se logró establecer alteraciones en las proteínas codificadas para las mutaciones RN- del PRKAG3 y n de RYR1. Para la primera se estableció una disminución en el valor de PI, pasando de 5.24 a 5.18, es decir esta molécula podría conferirle una mayor actividad a la molécula AMPK en el período PM, traducándose en un valor de pH final mucho más bajo de lo normal, algo totalmente en concordancia con la calidad cárnica atribuida a animales con esta mutación (Lindhahl *et al.*, (2004). Adicionalmente, la mutación RN- del cerdo

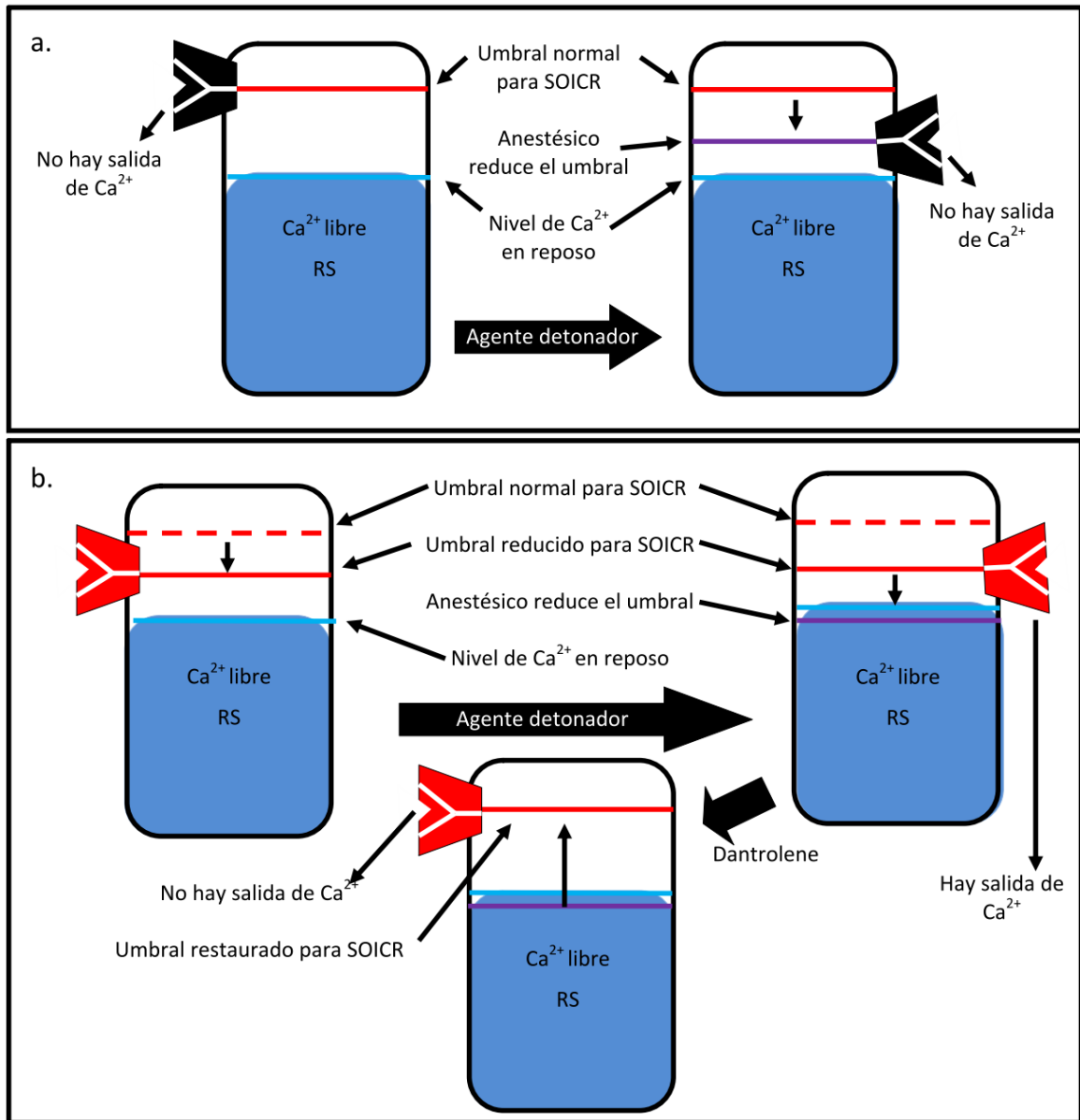
logra modificar el potencial electrostático de la proteína, lo que podría alterar su asociación a su ligando y/o su ensamblaje a la molécula final de AMPK.

En el caso de RYR1 algunas mutaciones como es el caso del polimorfismo R615C del cerdo han sido asociadas a alteraciones como la hipertermia maligna (Reyes y Zarain, 2006; Duke *et al.*, 2010). Según Laville *et al.* (2009), los animales presentan un incremento en la respuesta metabólica, como es el caso de los individuos nn luego del sacrificio, como resultado del incremento en la sensibilidad a activadores de RYR1 que durante eventos estresantes permiten la salida incontrolada de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS facilitando el consumo inmediato del glucógeno existente en el miocito, con su posterior conversión a ácido láctico, produciendo una caída rápida de pH lo que altera la calidad de la carne. El único parámetro físico-químico de los evaluados *in-silico* en el presente trabajo que mostró modificación por el polimorfismo R615C corresponde al potencial electrostático, siendo posiblemente el responsable de modificar algún tipo de interacción interdominios en RYR1 o con otras moléculas moduladoras. En general, dado el efecto que posee la mutación R615C porcina (Jiang *et al.*, 2008) en alteraciones sobre el umbral en el mecanismo SOICR (liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por sobrecarga de almacenamiento o *store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release*) en el músculo esquelético, porque existe una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneamente desde el RS en animales normales bajo un umbral determinado y cuando el animal es sometido a algún agente detonante como es el caso del anestésico Rianodina, este umbral disminuye. Adicionalmente, cuando hay una mutación asociada a Hipertermia Maligna como es el caso de la R615C, este umbral disminuye aún más, dando como consecuencia la salida de calcio desde el RS a un umbral mucho más bajo en presencia de un estímulo (figura 8.2) como el estrés, el cual estimula la acción de  $\beta$ -Adrenérgicos que incrementan la liberación conjuntamente con la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS (Rudolf *et al.*, 2006). Esta disminución en el umbral normal para SOICR, es posiblemente resultado de la alteración del potencial electrostático reportado en el capítulo 4.

En el caso del bovino la mutación K827E (ss414337672), modelada en el presente trabajo, presenta un efecto similar al R615C en el potencial electrostático y adicionalmente logra modificar el valor de PI, por lo que se sugiere como potencialmente importante en estudios de asociación con parámetros de calidad cárnica, sin embargo este polimorfismo no fue evaluado en el estudio de asociación fenotipo-genotipo del presente trabajo. De las tres mutaciones de RYR1 determinadas en el capítulo de análisis computacional de SNPs reportados como de importancia,

únicamente fue evaluada en el estudio de asociación fenotipo-genotipo del presente trabajo, la mutación ss267582941, sin embargo no fue establecida como polimórfica en la población analizada.

**Figura 8-2:** Efecto fisiológico de la mutación R615C porcina.



a. Efecto del agente detonante en el umbral de SOICR en RYR1 normal, b. efecto del agente detonante y del medicamento Dantrolene sobre el umbral de SOICR en RYR1 mutada. Adaptado de Jiang *et al.*, 2008.

### **8.3 Aplicaciones futuras**

Desplazándonos hacia la era genómica, en la cual encontramos la secuenciación de nueva (ó próxima generación) es posible revolucionar los avances en nuestra comprensión (Mardis, 2011) de características determinadas como complejas (muchas de las cuales son de importancia en producción animal). En esencia, la secuenciación es un motor que acciona un carro que nos permite viajar por las carreteras del genoma, que se hace cada vez más poderoso, y permite encontrar respuesta a múltiples preguntas acerca de la geografía del paisaje genómico, pero claro, un carro con solo motor no es funcional. Como tal la tecnología de la secuenciación proporciona una parte integral de un enorme sistema, uno con múltiples componentes que deben ser apropiadamente unidos, en orden de llevar a cabo un alto rendimiento y eficiencia. No ha sido nunca tan fácil como simplemente comprar instrumentos de secuenciación, conectar y generar datos. Necesitamos del material crudo, tal como el combustible (ADN), un encendido para accionar el combustible (reactivos), una parte mecánica para convertir el encendido y la ignición en movimiento (robótica) y la dirección (bioinformática), todo trabajando cuidadosamente y adicionalmente un conductor (centro genómico) para conducir rápida y eficientemente hacia el destino deseado, la comprensión biológica (Mardis, 2011).

