



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LOS GENES CAST Y CAPN1 ASOCIADOS A TERNEZA DE LA CARNE EN BOVINOS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ALELO ESPECÍFICA

CARLOS MARIANO SERRANO CANELEO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: LEONARDO SAENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO:	SERGIO BUCAREY VIVANCO
PROFESOR CONSEJERO:	VICTOR MARTINEZ MONCADA

SANTIAGO, CHILE
2009

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a cada persona que de una u otra forma, colaboró en la realización de esta memoria. En primer lugar, agradecer a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por estar junto a mí durante todos estos años y por su constante apoyo y cariño hacia mi persona y mis proyectos. No cualquiera se mantiene al lado de uno en cualquier circunstancia o frente a cualquier decisión, sea buena o mala, por lo cual, siempre estaré en deuda con ellos.

También quisiera agradecer a mi profesor guía, Dr. Leonardo Saénz Iturriaga, por haber confiado en mí y en mi capacidad. Sin su continuo consejo y ayuda, este trabajo no habría visto nunca la luz. A la vez, agradecer al Dr. Sergio Bucarey Vivanco, por su constante asesoría y apoyo técnico a lo largo de todo el proyecto. Siempre los recordaré por sus enseñanzas y por como me mostraron lo grande que es el mundo de la investigación y de la ciencia, reconociéndolos a ambos como mis mentores y valorando su amistad y dedicación.

Por último, agradecer a todo el personal académico, técnico y al grupo de tesis de los laboratorios BIOVETEC y CIMAT del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Cada uno de todos ellos aportó en mayor o menor grado, algo para que esta tesis llegara a realizarse satisfactoriamente, aportes que se reflejan en cada página de este escrito y que agradezco enormemente.

Gracias a todos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
1. LA TERNEZA DE LA CARNE Y SU ASOCIACIÓN CON EL SISTEMA ENZIMÁTICO PROTEOLÍTICO DE CALPAÍNAS.....	8
1.1 LAS ENZIMAS CALPAÍNAS.....	9
1.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CALPAÍNAS.....	10
1.3 DESCRIPCIÓN DE CALPASTATINA.....	12
1.4 RELACIÓN ENTRE CALPAÍNAS Y TERNEZA DE LA CARNE.....	14
2. GENES DE LA μ - CALPAÍNA Y CALPASTATINA.....	15
2.1 GEN <i>Calcium – Actived Neutral Protease</i> o CAPN1.....	16
2.2 GEN <i>CALPASTATINE</i> o CAST.....	20
3. SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA.....	22
3.1 PCR ALELO ESPECÍFICO o AS – PCR.....	24
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

RESUMEN

En la producción de carne para consumo humano, una de las características más importantes del producto para los consumidores es la ternura de la carne, la cual posee un componente genético asociado, genes que codifican las enzimas que participan en el proceso de degradación de la carne en el postmortem y que pueden sufrir cambios en sus secuencias, del tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), que generan cambios en estas enzimas y por ende cambios en la característica del producto. Este hecho, hace muy importante el tener una herramienta de detección eficiente y rápida de estas variaciones genéticas. Muestras de semen de toros procedentes del catálogo de inseminación artificial de INDAP, 2007 y muestras de tejido de novillos híbridos de Wagyu, fueron sometidas a extracción de DNA, comprobando la efectividad de ésta mediante medición de concentración de DNA en espectrofotómetro. Se implementó una técnica de reacción de polimerasa en cadena alelo específica (AS – PCR), la cual fue aplicada a las muestras con alta concentración de DNA extraído, utilizando partidores sintetizados para los SNP CAPN1 – 316, CAPN1 – 530 y CAST – 2959. Los resultados del AS – PCR fueron confirmados con secuenciación de varias muestras. La extracción de DNA fue más efectiva en las muestras de tejido de novillos Wagyu que en las muestras de semen, probablemente por el estado de conservación de la muestra, el grado de condensación del DNA en los espermatozoides y la presencia de inhibidores en el semen. La implementación y ajuste de parámetros en el PCR se hizo de la misma forma que lo observado en la literatura, obteniendo resultados similares en frecuencias genotípicas y su asociación con el rasgo fenotípico, a estudios previos en el tema. La secuenciación de las muestras dejó en evidencia la eficiencia de la Taq polimerasa en la fase de extensión y además, identificó la presencia de una secuencia extra en el alelo C de CAPN – 316, compatible con los “directos repetidos” y con el proceso de arrastre de exones que ocurren durante la recombinación genética y la evolución de los genes. Todos los datos nos permiten concluir que la técnica de AS – PCR es una herramienta efectiva para determinar variaciones del tipo polimorfismo de un solo nucleótido en genes relacionados con características de importancia productiva.

ABSTRACT

In meat production for human consume, one of the most important characteristic of the product for the customers is the meat tenderness, which has a genetic component associated, genes that encode enzymes involved in degradation process of meat in postmortem and these ones can suffer changes in the code sequence, type single nucleotide polymorphism (SNP), that generate changes in these enzymes and therefore, changes in the characteristic of the product. These fact, makes very important have a quick and efficient detection tool of these genetic variations. Semen samples of bulls from 2007 INDAP's artificial insemination catalog, and tissue samples from hybrid Wagyu steers was subject to DNA extraction, checking the effectiveness of this by measuring DNA concentration in a spectrophotometer. A allele specific polymerase chain reaction (AS – PCR) was implemented, which was applied in samples with the highest DNA concentration extracted, using primers synthesized for CAPN1 – 316, CAPN1 – 530 and CAST – 2959 SNP. The results of AS – PCR were confirmed with the sequencing of several samples. The DNA extraction was more effective in tissue samples of Wagyu steers than semen samples, probably for the conservation status of samples, DNA condensation grade in sperm and presence of inhibitors in semen. The implementation and adjustment of parameters in the PCR was done in the same manner as noted in the literature, and we have similar results in genotype frequencies and their association with the phenotypic trait, as previous studies on the subject. The sequence of samples is the evidence of efficiency in elongation phase of Taq polymerase, also, these sequence identified and extra code in C allele of CAPN1 – 316, compatible with 'repeated direct' and exon shuffling process, which occur in genetic recombination and evolution of genes. All the data allows us to conclude the AS – PCR technique is a effective tool to determinate variations type single nucleotide polymorphisms in genes correlated with important production rates.

INTRODUCCIÓN

Actualmente Chile se presenta al mundo como una potencia alimentaria. Gracias a los tratados de libre comercio y las políticas sanitarias internas del país en materia de producción, nuestros productos alimenticios han podido acceder a los mercados más exigentes de Europa, Asia y América, situación de la cual la producción de carne bovina nacional no ha sido ajena.

Según datos del censo 2007, la producción total de carnes en el país en ese año fue de 1.340.000 toneladas, de las cuales aproximadamente el 20% corresponden a carne bovina (242.000 toneladas), equivalente a 968.000 cabezas de ganado. De este total, se exportó 8.070 toneladas por un valor de US\$ 33 millones, con un precio promedio de US\$ 4.107 por tonelada, de la cual un 70% se envía como carne congelada. Sin embargo, la carne refrigerada ha venido cobrando importancia, de tal forma que en los primeros cuatro meses de 2008, ha llegado a significar casi la mitad del total de las exportaciones de carne bovina, siendo uno de los mayores receptores la Unión Europea (FIA, 2009).

Estos valores no sólo representan un gran logro para la empresa nacional, considerando que la exportación de carne bovina es una actividad relativamente nueva, sino también una gran responsabilidad, ya que son mercados de alta exigencia, tanto en el status sanitario como en las características exigidas al producto por parte de los consumidores. Éstos no buscan un producto que sólo cumpla con las normas internacionales y locales de higiene, sino que también buscan características organolépticas especiales en él, como son el sabor, jugosidad o terneza, características que cada día toman más importancia y que no deben ser pasadas por alto por nuestros productores nacionales.

Existen importantes antecedentes que avalan que estas características no sólo son mediadas por factores ambientales, también lo son por factores genéticos, lo cual significa que la expresión de una secuencia genética en particular determinará variaciones en la presencia de una característica en observación.

Estas variaciones hacen que distintas razas posean rasgos o atributos únicos y compatibles con un sistema de producción y con el producto que se busca conseguir. Cuando se trata de producción de carne para consumo humano, una de las características más importantes es su grado de terneza. La terneza de la carne se define como la dificultad o facilidad con la que la carne se puede cortar o masticar y forma parte de la calidad sensorial de la carne que junto con el sabor y jugosidad, determinan las variaciones en la palatabilidad de la carne en el momento de degustación por parte del consumidor (Peluffo y Monteiro, 2002).

Esta cualidad posee un componente genético, basado en genes que codifican las enzimas que forman parte del sistema proteolítico de calpainas, las cuales actúan durante el periodo *postmortem* degradando las fibras musculares.

Se debe tomar en cuenta que es en los genes donde localizaremos el primer nivel de variación, en el genotipo, el cual posee la información para el desarrollo y funcionalidad de todos los seres vivos. Estos genes pueden sufrir mutaciones, cambios en la información que poseen, lo que derivará en variaciones a nivel de las proteínas que codifican, por diferencias en la secuencia aminoacídica traducida, lo que conlleva finalmente a una variación a nivel de fenotipo, es decir, en las características apreciables entre los individuos de distintas e incluso una misma especie (Cunningham y Meghen, 2001).

En nuestro país, se ha potenciado el mejoramiento de la producción y de los productos alimenticios, en el marco de posicionar a Chile como potencia alimentaria. Se ha realizado mejoramiento genético en distintos atributos y características para los bovinos como facilidad de parto, infiltración grasa o peso de canal. En este sentido, el Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP) ha creado muchos planes y proyectos, entre los cuales destaca el proyecto “Incorporación de genética seleccionada en rebaños de bovinos de carne de la Agricultura Familiar Campesina”, el cual tiene por objeto mejorar el potencial genético de los rebaños de carne pertenecientes a este segmento de agricultores, a través del uso de animales de carne de distintas razas y empresas, seleccionados de acuerdo a las características más relevantes para el sector de la agricultura familiar campesina (INDAP,

2007). Aun así, no hay que olvidar a la empresa privada, la cual canaliza sus esfuerzos a través de las cooperativas y asociaciones de productores.

Este estudio se enfocó en el diseño y aplicación de una técnica de PCR alelo específico para determinar la presencia de polimorfismos genéticos de un sólo nucleótido (SNP) correlacionados con la ternura de la carne, presentes en los genes *Calcium – Activated Neutral Preotese* (CAPN1) y *Calpastatine* (CAST). Para este efecto se tomaron muestras de DNA de animales provenientes de un plantel de novillos híbridos de raza Wagyu pertenecientes al fundo “Las Lumas” de la comuna de Panguipulli en la Región de Los Ríos y además, muestras de DNA de toros de razas de producción de carne, pertenecientes al catálogo 2007 de inseminación artificial del INDAP para mejoramiento de rebaños de la agricultura familiar campesina. La efectividad de la técnica planteada fue comprobada mediante la secuenciación de los productos de la reacción.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LA TERNEZA DE LA CARNE Y SU ASOCIACIÓN CON EL SISTEMA ENZIMÁTICO PROTEOLÍTICO DE CALPAÍNAS

La inconsistencia de la terneza de la carne a nivel del consumidor ha sido identificada como uno de los problemas más importantes para el sector ganadero. Esta característica se encuentra enmarcada entre los argumentos que forman parte de la triada ideal, junto con el sabor y jugosidad, para lograr un alto grado de satisfacción en el consumidor por el producto (Koohmaraie, 1998). Sin embargo, los esfuerzos se han dirigido hacia la terneza principalmente porque los consumidores la consideran como el componente más importante de la carne (Miller, 1992), son capaces de diferenciarla y de pagar por ella (Boleman *et al.*, 1995) y el coeficiente de variación sensorial de terneza es el doble que el de jugosidad o sabor (Shackelford *et al.*, 1995). El hecho que se detecte por parte de los consumidores inconsistencia en esta característica deja al descubierto una combinación entre la inhabilidad en los procesos para producirla y la incapacidad para identificar reses con carne dura y clasificarlas como tales (Koohmaraie, 1998).

Estas razones son la excusa del por qué identificar las causas de variación de la terneza de la carne, en especial las causas biológicas de ésta, ya que así podremos trabajar sobre ellas fácilmente y en forma precisa. Durante muchos años se han estudiado diversas variables que influyan en este componente como cantidad y solubilidad de tejido conectivo y cantidad de grasa intramuscular, sin embargo, éstos no explican el total de la variación (Koohmaraie, 1998). Otros estudios han descrito el efecto genético, ya que este hace un significativo aporte a la variación total de la terneza tanto entre razas como dentro de una misma raza (Shackelford *et al.*, 1995), aunque los mejores indicadores muestran que la genética sólo controla un 30% de la variación, dejando el 70% restante a factores ambientales y genes no aditivos. Entre estos factores ambientales se encuentran el tiempo de engorde, energía de la dieta, stress, enfriamiento de la res, maduración en cámara de frío, método de cocción e incluso la temperatura de cocción (Koohmaraie, 1998).

Finalmente, se han estudiado a fondo los mecanismos que mejoran la terneza posterior al proceso de faena, o periodo *postmortem*. Durante este periodo se produce la degradación de proteínas por acción de enzimas, sobretodo de proteínas que son las responsables de mantener la integridad muscular, lo cual es conocido como proteólisis. La diferencia de la tasa y extensión de esta proteólisis puede ser muy variable, sin embargo, es la mayor fuente de variación de terneza de la carne en maduración. Este mecanismo presente en el *postmortem* depende de un sistema de enzimas llamado “sistema proteolítico de calpaínas”, el cual está compuesto de las calpaínas (m – calpaína y μ - calpaína) y su inhibidor calpastatina. Además de este sistema, se requiere un almacenamiento en frío que en la carne vacuna es de aproximadamente 14 días, tiempo mucho mayor que el de carnes de otras especies ya que la degradación muscular en el *postmortem* del vacuno es un proceso mucho más lento (Koohmaraie, 1998).

1.1 LAS ENZIMAS CALPAÍNAS

Las enzimas de la familia de las calpaínas, son estructuras proteicas heterodiméricas que se componen de una subunidad catalítica grande de 80 kDa y una regulatoria pequeña de 28 kDa (Goll *et al.*, 2003). Se han identificado a lo menos 16 enzimas diferentes dentro de esta familia (Franco y Huttenlocher, 2005), las cuales se clasifican en típicas o atípicas dependiendo de la presencia o ausencia de la subunidad EF, una estructura compuesta de dos hélices posicionadas en forma perpendicular y enlazadas entre ellas por una región corta de aproximadamente 12 aminoácidos y que generalmente tiene como función el capturar calcio (Branden y Tooze, 1999) y la unión de la molécula al tejido del cual procedan. Aunque estas enzimas se encuentran en todos los tejidos, varían en cuanto a su concentración dependiendo del microambiente celular (Goll *et al.*, 2003).

En el músculo estriado las dos isoformas más comunes son la m – calpaína y la μ - calpaína, enzimas a las cuales no sólo se les relaciona con el proceso de degradación de fibras musculares, sino también en los procesos de apoptosis (Atencio *et al.*, 2000), regulación de ciclos, dispersión (Carragher y Frame, 2002), anclaje, motilidad e invasión de tejido por la célula (Dedieu *et al.*, 2003). Incluso en los procesos de miogénesis, jugando

un papel crítico en las etapas tempranas de éste, como lo es en la migración del mioblasto y su fusión para formar el miotubo (Leoup *et al.*, 2006). La secuencia proteica de μ - calpaína muestra un gran grado de similitud entre distintos animales, lo cual demostraría la gran conservación de ésta durante la evolución de los mamíferos (Smith *et al.*, 2000).