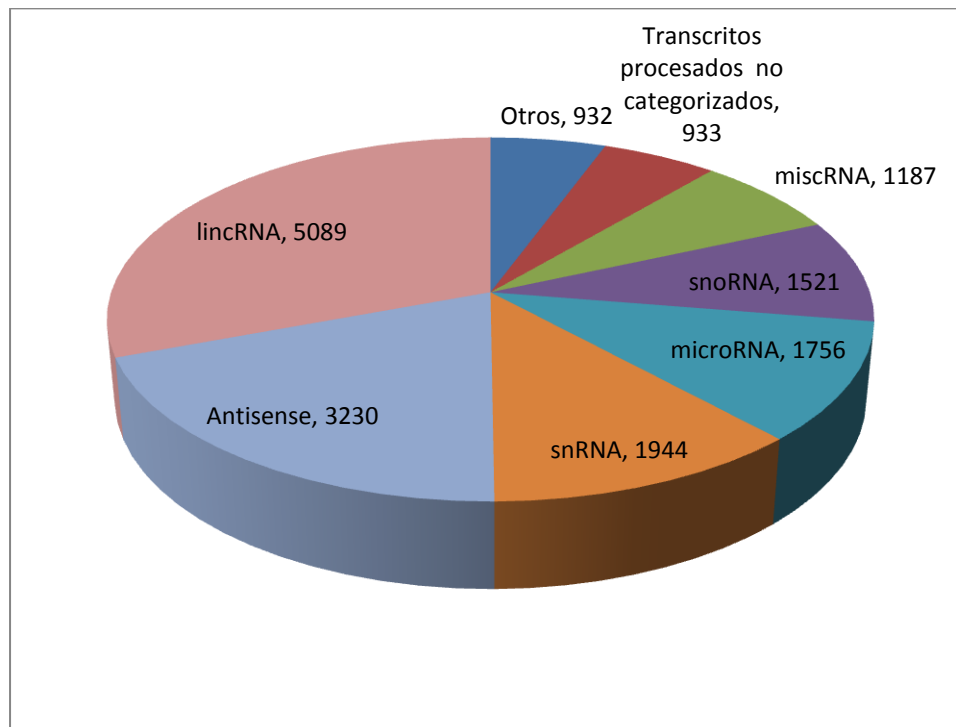
Como lo muestra Mardis (2011) los recursos bioinformáticos han sido cruciales para el análisis de los datos obtenidos por las nuevas tecnologías genómicas, y uno de los ejemplos más relucientes se refiere a la identificación y descubrimiento de mutaciones, inicialmente obtenidas en aproximaciones genómicas del cáncer, empleando la secuenciación masiva en paralelo. Esta técnica permite la secuenciación al mismo tiempo de un pool de miles de productos de PCR, disminuyendo el costo e incrementando dramáticamente la velocidad de la obtención de datos poblacionales, además de proveer información fundamental. Por ejemplo, es importante evaluar cambios en la asociación de las histonas y el ADN cromosómico durante el desarrollo embrionario, la ubicación exacta de proteínas reguladoras que se ligan al ADN, la metilación del ADN y alteraciones en la expresión génica y como estas condiciones varían según un determinado estímulo ó diferentes tejidos (Mardis, 2011). Esta información puede ser de gran importancia en las áreas pecuarias, dada la posibilidad de modificar el desarrollo y composición muscular y por lo tanto, (como se mencionó anteriormente) las características de calidad cárnica.

Otra aproximación genómica que destaca Mardis (2011) es la identificación de perfiles de expresión de ARN no codificantes y su variación tejido específica, entendiendo por transcriptoma,

al juego completo de transcritos de una célula, conjuntamente con su cuantificación, en un estado de desarrollo específico o condición fisiológica (Wang *et al.*, 2009). Lo anterior posee una gran aplicabilidad, dado que permitiría determinar que genes presentan actividad en determinados estados de desarrollo en los animales productores de carne, genes involucrados en suministrar la estructura física y/o energética del músculo, los cuales pueden contribuir a variaciones fenotípicas en las características organolépticas utilizadas al evaluar la calidad de la carne.

Los objetivos de la transcriptómica son: Catalogar todos los tipos de transcritos, incluyendo ARNm, ARN no codificante y ARN pequeño; determinar la estructura transcripcional de los genes en término de sus puntos de inicio 5' y de final 3', los patrones de splicing y otras modificaciones transcripcionales; cuantificar cambios en los niveles de expresión de cada transcrito durante diferentes estados del desarrollo y bajo diferentes condiciones (Wang *et al.*, 2009). El conocimiento del transcriptoma es esencial para la interpretación de elementos funcionales del genoma (Wang *et al.*, 2009), algo importante en la postulación de nuevos genes candidato aun no descritos, como es el caso de los genes de ARN no codificante.

**Figura 8-3:** Número y tipos descritos de ARN no codificantes.



lincRNA (ARN no codificante intergénico largo); snRNA (ARN pequeño nuclear); snoRNA (ARN pequeño nucleolar); y miscRNA (ARN misceláneo). Adaptado de Baker, 2011.

Respecto a lo anterior, solamente el 2% del genoma mamífero es codificante, pero se ha demostrado que la mitad del genoma (e incluso más) es transcrito (en la figura 8-3 se presentan los tipos de ARN no codificantes) y hasta este momento se está iniciando el descubrimiento de algunas de sus funciones (Baker, 2011) y tal como lo mencionan Wang *et al.* (2009), actualmente se están caracterizando nuevas regiones genómicas con actividad transcripcional y nuevas variantes transcripcionales, haciendo de este campo, mucho más complejo de lo considerado anteriormente. Según Baker (2011), actualmente muchos de estos ARNs putativos son identificados por RNA-seq (secuenciación del ARN), técnica que ofrece mayor exactitud y confiabilidad si es comparada con los micro-arreglos (Wang *et al.*, 2009).

## 9. Conclusiones y recomendaciones

La detección de genes polimórficos con efecto sobre la calidad cárnica es el primer paso para iniciar procesos de selección animal que permitan cumplir lineamientos dirigidos a incrementar la competitividad del sector bovino en Colombia, mediante el mejoramiento genético de los animales productores de carne. Aunque varios procesos, como los involucrados en la conversión del músculo a carne son muy complejos y algunos mecanismos moleculares permanecen aún relativamente desconocidos, es importante intentar establecer un sustento biológico a cualquier tipo de asociación genotipo-fenotipo, con el fin de suministrar una herramienta útil y confiable en el desarrollo de la industria cárnica. Por lo anterior, debido a que la investigación *in-vitro* y lógicamente *in-vivo* es costosa, la existencia de herramientas computacionales que pueden proporcionar una aproximación a modelos biológicos teóricos, puede ser de gran ayuda, facilitando los procesos de investigación, pero no logrando desplazar su validación con los análisis *in-vitro* ni mucho menos *in-vivo*. Empleando este tipo de aproximaciones se logra discernir entre un sinnúmero de mutaciones reportadas en bases de datos, con el fin de enfocar los esfuerzos en la investigación en una cantidad seleccionada de ellas, en la búsqueda de un efecto fenotípico claro y sustentado. Mediante la aplicación de herramientas de modelamiento del ARNm y de la proteína, se logró identificar varios polimorfismos reportados en bases de datos, como posibles candidatos y de igual manera, el determinar un posible sustento biológico a los fenotipos asociados a las mutaciones RN- del PRAKG3 y R615C del RYR1 del porcino.

Para el PRKAG3, los polimorfismos del bovino 1796C y 2338T en el ARNm y el 389T en la secuencia proteica son los SNPs más opcionados a contribuir a la variación fenotípica encontrada según literatura en la carne de bovino. La mutación 200Q (RN-) del cerdo, fue identificada como causante de modificaciones en el PI y potencial electrostático de la proteína *in-silico*, lo que podría dar respuesta al marcado efecto que posee sobre la calidad cárnica en esta especie. Algo similar fue hallado para el polimorfismo R615C en la proteína RYR1 porcina, en relación al parámetro, potencial electrostático. En el caso de la RYR1 bovina, los polimorfismos K827E, C762W y

E832G modifican el potencial electrostático respecto al silvestre, lo que puede influir en la interacción intermolecular de RYR1 o su asociación con otras proteínas reguladoras.

Para el caso de la Desmina se obtuvo un modelo tridimensional desde el aminoácido 39 al 470 y se lograron postular a las mutaciones 45C y 49C del ARNm del bovino, como causantes de una modificación en la estructura bidimensional de esta molécula, conjuntamente a una disminución en su estabilidad *in-silico*. En los genes del sistema de enzimas de la  $\mu$ -Calpaína y Calpastatina, varios polimorfismos fueron postulados como potencialmente asociados dado una modificación importante en parámetros físico-químicos del ARNm (estabilidad y polimorfismo conformacional) y de la proteína (punto isoelectrico, potencial electrostático y superficie molecular).

La CRA de la carne sobresale de las demás características de calidad cárnica, dado a su asociación no únicamente a la percepción sensorial adquirida por el consumidor (jugosidad), sino que también puede ser de importancia en la cadena productiva por su relación al parámetro de mermas en crudo y al cocinar la carne. La CRA es influenciada durante el período de maduración por múltiples factores genéticos y medio ambientales pero aún existe un desconocimiento importante del efecto de la raza y/o cruce del animal (sobre todo en los tipos raciales más empleados para la producción cárnica en Colombia) y del efecto del tiempo de maduración PM. Al determinar el efecto de estos dos factores (cruce y maduración) y su posible interacción se obtuvo que el parámetro CRAR en LD presentó significancia de los factores Cruce y Maduración y en ST del factor Maduración. Para el parámetro de CRAc en LD fue significativo el factor Cruce y para ST ninguno de los dos factores ni su interacción fueron significativos.

Otro aspecto importante, es el establecimiento de una relación entre parámetros de calidad cárnica asociados a la CRA y otros parámetros de calidad de la pieza cárnica. Una correlación significativa fue encontrada entre CRAR-pH, CRAR-CRAc, CRAc-pH y CRAc-WBSF en ambos músculos evidenciando la relación entre estos parámetros de calidad cárnica y la CRA.

Finalmente, se encontró la asociación con ambos parámetros evaluados (CRAR y CRAc) y los marcadores CAST2959, RYR1-13638 y RYR1-27970, siendo los genotipos benéficos AA, CC y CC respectivamente, convirtiéndolos en polimorfismos potencialmente útiles en procesos de selección animal y mejoramiento de este parámetro de calidad cárnica. Adicionalmente se reporta la existencia de la interacción Marcador\*tiempo de Maduración y Marcador\*Grupo racial en

varios polimorfismos evaluados, siendo principalmente este último una potencialidad de los individuos *Bos indicus* respecto a su cruce con *Bos taurus*.

Entre las recomendaciones prácticas formuladas a partir de las conclusiones obtenidas en el presente documento se pueden clasificar según se aplicabilidad:

Primero a nivel productivo, es importante tener en cuenta el cruce (y muy probablemente la raza, que no fue tratada como tal en este documento) al momento de realizar el proceso de almacenamiento, dado que algunos cruces presentan una desventaja comparativa respecto a otros en el músculo *Longissimus dorsi*, por lo que requieren de algún manejo tecnológico especial o simplemente a nivel de finca incentivar cruces de mejor desempeño en los parámetros CRAR y CRAC, como es el caso del Limousin-BB. Adicionalmente, al realizar la maduración de la carne en el *post-mortem*, es importante recalcar que los tiempos ideales corresponden a tiempos cortos (7 días) dado que si este tiempo se incrementa, la pérdida de peso de la carne y posiblemente la percepción sensorial del consumidor se verán afectadas, además de incrementar aspectos técnicos del proceso como los relacionados con la disponibilidad de infraestructura y manejo. Finalmente, se reportan un total de tres SPNs (dos en el gen RYR1 y uno en CAST1) que presentaron asociación con los parámetros evaluados de la CRA de una manera muy consistente, dado que se presentaron al evaluar la CRAR y la CRAC de manera simultánea, lo que los convierte en posibles candidatos a ser incluidos en programas de selección que tengan como finalidad incrementar el desempeño de los animales en este parámetro de calidad cárnica.

La segunda recomendación, surge desde el punto de vista investigativo, en donde la formulación de un sustento biológico a las asociaciones presentadas en un documento deben ser primordiales y el uso de herramientas bioinformáticas como los análisis *in-silico*, corresponden a una muy buena opción, dado que permiten conocer el funcionamiento de las moléculas de ARNm y proteínas evaluadas, además de las alteraciones “teóricas” producidas por mutaciones en parámetros moleculares de importancia. Adicionalmente, estas herramientas computacionales pueden ser de utilidad en procesos de evaluación de genes candidato y selección de mutaciones de estos últimos, que en mayor medida pueden presentar una contribución importante sobre el fenotipo de los individuos, en parámetros productivos que son los que nos atañen. Respecto a lo anterior, se presenta un listado de mutaciones en los cinco genes evaluados, que poseen una gran probabilidad de estar asociados a parámetros de calidad cárnica y que deben ser incluidos en un posterior

estudio de asociación, con el fin de verificar *in-vivo* la aplicabilidad de este tipo de análisis (aunque existe una gran cantidad de literatura disponible que ha previamente reportado su validez).

Respecto al posible efecto de las mutaciones RN- del PRAKG3 y R615C (n) del RYR1 del porcino, es necesario considerar inicialmente escenarios *in-vitro*, que permitan evaluar y dar un mayor sustento a estas teorías, dado que son postulaciones no formuladas previamente, que posibilitarían una mayor comprensión de los mecanismos de acción de ambas proteínas y su efecto en el fenotipo reportado en la literatura.

Es importante recalcar que todas las asociaciones realizadas en el presente documento deben ser sometidas a un proceso de validación en poblaciones más grandes no relacionadas en el país, con el fin de poder ser incluidas en planes de selección animal, que tengan como objetivo, el mejoramiento de las características asociadas a la CRA evaluadas en el presente estudio. Además de la necesidad de aplicar nuevas tecnologías como la PCR-RT, RNA-seq y secuenciación masiva en paralelo, con el fin de evaluar estos genes a otro nivel genético y/ó postular nuevos genes candidato posiblemente asociados a características de calidad cárnica, como lo son los genes de ARN no codificante.

## A. Anexo: Valores promedio de WHSF y pH

Valores promedio de WBSF sin ajustar de los datos empleados en las correlaciones con las características CRA							
		Promedio	SE			Promedio	SE
LD	BON	26.55	3.03	ST	BON	26.55	3.03
	BB	25.10	3.28		BB	25.10	3.28
	BR	25.26	2.60		BR	25.26	2.60
	Braunvieh	25.34	3.51		Braunvieh	25.34	3.51
	Guzerat	26.05	3.01		Guzerat	26.05	3.01
	Limousin	25.57	2.97		Limousin	25.58	2.97
	Normando	27.06	2.81		Normando	27.06	2.81
	Romosinuano	26.22	3.52		Romosinuano	26.22	3.52
	Simental	26.31	3.23		Simental	26.31	3.23
	7 días	22.96	11.46		7 días	26.05	3.37
	14 días	23.51	11.83		14 días	26.40	3.27
	21 días	23.14	12.01		21 días	25.03	2.71
Valores promedio de pH sin ajustar de los datos empleados en las correlaciones con las características CRA							
		Promedio	SE			Promedio	SE
LD	BON	5.50	0.17	ST	BON	5.50	0.16
	BB	5.40	0.18		BB	5.47	0.17
	BR	5.40	0.17		BR	5.45	0.14
	Braunvieh	5.46	0.17		Braunvieh	5.45	0.12
	Guzerat	5.48	0.10		Guzerat	5.50	0.08
	Limousin	5.43	0.21		Limousin	5.50	0.18
	Normando	5.46	0.12		Normando	5.47	0.12
	Romosinuano	5.41	0.17		Romosinuano	5.44	0.11
	Simental	5.48	0.16		Simental	5.52	0.14
	7 días	5.51	0.11		7 días	5.51	0.11
	14 días	5.45	0.18		14 días	5.45	0.18
	21 días	5.35	0.16		21 días	5.35	0.18

## B. Anexo: Evaluación de los modelos proteicos

Valores de Ramachandran plot para cada uno de los modelos obtenidos por gen.

Proteína	Modelo	Figura	Regiones en Gráfica de Ramachandram			
			Más favorables (%)	Frecuentemente permitidas (%)	Generosamente permitidas (%)	No permitidas (%)
PRKAG3		3-7	88.4	10.5	0.7	0.4
RYR1	Modelo 12-532	4-3	85.5	12.1	2.0	0.4
	Modelo 533-1000	4-3	78.6	16.3	3.3	1.8
	Modelo 1001-1500	4-3	73.5	20.0	3.7	2.8
	Modelo 1501-2000	4-3	78.5	14.8	3.7	3.0
	Modelo 2001-2500	4-3	81.5	11.9	2.9	3.7
	Modelo 2501-3000	4-3	88.4	8.6	1.5	1.5
	Modelo 3001-3500	4-3	87.6	8.2	2.2	2.0
	Modelo 3501-4000	4-3	87.2	8.4	1.5	3.0
	Modelo 4001-4500	4-3	84.3	10.3	3.0	2.5
Modelo 4500-5040	4-3	82.7	11.4	4.0	1.9	
DES		5-5	86.9	8.3	2.8	2.1
CAPN1	CAPN1	6-4	71.0	22.9	4.5	1.6
	CAPN1-CAPNS-Ca <sup>2+</sup>	6-4	89.6	9.6	0.4	0.4
	CAPN1-CAPNS-Ca <sup>2+</sup> -CAST	6-4	89.7	9.6	0.4	0.4
CAST		6-4	75.8	17.3	5.4	1.5

## C. Anexo: Posición de las mutaciones evaluadas

Nombre posición	Nucleótido	Secuencia contenedora
CAPN 5331	161	GAGGGCGGGG(A/T)GGAGCGCTCT
CAPN 316	5544	GAGTGGAACG(C/G)CGTGGACCCT
CAPN 530	22128	GGATGACCAG(A/G)TCCAGGCCAA
CAPN 4751	24114	GGGGGGAAAA(T/C)CGAGGCGCAG
UoGCAST	84719	TTCAAATTTT(G/C)TACCCAAAGT
CAST 1	85920	AGAAGGACTT(T/C)TTCGTTATGA
CAST 2870	134877	TAGTATTTTC(A/G)ATTTGCACTT
CAST 2959	134966	CTTTCCTCTT(G/A)GACTTGTGGA
PRKAG3-1526	1526	CAGCCTCCCC(G/T)CTGACTGTAC
PRKAG3-2180	2180	AAACAAGGTA(C/T)ATCATTTTGA
PRKAG3-2745	2745	AAGCAGAGCTT(C/T)GTGGGTGAGG
PRKAG3-2925	2925	GGTCCAGGGT(A/G)AACCCCACTC
PRKAG3-2961	2961	CCCACCCCCC(A/G)CAGGGATGCT
PRKAG3-3047	3047	TCAGGGTCCT(A/G)GGGGCACCCA
PRKAG3-3068	3068	TCTGGACTGG(A/G)GCGGAAGGAG
PRKAG3-3078	3078	GGCGGAAGGA(A/G)TTCAGGAAGC
PRKAG3-5898	5898	CTCCTGGGTT(G/A)GTGTCCCTCT
RYR1-11195	11195	ATGCTGCCCC(G/A)GACCCCAAGG
RYR1-13638	13638	ACATGGACGA(T/C)GCACTGTCAC
RYR1-20298	20298	AGCTTCTGCT(G/A)CAGACAAACC
RYR1-21643	21643	TCAGCTGCTG(T/C)CTGGACCTCA
RYR1-26680	26680	TGGGCATGGC(C/A)GATGAGAAGG
RYR1-27871	27871	TCCCTGCCC(G/C)CGGAACCCCTC
RYR1-27970	27970	TGCTGGGCTA(T/C)GGCTACAACA
RYR1-27982	27982	TGCTGGGCTA(T/C)GGCTACAACA
RYR1-28046	28046	CCCTGGACTC(G/C)AATCTCTGAC
RYR1-28068	28068	CAACTCAGCC(T/C)CTCAGTGGGC