1.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CALPAÍNAS

La m - calpaína y la μ - calpaína son enzimas cistein proteasas, las cuales dependen de la presencia de calcio (Ca^{+2}) para su activación (Goll *et al.*, 2003). Al determinar su estructura, se describieron hasta cuatro dominios enzimáticamente activos (Pal *et al.*, 2003). El dominio I corresponde a una α - hélice sencilla presente en el N - Terminal de algunas calpaínas y tendría un papel importante en la estabilidad de la proteína. El dominio II corresponde a la porción proteolítica de la enzima, con un sitio activo constituido por la triada Cys₁₀₅, His₂₆₂ y Ans₂₈₆. Estos tres residuos al momento de la activación son alineados en un espacio preciso debido a cambios conformacionales que se llevan a cabo en este proceso, lo cual gatillaría la acción de la enzima (Franco y Huttenlocher, 2005). El dominio III es una región que se compone de ocho láminas β superpuestas una encima de otra y envuelta en enlaces de Ca^{+2} y fosfolípidos. La función de este dominio es el de centro organizador de la enzima al estar anclado iónicamente a los otros dominios, interacciones que además, determinan los movimientos de éstos, como una suerte de “interruptor electrostático” (Tompa *et al.*, 2001). Los dominios IV y VI ubicados en la subunidad grande y pequeña respectivamente, contienen 5 estructuras del tipo subunidad EF (Franco y Huttenlocher, 2005). Las dos primeras, EF - 1' y EF - 2', se ubican pareadas y en una conformación “abierta”, mientras que las subunidades EF - 3' y EF - 4' también se disponen pareadas pero en una conformación “cerrada”, dejando a la subunidad EF - 5' como enlace entre estas estructuras (Goll *et al.*, 2003). El dominio V presente en la subunidad pequeña, aparenta tener una estructura muy flexible debido a que es rica en glicina y ésta sería la razón aparente del por qué esta estructura a diferencia de los otros dominios, se mantiene totalmente indescifrable (Franco y Huttenlocher, 2005).

Existen diversos mecanismos *in vivo* de regulación de las calpaínas, siendo el más conocido y mejor estudiado el de activación por Ca^{+2} , del cual deriva el nombre de estas proteasas (Guroff, 1964), nombrando a la m – calpaína por requerir concentraciones milimolares y μ – calpaína concentraciones micromolares de Ca^{+2} (Suzuki *et al.*, 1981). Descartando situaciones patológicas, los niveles de Ca^{+2} en las células vivas no se encuentran en la cantidad requerida para la activación de las calpaínas, es por ésto que se ha teorizado sobre otros mecanismos reguladores existentes que disminuirían los niveles requeridos *in vivo* (Franco y Huttenlocher, 2005). Entre éstos existen proteínas activadoras específicas para μ – calpaína, las cuales capturan el Ca^{+2} y forman un complejo 1:1 con ésta, aumentando su sensibilidad a Ca^{+2} hasta 10 veces más. De la misma forma se describe un activador específico para m – calpaína, el cual baja su valor de actividad media de 400 μM a 15 μM , facilitando la autólisis y así permitiendo su activación. En la autólisis, el extremo N – Terminal sufre una modificación en ambas subunidades, lo cual aumenta la sensibilidad al Ca^{+2} significativamente (Suzuki y Sorimachi, 1998), removiendo el dominio I y permitiendo el movimiento del dominio II (Franco y Huttenlocher, 2005). Es claro que la autólisis disminuye la concentración de Ca^{+2} necesaria para activación de estas enzimas, sin embargo, la activación del proceso de autólisis en si requiere de altas concentraciones de Ca^{+2} , lo cual es inconsistente con la cascada de activación de calpaínas (Suzuki y Sorimachi, 1998). Actualmente se sabe que la autólisis no es necesaria para expresar actividad catalítica de las proteasas, mas bien, sugiere una función más dirigida hacia la progresión de la catálisis (Franco y Huttenlocher, 2005).

A pesar de que m – calpaína requiere más concentración de Ca^{+2} para su activación que μ – calpaína (Maravall *et al.*, 2000) y además, m – calpaína enlaza más iones de Ca^{+2} que μ – calpaína (Kapprell y Goll, 1989), es μ – calpaína la enzima principal en el proceso de proteólisis de la fibra muscular. Aunque m – calpaína puede mantener constante su actividad en condiciones de refrigeración por 11 días, mientras que μ – calpaína sólo puede por los primeros 2 a 3 días, disminuyendo a niveles mínimos los días siguientes (Camou *et al.*, 2007). Pruebas en animales carentes del gen *Calcium – Activated Neutral Protease* (CAPN1) demostraron poca degradación de la fibra muscular en el periodo de maduración, sobretodo por la poca degradación de nebulina, distrofina, metavinculina, desmina y

troponina T, lo cual fue vinculado con el enternecimiento de la carne. Estos hallazgos, en conjunto, demuestran que es μ - calpaína y no m – calpaína la responsable principal de la proteólisis *postmortem* en el músculo y por ende, del enternecimiento de la carne durante la maduración (Geesink *et al.*, 2006).

Otros factores de regulación son el pH, donde los valores de 6,5 y 7,5 son los indicados para la mayor actividad en μ - calpaína y en m – calpaína respectivamente (Maddock *et al.*, 2005) y los fosfolípidos, los cuales también reducen considerablemente los requerimientos de concentración de Ca^{+2} necesaria para autólisis y activación en μ - calpaína, pero son insuficientes para activar m – calpaína a concentraciones fisiológicas de Ca^{+2} (Suzuki y Sorimachi, 1998). Por último, no se puede dejar de lado la regulación de estas enzimas por parte de la otra enzima clave en el proceso de degradación de la fibra muscular, Calpastatina.

1.3 DESCRIPCIÓN DE CALPASTATINA

La calpastatina es el inhibidor principal de μ - calpaína y m – calpaína. Los datos recolectados de estudios estructurales y bioquímicos indican que la calpastatina puede unirse con mayor preferencia a calpaínas activas, sugiriendo que éste es más un mecanismo de atenuación que de prevención (Wendt *et al.*, 2004). También se observó que calpastatina requiere niveles de Ca^{+2} significativamente menores para su activación durante las primeras 24 horas del proceso de maduración de la carne, en comparación con las calpaínas (Morgan *et al.*, 1993).

Dentro de sus características se cuentan el ser una molécula termoestable (Okitani *et al.*, 1976) y resistente a varios agentes desnaturantes como la urea, SDS o algunos ácidos (Otsuka y Goll, 1987). Al igual que las calpaínas, la secuencia de calpastatina es homóloga para varias especies de mamíferos, homología que no es tan alta como en el caso de la otra molécula, lo cual se evidenció al ver que solo se conserva el 65% de los aminoácidos homólogos entre las calpastatinas codificadas de diversas especies (Goll *et al.*, 2003). Se describe que la calpastatina es una molécula con una variación de masa entre 34 a 280 –

300 kDa (Maki *et al.*, 1990), variación que se explicaría mas que nada por ser lábil frente a la degradación proteolítica, a su estructura espacial dispuesta en espirales al azar que tiende a ser subestimada en estudios de cromatografía (Shannon y Goll, 1985) y por ser una molécula que presenta alrededor de 8 isoformas. Estas isoformas no son exclusivas de un tejido en particular, ya que se puede encontrar más de una isoforma en una muestra única. Por último, la calpastatina es una molécula que migra en forma aislada en sistemas de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), lo cual hace difícil el relacionar una banda migratoria a un peso molecular particular en SDS-PAGE y a una isoforma conocida (Goll *et al.*, 2003).

Gracias a estas isoformas, la calpastatina es una molécula capaz de tener o no ciertos dominios. Una es el dominio XL, el cual es una estructura de 60 aminoácidos que posee 3 sitios de fosforilación por protein kinasas A. Luego es posible identificar calpastatinas con una estructura denominada dominio L, el cual es un dominio NH₂ – terminal y que puede variar en masa dependiendo si hubo o no, un proceso de *splicing* alternativo post – transcripcional en el DNA. Finalmente, observamos los dominios de inhibición, los cuales pueden ir desde uno hasta cuatro dominios y por ende puede inhibir más de una molécula de calpaína, los cuales poseen una masa de aproximadamente 140 aminoácidos cada uno (Goll *et al.*, 2003). Cada dominio de inhibición de calpastatina posee tres subdominios: A, B y C, de los cuales el subdominio A se une al dominio IV de la calpaína y el subdominio C al dominio VI, uniones que involucran interacciones hidrofóbicas en el sitio cercano a la subunidad EF del dominio de calpaína correspondiente (Wendt *et al.*, 2004). Esta unión, entre el subdominio de calpastatina y el dominio de calpaína, no sería posible sin la unión previa de Ca⁺² a calpaína, el cual origina un cambio conformacional en las subunidades EF, exponiendo las áreas hidrofóbicas, lo que permite el suficiente espacio en la estructura para permitir la unión de las subunidades de los sitios de inhibición de calpastatina (Hanna *et al.*, 2008). El subdominio B permite la actividad inhibitoria de los otros subdominios. Aunque el subdominio B es cinéticamente competitivo en naturaleza, éste no interactúa en forma directa con el sitio activo de calpaína, pero se cree que se une al dominio III de ésta y actúa bloqueando el acceso al sitio activo. Es muy posible que el subdominio B sólo se una a

calpaína una vez de que ésta haya sido activada por Ca^{+2} (Wendt *et al.*, 2004). Previamente, estudios cinéticos de calpastatina demostraron que ésta actúa como un inhibidor competitivo de las calpaínas (Maki *et al.*, 1990) y que intracelularmente no solo inhibe a estas enzimas, sino también a otras enzimas proteolíticas del músculo (Koochmaraie, 1994).

La función inhibidora de calpastatina sobre μ - calpaína no se ve afectada por valores de pH, sin embargo en el caso de m - calpaína, se detectó mayor actividad inhibitoria a valores de pH 6,5, con menor actividad inhibitoria a valores superiores (Maddock *et al.*, 2005).

1.4 RELACIÓN ENTRE CALPAÍNAS Y TERNEZA DE LA CARNE

Las calpaínas y la calpastatina están estrechamente vinculadas con el grado de terneza de la carne, reportándose en mediciones del efecto conjunto en la fuerza de resistencia al corte de Warner - Bratzler (del inglés: *Warner - Bratzler Share Force*, WBSF) en distintas poblaciones, un máximo de 25,7 +/- 5,5%, de variación con un promedio general de 15,2 +/- 4,8% (Morris *et al.*, 2006). WBSF fue diseñado como un sistema de medición mecánica de la terneza, mediante el uso de un instrumento con forma de guillotina que aplica determinados kilos de fuerza para que el corte de la fibra muscular sea exitoso (AMSA, 1995). Sin embargo, el efecto de estas enzimas sobre la cualidad de terneza dependerá también de otros factores, como la raza del animal. Animales de distinta raza tendrán distinta cantidad y por ende, distinta actividad de calpaínas y calpastatina, lo cual generará diferencias en el grado de terneza de la carne proveniente de éstos. Este efecto no sólo se observa en animales de una raza pura en particular, también en animales híbridos. Un ejemplo de esto son los estudios realizados en la Universidad de Florida en muestras de músculo *Longissimus dorsi* de animales progenie de la cruce de Angus con Brahman, demostraron que la actividad de la μ - calpaína disminuía al aumentar el porcentaje de Brahman en la mezcla, en desmedro de la parte Angus, mientras que m - calpaína se mantenía constante. A la vez, Calpastatina demostró un incremento de actividad a medida que aumentaba el porcentaje de Brahman en la muestra. El efecto también se reflejó en WBSF, presentando un incremento en animales con más porcentaje de esta raza, sobre la otra (Pringle *et al.*, 1997) (Tabla 1).

Tabla 1: Variaciones en actividad de enzimas calpaínas y calpastatina y variación en WBSF, según porcentaje de Brahman en progenie Brahman X Angus, Universidad de Florida

	PORCENTAJE MEZCLA					
	0% Brahman	25% Brahman	37% Brahman	50% Brahman	75% Brahman	100% Brahman
μ - Calpaína U/50 g	60,4	58,2	72,1	58,4	53,0	49,7
m - Calpaína U/50 g	47,7	49,2	48,4	46,2	41,1	49,0
Calpastatina U/50 g	173,8	193,8	181,4	198,1	205,8	227,7
WBSF 5 días, Kg	5,4	5,2	4,8	5,0	6,0	7,5
WBSF 14 días, Kg	4,3	5,0	4,2	4,7	4,8	6,1

(Tabla según datos obtenidos por Pringle *et al.*, 1997)

La castración también es un factor en el efecto de este sistema enzimático en la terneza de la carne. Estudios comparativos entre machos enteros y castrados demostraron que la WBSF es mayor en los machos enteros. A pesar que en este caso el grado de infiltración grasa, mayor en castrados que en machos enteros, juega un papel muy importante, ya que está positivamente correlacionada con la terneza, en los estudios no se observó diferencias en la actividad de μ - calpaína y m - calpaína en ambos grupos. En cambio la actividad de calpastatina es mucho mayor en el grupo de machos enteros (Morgan *et al.*, 1993). En el caso de la dieta del animal, ésta no afecta significativamente los valores de actividad de las enzimas, por lo cual no se ven efectos en WBSF de los animales (Ibrahim *et al.*, 2008).

Se debe mencionar, que existe evidencia que este sistema proteolítico está involucrado a la vez, en funciones esenciales como degradación de proteínas de citoesqueleto y del sarcómero de células músculo esqueléticas, actuando así tanto en el desarrollo prenatal como en el crecimiento postnatal (Goll *et al.*, 2003).

2. GENES DE LA μ - CALPAÍNA Y CALPASTATINA

Las enzimas μ - calpaína y calpastatina son codificadas por un gen en específico cada una, siendo el gen *calcium - activated neutral protease (CAPNI)* quien codifica una de las isoformas más comunes de las calpaínas, la μ - calpaína, y el gen *Calpastatine (CAST)* el cual codifica a la calpastatina (Morris *et al.*, 2006).

2.1 GEN Calcium – Activated Neutral Protease o CAPN1

El gen CAPN1 es el responsable de la codificación de la enzima μ - calpaína. Este gen fue mapeado y ubicado en el cromosoma 29 bovino (BTA29), específicamente en su final telomérico (Smith *et al.*, 2000), posición que lo sitúa dentro del locus de rasgo cuantitativo (del inglés: *quantitative trait locus*, QTL) recientemente descrito y relacionado con ternera de la carne (Casas *et al.*, 2000). Los QTL se definen como regiones específicas de los cromosomas donde se localizan uno o más genes que afectan en conjunto la expresión de una característica y sumado con el efecto medioambiental, afectan la expresión fenotípica final (Davis y DeNise, 1998). El realizar una identificación de éstos, o un mapeo de QTL, es un estudio estadístico de los alelos presentes en el locus y los fenotipos que producen, lo cual se justifica debido a que muchas características son gobernadas por más de un gen, por lo cual, el definir y estudiar el locus en completo de genes relacionados nos da una pista para entender cómo el genotipo afectaría a un individuo (Mackay, 2001). Para su detección se han desarrollado marcadores genéticos, los cuales generalmente se encuentran ligados al QTL, aunque puede ocurrir una recombinación entre marcador y QTL en función de la distancia en que se encuentra uno del otro. También existen otros marcadores los cuales se definen como marcadores directos que no presentan recombinación con el QTL o donde los datos de la secuencia verifican la exacta localización del cambio genético en los individuos. Estos marcadores son las bases de los sistemas de selección asistida por marcadores (del inglés: *marker-assisted selection*, MAS), programas que utilizan la información dada para identificar animales con combinaciones de QTL favorables para una característica fenotípica particular (Davis y DeNise, 1998). Otro de estos marcadores genéticos es el polimorfismo de un sólo nucleótido (del inglés: *single nucleotide polymorphisms*, SNP).