## D. Anexo: Mutaciones importantes *in-silico* y su relación *in-vivo*.

Gen	Secuencia	Número de Acceso	Afecta	Secuencia	Número de Acceso	Afecta
PRKAG3	1	<a href="#">rs109995479</a>	Proteina	17	<a href="#">rs43315200</a>	ARNm
	15	<a href="#">rs43315202</a>	ARNm	28	<a href="#">rs43315190</a>	ARNm
	16	<a href="#">rs43315201</a>	ARNm			
RYR1	2*	<a href="#">ss267582941</a>	Proteina	4	<a href="#">ss267582943</a>	Proteina
	3	<a href="#">ss414337672</a>	Proteina	8	<a href="#">ss62464423</a>	Proteina
	3	<a href="#">ss414337672</a>	Proteina			
DES	1	<a href="#">rs135943644</a>	ARNm	5	<a href="#">rs132973368</a>	ARNm
	2	<a href="#">rs136748725</a>	ARNm			
CAPN1	CN2	<a href="#">ss28452420</a>	ARNm	CN11	<a href="#">ss28451392</a>	ARNm
	CN5	<a href="#">ss28452434</a>	ARNm	CN12	<a href="#">ss269202966</a>	ARNm
	CN6	<a href="#">ss28450971</a>	ARNm			
CAST	CS1	<a href="#">ss140795116</a>	Proteina	CS23	<a href="#">ss430490955</a>	ARNm
	CS11	<a href="#">ss115456740</a>	Proteina	CS26	<a href="#">ss430490956</a>	ARNm
	CS12	<a href="#">ss115456748</a>	ARNm	CS28	<a href="#">ss423036990</a>	ARNm
	CS13	<a href="#">ss115456750</a>	ARNm	CS29	<a href="#">ss77831765</a>	ARNm
	CS14	<a href="#">ss115456769</a>	Proteina	CS4	<a href="#">ss423036926</a>	Proteina
	CS17	<a href="#">ss430490950</a>	ARNm	CS5	<a href="#">ss77832279</a>	ARNm
	CS22	<a href="#">ss430490954</a>	ARNm	CS9	<a href="#">ss115456738</a>	ARNm

\*Polimorfismo de importancia *in-silico* pero no polimórfico en la población analizada. Las restantes mutaciones no fueron evaluadas *in-vivo*, ya que los análisis *in-silico* realizados en el presente documento fueron posteriores a la selección de regiones a evaluar en el estudio de asociación.

## E. Anexo: Script para ubicación de polimorfismos en la secuencia del gen

Aunque el proceso de ubicación de mutaciones en el ADN, ARN y proteína se realizó de manera manual, el siguiente script en perl fue desarrollado posteriormente para realizar este procedimiento de manera automatizada. El script requiere como input la secuencia del gen existente en el repositorio y la secuencia de la mutación reportada en la base de datos, por ejemplo: TGATTGCTTGTGGTCACTGAGACAAT(A/T) ACACCGAAATCCATCACTCCGACTTT. Esta secuencia es consignada en el script para la asignación del arreglo @SNP, eliminado el segmento ACACCGAAATCCATCACTCCGACTTT.

```
#!/usr/bin/perl
use strict;
use warnings;

my $gene="../DATA/GENE.txt"; # Importación de la secuencia
del gen X y su asignamiento a la variable $gene
open (FILE1,"<$gene") || die "ERROR: No puedo abrir el
fichero $gene\n";

$gene=<FILE1>;

#.....UBICACIÓN DE UNA MUTACIÓN EN LA
SECUECNIA DE ADN SILVESTRE.....

my $genemut = "../RESULTS/GENEMUT.txt"; # Creación de un
archivo para guardar la secuencia mutada del gen X
open (FILE2,">$genemut") || die "ERROR: No puedo abrir el
fichero $genemut\n";

my @SNP = ("TGATTGCTTGTGGTCACTGAGACAAT", "A", "T"); #
Definición del array contenedor de la información
suministrada en bases de datos sobre el polimorfismo a
evaluar
```

```
my $positioning = index($gene, $SNP[0]); # Ubicación de
TGATTGCTTGTGGTCACTGAGACAAT en la secuencia del gen X dando
como resultado la posición del primer nucleotido (Timina)
del elemento 0 de @SNP.
my $positionSNP = $positioning+26; # Se adicionan 26
nucleotidos a $positioning ya que es el número de
posiciones necesarias para obtener la posición exacta de la
mutación (longitud de TGATTGCTTGTGGTCACTGAGACAAT)

    if ($SNP[1] ne substr($gene,$positionSNP,1)) { #
Estructura de control, si el nucleotido existente en $gene
en la posición $positionSNP es diferente al segundo elemento
de @SNP
    my $geneSNP = substr($gene, $positionSNP, 1, $SNP[1]); #
Reemplacelo por el segundo elemento de @SNP
    }
    else { # si no es si
    my $geneSNP = substr($gene, $positionSNP, 1, $SNP[2]); #
Reemplacelo por el tercer elemento de @SNP, dado que solo
hay dos opciones en este SNP
    }

print FILE2 $gene; # Guarda la secuencia mutada en el
archivo GENEMUT.txt

close (FILE1); # Cierra archivo GENE.txt
close (FILE2); # Cierra archivo GENEMUT.txt
```

## Bibliografía

1. Aaslyng, M., Bejerholm, C., Ertbjerg, P., Bertram, H. y Andersen, H., 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Quality and Preference*, 14, pp.277-288.
2. Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet, N., Raynaud, P., Hocquette, J., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard, C. y Renand, G., 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*, 89, pp.1-11.
3. Andrade, E., 2011. La dualidad análogo digital de la información se ejemplifica en el estudio de las moléculas de RNA. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), pp.15-42.
4. Anzola, H., 2005. Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. *Archivos de Zootecnia*, 54, pp.141-144.
5. Aranguren, J., Portillo, M., Flores, C., Villasmil, Y., Rojas, I., Torres, P. y Contreras, G., 2011. Frecuencia alélica del gen de la calpastatina en el ganado criollo limonero. *Revista de la Universidad del Zulia*, 2, pp.194-202.
6. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. y Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), pp.195-201.
7. Aslan, O., Hamill, R., Mullen, A., Davey, G., Gil, M., Gladney, C. y Sweeney, T., 2012. Association between promoter polymorphisms in a key cytoskeletal gene (Ankyrin 1) and intramuscular fat and water-holding capacity in porcine muscle. *Molecular Biology Reports*, 39(4), pp.3903-3914.
8. Astruc, T., Gatellier, P., Labas, R., Santé, V. y Marinova, P., 2010. Microstructural changes in m. rectus abdominis bovine muscle after heating. *Meat Science*, 85, pp.743-751.
9. Baker, M., Serysheva, I., Sencer, S., Wu, Y., Ludtke, S., Jiang, W., Hamilton, S. y Chiu, W., 2002. The skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel has an oxidoreductase-like domain. *PNAS*, 99, pp.12155-12160.

10. Baker M., 2011. Long noncoding RNAs: the search for function. *Nature Methods*, 8, pp.379-383
11. Bar, H., Strelkov, S., Sjoberg, G., Aebi, U. y Herrmann, H., 2004. The biology of desmin filaments, pp.how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?. *Journal of Structural Biology*, 148, pp.137-152
12. Barbanti, D. y Pasquini, M., 2005. Influence of cooking conditions on cooking loss and tenderness of raw and marinated chicken breast meat. *LWT-Food Science and Technology*, 38, pp.895-901.
13. Barbera, S. y Tassone, S., 2006. Meat cooking shrinkage: Measurement of a new meat quality parameter. *Meat Science*, 73, pp.467-474.
14. Barendse, W., Harrison, B., Hawken, R., Ferguson, D., Thompson, J., Thomas, M. y Bunch, R., 2007. Epistasis between Calpain 1 and its inhibitor Calpastatin within breeds of cattle. *Genetics Society of America*, 176, pp.2601-2610.
15. Barnes, B., Glund, S., Chau, Y., Hjälml, G., Andersson, L. y Zierath, J., 2005. 5'-AMP-activated protein kinase regulates skeletal muscle glycogen content and ergogenics. *The FASEB Journal*, 19, pp.773-779.
16. Barone, V., Bertocchini, F., Bottinelli, R., Protasi, F., Allen, P., Armstrong, C., Reggiani, C. y Sorrentino, V., 1998. Contractile impairment and structural alterations of skeletal muscles from knock-out mice lacking type 1 and type 3 ryanodine receptors. *FEBS Letters*, 422, pp.160-164.
17. Bartoszewski, R., Jablonsky, M., Bartoszewska, S., Stevenson, L., Dai, Q., Kappes, J., Collawn, J. y Bebok, Z., 2010. A synonymous single nucleotide polymorphism in F508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, pp.28741-28748.
18. Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J. y Guedes, E., 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* . 5 (1), 7-15.
19. Bee, G., Anderson, A., Lonergan, S. y Huff-Lonergan, E., 2007. Rate and extent of pH decline affect proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. *Meat Science*, 76, pp.359-365.
20. Bergh, M., Ertbjerg, P. y Therkildsen, M., 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and  $\mu$ -calpain. *Meat Science*, 79, pp.77-85.