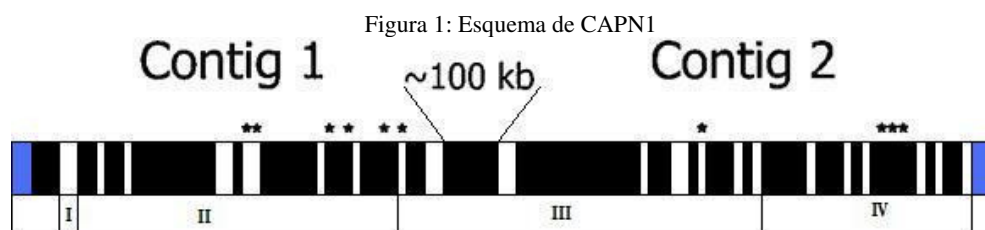
Los SNP corresponden a una secuencia de DNA donde un nucleótido en el genoma difiere entre miembros de una especie o entre pares de cromosomas de un individuo. Entre sus características, poseen poca diversidad alélicas y proveen de menos poder estadístico que otros marcadores genéticos como los microsatélites, pero lo compensan con una distribución más uniforme y densa dentro de los genomas, lo cual los hace muy útiles para estudios de mapeo genético o poblacionales (Xing *et al.*, 2005). Debido a su baja tasa de

mutación, tienden a mantenerse en forma mucho más estable dentro del tiempo de evolución en las líneas genéticas (Morin *et al.*, 2004). SNPs que son de alta frecuencia entre especies o dentro de una especie podrían considerarse neutros u objeto de selección, mientras que los de baja frecuencia podrían ser borrados y, por ende, seleccionados negativamente (Zhu *et al.*, 2004). Adicionalmente, mutaciones de SNPs sinónimas en cuanto al aminoácido que codifican tiene más posibilidades de ser seleccionadas neutralmente que aquellas que generan un cambio en un aminoácido (Zhao *et al.*, 2003), sin embargo, un SNP tendrá importancia cuando el cambio en la secuencia del genoma genere un cambio en la secuencia del producto proteico que codifica dicho genoma o en la expresión de este producto, y por ende, se genere una variación en las características del individuo. Los SNPs actualmente proveen muchos beneficios en el estudio de mapeado genético y de poblaciones, debido en parte, a su capacidad universal de aplicación por cualquier laboratorio y su flexibilidad en los protocolos de detección. Es así como vemos que las genotipificaciones basadas en variaciones de SNPs son de fácil comparación, incluso en realizaciones de estudios paralelos por más de una entidad, ya que no requieren estandarización de plataformas de detección, ni tampoco ajustes en los resultados (Coates *et al.*, 2009).

Al analizar la estructura de CAPN1, se encontró un total de 20 exones y 19 intrones, estos últimos, presentan un rango de tamaño entre 79 a 1.600 bp, a excepción de los intrones 9 y 10, en los cuales no han sido determinados sus tamaños, aunque se cree que el intrón 10 posee un tamaño aproximado de 3.500 bp. La secuencia del gen completa, se divide en *contig* 1, que abarca el segmento desde el exón 1 al 9 y *contig* 2, que abarca desde el exón 11 al 20 (Smith *et al.*, 2000), excluyendo los intrones 9 y 10 de esta división, aunque a esta parte de la secuencia también se le puede denominar *contig* 3 y que en total suma alrededor de 100 Kb (Page *et al.*, 2002).

En CAPN1 se han descrito diez SNPs, los cuales fueron descubiertos generando secuencias haploides desde DNA de poblaciones bovinas utilizadas en el estudio de la localización del segmento de inicio 5' del gen. De estos diez SNPs, sólo dos tienen un efecto en la estructura de la proteína, ya que generan un cambio en la secuencia aminoacídica de la μ -

calpaína al traducirse, el SNP 6, ubicado en el exón 9 del gen y el SNP 7 ubicado en el exón 14 (Figura 1) (Page *et al.*, 2002).



Rectángulos Azules: Segmentos de Regiones no Traducidas o UTR; Rectángulos Negros: Intrones; Rectángulos Blancos: Exones; Estrellas: SNPs; Números Romanos: Dominios de la proteína μ - calpaína. (Page *et al.*, 2002).

Se ha determinado que en el exón 9 el cambio de la base guanina a citosina, conlleva a un cambio de aminoácidos, pasando de una glicina a una alanina respectivamente en la posición 316 de la secuencia proteica, perteneciente al dominio II. Este cambio de bases genera la existencia de dos alelos para el mismo gen, el alelo G (guanina) y el alelo C (citosina) y el SNP en cuestión se denomina marcador *CAPN1 – 316*. En el exón 14, se observa un cambio de bases de adenina a guanina deriva en una sustitución en el aminoácido número 530 de la secuencia, parte del domino III de la molécula, de una isoleucina a una valina respectivamente. Esta variación también nos lleva a la existencia de dos alelos distintos, el alelo A (adenina) y el alelo G (guanina), identificando el SNP de esta posición como marcador *CAPN1 – 530* (Page *et al.*, 2002).

Este polimorfismo genético se ha asociado con la variación de la terneza de la carne, sugiriendo desde un punto de vista funcional y de posición, que la variación de la secuencia del gen está asociada a esta característica en el ganado (Page *et al.*, 2004).

Estudios de muestras de carne proveniente de poblaciones progenie de toros pertenecientes al *American Simmental Association* (ASA), determinaron que en el aminoácido 316, carnes de animales con el aminoácido alanina en esta posición, por ende animales homocigotos para la base citosina (alelo C), presentaban resistencias menores al corte que animales con glicina, homocigotos para guanina (alelo G) y menores, a la vez, que muestras de animales con genotipo heterocigoto. Por su parte, en el aminoácido 530, carnes de animales con el aminoácido valina en esta posición, o sea animales homocigotos para la base guanina (alelo

G) exhibían valores de WBSF menores que animales con isoleucina, homocigotos para adenina (alelo A) y menores que animales con genotipo heterocigoto. A la vez, se logró determinar que la variación de los valores de resistencia al corte entre ambos homocigotos era mucho mayor en el caso del marcador 316 que en el marcador 530, presentando 0,6 Kg. de diferencia entre homocigotos del marcador 316, versus 0,4 Kg. de diferencia entre los homocigotos del marcador 530 (Page *et al.*, 2004) (Tabla 2). Estos resultados fueron consistentes con el reporte original de estudio en poblaciones de toros realizado anteriormente, en donde las variantes haploides del tipo C/G (316/530) se asociaban con menores resistencias al corte (Page *et al.*, 2002).

Tabla 2: Comparación entre genotipo del marcador y WBSF en individuos con marcadores CAPN1 del ASA

GENOTIPO	WBSF, Kg ^a
Marcador 316	
CC	- 0,63 +/- 0,29
CG	- 0,24 +/- 0,10
GG	0
Marcador 530	
AA	0,38 +/- 0,15
AG	0,04 +/- 0,10
GG	0

^a: Desviación en la fuerza de resistencia (Page *et al.*, 2004)

A la vez, también se han hecho mediciones del efecto combinado de los SNPs sobre la característica en discusión (Tabla 3):

Tabla 3: Comparación entre WBSF y los dos SNPs de CAPN1 en individuos del ASA

	Marcador 316		
	CC	CG	GG
Marcador 530	WBSF, Kg ^a	WBSF, Kg ^a	WBSF, Kg ^a
AA	ND	- 0,52 +/- 0,42	0,25 +/- 0,17
AG	- 0,36 +/- 0,50	- 0,15 +/- 0,15	0,02 +/- 0,13
GG	- 0,69 +/- 0,36	- 0,23 +/- 0,16	0

^a: Desviación de la fuerza de resistencia; ND: no determinado (Page *et al.*, 2004)

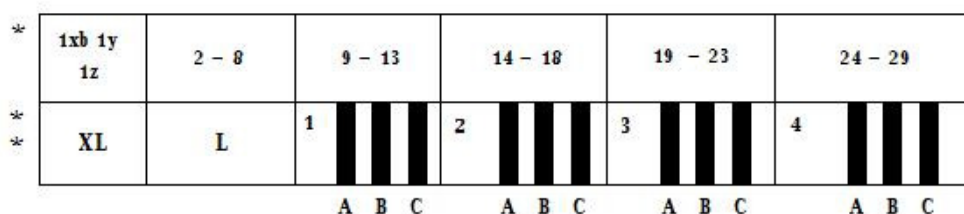
Los SNPs de CAPN1 son usados actualmente en diversos kits desarrollados por empresas privadas para la determinación genética de plantales productivos, kits que han sido validados en sus resultados por estudios y pruebas realizadas por la *National Beef Cattle Evaluation Consortium* o NBCEC (Van Eenennaam *et al.*, 2007).

2.2 GEN CALPASTATINE o CAST

CAST es el gen que codifica a la enzima Calpastatina, la cual tiene por función inhibir el funcionamiento tanto de μ - calpaína como de m – calpaína y por ende, toma un papel fundamental en la regulación de la degradación muscular y en la terneza de la carne. Este gen fue descrito y ubicado en el cromosoma 7 bovino (BTA7), mediante análisis y búsqueda de polimorfismos en el gen utilizando cortes con enzimas de restricción BamHI, EcoRI y TaqI (Bishop *et al.*, 1993).

Se han determinado distintas isoformas del gen CAST, las cuales a pesar de haber sido identificadas en distintas especies, no son de presentación exclusiva de éstas. En el caso de la isoforma determinada en bovinos, ésta se caracteriza por poseer en su extremo 5' tres exones identificados como 1xb, 1y y 1z, los cuales codifican el llamado dominio XL. Al inicio del código del dominio XL se encuentra un codón ATG, el cual es la opción principal de inicio de la transcripción/traducción del gen, a pesar de la existencia de un codón similar al final del código del dominio XL y que es homólogo al sitio de inicio de transcripción de otras isoformas de CAST, como la humana. Aún no está claro cuantos sitios de transcripción/traducción pueden ser usados en la expresión del gen CAST, en diferentes tejidos bajo diferentes condiciones fisiológicas. Luego encontramos la secuencia de 7 exones que codifica el dominio L, la cual puede variar mucho dependiendo de la acción de *splicing* alternativo, modificando este dominio. Por ultimo la secuencia de exones/intrones que codifican los dominios de inhibición, los cuales son altamente conservados. Con excepción del dominio IV que tiene un exón extra en COOH – terminal, todos estos dominios contienen cinco exones. A pesar de generar diversas isoformas, estudios muestran que éstas no difieren mucho en su capacidad de inhibir a las calpaínas (Figura 2) (Goll *et al.*, 2003).

Figura 2: Esquema gen CAST y Calpastatina, isoforma determinada en bovinos



*: Gen CAST indicando los exones que codifican cada dominio. Los exones del dominio XL son indicados por su nombre
 **: Calpastatina, se indican los dominios XL, L y los 4 dominios de inhibición; los subdominios A, B y C son los rectángulos negros (Gollet *et al.*, 2003)

Se han descrito varios SNP para CAST (Barendse, 2002), la gran mayoría descubiertos en la búsqueda de marcadores genéticos para la característica de ternera de la carne. Dentro de los SNPs descritos, destaca el ubicado en el segmento de la región no traducida 3' (del inglés: *Untranslated Region*, UTR), segmento que tiene gran importancia en la regulación de la expresión génica. Es en este segmento en donde podemos encontrar varias secuencias regulatorias, como las que marcan el final de la transcripción, sitios de unión a proteínas que pueden afectar la estabilidad o localización del RNA mensajero en la célula y sitios de unión de *RNA interference* que suprime la expresión de genes específicos (Mazumder *et al.*, 2003). Además, estos segmentos están implicadas en la correcta expresión espacial y temporal de los genes (Watson *et al.*, 2004). En este sector, se determinó un cambio en la secuencia de bases, específicamente en la base número 2959 de la secuencia, desde una guanina (alelo G) a una adenina (alelo A). Este SNP se identificó como marcador CAST – 2959 y también se determinó que este marcador genético tenía una asociación con el grado de ternera de la carne (Barendse, 2002). Estudios de medición de WBSF en planteles bovinos indicaron que individuos homocigotos para el alelo A poseían una reducción en la resistencia al corte de su carne de 8,6 +/- 2,0% en comparación con un individuo homocigoto para el alelo contrario, con valores para heterocigotos que fluctuaron en una reducción del 5,1 +/- 1,6% (Tabla 4) (Morris *et al.*, 2006).

Tabla 4: Comparación entre genotipo del marcador CAST – 2959 y WBSF en porcentaje en individuos

GENOTIPO	WBSF, % ^a
Marcador 2959	
AA	- 8,6 +/- 2,0%
AG	- 5,1 +/- 1,6%
GG	0

^a: Desviación Standard en el porcentaje de fuerza de resistencia (Según datos obtenidos por Morris *et al.*, 2006)

Como se menciona anteriormente, se han descrito muchos SNP de CAST, los cuales tienen correlación con la terneza de la carne y que son utilizados actualmente como marcadores genéticos en equipos de pruebas de terneza de la carne, elaborados y vendidos por entidades privadas (Schenkel *et al.*, 2006).

Finalmente, el efecto conjunto entre los SNP de CAPN1 y CAST, tomando en cuenta los extremos combinados que generan genotipos más duros y más blandos, mostrarán diferencias en WBSF del 25,7 +/- 5,5% (Morris *et al.*, 2006).

Para poder determinar la presencia de los SNPs, debemos utilizar herramientas y protocolos de experimentación que se engloban en los llamados “sistemas de identificación genética”.

3. **SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Los sistemas de identificación genética son tecnologías basadas en protocolos de experimentación de laboratorio que nos permiten efectuar la identificación de individuos basándonos en su DNA. En un principio, estos sistemas fueron usados en áreas de investigación legal, al ser usados en procesos forenses y pruebas de paternidad en humanos y luego se extendieron posteriormente al área animal al ser usados en comprobación de pedigree en ganado, caballos y perros. Después, esta tecnología se extendió aun más en esta área, al implementarla en los sistemas de trazabilidad de la carne (Cunningham y Meghen, 2001).

Estos sistemas de identificación basan su funcionamiento en la detección de marcadores genéticos, secuencias de DNA de ubicación conocida en un cromosoma y asociadas a un gen en particular y que pueden ser objeto de variación por mutación o alteración en el loci del genoma (Gomez – Raya *et al.*, 2002). En un principio, se desarrolló un sistema llamado *DNA fingerprinting*. Este sistema describía que el DNA debía pasar un proceso de digestión por enzimas específicas, dando como resultado un patrón de fragmentos de DNA al ser éste sometido a una electroforesis en gel, patrón que sería específico para cada individuo (Jeffreys *et al.*, 1985). Esta técnica a pesar de presentar una amplia gama de aplicaciones en

la investigación genética, también presentó limitaciones que fueron reconocidas tempranamente. Los fragmentos de DNA eran muy complejos y no eran fáciles de reproducir, además que el proceso de *DNA fingerprinting* requería una gran cantidad de DNA de alta calidad, la cual no siempre se encontraba disponible.

Posteriormente se describió la reacción de polimerasa en cadena o PCR. La idea detrás de esta reacción es generar en un tubo grandes cantidades de una secuencia de DNA en particular, la cual es identificada por un par de partidores de DNA artificiales de no más de 20 pares de bases. El método, en sí, consiste en un conjunto de ciclos repetitivos de denaturación, alineamiento y extensión, proceso que se concentra en el fragmento definido por las posiciones de los extremos 5' de los dos partidores unidos al DNA, así este fragmento aumentará su concentración exponencialmente y el proceso puede continuar por varios ciclos manteniendo su especificidad inherente (Mullis *et al.*, 1986). Con el tiempo, el PCR se convirtió en la base de los sistemas de identificación genética, permitiendo el desarrollo de diversas técnicas utilizadas en los procesos de identificación y detección de mutaciones y variables genéticas (Cunningham y Meghen, 2001).

Con el desarrollo del PCR, se crearon nuevos procesos, como el *Polimorfismo de tamaño en fragmento amplificado* o AFLP. Este método basa su funcionamiento al realizar una amplificación PCR de fragmentos específicos de un DNA digerido previamente. La técnica consta de tres pasos: restricción de DNA y ligación de adaptadores oligonucleótidos, amplificación selectiva de fragmentos de restricción y análisis de los fragmentos en gel. La amplificación de los fragmentos de restricción se logra usando adaptadores y secuencias de sitios de restricción como objetivos para el alineamiento de los partidores, los cuales permiten la extensión dentro de los fragmentos de restricción, amplificando sólo los fragmentos en donde la secuencia de los partidores coincida con los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción. Este método permite la visualización de varios sitios de restricción por PCR sin un conocimiento de la secuencia nucleotídica previa y permite la co-amplificación específica de un gran número de fragmentos de restricción. El AFLP se considera una nueva variante de *DNA fingerprinting* y se postula como una poderosa herramienta para el análisis de DNA de cualquier origen y complejidad (Vos *et al.*, 1995).