21. Bertram, H., Andersen, H., Karlsson, A., Horn, P., Hedegaard, J., Nørgaard, L. y Engelsen, S., 2003. Prediction of technological quality (cooking loss and Napole Yield) of pork based on fresh meat characteristics. *Meat Science*, 65, pp.707-712.
22. Beteta, O. 1997. Las razas autóctonas españolas y su participación en los bovinos criollos iberoamericanos. Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto. Razas bovinas creadas en Latinoamérica y el Caribe. Castello, 45 - Izda, 28001, Madrid, España. Simposium sobre utilizacion de razas y tipos de bovinos creados y desarrollados en Latinoamerica y el Caribe. ALPA, XV Reunion, Maracaibo, Venezuela, 24-28 de Noviembre.
23. Birk, J. y Wojtaszewski, J., 2006. Predominant  $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$  AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 577, pp.1021-1032.
24. Boehm, M., Kendall, T., Thompson, V. y Goll, D., 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 76, pp.2415-2434.
25. Bond, J. y Warner, R., 2007. Ion distribution and protein proteolysis affect water holding capacity of Longissimus thoracis et lumborum in meat of lamb subjected to antemortem exercise. *Meat Science*, 75, pp.406-414.
26. Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J. y Schwede, T., 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4.
27. Bouhrara, M., Clerjon, S., Damez, J., Chevarin, C., Portanguen, S., Kondjoyan, A. y Bonny, J., 2011. Dynamic MRI and thermal simulation to interpret deformation and water transfer in meat during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp.1229-1235.
28. Bouhrara, M., Lehallier, B., Clerjon, S., Damez, J. y Bonny, J., 2012. Mapping of muscle deformation during heating, pp.in situ dynamic MRI and nonlinear registration. *Magnetic Resonance Imaging*, 30, pp.422 - 430.
29. Brunner, R., Srikanchai, T., Murani, E., Wimmers, K. y Ponsuksili, S., 2012. Genes with expression levels correlating to drip loss prove association of their polymorphism with water holding capacity of pork. *Molecular Biology Reports*, 39, pp.97-107.
30. Café, L., McIntyre, B., Robinson, D., Geesink, G., Barendse, W. y Greenwood, P., 2010a. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle, 1. Growth, efficiency, temperament, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, 88, pp.3047-3058.

31. Café, L., McIntyre, B., Robinson, D., Geesink, G., Barendse, W., Pethick, D., Thompson, J. y Greenwood, P., 2010b. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality. *Journal of Animal Science*, 88, pp.3059-3069.
32. Calvo, S., Martínez, E., Tirado, J., Corrales, J., Montoya, S., Burgos, W., Cerón, M. y Moreno, M., 2009. Caracterización genética de las razas criollas BON y Romosinuano. *Livestock Research for Rural Development* 21(4).
33. Campo, M., Santolaria, P., Sañudo, C., Lepetit, J., Olleta, J., Panea, B. y Albertí, P., 2000. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 55, pp.371-378.
34. Casas, E., White, S., Wheeler, T., Shackelford, S., Koohmaraie, M., Riley, D., Chase, C., Johnson, D. y Smith, T., 2006. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84, pp.520-525.
35. Casas, E., White, S., Riley, D., Smith, T., Brenneman, R., Olson, T., Johnson, D., Coleman, S., Bennett, G. y Chase, C., 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83, pp.13-19.
36. Chambaz, A., Scheeder, M., Kreuzer, M. y Dufey, P., 2003. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Science*, 63, pp.491-500.
37. Chan, E., Nagaraj, S. y Reverter, A., 2010. The evolution of tropical adaptation: Comparing Taurine and Zebu cattle. Cooperative Research Centre for Beef Genetic Technologies CSIRO Livestock Industries, Queensland Bioscience Precinct 306 Carmody Rd., St. Lucia, Brisbane, Queensland 4067, Australia
38. Chang, K., Beuzen, N. y Hall, A., 2003. Identification of Microsatellites in Expressed Muscle Genes: Assessment of a Desmin (CT) Dinucleotide Repeat as a Marker for Meat Quality. *The Veterinary Journal*, 165, pp.157-163.
39. Cheng, Q. y Sun, D., 2008. Factors affecting the water holding capacity of red products: a review of recent research advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, pp.137-159.
40. Chiavaro, E., Rinaldi, M., Vittadini, E. y Barbanti, D., 2009. Cooking of pork Longissimus dorsi at different temperature and relative humidity values, pp.Effects on selected physico-chemical properties. *Journal of Food Engineering*, 93, pp.158-165.

41. Christensen, L., Bertram, H., Aaslyng, M. y Christensen, M., 2011. Protein denaturation and water-protein interactions as affected by low temperature long time treatment of porcine Longissimus dorsi. *Meat Science*, 88, pp.718-722.
42. Christensen, M., Purslow, P. y Larsen, L., 2000. The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Scienc*, 55, pp.301-307.
43. Chung, H. y Davis, M., 2011. Effects of calpain genotypes on meat tenderness and carcass traits of Angus bulls. *Molecular Biology Reports*, 38, pp.4575-4581.
44. Chung, H., Davis, M. y Hines, H., 2000. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. Department of Animal Sciences, The Ohio State University, 2027 Coffey Road, Columbus OH 43210, USA.
45. Ciobanu, D., Bastiaansen, J., Lonergan, S., Thomsen, H., Dekkers, J., Plastow, G. y Rothschild, M., 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 82, pp.2829-2839.
46. Cornea, R., Nitu, F., Samso, M., Thomas, D. y Fruen, B., 2010. Mapping the Ryanodine Receptor FK506-binding Protein subunit using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, pp.19219-19226.
47. Corva, P., 2010. Genómica Bovina, pp.Dónde estamos. Hacia dónde vamos. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 21(2).
48. Corva, P., Soria, L., Schor, A., Villarreal, E., Pérez, M., Motter, M., Mezzadra, C., Melucci, L., Miquel, C., Paván, E., Depetris, G., Santini, F. y Grigera, J., 2007. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in Bos Taurus beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 30(4), pp.1064-1069.
49. Costello, S., O'Doherty, E., Troy, D., Ernst, C., Kim, K., Stapleton, P., Sweeney, T. y Mullen, A., 2007. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine M. longissimus dorsi. *Meat Science*, 75, pp.551-557.
50. Cui, J., Du, H., Liang, Y., Deng, X., Li, N. y Zhang, X., 2006. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken Prolactin with egg production. *Poultry Science*, 85, pp.26-31.
51. Curi, R., Chardulo, J., Giusti, J., Silveira, A., Martins, C. y de Oliveira, H., 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat

- traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*-*Bos indicus* cross beef cattle. *Meat Science*, 86, pp.915-920.
52. Dekkers, J., 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock, pp.Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, 82, pp.313-328.
  53. Duan, J., Wainwright, M., Comeron, J., Saitou, N., Sanders, A., Gelernter, J. y Gejman, P., 2003. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics*, 12(3), pp.205-216.
  54. Duke, A., Hopkins, P., Calaghan, S., Halsall, J. y Steele, D., 2010. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in Malignant Hyperthermia-susceptible human skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), pp.25645-25653.
  55. Duque, J., Sánchez, A., Fierro, L. y Castaño, R., 2009. Aproximación In Silico a la estructura 3D de la proteína antiveneno Dm64 de la Zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: didelphidae). *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exáctas, Física y Naturales*, 33(126), pp.103-123.
  56. Dziejewski, B., Kurzawski, M., Paczkowska, E., Machalinski, B. y Pawlik, A., 2012. The impact of IL18 gene polymorphisms on mRNA levels and interleukin-18 release by peripheral blood mononuclear cells. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 66, pp.409-414.
  57. Enfält, A., von Seth, G., Josell, A., Lindahl, G., Hedebro, I., Braunschweig, M., Andersson, L. y Lundström, K., 2006. Effects of a second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus on carcass composition in pigs. *Livestock Science*, 99, pp.131- 139.
  58. Farouk, M., Mustafa, N., Wu, G. y Krsinic, G., 2012. The “sponge effect” hypothesis: An alternative explanation of the improvement in the water holding capacity of meat with ageing. *Meat Science*, 90, pp.670-677.
  59. FEDEGAN., 2006. Federación Colombiana de Ganaderos. Plan estratégico de la ganadería colombiana 2019.
  60. Felder, E., Protasi, F., Hirsch, R., Franzini, C. y Allen, P., 2002. Morphology and Molecular Composition of Sarcoplasmic Reticulum Surface Junctions in the Absence of DHPR and RyR in Mouse Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, 82, pp.3144-3149.
  61. Fessenden, J., Feng, W., Pessah, I. y Allen, P., 2004. Mutational analysis of putative calcium binding motifs within the skeletal Ryanodine Receptor isoform, RyR1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51), pp.53028-53035.