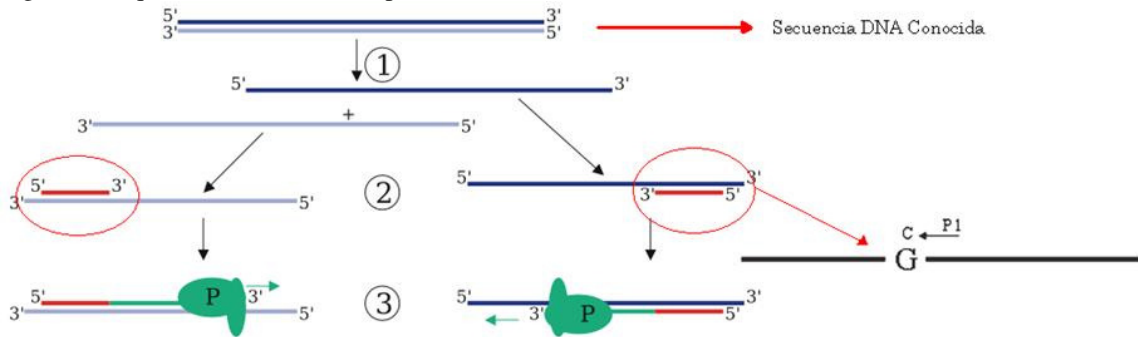
Sin embargo, lo que más impulsó al PCR en el tema de identificación genética fue la introducción de las repeticiones simples en línea (del inglés: *simple tandem repeats*, STR) o microsatélites. Éstos son secuencias repetidas de hasta 400 pares de bases, los cuales poseen unidades de repetición de 1 a 6 pares de bases de tamaño y que están ampliamente distribuidos en el genoma (Robinson, 2003). La utilidad de éstos para sistemas de identificación genética radica en su variación causada por mutación natural, la cual hará que las repeticiones aumenten o disminuyan, diferencias que se van acumulando por generaciones y generan diferentes individuos con diferentes variantes de microsatélites. Actualmente los microsatélites son utilizados en muchos procesos, como los sistemas de trazabilidad y otros (Cunningham y Meghen, 2001).

3.1 PCR ALELO ESPECÍFICO O AS – PCR

Con el descubrimiento e identificación de los SNP y su relación con las características en los animales, se requirió de una herramienta capaz de detectarlos, naciendo el *PCR alelo específico* (AS – PCR). El AS – PCR fue creado como una optimización del PCR tradicional, en busca de un sistema capaz de identificar mutaciones polimórficas puntuales en cualquier parte de la secuencia genómica, en estudios de enfermedades humanas. La clave en este caso, no sólo fue el conocimiento previo de la secuencia genética donde se encontraba la mutación del SNP, también fue en el desarrollo de los partidores de inicio. Los partidores fueron diseñados de tal forma que su extremo 3' fuera alelo específico, es decir, en este punto debe poseer una base complementaria a la del SNP. Así, el partidor es sintetizado de dos formas, la forma “normal” que será refractaria a la variación o mutación de la base y la forma “mutante”, refractaria a la normal. De esta manera, durante la fase de alineamiento del ciclo de PCR, si uno de los partidores se encuentra con una secuencia refractaria a la cual fue diseñado, se producirá un *mismatch*, una incompatibilidad entre partidor y secuencia, ya que, la base en el extremo 3' no es la complementaria a la del SNP y por ende, no se producirá el proceso de extensión por parte de la Taq polimerasa, caso contrario, en presencia de alineamiento perfecto entre partidor y secuencia si obtendremos la elongación del segmento. En algunos casos, una base en posición 3' de un partidor que no acopla perfectamente a la secuencia puede generar una amplificación del segmento, sin

embargo, se determinó que este problema puede aminorarse introduciendo deliberadamente secuencias incompatibles cerca de 3' en los partidores (Newton *et al.*, 1989) (Figura 3).

Figura 3: Esquema del PCR alelo específico



Los números representan las fases del ciclo de PCR: 1 = denaturación; 2 = Alineamiento; 3 = extensión. En la fase de alineamiento se hace una ampliación al partidor (P1) demostrando en su extremo 3' la base compatible con el SNP de la secuencia, lo que permite el paso a la fase siguiente (Newton *et al.*, 1989).

Con la creciente importancia y ventajas de los SNP, el AS – PCR se masificó, ya que la naturaleza de estos marcadores genéticos permitían análisis de fácil implementación y totalmente automatizados, con un gran poder de discriminación (Cunningham y Meghen, 2001). El AS – PCR se presenta no sólo como un protocolo de identificación genética, sino también como una herramienta altamente eficiente, de bajo costo y muy confiable en procesos de validación de SNPs descubiertos recientemente, rivalizando fuertemente con otros métodos como mini - secuenciación, técnicas basadas en ligasas o marcadores moleculares (Soleimani *et al.*, 2003). A pesar de ésto, actualmente se ha desarrollado una técnica mucho mas avanzada, el *PCR en tiempo real* (del ingles: *Real time PCR*, RT – PCR). Llamada también como análisis de PCR cinético, el RT – PCR no sólo amplificaba una secuencia de DNA objetivo, sino que a la vez, cuantificaba simultáneamente los fragmentos amplificados. Esta técnica sigue los pasos de un PCR tradicional pero va cuantificando la cantidad de amplificado mediante fluoróforos que se unen a las moléculas resultantes o a oligonucleótidos de DNA modificado que se tornan fluorescentes al unirse con cadenas de DNA complementarias. El RT – PCR permitió acceder a un método de monitoreo de la reacción de PCR aplicable a cualquier condición y redujo el riesgo de contaminación del producto al no necesitar abrir los tubos de reacción para sacarlo, ya que, no requiere de los pasos subsiguientes a los ciclos, simplificando el proceso completo. A la

vez, permitió dar una solución alternativa a otros métodos de medición cuantitativa en PCR, los cuales no sólo necesitaban un proceso de hibridización o electroforesis en gel, sino que poseían rangos muy limitados de medición, por lo cual, se pueden ver afectados fácilmente por diversos factores propios de la reacción (Higuchi *et al.*, 1993). A pesar de sus ventajas, su alto costo no lo hace un buen candidato para estudios muy específicos o con poco material de muestreo.

De la técnica de PCR, han derivado muchos otros métodos, sin embargo los mencionados son los relacionados directamente con la detección e identificación de variables genéticas.

HIPÓTESIS

Utilizando la técnica de PCR alelo específica, será posible discriminar de manera sencilla y en un solo paso la presencia de polimorfismos de un nucleótido (SNP) en los genes *CAST* y *CAPNI* en un grupo de animales seleccionados.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de polimorfismo genético del tipo SNP en los genes *CAPNI* y *CAST* relacionados con la terneza de la carne, utilizando la técnica de PCR alelo específica comprobando su eficacia mediante secuenciación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Implementar un protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de tejido pertenecientes a los animales en estudio.
- 2- Analizar la presencia de polimorfismo en los alelos *CAST* 2959 A > G, *CAPNI* 316 C > G y *CAPNI* 530 A > G a partir de las muestras de DNA obtenidas, utilizando la técnica de PCR alelo específica.
- 3- Comprobar la presencia de los polimorfismos mediante la secuenciación de las muestras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo N° 1: Implementar un protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de tejido pertenecientes a los animales en estudio.

Protocolo de extracción de muestras de DNA:

Se dispuso de muestras de semen congelado. Estas muestras provienen de pajuelas para inseminación artificial, cuyo origen son los toros indicados en el catálogo de toros 2007 del INDAP para ayudar al mejoramiento de los rebaños de la agricultura familiar campesina del país.

Las pajuelas fueron descongeladas según el protocolo establecido para descongelación entregado por el proveedor (Cooprinsem, ABS y Select Sires) y sometidas a lavado para retirar el crioprotector y luego el semen fue depositado en tubos de centrifuga de 1.5 ml. Luego se adicionó en los tubos 800 µl de tampón de lisis de DNA (50 mM de Tris HCL, 50 mM EDTA pH 8 y 400 mM NaCl), 100 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (20 µg/ml). Los tubos con el contenido se sometieron a agitación en vortex por unos segundos y se incubaron a 65° C por 24 horas en baño seco. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 15961 G por 15 minutos, para luego extraer por pipeteo 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio, evitando tomar la fracción sólida del fondo, así como la fracción superficial oleosa en el caso que hubiese. En los tubos nuevos con sobrenadante, se agregó una mezcla de 200 µl de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (50%, 48%, 5%) y nuevamente se sometieron a centrifugación a 15961 G por 15 minutos, retirando posteriormente el sobrenadante y depositándolo en un tubo limpio. A este se le adicionó igual volumen de isopropanol 100% y se incubará por 24 horas a -20 ° C a cada uno. Estos nuevos tubos fueron centrifugados a 15961 G por 15 minutos, y se descartó todo el sobrenadante resultante, dejando sólo el precipitado. Este precipitado se sometió a lavado con 500 µl de etanol 70°, evitando perder o disgregar el precipitado, para luego descartar el alcohol y secarlo en estufa a 37° C por un lapso de 2 horas. Finalmente se resuspendió en 50 µl de H₂O libre de nucleasas y se mantendrán almacenados a -20° C.

A la vez, se dispuso de muestras de tejido de animales de un plantel híbrido de raza Wagyu. Este plantel, se ubicaba en el fundo “Las Lumas” en Panguipulli y se componía de 66 animales de padre Wagyu y madres de distintas razas, las cuales fueron inseminadas artificialmente. Las muestras son tejido perteneciente a la oreja derecha de cada uno de éstos, extraída por un crotal previamente desinfectado y fueron etiquetadas con dos códigos: uno dado por el código del crotal impuesto por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para identificación de los animales del plantel y el otro código impuesto en este estudio a modo de facilitar el almacenamiento de las muestras. De las 66 muestras pertenecientes a los animales de este plantel, se tomaron 26 para proceder a la extracción de DNA (Tabla 5):

Tabla 5: Identificación de muestras de tejido, provenientes de animales híbridos Wagyu, según codificación impuesta por SAG y código de almacenamiento, utilizados en proceso de extracción de DNA.

CODIGO ALMACENAMIENTO	CODIGO SAG
2C	000239968
3C	001165521
4D	001165487
5D	001165534
6F	001165468
2D	001165474
3D	001165465
4E	001165481
5E	001165516
6G	001165458
3H	001165560
4H	001165510
5I	000239977
6I	000239980
7A	001165501
2H	001165532
5H	001165491
4I	001165444
2I	000239966
7B	000239970
7F	000239965
5A	001165536
6J	001165466
3G	001165488
2G	001165478
2F	001165497

La muestra de tejido fue lavada, se extrajo los pelos y se fraccionó, para luego depositarlas en tubos de centrifuga de 1.5 ml. Luego se adicionó en los tubos 800 µl de tampón de lisis de DNA, 100 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K. Los tubos con el contenido se sometieron a agitación en vortex por unos segundos y se incubaron a 65° C por 24 horas en baño seco. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 15961 G por 15 minutos, para luego extraer por pipeteo 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio, evitando tomar la fracción sólida del fondo, así como la fracción superficial oleosa. En los tubos nuevos con sobrenadante, se agregaron una mezcla de 200 µl de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (50%, 48%, 5%) y nuevamente se sometieron a centrifugación a 15961 G por 15 minutos, retirando posteriormente el sobrenadante y depositándolo en un tubo limpio. A este se le adicionaron igual volumen de isopropanol 100% y se incubó por 24 horas a -20 ° C a cada uno. Estos nuevos tubos fueron centrifugados a 15961 G por 15 minutos, y se descartó todo el sobrenadante resultante, dejando solo el precipitado. Este precipitado se sometió a lavado con 500 µl de etanol 70°, evitando perderlo o disgregarlo, para luego descartar el alcohol y secarlo en estufa a 37° C por un lapso de 2 horas. Finalmente se resuspendió en 50 µl de H₂O libre de nucleasas y se mantendrán almacenados a -20° C.

En ambos casos, se midió la concentración de DNA resultante de la extracción en un espectrofotómetro Ati Unicam UV/VIS Spectrometer UV2.

Objetivo N° 2: Analizar la presencia de polimorfismo en los alelos *CAST 2959 A > G*, *CAPNI 316 C > G* y *CAPNI 530 A > G* a partir de las muestras de DNA obtenidas, utilizando la técnica de PCR alelo específica.

Protocolo de calibración de temperaturas de alineamiento y número de ciclos para TAQ Polimerasa

Antes de comenzar la identificación de los polimorfismos, se realizó una calibración de las temperaturas de alineamiento y en especial, los números de ciclos de PCR óptimos para el estudio. La muestra utilizada para la calibración fue el DNA extraído desde semen del animal código AN0791, nombre Sitz Alliance, raza Angus Negro, propiedad de

Cooprinsem. En tubos de centrífuga de 0.2 ml se creó una mezcla compuesta de: 1.25 µl de solución tampón de reacción PCR 10X RBC Bioscience® [500mM KCl, 15 mM MgCl, 100 mM Tris – HCl (pH 8.3), 1 mg/ml BSA, 100 mM (NH₄)SO₄]; 0.25 µl de dNTPs 10 mM; 1 µl de partidores (0.5 µl partidor directo, 0.5 µl partidor reversa), para marcador *CAPNI* – 530, previamente diseñados con el programa Primer3™ Versión 0.4.0 y analizados en el programa OligoAnalyzer™ Versión 1.0.2; 0.063 µl de Taq polimerasa RBC Bioscience® (5 U/µl) y 2 µl de material genético. Se agregó a la mezcla H₂O libre de nucleasas hasta completar una cantidad de 12.5 µl en el tubo. Se prepararon 24 tubos de reacción para marcador *CAPNI* – 530 alelo G y 24 tubos para *CAPNI* – 530 alelo A, los cuales se utilizaron en una reacción PCR con temperaturas de alineamiento en gradiente, desde 59° C hasta 64.5° C, manteniendo las temperaturas de *denaturación* y *elongación* en 95° C y 72° C respectivamente. También las reacciones se realizaron a cantidad de ciclos de PCR distintos, desde 18 ciclos hasta 24 ciclos, con tiempos por fase en cada ciclo de 30 segundos para *denaturación*, 30 segundos para *alineamiento* y 15 segundos para *elongación*.

Visualización de prueba de calibración:

Las mezclas sometidas a PCR para esta prueba, se cargaron en conjunto con tampón de carga DNA 6X en un gel de agarosa en tampón TAE (40mM Tris acetato, 1mM EDTA pH 7.4) y se sometieron a electroforesis a 80 Volts, en cámara de electroforesis con TAE 1X.

Protocolo de PCR alelo específico para determinar presencia de Polimorfismo:

Cada muestra de DNA fue sometida a una reacción de PCR para la determinación del polimorfismo de genes *CAST* y *CAPNI*. En tubos de centrífuga de 0.2 ml se creó una mezcla compuesta de: 1.25 µl de solución tampón de reacción PCR 10X RBC Bioscience®; 0.25 µl de dNTPs 10 mM; 1 µl de partidores (0.5 µl partidor directo, 0.5 µl partidor reversa), para los marcadores *CAST*, *CAPNI* – 316 y *CAPNI* – 530, previamente diseñados con el programa Primer3™ Versión 0.4.0 y analizados en el programa OligoAnalyzer™ Versión 1.0.2; 0.063 µl de Taq polimerasa RBC Bioscience® y 2 µl de material genético. Se agregó a la mezcla H₂O libre de nucleasas hasta completar una cantidad de 12.5 µl en el

tubo. Ésto sometió a cada muestra de DNA a reacciones de PCR alelo específico que solo varían en el tipo de partidor de inicio para cada uno de los SNP en estudio (Tabla 6):

Tabla 6: Identificación de partidores, secuencias de partidores y secuencias de alelos identificables para cada SNP, utilizados en reacción de polimerasa en cadena

GEN	PARTIDOR	SECUENCIA DEL PARTIDOR	SECUENCIA ALELOS
CAST 2959	CAST A	5' – CTC ATG ACC CCT TTC CTC TTA – 3'	AA – AG – GG
	CAST G	5' – CTC ATG ACC CCT TTC CTC TTG – 3'	
	CAST R	5' – CAG TAC TGC GGC AGA GAT CAA – 3'	
CAPN1 316	CAPN1 316 C	5' – AGC TCC TCG GAG TGG AAC GC – 3'	CC – CG – GG
	CAPN1 316 G	5' – AGC TCC TCG GAG TGG AAC GG – 3'	
	CAPN1 316 R	5' – GTG AGG AAA CAG GCT CAG AGA G – 3'	
CAPN1 530	CAPN1 530 A	5' – GCA GAG AGC TGG ATG ACC AGG – 3'	AA – AG – GG
	CAPN1 530 G	5' – GCA GAG AGC TGG ATG ACC AGA – 3'	
	CAPN1 530 R	5' – CCT CTC TGA ACC TGA GTT TCC CT – 3'	

La reacción de PCR sometió a los tubos a 22 ciclos, cada uno compuestos de las 2 primeras fases de 30 segundos cada una y la de *elongación* de 15 segundos, diferenciadas en sus temperaturas. Aunque las temperaturas de *denaturación* y *elongación* serán las mismas para los 3 genes en estudio (95° C y 72 ° C respectivamente, por un tiempo de 30 y 15 segundos cada una respectivamente), la temperatura de *alineamiento* será distinta, siendo en el caso de *CAST – 2959* 56° C, en *CAPN1 – 316* 61° C y en *CAPN1 – 530* 62° C, todas por 30 segundos. Terminado el proceso se almacenaron en frío para su posterior utilización.

Electroforesis en gel de agarosa:

Las mezclas sometidas a PCR, se cargaron en conjunto con tampón de carga DNA 6X en un gel de agarosa en tampón TAE y se sometieron a electroforesis a 80 Volts, en cámara de electroforesis con TAE 1X.

Objetivo N° 3: Comprobar la presencia de los polimorfismos mediante la secuenciación de las muestras.

Protocolo de PCR para partidores de secuenciación de segmentos con los SNP en estudio

Se diseñaron partidores de inicio “de secuenciación”, partidores distintos a los partidores de inicio que identifican el SNP y que se ubican en un segmento de la secuencia de DNA alejado del segmento del marcador genético. Cada partidor de secuenciación para cada SNP fue diseñado de tal forma que utilizara el mismo partidor reversa de los partidores de SNP y utilizara temperaturas de alineamiento también idénticas a éstos. Estos partidores fueron diseñados con el programa Primer3TM Versión 0.4.0 y analizados en el programa OligoAnalyzerTM Versión 1.0.2 (Tabla 7):

Tabla 7: Identificación de partidores de secuenciación, secuencias genéticas de éstos y temperaturas de alineamiento, para los SNP en estudio.

GEN	PARTIDOR	SECUENCIA	t° ALINEAMIENTO
CAST 2959	CASTsec F	5'- CCT TCA GTT GGG AGA GAA AGG - 3'	56° C
CAPN1 316	CAPN1 316sec F	5'- GGG GTC TCT GGA CTT GCC CT - 3'	61° C
CAPN1 530	CAPN1 530sec F	5'- TCG AGC CCA ACA AGG AAG GTG - 3'	62° C

En tubos de centrifuga de 0.2 ml se creó una mezcla compuesta de: 5 µl de solución tampón de reacción PCR 10X RBC Bioscience[®]; 1 µl de dNTPs 10 mM; 2 µl de partidores (1 µl partidor directo de secuenciación, 1 µl partidor reversa); 0.3 µl de Taq polimerasa RBC Bioscience[®] y 4 µl de material genético. Se agregó a la mezcla H₂O libre de nucleasas hasta completar una cantidad de 50 µl en el tubo. Se realizó una reacción de PCR de 30 ciclos y cada ciclo con sus 3 fases de 30 segundos de duración.

Electroforesis en gel de agarosa y rescate de bandas de producto de PCR:

Las mezclas sometidas a PCR, se cargaron en conjunto con tampón de carga DNA 6X en un gel de agarosa en tampón TAE y se sometieron a electroforesis a 80 Volts, en cámara de electroforesis con TAE 1X. Las bandas con el producto de PCR de los partidores de secuenciación fueron extraídas del gel y el producto fue purificado de éste mediante el uso del AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit de Axygen[®] Bioscience.

Ligación a plasmidio del segmento de DNA y transformación a componente celular para clonación

El producto de PCR de secuenciación rescatado del gel de agarosa es sometido a ligación a plasmidio, usando el protocolo del kit para vector pGEM[®] - T Easy de PROMEGA[®] Corporation, el cual se dejó incubando por un periodo de 24 horas a 4° C.

Luego se realizó la transformación de este plasmidio a componente celular, utilizando células competentes JM109. En tubos de centrifuga de 1.5 ml, se agregó 1 ml de cultivo de JM109, tubos depositados en hielo previamente. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 15961 G por 30 segundos a 4° C y el sobrenadante se retiró, resuspendiendo cuidadosamente el precipitado en 50 µl de medio de cultivo (tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, H₂O destilada). Ésto se incubó por 5 minutos en hielo, para luego adicionar 50 µl de 2X TSS (caldo de cultivo, PEG 10%, DMSO 5%, 20 mM Mg⁺², pH 6.5) y se mezcló cuidadosamente. Se volvió a incubar por 5 minutos en hielo para luego adicionar 5 µl del plasmidio con el segmento de DNA ligado a los tubos con JM109. Posteriormente se procedió a incubar por 60 minutos en hielo, para luego dar un “golpe de calor” al tubo de 90 segundos a 42° C y volver a incubar en hielo por 5 minutos. Cumplido este tiempo, se agregó 1 ml de caldo de cultivo y se procedió a incubar los tubos a 37° C por 60 minutos, tiempo que permite que las células expresen su resistencia a antibióticos. A continuación, se volvieron a centrifugar los tubos a 15961 G por 30 segundos a 4° C, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 100 µl de caldo de cultivo. El sedimento resuspendido fue sembrado en placas con medio de cultivo, agar, ampicilina [100 mg/ml], X – Gal e IPTG, placas que fueron incubadas a 37° C por 24 horas.

Extracción de colonias positivas, PCR de comprobación y purificación del plasmidio

Pasado el periodo de incubación, se rescataron de la placa las colonias color blanco (las cuales poseen el plasmidio con el segmento de DNA ligado) y una colonia color azul (que se considera negativa, con plasmidio sin segmento ligado) y se resuspenden en un tubo de centrifuga de 0.6 ml, con 30 µl de caldo de cultivo. A estas colonias resuspendidas se les realiza un PCR de comprobación, para ver si las colonias positivas lo son realmente. En tubos de centrifuga de 0.2 ml se creó una mezcla compuesta de: 2.5 µl de solución tampón de reacción PCR 10X RBC Bioscience[®]; 0.5 µl de dNTPs 10 mM; 2 µl de partidores M13

(1 µl partidor directo, 1 µl partidor reversa); 0.13 µl de Taq polmerasa RBC Bioscience® y 5 µl de material genético. Se agregó a la mezcla H₂O libre de nucleasas hasta completar una cantidad de 25 µl en el tubo. Se corrieron 30 ciclos de PCR con fase de *denaturación* de 30 segundos a 95° C, *alineamiento* de 47° C por 30 segundos y *elongación* de 72° C por 30 segundos. Una vez comprobadas las colonias positivas al correr el PCR en gel de agarosa, las colonias resuspendidas fueron vertidas en tubos de 50 ml, con 20 ml de medio de cultivo y 20 µl de ampicilina, incubándolos a 37° C por 24 horas.

Pasadas las 24 horas, los cultivos fueron sometidos a extracción y purificación del plasmidio, mediante el uso del AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit de Axygen® Bioscience.

Secuenciación de los segmentos de DNA en plasmidio

Los plasmidios extraídos fueron enviados al Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para ser sometidos a secuenciación automática de DNA, resultados que serán comparados con las secuencias presentes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS

Objetivo N° 1: Implementar un protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de tejido pertenecientes a los animales en estudio.

Una vez realizado el protocolo de extracción de DNA en las muestras, se procedió a comprobar la efectividad de éste, mediante la medición de concentración de DNA por espectrofotómetro. Los resultados fueron ordenados y tabulados según el grupo de animales al cual pertenecían (Tabla 8 y Tabla 9):

Tabla 8: Concentración de DNA (ng/μl) extraído de muestras de semen de toros de catalogo INDAP 2007, según espectrofotómetro.

RAZA	EMPRESA	NOMBRE	CODIGO	280 nm	260 nm	[DNA] ng/μl
Angus Rojo	Select Sires	Field Day	7AR049	0.026	0.026	20
		Logan	29ARO142	0.008	0.007	0
		Rambler	7AR048	0.022	0.024	60
		Virile	7AR040	0.023	0.025	28
	ABS	Above & Beyond	29ARO183	0.000	0.000	0
		Makin Hay	014AR02034	0.000	0.001	0
	Cooprinsem	All Beef	1AR0885	0.017	0.018	13
		Maximus	7AR050	0.027	0.029	32
Red Spread		014AR02015	0.017	0.015	58	
Angus Negro	Select Sires	Sultan	7AN244	0.014	0.016	13
		Dillon	7AN233	0.032	0.033	32
		Bextor	7AN207	0.011	0.012	10
	ABS	Innovator	29AN1634	0.007	0.006	13
		N Bar Prime Time	29AN1520	0.008	0.008	8
		New Desing	878 29AN1523	0.005	0.004	8
		Power Desing	29AN1530	0.007	0.007	25
	Cooprinsem	Sitz Alliance	1AN0791	0.008	0.014	65
		Final Answer	1AN1044	0.004	0.003	0
Genetics By Desing		014AN00249	0.002	0.003	0	
Hereford	Cooprinsem	New Dimension	1HP0814	0.002	0.003	0
		Prospector	014HP01007	0.001	0.002	0
		World Class	014HP01009	0.001	0.001	0
Simmental	Cooprinsem	Autobahn	7SM036	0.010	0.011	15
		Majestic	7SM046	0.013	0.015	25
		Real Deal	014SM03031	0.006	0.007	2

Tabla 9: Concentración de DNA (ng/μl) extraído de muestras de tejido de novillos híbridos Wagyu del fundo “Las Lumas”, Panguipulli, según espectrofotómetro.

ANIMAL	CODIGO	280 nm	260 nm	[DNA] ng/μl
2C	000239968	0.018	0.040	200
3C	001165521	0.022	0.036	180
4D	001165487	0.015	0.038	190
5D	001165534	0.015	0.084	420
6F	001165468	0.018	0.046	230
2D	001165474	0.013	0.024	120
3D	001165465	0.012	0.025	125
4E	001165481	0.005	0.013	65
5E	001165516	0.011	0.018	90
6G	001165458	0.069	0.018	90
3H	001165560	0.014	0.028	140
4H	001165510	0.007	0.015	75
5I	000239977	0.009	0.028	140
6I	000239980	0.006	0.054	270
7A	001165501	0.009	0.051	255
2H	001165532	0.005	0.047	235
5H	001165491	0.014	0.090	450
4I	001165444	0.008	0.060	300
2I	000239966	0.007	0.052	260
7B	000239970	0.010	0.048	240
7F	000239965	0.011	0.019	95
5A	001165536	0.019	0.032	160
6J	001165466	0.010	0.016	80
3G	001165488	0.010	0.019	95
2G	001165478	0.007	0.013	65
2F	001165497	0.011	0.019	95

Todas las mediciones realizadas en el espectrofotómetro, fueron a 260 y 280 nm de longitud de onda, en ambos casos. A la luz de los resultados de concentración obtenidos, se decidió realizar los objetivos siguientes con el grupo de muestras provenientes de novillos híbridos Wagyu, rescatando sólo la muestra AN0791 del grupo de muestras de semen.

Objetivo N° 2: Analizar la presencia de polimorfismo en los alelos *CAST A > G*, *CAPNI 316 C > G* y *CAPNI 530 A > G* a partir de las muestras de DNA obtenidas, utilizando la técnica de PCR alelo específica.

Calibración de temperaturas de alineamiento y número de ciclos para TAQ Polimerasa

En la práctica, la reacción de PCR puede fallar por diversas causas, entre las cuales se encuentra la implementación errónea de las temperaturas y ciclos exactos de la reacción, lo cual puede conducirnos a la obtención de falsos positivos, falsos negativos, etc. Ésto se acentúa mucho mas en una reacción de PCR alelo específica (Bartlett y Stirling, 2003). Por ello, se decidió como primer paso realizar una calibración de temperaturas y ciclos del proceso en si. Para tal efecto, se escogió una muestra con resultados ya conocidos de PCR para un SNP en particular (Figura 4). Con esta muestra se realizó la prueba, la cual indicó los rangos de temperatura de alineamiento y número de ciclos óptimos para trabajar con la TAQ polimerasa y realizar el estudio, para evitar errores (Figura 5).

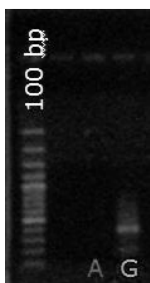


Figura 4: Gel de agarosa 1% en tampón TAE que revela reacción PCR alelo específica para muestra AN0791, para SNP *CAPNI – 530*. La banda a la altura de 300 bp, ubicada en el tercer carril desde la escala de peso de DNA indica la presencia del alelo G en el SNP.

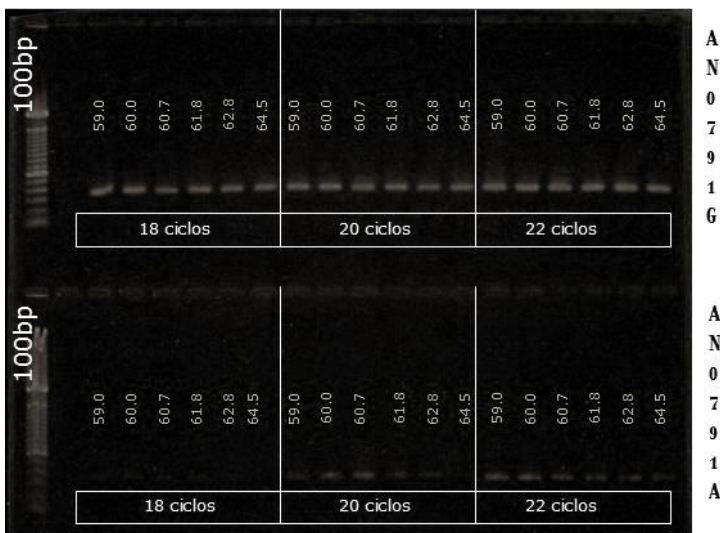


Figura 5: Gel de agarosa en tampón TAE que revela resultados de calibración de TAQ polimerasa en muestra AN0791.

Número de Ciclos ideal: 18 ciclos
 t° alineamiento ideal: 62°C para *CAPNI 530*

Posteriormente, se consideró que la temperatura de alineamiento óptima para los partidores de los SNPs en estudio sería 3 grados menor que la temperatura de *melting* teórica, ofrecida por el programa de diseño de partidores OligoAnalyzer™ Versión 1.0.2, temperaturas que están indicadas en la sección de materiales y métodos.

Identificación de polimorfismos para los SNPs CAPN1 – 316, CAPN1 – 530 y CAST – 2959 en las muestras.