62. Fontanesi, L., Davoli, R., Nanni, L., Beretti, F., Scotti, E., Tazzoli, M., Tassone, F., Colombo, M., Buttazzoni, L. y Russo, V., 2008. Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: Association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs. *Meat Science*, 80, pp.780-787.
63. Geesink, G., Kuchay, S., Chishti, A. y Koohmaraie, M., 2006.  $\mu$ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*, 84, pp.2834-2840.
64. Geesink, G., Taylor, R. y Koohmaraie, M., 2005. Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. *Journal of Animal Science*, 83, pp.1646-1652.
65. Gil, M., Hortós, M. y Sárraga, C., 1998. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of longissimus porcine muscle from normal and PSE meat. *Food Chemistry*, 63, pp.385-390.
66. Gill, J., Bishop, S., McCorquodale, C., Williams, J. y Wiener, P., 2010. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Science*, 86, pp.985-993.
67. Goldfarb, L., Vicart, P., Goebel, H. y Dalakas, M., 2004. Desmin myopathy. *Brain*, 127, pp.723-734.
68. Goñi, S. y Salvadori, V., 2010. Prediction of cooking times and weight losses during meat roasting. *Journal of Food Engineering*, 100, pp.1-11.
69. Grahame, D., 2005. New roles for the LKB1  $\rightarrow$ AMPK pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, pp.167-173.
70. Halvorsen, M., Martin, J., Broadaway, S. y Laederach, A., 2010. Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genetics*, 6(8).
71. Hamilton, S., 2005. Ryanodine receptors. *Cell Calcium*, 38, pp.253-260.
72. Hanna, R., Campbell, R. y Davies, P., 2008. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, 456.
73. Hanna, R., Garcia, B. y Davies, P., 2007. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Letters*, 581, pp.2894-2898.
74. Harper, G., 1999. Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. *Australian Journal Agricultural Research*, 50, pp.1105-1129.
75. Hoggart, C., Whittaker, J., De Iorio, M. y Balding, D., 2008. Simultaneous Analysis of All SNPs in Genome-Wide and Re-Sequencing Association Studies. *PLoS Genetics*, 4(7).
76. Huff-Lonergan, H. y Lonergan, S. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat, The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, pp.194-204.

77. Huff-Lonergan, H. y Lonergan, S., 2008. Interaction between structure and proteolytic tenderization in beef. Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.
78. Hwang, J., Zorzato, F., Clarke, N. y Treves, S., 2012. Mapping domains and mutations on the skeletal muscle ryanodine receptor channel. Trends in Molecular Medicine, 18(11), pp.644-657.
79. Ikemoto, T., Komazaki, S., Takeshima, H., Nishi, M., Noda, T., Linot, M. y Endo, M., 1997. Functional and morphological features of skeletal muscle from mutant mice lacking both type 1 and type 3 ryanodine receptors. Japanese Journal of Physiology, 50(2), pp.305-312.
80. International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409.
81. Iwanowska, A., Grzes, B., Mikołajczak, B., Iwanska, E., Juszczak, E., Rosochacki, S. y Pospiech, E., 2011. Impact of polymorphism of the regulatory subunit of the  $\mu$ -calpain (CAPN1S) on the proteolysis process and meat tenderness of young cattle. Molecular Biology Reports, 38, pp.1295-1300.
82. Jeremiah, L., Gibson, J., Gibson, L., Ball, R., Aker, C. y Fortin, A., 1999. The influence of breed, gender, and PSS (Halothane) genotype on meat quality, cooking loss, and palatability of pork. Food Research International, 32, pp.59-71.
83. Jiang, D., Chen, W., Xiao, J., Wang, R., Kong, H., Jones, P., Zhang, L., Fruen, B. y Wayne, S., 2008. Reduced threshold for luminal  $Ca^{2+}$  activation of RyR1 underlies a causal mechanism of porcine Malignant Hyperthermia. The Journal of Biological Chemistry, 283(30), pp.20813-20820.
84. Johnson, A., Trumbower, H. y Sadee, W., 2011. RNA structures affected by single nucleotide polymorphisms in transcribed regions of the human genome. Bioinformatics, 27(2).
85. Kaplan, H., Hill, K., Lancaster, J. y Hurtado, A., 2000. A theory of human life history evolution: diet, intelligence, and longevity. Evolutionary Anthropology, 9(4), pp.156-185.
86. Kapprell, H. y Darrel, E., 1989. Effect of  $Ca^{2+}$  on Binding of the Calpains to Calpastatin. The Journal of Biological Chemistry, 264, pp.17888-17896.
87. Klaff, P., Riesner, D. y Steger, G., 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. Plant Molecular Biology, 32, pp.89-106.

88. Kolczak, T., Krzysztoforski, K. y Palka, K., 2007. The effect of post-mortem ageing and heating on water retention in bovine muscles. *Meat Science*, 75, pp.655-660.
89. Kolczak, T., Palka, K. y Lacki, J., 2005. Water retention, shear force and texture parameters of cattle Psoas and Semitendinosus muscles unfrozen and frozen during Post-mortem ageing. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(55), pp.17-26.
90. Koohmaraie, M. y Geesink, G., 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, 74, pp.34-43.
91. Kristensen, L., Christensen, M. y Ertbjerg, P., 2006. Activities of calpastatin,  $\mu$ -calpain and m-calpain are stable during frozen storage of meat. *Meat Science*, 72, pp.116-120.
92. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305, pp.567-580.
93. Lahucky, R., Christian, L., Kovaq, L., Staldert, J. y Bauerova, M., 1997. Meat Quality Assessed Ante- and Post Mortem by Different Ryanodine Receptor Gene Status of Pigs. *Meat Science*, 47(3-4), pp.277-285.
94. Lametsch, R., Roepstorff, P., Møller, H. y Bendixen, E., 2004. Identification of myofibrillar substrates for  $\mu$ -calpain. *Meat Science*, 68, pp.515-521.
95. Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Blinet, S., Pinguet, J., Fillaut, M., Glenisson, J. y ChereL, P., 2009. Differences in Pig Muscle Proteome According to HAL Genotype: Implications for Meat Quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, pp.4913-4923.
96. Lawson, M., 2004. The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork. *Meat Science*, 68, pp.559-566.
97. Lee, Y., Kwon, E., Cho, E., Park, D., Kim, B., Park, H., Park, B., Jang, I., Choi, J., Bang, W. y Kim, C., 2011. Association analysis of polymorphism in KIAA1717, HUMMLC2B, DECR1 and FTO genes with meat quality traits of the Berkshire breed. *African Journal of Biotechnology*, 10(25), pp.5068-5074.
98. Li, C., Zhou, G. y Xu, X., 2010. Dynamical Changes of Beef Intramuscular Connective Tissue and Muscle Fiber during Heating and their Effects on Beef Shear Force. *Food and Bioprocess Technology*, 3, pp.521-527.
99. Li, J., Zhang, L., Gan, Q., Li, J., Gao, H., Yuan, Z., Gao, X., Chen, J. y Xu, Z., 2010. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in chinese

- commercial cattle herds. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23(11), pp.1405-1411.
100. Lindahl, G., Enält, A., Von Seth, G., Josell, A., Hedebro, I., Andersen, H., Braunschweig, M., Andersson, L., Lundstöm, K., 2004a. A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus—II. Effect on colour characteristics of pork loin. Meat Science, 66, pp.621-627.
101. Lindahl, G., Enält, A., Von Seth, G., Josell, A., Hedebro, I., Andersen, H., Braunschweig, M., Andersson, L. y Lundstöm, K., 2004b. A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus—Effect on technological meat quality of pork loin. Meat Science, 66, pp.609-619.
102. Lobo, P. y Van Petegem, F., 2009. Crystal structures of the N-terminal domains of cardiac and skeletal muscle Ryanodine Receptors: Insights into disease mutations. Structure, 17, pp.1505-1514.
103. Long, Y., Barnes, B., Mahlapuu, M., Steiler, T., Martinsson, S., Leng, Y., Wallberg, H., Andersson, L. y Zierath, J., 2005. Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. Diabetologia, 48, pp.2354 - 2364.
104. López, A., Saldarriaga, O., Arango, A., Rugeles, M., Zuluaga, F., Olivera, M., Bermúdez, N., Bedoya, G. y Ossa, J., 2001. Ganado Blanco Orejinegro (BON): Una alternativa para la producción en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 14(2), pp.121-128.
105. Ludtke, S., Serysheva, I., Hamilton, S. y Chiu, W., 2005. The pore structure of the closed RyR1 channel. Structure, 13, pp.1203-1211.
106. Majidi, A., Panandam, J., Sazili A. y Siraj S., 2009. Characterization of bovine Calpastatin gene in Nelore cattle using Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphisms. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 4(4), pp.92-94.
107. Malek, M., Dekkers, J., Lee, H., Baas, T., Prusa, K., Huff-Lonergan, E. y Rothschild, M., 2001. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. Mammalian Genome, 12, pp.637-645.
108. Mansoori, M., Golalipour, M., Alizadeh, S., Jahangirerad, A., Khanduzi, S. y Shahbazi, M., 2012. RS28381943 SNP of ABCB1 gene may be the reason of mRNA stabilization which may lead to gene overexpression. 2012 International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (ICBCB 2012). IPCSIT, 34.