Previamente, se estandarizó la concentración de DNA de todas las muestras de DNA Wagyu a 65 ng/µl mediante dilución de éstas, concentración similar a la obtenida en muestra AN0791. Luego, los datos obtenidos de los resultados de las pruebas de AS – PCR fueron tabulados para su presentación (Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12):

❖ Tabla 10: Resumen de presencia / ausencia de alelos para SNP CAPN1 – 316 en muestras de tejido de animales novillos Wagyu y muestra semen AN0791

ANIMAL	CODIGO	CAPN1 316		ANIMAL	CODIGO	CAPN1 316	
		G	C			G	C
2C	000239968	1	0	6I	000239980	1	1
3C	001165521	1	1	7A	001165501	1	1
4D	001165487	1	0	2H	001165532	1	1
5D	001165534	1	1	5H	001165491	1	1
6F	001165468	1	0	4I	001165444	1	0
2D	001165474	1	1	2I	000239966	1	0
3D	001165465	1	1	7B	000239970	1	1
4E	001165481	1	0	7F	000239965	1	1
5E	001165516	1	0	5A	001165536	1	1
6G	001165458	1	0	6J	001165466	0	1
3H	001165560	1	0	3G	001165488	1	1
4H	001165510	1	1	2G	001165478	1	1
5I	000239977	1	1	2F	001165497	1	1
				Sitz Alliance	1AN0791	0	1

1: presencia del alelo; 0: ausencia del alelo

Figura 6: Gráfico resumen de resultados de PCR para SNP CAPN1 – 316 en muestras de DNA de novillos híbridos Wagyu y semen de toro AN0791

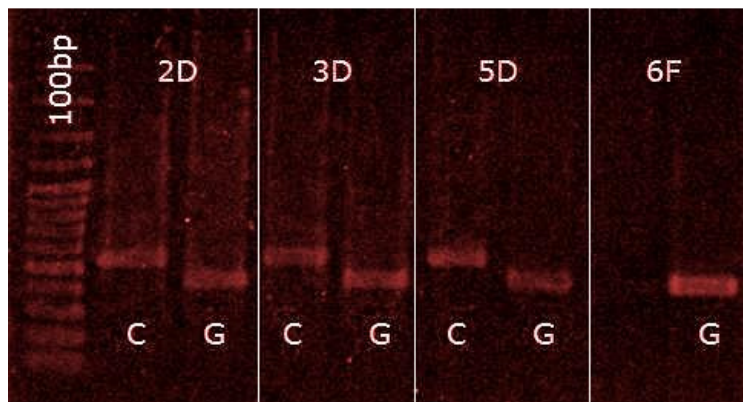
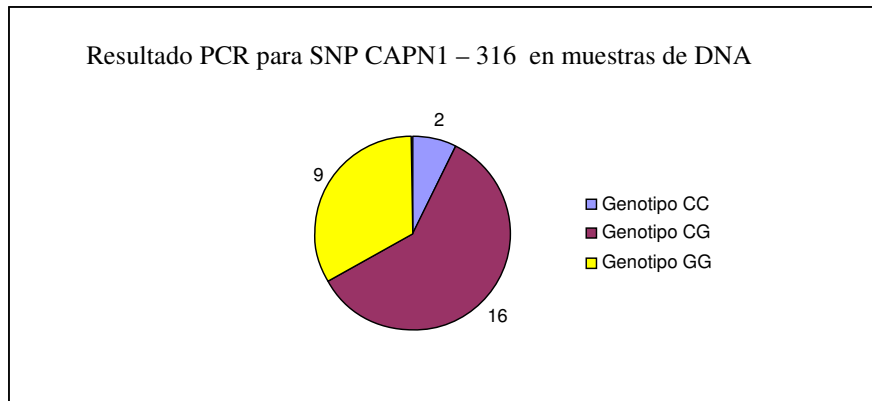


Figura 7: Gel de agarosa en tampón TAE que revela presencia de alelos G/C para SNP CAPN1 – 316 para muestras Wagyu 2D, 3D, 5D y 6F.

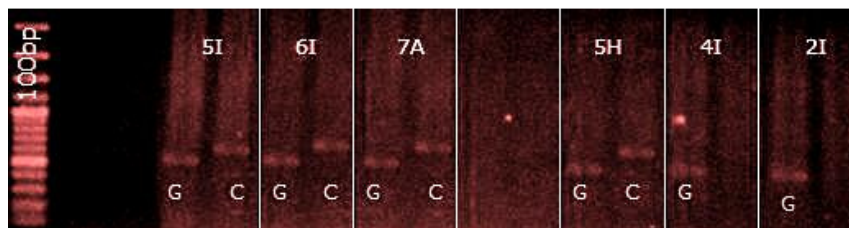


Figura 8: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/C para SNP CAPN1 – 316 para muestras Wagyu 5I, 6I, 7A, 5H, 4I y 2I

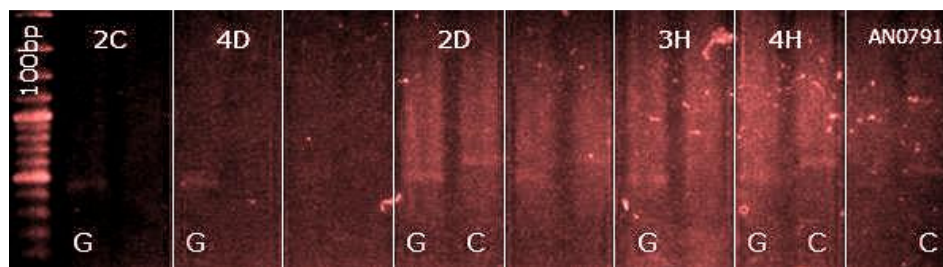


Figura 9: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/C para SNP *CAPN1* – 316 para muestras Wagyu 2C, 4D, 2D, 3H, 4H y en AN0791.

❖ Tabla 11: Resumen de presencia / ausencia de alelos para SNP *CAPN1* – 530 en muestras de tejido de animales novillos Wagyu y muestra semen AN0791

ANIMAL	CODIGO	CAPN1 530		ANIMAL	CODIGO	CAPN1 530	
		G	A			G	A
2C	000239968	1	0	6I	000239980	1	0
3C	001165521	1	0	7A	001165501	1	0
4D	001165487	1	0	2H	001165532	1	0
5D	001165534	1	0	5H	001165491	1	0
6F	001165468	1	1	4I	001165444	1	0
2D	001165474	1	0	2I	000239966	1	0
3D	001165465	1	1	7B	000239970	1	0
4E	001165481	1	0	7F	000239965	1	1
5E	001165516	1	1	5A	001165536	1	0
6G	001165458	1	0	6J	001165466	0	0
3H	001165560	1	0	3G	001165488	1	1
4H	001165510	1	0	2G	001165478	1	0
5I	000239977	1	0	2F	001165497	1	0
				Sitz Alliance	1AN0791	1	0

1: presencia del alelo; 0: ausencia del alelo

Figura 10: Gráfico resumen de resultados de PCR para SNP CAPN1 – 530 en muestras de DNA de novillos híbridos Wagyu y semen de toro AN0791

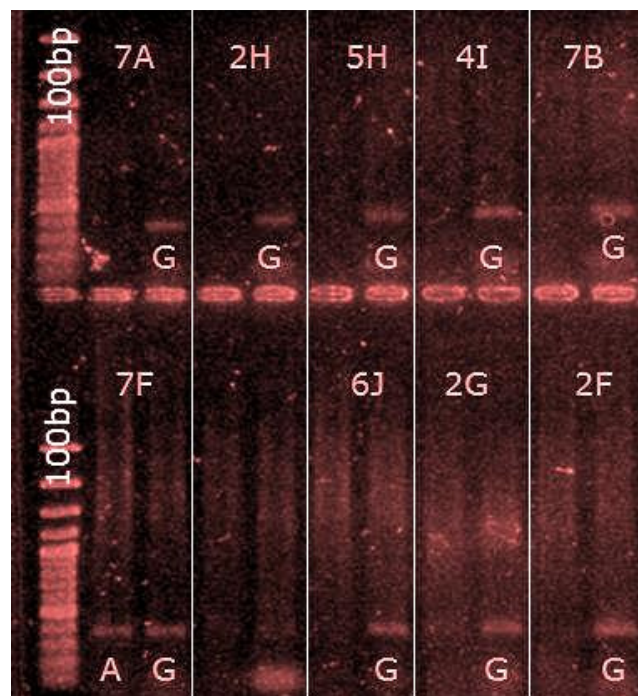
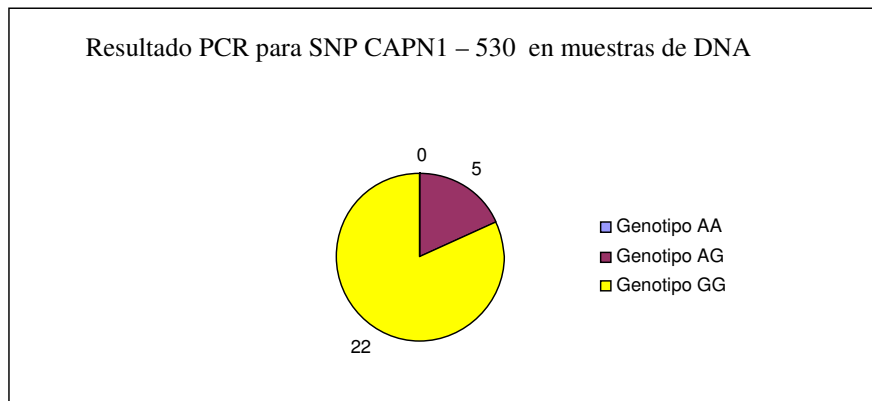


Figura 11: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/A para SNP CAPN1 – 530 para muestras Wagyu 7A, 2H, 5H, 4I, 7B, 7F, 6J, 2G y 2F.

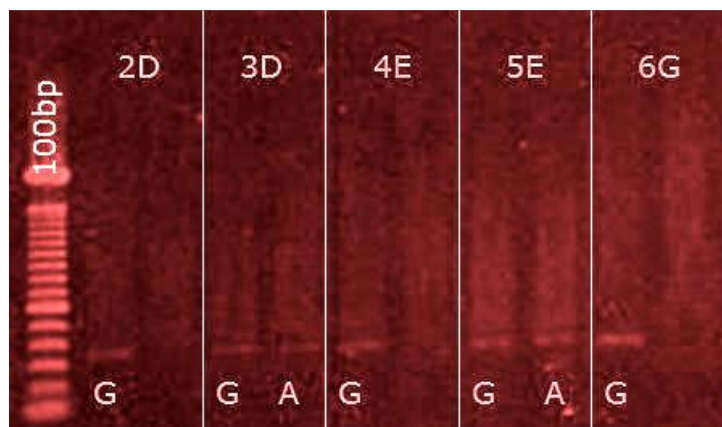


Figura 12: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/A para SNP *CAPNI* – 530 para muestras Wagyu 2D, 3D, 4E, 5E y 6G.

❖ Tabla 12: Resumen de presencia / ausencia de alelos para SNP *CAST* – 2959 en muestras de tejido de animales novillos Wagyu y muestra semen AN0791

ANIMAL	CODIGO	CAST 2959		ANIMAL	CODIGO	CAST 2959	
		G	A			G	A
2C	000239968	0	1	6I	000239980	1	1
3C	001165521	1	0	7A	001165501	1	1
4D	001165487	0	1	2H	001165532	1	1
5D	001165534	1	1	5H	001165491	1	1
6F	001165468	0	1	4I	001165444	1	1
2D	001165474	1	1	2I	000239966	1	1
3D	001165465	1	0	7B	000239970	1	1
4E	001165481	1	1	7F	000239965	0	1
5E	001165516	0	1	5A	001165536	1	1
6G	001165458	1	1	6J	001165466	1	1
3H	001165560	0	1	3G	001165488	0	1
4H	001165510	1	1	2G	001165478	0	1
5I	000239977	0	1	2F	001165497	0	1
				Sitz Alliance	1AN0791	1	1

1: presencia del alelo; 0: ausencia del alelo

Figura 13: Gráfico resumen de resultados de PCR para SNP CAST – 2959 en muestras de DNA de novillos híbridos Wagyu y semen de toro AN0791

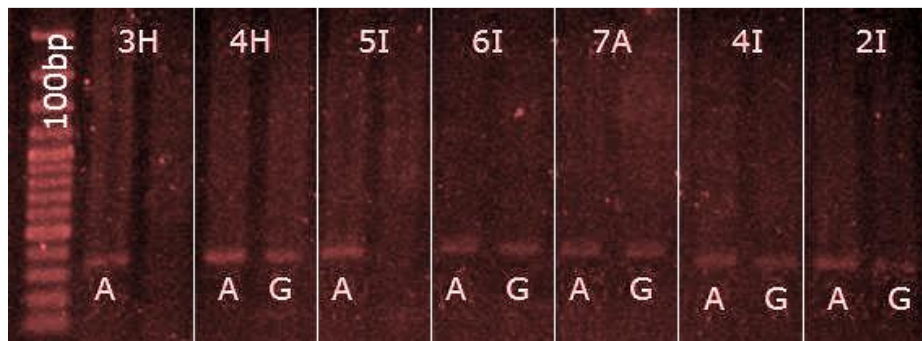
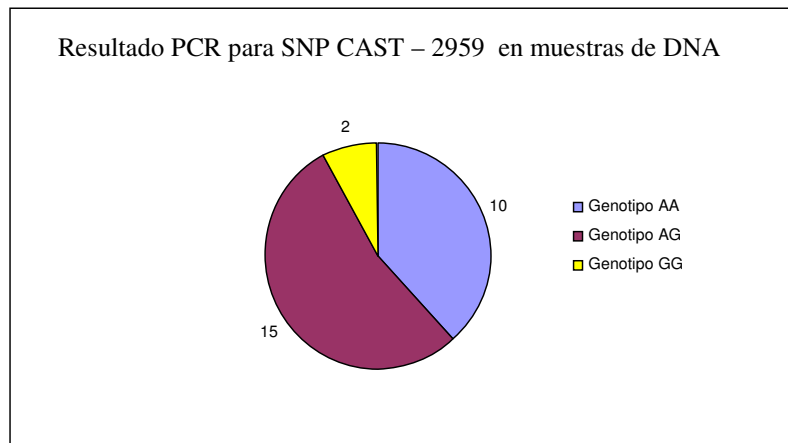


Figura 14: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/A para SNP CAST – 2959 para muestras Wagyu 3H, 4H, 5I, 6I, 7A, 4I y 2I.

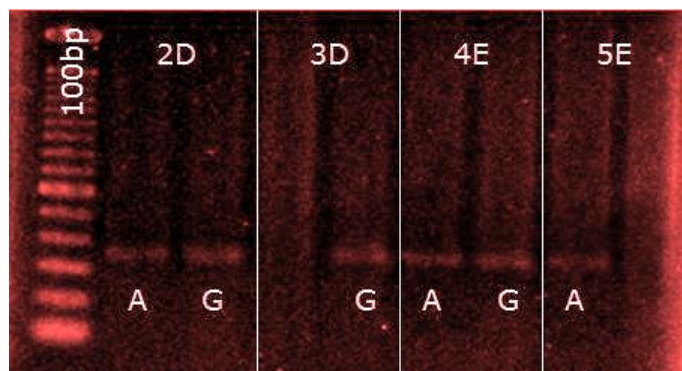


Figura 15: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/A para SNP CAST – 2959 para muestras Wagyu 2D, 3D, 4E y 5E.

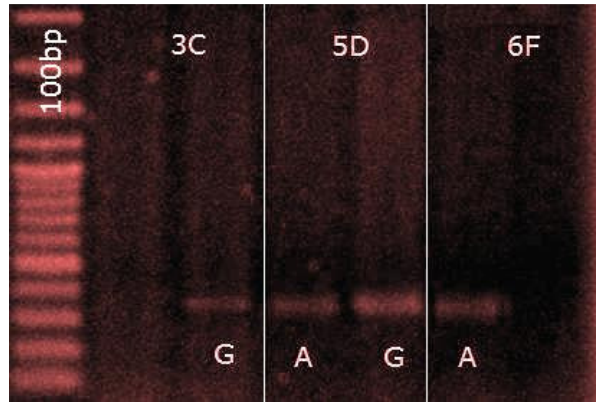


Figura 16: Gel de agarosa en tampón TAE que revela la presencia de alelos G/A para SNP *CAST – 2959* para muestras *Wagyu* 3C, 5D y 6F.

Objetivo N° 3: Comprobar la presencia de los polimorfismos mediante la secuenciación de las muestras.

Ligación de segmento PCR a vector pGEM – T Easy.

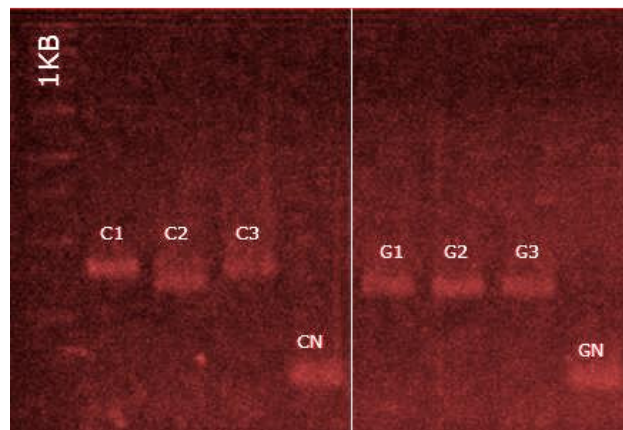


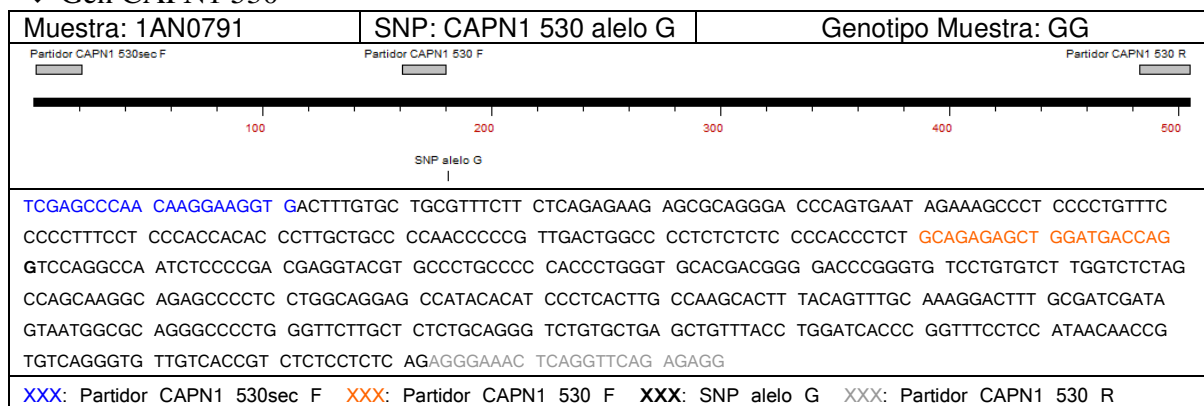
Figura 17: Gel de agarosa en tampón TAE que muestra colonias con inserto de plasmidio positivo y negativo. Se insertaron los dos alelos de *CAPNI – 316* en las secuencias de dos plasmidios y éstos se introdujeron en bacterias JM109. Se rescataron 3 colonias positivas y una negativa para cada caso (GN y CN). Muestra utilizada: 2D/001165474.

Se escogió una colonia positiva de cada alelo y se replicaron en medio de cultivo para luego extraer gran cantidad de plasmidio y posteriormente se enviaron a secuenciación. Todo el proceso se llevó a cabo a la vez con muestra 6F/001165468 para *CAST* (A) y con AN0791 para *CAPNI – 530* (G)

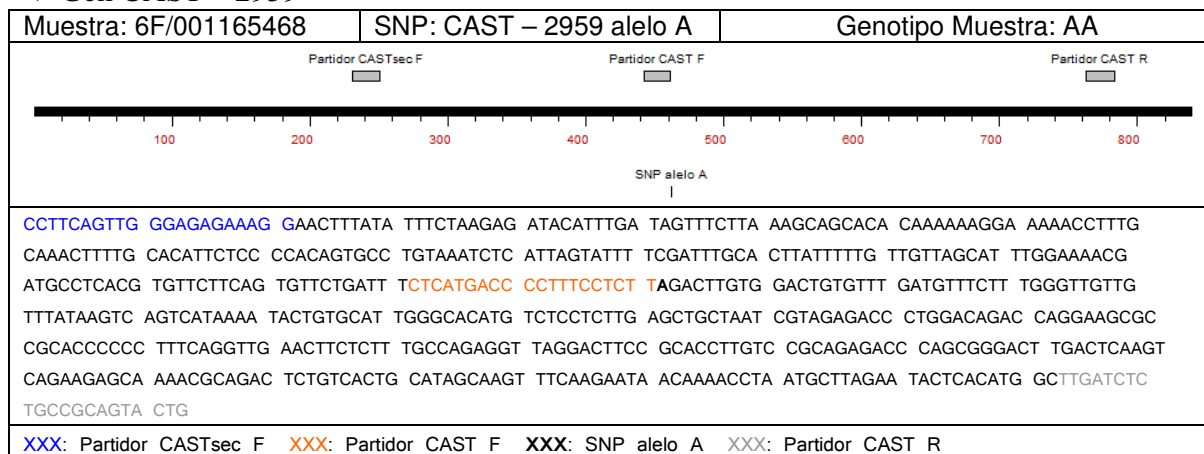
Resultados de secuenciación

A continuación, se presentan las secuencias determinadas por el proceso de secuenciación al cual se sometieron las muestras previamente indicadas, para los SNP en estudio:

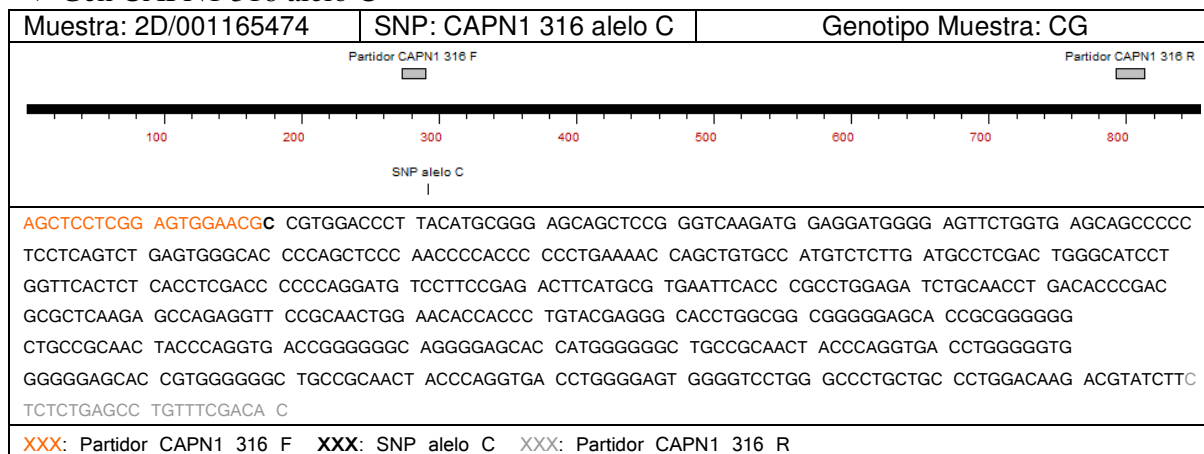
❖ Gen CAPN1 530



❖ Gen CAST – 2959



❖ Gen CAPN1 316 alelo C



❖ Gen CAPN1 316 alelo G

Muestra: 2D/001165474	SNP: CAPN1 316 alelo G	Genotipo Muestra: CG
<p>AGCTCCTCGG AGTGGAAACG CGTGACCCT TACATGCGGG AGCAGCTCCG GGTCAAGATG GAGGATGGGG AGTTCTGGTG AGCAGCCCC TCCTCAGTCT GAGTGGGCAC CCCAGCTCCC AACCCACCC CCCCAGAAAC CAGCTGTGCC ATGTCTTTG ATGCCTCGAC TGGGCATCCT GGTTCACTCT CACCTCGACC CCCAGGATGT CATTCCGAGA CTTATGCGT GAATTCACCC GCCTGGAGAT CTGCAACCTG ACACCCGACG CGCTCAAGAG CCAGAGGTTT CGCAACTGGA ACACCACCCT GTATGAGGGC ACCTGGCGGC GGGGGAGCAC CGCGGGGGGC TGCCGCAACT ACCCAGGTGA CCTGGGGAGT GGGGTCCTGG GCCCTGCTGC CCTGGACAAG ACATATCTTC TCTCTGAGCC TGTTTCTCA C</p>		
<p>XXX: Partidor CAPN1 316 F XXX: SNP alelo C XXX: Partidor CAPN1 316 R</p>		

Posteriormente, se realizó una comparación entre resultados de secuenciación y las secuencias presentes en la base de datos en línea de NCBI.

❖ Figura 18: Comparación de secuencias para SNP CAST – 2959: Muestra 6F/001165468 (6F) con NCBI

NCBI	1	CCTTCAGTTGGGAGAGAAAGGAAC	TTTATATTTCTAAGAGATACATTTGATAGTTTCTTA	60
6F	1	CCTTCAGTTGGGAGAGAAAGGAAC	TTTATATTTCTAAGAGATACATTTGATAGTTTCTTA	60
NCBI	61	AAGCAGCACACAAAAAGGAAAAAC	TTTGCAAACCTTTGACATTCTCCCCACAGTGCC	120
6F	61	AAGCAGCACACAAAAAGGAAAAAC	TTTGCAAACCTTTGACATTCTCCCCACAGTGCC	120
NCBI	121	TGAAATCTCATTAGTATTTTCAAT	TTTGCACTTATTTTGTGTTAGCATTGGAAAACG	180
6F	121	TGAAATCTCATTAGTATTTTCAAT	TTTGCACTTATTTTGTGTTAGCATTGGAAAACG	180
NCBI	181	ATGCCTCACGTGTTCTTCAGTGTT	CTGATTCTCATGACCCTTTCTCTT	240
6F	181	ATGCCTCACGTGTTCTTCAGTGTT	CTGATTCTCATGACCCTTTCTCTT	240
NCBI	241	GACTGTGTTGATGTTTCTTTGGG	TGTGTTATAAGTCAGTCATAAAATACTGTGCAT	300
6F	241	GACTGTGTTGATGTTTCTTTGGG	TGTGTTATAAGTCAGTCATAAAATACTGTGCAT	300
NCBI	301	TGGGCACATGTCTCCTCTTGAGCT	GCTAATCGTAGAGACCCTGGACAGACCAGGAAGCGC	360
6F	301	TGGGCACATGTCTCCTCTTGAGCT	GCTAATCGTAGAGACCCTGGACAGACCAGGAAGCGC	360
NCBI	361	CGACCCCCTTTAGGTTGAAC	TCTCTTGCCAGAGGTTAGGACTCCGCACCTTGTG	420
6F	361	CGACCCCCTTTAGGTTGAAC	TCTCTTGCCAGAGGTTAGGACTCCGCACCTTGTG	420
NCBI	421	CGAAAGACCCACCGGACTT	GACTCAAGTCAGAAGAGCAAACGCAGACTCTGTCACTG	480
6F	421	CGAAAGACCCACCGGACTT	GACTCAAGTCAGAAGAGCAAACGCAGACTCTGTCACTG	480
NCBI	481	CATAGCAAGTTTCAAGAATAAC	AAAACCTAATGCTTAGAATACTCACATGGCTTGATCTC	540
6F	481	CATAGCAAGTTTCAAGAATAAC	AAAACCTAATGCTTAGAATACTCACATGGCTTGATCTC	540
NCBI	541	TGCCCGAGTACTG	553	
6F	541	TGCCCGAGTACTG	553	

XXX: Partidor CASTsec F XXX: Partidor CAST F XXX: SNP alelo A XXX: Partidor CAST R

❖ Figura 19: Comparación de secuencias para SNP CAPN1 – 530: Muestra 1AN0791 (AN0791) con NCBI

```

NCBI 1 TCGAGCCCAACAAGGAAGGTGACTTTGTGCTGCGTTTCTTCTCAGAGAAGAGCGCAGGGA 60
      |||
AN0791 1 TCGAGCCCAACAAGGAAGGTGACTTTGTGCTGCGTTTCTTCTCAGAGAAGAGCGCAGGGA 60
NCBI 61 CCCAGTGAGTAGAAAGCCCTCCCTGTCTCCCTTTCTCCACCACACCCTTGCTGCC 120
      |||
AN0791 61 CCCAGTGAATAGAAAGCCCTCCCTGTCTCCCTTTCTCCACCACACCCTTGCTGCC 120
NCBI 121 CCAACCCCGTTGACTGGCCCTCTCTCTCCACCCTCTGCAGAGAGCTGGATGACCAG 180
      |||
AN0791 121 CCAACCCCGTTGACTGGCCCTCTCTCTCCACCCTCTGCAGAGAGCTGGATGACCAG 180
NCBI 181 GTCCAGGCCAATCTCCCGACGAGGTACGTGCCCTGCCCCACCCTGGGTGCACGACGGG 240
      |||
AN0791 181 GTCCAGGCCAATCTCCCGACGAGGTACGTGCCCTGCCCCACCCTGGGTGCACGACGGG 240
NCBI 241 GACCCGGGTGTCCTGTGTCTTGGTCTAGCCAGCAAGGCAGAGCCCTCTGGCAGGAG 300
      |||
AN0791 241 GACCCGGGTGTCCTGTGTCTTGGTCTAGCCAGCAAGGCAGAGCCCTCTGGCAGGAG 300
NCBI 301 CCATACACATCCCTCACTTGCCAAGCACTTTACAGTTTGCAAAGGACTTTGCGATCGATA 360
      |||
AN0791 301 CCATACACATCCCTCACTTGCCAAGCACTTTACAGTTTGCAAAGGACTTTGCGATCGATA 360
NCBI 361 GTAATGGCGCAGGGCCCTGGGTTCTTGTCTCTGCAGGGTCTGTGCTGAGCTGTTTACC 420
      |||
AN0791 361 GTAATGGCGCAGGGCCCTGGGTTCTTGTCTCTGCAGGGTCTGTGCTGAGCTGTTTACC 420
NCBI 421 TGGATACCCGGTTTCTCCATAACAACCGTGCAGGGTGTGTCACCGTCTCTCCTCTC 480
      |||
AN0791 421 TGGATACCCGGTTTCTCCATAACAACCGTGCAGGGTGTGTCACCGTCTCTCCTCTC 480
NCBI 481 AGAGGGAAACTCAGGTTTCAGAGAGG 505
      |||
AN0791 481 AGAGGGAAACTCAGGTTTCAGAGAGG 505
  
```

XXX: Partidor CAPN1 530sec F XXX: Partidor CAPN1 530 F XXX: SNP alelo G XXX: Partidor CAPN1 530 R

❖ Figura 20: Comparación de secuencias para SNP CAPN1 – 316 alelo G: Muestra 2D/001165474 (2D) con NCBI

```

NCBI 1 AGCTCCTCGGAGTGGAAACGCGTGGACCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGATG 60
      |||
2D 1 AGCTCCTCGGAGTGGAAACGCGTGGACCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGATG 60
NCBI 61 GAGGATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTCAGTCTGAGTGGGCACCCAGCTCCC 120
      |||
2D 61 GAGGATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTCAGTCTGAGTGGGCACCCAGCTCCC 120
NCBI 121 AACCCACCCCTGAAACAGCTGTGCCATGTCTTGTATGCCTCGACTGGGCATCCT 180
      |||
2D 121 AACCCACCCCTGAAACAGCTGTGCCATGTCTTGTATGCCTCGACTGGGCATCCT 180
NCBI 181 GGTTCACTCTCACCTCGACCCCAAGGATGTCTTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACC 240
      |||
2D 181 GGTTCACTCTCACCTCGACCCCAAGGATGTCTTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACC 240
NCBI 241 CGCCTGGAGATCTGCAACCTGACACCCGACGCGCTCAAGAGCCAGAGGTTCCGCAACTGG 300
      |||
2D 241 CGCCTGGAGATCTGCAACCTGACACCCGACGCGCTCAAGAGCCAGAGGTTCCGCAACTGG 300
NCBI 301 AACACCACCCTGTACGAGGGCACCTGGCGGGGGGAGCACCCTGGGGGGCTGCCGAAC 360
      |||
2D 301 AACACCACCCTGTATGAGGGCACCTGGCGGGGGGAGCACCCTGGGGGGCTGCCGAAC 360
NCBI 361 TACCCAGGTGACCTGGGGAGTGGGGTCTGGGCCCTGCTGCCCTGGACAAGACGTATCTT 420
      |||
2D 361 TACCCAGGTGACCTGGGGAGTGGGGTCTGGGCCCTGCTGCCCTGGACAAGACATATCTT 420
NCBI 421 CTCTGAGCCTGTTTCTCAC 442
      |||
2D 421 CTCTGAGCCTGTTTCTCAC 442
  