109. Marchler, A. y Bryant, S., 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, 32 (Web Server issue), pp.W327-31.
110. Mardis, E., 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470, pp.198-203.
111. Mariño, G., Vilca, M. y Ramos, D., 2005. Evaluación del pH en canales de toros Holstein (*Bos taurus*) y Nelore (*Bos indicus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 16(1), pp.90-95.
112. Marks, A., Taubman, M., Saito, A., Dai, Y. y Fleischert, S., 1991. The Ryanodine Receptor/Junctional channel complex is regulated by growth factors in a myogenic cell line. *The Journal of Cell Biology*, 114(2), pp.303-312
113. Marks, A., Tempst, P., Hwang, K., Taubman, M., Inui, M., Chadwick, C., Fleischer, S. y Nadal, B., 1989. Molecular cloning and characterization of the Ryanodine Receptor/Junctional Channel Complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *PNAS*, 86, pp.8683-8687.
114. Martínez, C., Manrique, C., Elzo, M. y Jiménez, A., 2012. Additive genetic group and heterosis effects on growth and corporal composition of crossbred cattle in southern Cesar (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25, pp.377-390.
115. Martínez, G., 1998. El ganado criollo Romosinuano (Romo). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Apartado Aereo 2011. Villavicencio, Meta, Colombia S.A. Information, *AGRI* 24, pp.1-11.
116. McBryan, J., Hamill, R., Davey, G., Lawlor, P. y Mullen, A., 2010. Identification of suitable reference genes for gene expression analysis of pork meat quality and analysis of candidate genes associated with the trait drip loss. *Meat Science*, 86, pp.436-439.
117. McKay, S., White, S., Kata, S., Loan, R. y Womack, J., 2003. The bovine 5'AMPK gene family: mapping and single nucleotide polymorphism detection. *Mammalian Genome*, 14, pp.853-858.
118. Moldoveanu, T., Gehring, K. y Green, D., 2008. Concerted multi-pronged attack by Calpastatin specifically occludes the catalytic cleft of heterodimeric Calpains. *Nature*, 456(7220), pp.404-408.
119. Moller, S., Croning, M. y Apweiler, R., 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), pp.646-653.
120. Monsón, F., Sañudo, C. y Sierra, I., 2004. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Science*, 68, pp.595-602.

121. Monsón, F., Sañudo, C. y Sierra, I., 2005. Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Science*, 71, pp.471-479.
122. Morón, O., González, N. y Vázquez, F., 2004. Contenido de colágeno y sus fracciones en tres músculos de toretes comerciales. *Revista Científica Universidad de Zulia*, 3, pp.270-273.
123. Motter, M., Corva, P., Krause, M., Perez, M. y Soria, L., 2009. Rol de la Calpastatina en la variabilidad de la Terneza de la Carne Bovina. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 20(1), pp.15-24.
124. Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Raats, J. y Strydom, P., 2008. Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape, South Africa. *Meat Science*, 79, pp.20-28.
125. Nelson, D. y Cox, M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th edition) Editorial W. H. Freeman.
126. Oliete, B., Moreno, T., Carballo, J., Monserrat, L. y Sanchez, L., 2006. Estudio de la calidad de carne de ternera de la raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Archivos de Zootecnia*, 55, pp.3-14.
127. Olsen, H., Nilsen, H., Hayes, B., Berg, P., Svendsen, M., Lien, S. y Meuwissen, T., 2007. Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the ABCG2 gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genetics*, 8(32).
128. Ortigues, I., Thomas, E., Prévéraud, D., Girard, C., Bauchart, D., Durand, D. y Peyron, A., 2006. Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats, pp. Water losses and vitamin B12. *Meat Science*, 73, pp.451-458.
129. Otto, G., Roehe, R., Looft, H., Thoelking, L., Knap, P., Rothschild, M., Plastow, G. y Kalm, E., 2007. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Science*, 75, pp.185-195.
130. Ouali, A., Herrera, C., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. y Sentandreu, M., 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74, pp.44-58.
131. Page B., Casas E., Heaton M., Cullen N., Hyndman D., Morris C., Crawford A., Wheeler T., Koohmaraie M., Keele J. y Smith T. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, pp.80, 3077-3085.

132. Palka, K. y Daun, H., 1999. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine M. semitendinosus during heating. *Meat Science*, 51, pp.237-243.
133. Palka, K., 1999. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine m. semitendinosus during retorting. *Meat Science* 53, pp.189-194.
134. Papaleo, J., Melucci, L., Villarreal, E., Mezzadra, C., Soria, L., Corva, P., Motter, M., Schor, A. y Miquel, M., 2010. Effect of ageing and  $\mu$ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Science*, 86, pp.878-882.
135. Park, K., Dalakas, M., Semino, C., Lee, H., Litvak, S., Takeda, K., Ferrans, V. y Goldfarb, L., 2000. Sporadic cardiac and skeletal myopathy caused by a de novo desmin mutation. *Clinical Genetics*: 57, pp.423-429.
136. Parmley, J. y Hurst, L., 2007. How do synonymous mutations affect fitness?. *BioEssays*, 29, pp.515-519.
137. Parr, T., Jewell, K., Sensky, P., Brameld, J., Bardsley, R. y Buttery, P., 2004. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 427, pp.8-15.
138. Paulin, D. y Li, Z., 2004. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301, pp.1-7.
139. Pearce, K., Rosenvold, K., Andersen, H. y Hopkins, D., 2011. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes. *Meat Science*, 89, pp.111-124.
140. Perez, C., Mukherjee, S. y Allen, P., 2003. Amino acids 1-1,680 of Ryanodine Receptor Type 1 hold critical determinants of skeletal type for excitation-contraction coupling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), pp. 39644-39652.
141. Pinto, L., Ferraz, J., Meirelles, F., Eler, J., Rezende, F., Carvalho, M., Almeida, H. y Silva, R., 2010. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 9(3), pp.1431-1442.
142. Pomponio L., Lametsch R., Karlsson A., Costa L., Grossi A. y Ertbjerg P. 2008. Evidence for post-mortem m-calpain autolysis in porcine muscle. *Meat Science*, 80, pp.761-764.
143. Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A., Nanni, L. y Lametsch, R., 2010. Influence of early pH decline on calpain activity in porcine muscle. *Meat Science*, 85, pp.110-114.
144. Ponsuksili, S., Jonas, E., Murani, E., Phatsara, C., Srikanchai, T., Walz, C., Schwerin, M., Schellander, K. y Wimmers, K., 2008. Trait correlated expression combined with expression

- QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics*, 9(367).
145. Proenza, C., O'Brien, J., Nakai, J., Mukherjee, S., Allen, P. y Beam, K., 2002. Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the 1S (CaV1.1) II-III Loop. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp.6530-6535.
  146. Promeyrat, A., Gatellier, P., Lebret, B., Kajak, K., Aubry, L. y Santé, V., 2010. Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chemistry*, 121, pp.412-417.
  147. Puolanne, E. y Halonen, M., 2010. Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science*, 86, pp.151-165.
  148. Purslow, P., 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science* 70, pp.435-447.
  149. Raynaud, P., Gillard, M., Parr, T., Bardsley, R., Amarger, V. y Levéziel, H., 2005. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms, 440, pp.46-53.
  150. Reardon, W., Mullen, A., Sweeney, T. y Hamill, R., 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science*, 86, pp.270-275.
  151. Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P. y Lepetit, J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science*, 59, pp.49-60.
  152. Reyes, J. y Zarain, A., 2006. Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 76, pp.18-32.
  153. Ron, M. y Weller, J., 2007. From QTL to QTN identification in livestock-winning by points rather than knock-out: a review. *Animal Genetics*, 38, pp.429-439.
  154. Roux, M., Nizou, A., Forestier, L., Ouali, A., Levéziel, H. y Amarger, V., 2006. Characterization of the bovine PRKAG3 gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts. *Mammalian Genome*, 17, pp.83-92.
  155. Roy, A., Kucukural, A. y Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), pp.725-738.
  156. Rudolf, E., Magalhães, P. y Pozzan, T., 2006. Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 173(2), pp 187-193.

157. Sánchez, L., Carballo, J., Sánchez, B. y Monserrat, L., 2005. Características de la canal y de la carne de machos procedentes del cruce de Rubia Gallega con Nelore. *Archivos de Zootecnia*, 54, pp.485-489.
158. Sánchez, G., 1997. *Ciencia básica de la carne*. Fondo Nacional Universitario: Santafé de Bogotá.
159. Sañudo, C., Albertí, P., Campo, M., Olleta, J. y Panea, B., 1998. Calidad instrumental de la carne de bovino de siete razas españolas. *Archivos de Zootecnia*, 48, pp.397-402.
160. Sañudo, C., Macie, E., Olleta, J., Villarroel, M., Panea, B. y Alberí, P., 2004. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 66, pp.925-932.
161. SAS (2008) SAS/STAT. User's guide, version 9.2. Cary, NC, USA, SAS Institute Inc.
162. Scheffler, T., Park, S. y Gerrard, D., 2011. Lessons to learn about postmortem metabolism using the AMPK $\gamma$ 3 R200Q mutation in the pig. *Meat Science*, 89, pp.244-250.
163. Schenkel, F., Miller, S., Jiang, Z., Mandell, I., Ye, X., Li, H. y Wilton, J., 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84, pp.291-299.
164. Schmoelzl, S., Leeb, T., Brinkmeier, H., Bremi, G. y Brenig, B., 1996. Regulation of tissue-specific expression of the skeletal muscle Ryanodine Receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9), pp.4763-4769.
165. Schönfeldt, H. y Strydom, P., 2011. Effect of age and cut on cooking loss, juiciness and flavour of South African beef. *Meat Science*, 87, pp.180-190.
166. Sencer, S., Papineni, R., Halling, D., Pate, P., Krol, J., Zhang, J. y Hamilton, S., 2001. Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), pp.38237-38241.
167. Serra, X., Gil, M., Gispert, M., Guerrero, L., Oliver, M., Sañudo, C., Campo, M., Panea, B., Olleta, J., Quintanilla, R. y Piedrafita, J., 2004. Characterisation of young bulls of the Bruna dels Pirineus cattle breed (selected from old Brown Swiss) in relation to carcass, meat quality and biochemical traits. *Meat Science*, 66, pp.425-436.
168. Serysheva, I., Hamilton, S., Chiu, W. y Ludtke, S., 2005. Structure of Ca<sup>2+</sup> release channel at 14 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 345, pp.427-431.
169. Serysheva, I., Ludtke, S., Baker, M., Cong, Y., Topf, M., Eramian, D., Sali, A., Hamilton, S. y Chiu, W., 2008. Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of skeletal muscle RyR channel. *PNAS*, 105, pp.9610-9615.

170. Shen, L., Basilion, J. y Stanton, V., 1999. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. PNAS, 96 , pp.7871-7876.
171. Silva, J., Patarata, L. y Martins, C., 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. Meat Science, 52, pp.453-459.
172. Škrlep, M., Čandek, M., Kavar, T., Žlender, B., Hortós, M., Gou, P., Arnau, J., Evans, G., Southwood, O., Diestre, A., Robert, N., Dutertre, C. y Santé, V., 2010. Association of PRKAG3 and CAST genetic polymorphisms with traits of interest in dry-cured ham production: Comparative study in France, Slovenia and Spain. Livestock Science, 128, pp.60-66.
173. Škrlep, M., Kavar, T. y Čandek, M., 2010. Comparison of PRKAG3 and RYR1 gene effect on carcass traits and meat quality in Slovenian commercial pigs. Czech Journal of Animal Science, 55(4), pp.149-159.
174. Soria, L., Corva, P., Huguet, M., Miño, S. y Miquel, M., 2010. Bovine  $\mu$ -calpain (CAPN1) gene polymorphisms in Brangus and Brahman bulls. Journal of Basic & Applied Genetics, 21, pp.61-69.
175. Srikanthai, T., Murani, E., Wimmers, K. y Ponsuksili, S., 2010. Four loci differentially expressed in muscle tissue depending on water-holding capacity are associated with meat quality in commercial pig herds. Molecular Biology Reports, 37, pp.595-601.
176. Straadt, I., Rasmussen, M., Andersen, H. y Bertram, H., 2007. Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss-A combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxation study. Meat Science, 75, pp.687-695.
177. Straadt, I., Rasmussen, M., Young, J. y Bertram, H., 2008. Any link between integrin degradation and water-holding capacity in pork?. Meat Science, 80, pp.722-727.
178. Strydom, P., Naude, R., Smith, M., Scholtz, M. y Van Wyk, J., 2000. Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. Meat Science, 55, pp.79-88.
179. Sunnucks, P., Wilson, A., Beheregaray, L., Zenger, K., French, J. y Taylor, A., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology, 9, pp.1699-1710.
180. Ta, T. y Pessah, I., 2007. Ryanodine receptor type 1 (RyR1) possessing malignant hyperthermia mutation R615C exhibits heightened sensitivity to dysregulation by non-coplanar 2, 20, 3, 50, 6-pentachlorobiphenyl (PCB 95). NeuroToxicology, 28, pp.770-779.

181. Te Pas, M., Everts, M., Haagsman, H., 2004. Muscle development of livestock animals: Physiology, Genetics and Meat Quality, CABI Publishing: London.
182. Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C., Lin, G., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. y Narayana, S., 2003. A structural model for the inhibition of Calpain by Calpastatin: Crystal structures of the native domain VI of Calpain and its complexes with Calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, 328, pp.131-146.
183. [toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\\_d](http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2_d)
184. Tornberg, E., 2005. Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, pp.493-508.
185. Van Eenennaam, A., Li, J., Thallman, R., Quaas, R., Dikeman, M., Gill, C., Franke, D. y Thomas, M., 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 85, pp.891-900.
186. Van Oeckel, M., Warnants, N. y Boucque, V., 1999. Comparison of different methods for measuring water holding capacity and juiciness of pork versus on-line screening methods. *Meat Science*, 51, pp.313-320.
187. van Spaendonck, K., van Hessem, L., Jongbloed, J., de Walle, H., Capetanaki, Y., van der Kooi, A., van Langen, I., van den Berg, M. y van Tintelen, J., 2011. Desmin-related myopathy. *Clinical Genetics*, 80, pp.354-366.
188. Wagenknecht, T. y Radermacher, M., 1997. Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(2), pp.258-264.
189. Wang, D. y Sadée, W., 2006. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: Example ABCB1 (MDR1). *The AAPS Journal*, 8, pp.515-520.
190. Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews | Genetics*, 10, pp.57-63.
191. Ward, J., Sodhi, J., McGuffin, L., Buxton, B. y Jones, D., 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of Molecular Biology*, 337, pp.635-645.
192. White, S., Casas, E., Wheeler, T., Shackelford, S., Koohmaraie, M., Riley, D., Chase, C., Johnson, D., Keele, J. y Smith, T., 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, 83, pp.2001-2008.
193. Williams, J., Dunner, S., Valentini, A., Mazza, R., Amarger, V., Checa, M., Crisa, A., Razzaq, N., Delourme, D., Grandjean, F., Marchitelli, C., García, D., Pérez, S., Negrini, R.,

- Ajmone, P. y Levéziel, H., 2009. Discovery, characterization and validation of single nucleotide polymorphisms within 206 bovine genes that may be considered as candidate genes for beef production and quality. *Animal Genetics*, 40, pp.486-491.
194. Wu, Y., Aghdasi, B., Dou, S., Zhang, J., Liu, S. y Hamilton, S., 1997. Functional interactions between cytoplasmic domains of the skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel, 272(40), pp.25051-25061.
195. [www.expasy.org/spdbv/](http://www.expasy.org/spdbv/)
196. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
197. [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)
198. Xiang, Z., 2006. Advances in homology protein structure modeling. *Current Protein & Peptide Science.*, 7(3), pp.217-227.
199. Xiao, B., Sanders, M., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F., Carmena, D., Jing, C., Walker, P., Eccleston, J., Haire, L., Saiu, P., Howell, S., Aasland, R., Martin, S., Carling, D. y Gamblin, S., 2011. Structure of Mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472(7342), pp.230-233.
200. Xiong, L., Newman, R., Rodney, G., Thomas, O., Zhang, J., Persechini, A., Shea, M. y Hamilton, S., 2002. Lobe-dependent regulation of Ryanodine Receptor Type 1 by Calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, pp.40862-40870.
201. Yang, T., Ta, T., Pessah, I. y Allen, P., 2003. Functional defects in six Ryanodine Receptor Isoform-1 (RYR1) mutations associated with Malignant Hyperthermia and their impact on skeletal excitation-contraction coupling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp.25722-25730.
202. Yarmand, M. y Homayouni, A., 2010. Quality and microstructural changes in goat meat during heat treatment. *Meat Science*, 86, pp.451-455.
203. Yu, S., Kim, J., Chung, H., Jung, K., Lee, Y., Yoon, D., Lee, S., Choi, I., Bottema, C., Sang, B. y Lee, J., 2005. Molecular cloning and characterization of bovine PRKAG3 gene: structure, expression and single nucleotide polymorphism detection. *Journal of Animal Breeding Genetic*, 122, pp.294-301.
204. Zamorano, J. y Gambaruto, M., 1997. Contribution to Improving the Meat Water Holding Capacity Test by the Filter Paper Press Method. A Comparison of Three Methods for Measuring Areas. *Meat Science*, 46, pp.129-137.
205. Zamorano, M., 1996. Qué es y para qué sirve la Capacidad de retención de agua de la carne. *La industria cárnica latinoamericana*, 102.

206. Zea, J., Díaz, M. y Carballo, J., 2007. Efecto de la raza, sexo y alimentación en la calidad de la carne de vacuno. *Archivos de Zootecnia*, 56, pp.737-743.
207. Zea, J., Díaz, M. y Carballo, J., 2008. Efecto del peso de sacrificio y la raza en la carne y la grasa de terneros alimentados con ensilados. *Archivos de Zootecnia*, 57(218), pp.101-112.
208. Zhang, W., Lonergan, S., Gardner, M. y Huff-Lonergan, E., 2006. Contribution of postmortem changes of Integrin, Desmin and  $\mu$ -Calpain to variation in water holding capacity of pork. *Meat Science*, 74, pp.578-585.
209. Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9.
210. Zhou, G., Cao, Y., Li, M., Zhang, L., Yu, Y. y Jin, H., 2010. Meat quality and carcass traits in relation to HGD-BstXI and HGD-HaeIII PCR-RFLP polymorphism in Chinese red cattle. *Meat Science*, 85, pp.270-273.
211. Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31 (133), pp.3406-3415.