```

XXX: Partidor CAPN1 316 F XXX: SNP alelo C XXX: Partidor CAPN1 316 R

❖ Figura 21: Comparación de secuencias para SNP CAPN1 – 316 alelo C: Muestra 2D/001165474 (2D) con NCBI

```

2D  1  AGCTCCTCGGAGTGGAAACGCCGTGGACCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGATG  60
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5690 AGCTCCTCGGAGTGGAAACGCCGTGGACCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGATG  5749
2D  61  GAGGATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTCAGTCTGAGTGGGCACCCCAGCTCCC  120
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5750 GAGGATGGGGAGTTCTGGTGAGCAGCCCCCTCCTCAGTCTGAGTGGGCACCCCAGCTCCC  5809
2D  121 AACCCACACCCCTGAAAACCAGCTGTGCCATGTCTCTTGATGCCTCGACTGGGCATCCT  180
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5810 AACCCACACCCCTGAAAACCAGCTGTGCCATGTCTCTTGATGCCTCGACTGGGCATCCT  5869
2D  181 GGTCACTCTCACCTCGACCCCCAGGATGTCCTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACC  240
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5870 GGTCACTCTCACCTCGACCCCCAGGATGTCCTCCGAGACTTCATGCGTGAATTCACC  5929
2D  241 CGCCTGGAGATCTGCAACCTGACACCCGACGCGCTCAAGAGCCAGAGGTTCCGCAACTGG  300
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5930 CGCCTGGAGATCTGCAACCTGACACCCGACGCGCTCAAGAGCCAGAGGTTCCGCAACTGG  5989
2D  301 AACACCACCCTGTACGAGGGCACCTGGCGGGGGGAGCACCGCGGGGGGCTGCCGCAAC  360
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 5990 AACACCACCCTGTACGAGGGCACCTGGCGGGGGGAGCACCGTGGGGGGCTGCCGCAAC  6049
2D  361 TACCCAGGTGACCTGGGG 379
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 6050 TACCCAGGTGACCTGGGG 6067

```

```

2D  420 ACCTGGGGGTGGGGGGAGCACCGTGGGGGGCTGCCGCAACTACCCAGGTGACCTGGGGAG  479
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 6011 ACCTGGCGG-CGGGGGAGCACCGTGGGGGGCTGCCGCAACTACCCAGGTGACCTGGGGAG  6069
2D  480 TGGGGTCTGGGCCCTGCTGCCCTGGACAAGACGTATCTTCTCTCTGAGCCTGTTTCGACAC  541
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NCBI 6070 TGGGGTCTGGGCCCTGCTGCCCTGGACAAGACGTATCTTCTCTCTGAGCCTGTTTCGACAC  6131

```

XXX: Partidor CAPN1 316 F **XXX**: SNP alelo C **XXX**: Secuencia 100 bp extra XXX: Partidor CAPN1 316 R

DISCUSIÓN

Actualmente, el desarrollo de los marcadores moleculares como los SNP en el análisis genético de características de importancia productiva, ha significado un enorme adelanto para el rubro ganadero. Gracias a ésto, los criadores han podido implementar programas de selección asistida y manejo asistido por marcadores, lo cual adelanta el proceso de toma de decisiones que influirán en la rentabilidad futura de su sistema productivo.

Extracción de DNA desde muestras

Hemos realizado durante este estudio diversos pasos para lograr los objetivos planteados, entre los cuales se encuentra la extracción de DNA desde las muestras. Para este efecto, implementamos un protocolo basado en los métodos estándar de extracción de DNA desde tejido, derivados específicamente de los métodos de purificación clásicos, como son la extracción con fenol – cloroformo. Terminado el proceso de extracción, comprobamos la eficacia al realizar una medición espectrofotométrica de la concentración final de DNA obtenida por cada reacción, observando que el proceso fue más eficiente para las muestras provenientes de tejido de novillos híbridos de Wagyu, que para las muestras provenientes de pajuelas de semen de toros reproductores.

El protocolo implementado poseía los componentes básicos que componen los pasos a seguir durante un procedimiento de extracción, como son un tampón de lisis, un detergente que removiera los lípidos de membrana, una proteasa que degradara las proteínas, el fenol – cloroformo, que además poseía alcohol isoamílico como estabilizador de la solución e isopropanol y etanol, los cuales son utilizados en la precipitación del DNA y en la remoción de sales solubles en estos alcoholes (Chomczynski y Sacchi, 2006).

La diferencia en la eficiencia del proceso de purificación aplicado a ambos grupos, puede tener su explicación en el grado de conservación de la muestra. El estado de conservación de las muestras de semen utilizadas por nosotros podría no ser similar, en comparación con otros estudios descritos en la literatura de extracción de DNA a partir de semen, en los cuales, las muestras se encontraba en estado fresco y fue recolectado ya sea por

estimulación eléctrica o manual, sin almacenamiento en frío por periodos prolongados (Masri *et al.*, 1997). A la vez, el crioprotector utilizado también genera variación en la degradación. Los crioprotectores permiten la conservación del semen a bajas temperaturas por tiempos extensos, sin embargo su acción no es total. La baja mantención de integridad del DNA de nuestras muestras de semen con crioprotector, es concordante con los estudios anteriores sobre integridad de DNA bajo criopreservación, con crioprotectores comunes, en los cuales también se observó una alta degradación (Waterhouse *et al.*, 2009). Esto último se relaciona en cierta medida con el estudio de toxicidad de crioprotectores y su acción sobre semen, en el cual crioprotectores menos tóxicos como el DMSO se componen de moléculas más grandes que las de otros, por lo cual, no atravesarían fácilmente la membrana plasmática y por ende, no generan una rápida y excesiva deshidratación celular (Joo y Dupré, 2002). Sin embargo, se ha registrado que la baja viabilidad del semen post – descongelación sólo se presenta en casos donde se ha visto comprometido el estado del sistema de conservación, como la falta de nitrógeno líquido por tiempo prolongado o por casos de contaminación con microorganismos inespecíficos, manteniéndose éste en la mayoría de los casos a niveles altos (Catena y Cabodevila, 1999). Otro punto a considerar es la posibilidad de que el protocolo de extracción se vea afectado por el crioprotector presente o algunos otros componentes que se encuentran en la solución crioprotectora. Algunos de los crioprotectores utilizados son de naturaleza peptídica, como los glutamatos y aspartatos (Martos *et al.*, 2004). En presencia de estos péptidos, agentes desnaturantes como el SDS tienden a inhibir la acción de la proteinasa K en vez de potenciarla, limitando la efectividad de la extracción (Hilz *et al.*, 1975). También, estas sustancias pueden contener azúcares, como glucosa o sacarosa, los cuales recubren la membrana plasmática y la protegen firmemente de daños o degradación (Nagase *et al.*, 1968). Por último, el paso final de nuestro protocolo no incluyó el tampón TE como medio de resuspensión de DNA extraído, que protege a éste de la degradación al inhibir la acción de DNA nucleadas presentes, solución siempre considerada en los estudios anteriores de extracción de DNA desde semen (Masri *et al.*, 1997).

A la vez, hay que considerar el tipo de muestra en si. El material genético presente en los espermatozoides se encuentra altamente condensado. Este DNA se condensa en el trayecto

desde testículo a cola del epidídimo (Barrera *et al.*, 1993), adquiriendo la forma de cromosoma observado en la metafase. Esta elevada condensación impide el acceso de enzimas de diverso tipo al DNA (Lippman y Martienssen, 2004). Además, las proteínas no histónicas presentes y que ayudan a dar mayor organización a la estructura, tienen la característica de unirse fuertemente tanto a las histonas como al DNA, unión que es muy difícil de romper y que requiere de un paso extra, especialmente en procesos de aislamiento de DNA desde células de distinto tipo (Elgin y Bonner, 1970). Estas características pueden haber tenido un rol negativo al momento de desarrollarse el proceso de extracción.

En el caso de las muestras de tejido de novillos híbridos Wagyu, el protocolo de extracción fue eficiente. Las muestras fueron refrigeradas a 4° C, temperatura que es efectiva para la obtención de altas concentraciones de DNA y concuerda con los datos de estudios de comparación entre temperaturas de almacenaje y efectividad de extracción (Cushwa y Medrano, 1993). Los resultados del protocolo son similares en efectividad a los protocolos utilizados en estudios de extracción de DNA desde tejidos, con el propósito de determinación de polimorfismo (Morris *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2004).

PCR alelo específico para SNPs CAST – 2959, CAPN1 – 316 y CAPN1 – 530

La tecnología de PCR aplicada a los marcadores moleculares, tendrá una fuerte repercusión en los procesos de selección en los rebaños. La técnica de AS – PCR aplicada a marcadores de tipo SNP, que se correlacionan con características de importancia productiva, nos permite una eficaz selección de los mejores animales en el ganado, aumentando la productividad, y por ende, la rentabilidad del rebaño y reduciendo los costos de producción, al tener la información disponible en forma anticipada y con prontitud.

Previamente, se realizaron pruebas preliminares con los partidores para el SNP CAPN1 – 530 en las muestras de semen de toros reproductores disponibles, las cuales fueron negativas a excepción de la muestra de 1AN0791. A la vez, se realizaron las mismas pruebas con las muestras de los novillos híbridos Wagyu, las cuales respondieron positivamente. Posterior a ésto se realizaron las reacciones de PCR para cada partidor de

cada SNP, marcadores genéticos validados previamente para la característica con la cual se relacionan (Van Eenennaam *et al.*, 2007).

El diseño de los partidores de inicio considera, en su extremo 3', el ser complementarios al SNP presente en la muestra. La técnica fue estructurada en forma muy similar al procedimiento estándar descrito (Newton *et al.*, 1989) y a los procedimientos estándares utilizados en determinación de SNPs (Morris *et al.*, 2006). Gracias a esta técnica, logramos obtener resultados en las 27 muestras de Wagyu disponibles, con cada uno de los SNPs con los que se decidió trabajar. Los resultados obtenidos son altamente específicos a la hora de indicar la presencia de los SNPs en estudio en cada muestra, dejando en evidencia la efectividad y capacidad de discriminación del método. Sin embargo, el sistema exige un ajuste de temperaturas preciso previamente, sobretodo en las temperaturas de alineamiento, para evitar las uniones inespecíficas de los partidores a secuencias no complementarias y por ende, falsos positivos. El ajuste de temperaturas de alineamiento en el ciclo de PCR fue desarrollado basándose en los protocolos y metodologías disponibles en la literatura, logrando concordancia en efectividad y resultados entre nuestro proceso de ajuste y el descrito previamente (Corvalán, 2002). Las características observadas experimentalmente, son equivalentes a las demostradas por las pruebas de AS – PCR como sistema de validación de SNPs (Soleimani *et al.*, 2003). A la vez, el método ofrece los resultados en un lapso de tiempo relativamente corto, lo cual permite la rápida disponibilidad de la información para su análisis.

El rasgo fenotípico asociado que, en este caso, es el grado de terneza que tendría la carne proveniente de estos animales, está asociado al SNP presente en forma individual o combinada con los otros. Un ejemplo de esto se observa al combinar los datos de ambos SNP del gen CAPN1 en las muestras, sólo 2 poseen la combinación ideal de mayor terneza C/G (316/530): 1AN0791 y 6J/001165466, sin embargo ambas muestras presentan ambos alelos en el SNP CAST – 2959, por lo cual no presentan la triada ideal de genotipo para mayor terneza. La frecuencia de presentación de los genotipos para cada SNP en particular, observados en nuestros resultados, es similar a la frecuencia de presentación a los observados en estudios en poblaciones bovinas productoras de carne (Corva *et al.*, 2007).

Page et al. (2004), observaron en el caso del SNP CAPN1 – 316, el genotipo con mayor frecuencia es el CG, resultado que coincide con el nuestro y con reportados anteriormente en bovinos (Morris *et al.*, 2006), misma situación de mayor frecuencia para el genotipo GG, en el caso del marcador CAPN1 – 530 (Page *et al.*, 2004). En el caso del marcador CAST – 2959, Casas et al. (2006) descubrieron una mayor frecuencia del genotipo AG, lo cual también es similar con los resultados de Morris et al. (2006) y con los nuestros. A la vez, estas frecuencias genotípicas son similares a las presentes en razas británicas productoras de carne, en especial a las razas Angus y Hereford (Corva *et al.*, 2007).

Al relacionar estas frecuencias genotípicas presentes en nuestras muestras con el rasgo fenotípico, observamos, considerando cada marcador en forma individual, una mayor prevalencia de animales con valores de WBSF intermedios para los marcadores CAPN1 – 316 y CAST – 2959, mientras que en el caso del marcador CAPN1 – 530, hay mayor presencia de animales con valores altos de WBSF, datos que concuerdan con los estudios anteriores (Corva *et al.*, 2007). El hecho de que las frecuencias de nuestros resultados sean tan similares a las de animales de razas británicas puede tener su origen en que nuestras muestras provienen de animales híbridos, los cuales comparten sólo el 50% de su material genético con los animales Wagyu puros, mientras que el resto depende de la raza origen de las madres, lo cual tendría relación con los resultados descritos en estudios de comparación de características productivas entre híbridos de Wagyu y razas británicas (Ibrahim *et al.*, 2008).

Secuenciación de los productos de PCR

Como último paso, se procedió a la secuenciación de las muestras para la comprobación de la presencia de uno u otro alelo. Se logró probar en gran parte de ellas la efectividad de la técnica, al evidenciar que las secuencias en las muestras eran idénticas al compararlas con la secuencia presente en la base de datos de NCBI. Ésto, deja en evidencia la efectividad de la Taq polimerasa para no cometer errores en la fase de extensión, lo cual coincide con los datos documentados sobre la baja tasa de error que posee esta enzima (Étienne, 2001), sumado a los registros de menor frecuencia de errores de ésta en protocolos de PCR con un número de ciclos bajo, generalmente bajo 30 ciclos (Mas *et al.*, 2001). Para evitar

resultados sesgados por el propio PCR, cada secuencia comenzó 100 bp río arriba de la base correspondiente al SNP.

En todos los casos se obtuvo comprobación del resultado indicado en el AS – PCR, vale decir, el resultado obtenido por la técnica empleada corresponde al SNP realmente presente en la muestra, evidencia que afirma la eficacia del AS – PCR. Sin embargo, el resultado en el caso de CAPN1 – 316, al ser observado en gel de agarosa, revelaba el producto de PCR correspondiente al alelo C a un nivel 100 bp mayor que el alelo G. Este resultado se dio con todas las muestras utilizadas, tanto heterocigotos como homocigotos para el alelo C, incluso en muestras de DNA de animales puros para la raza Wagyu como para la muestra 1AN0791 que es un Angus Negro (Figura 22).

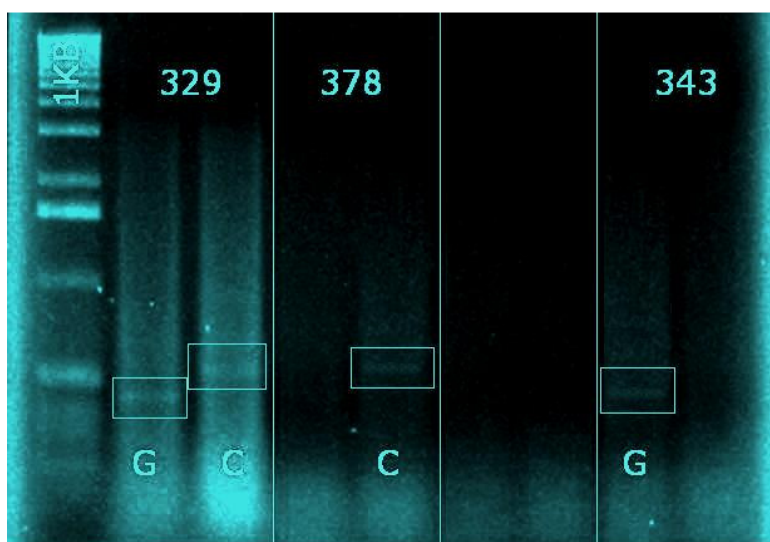
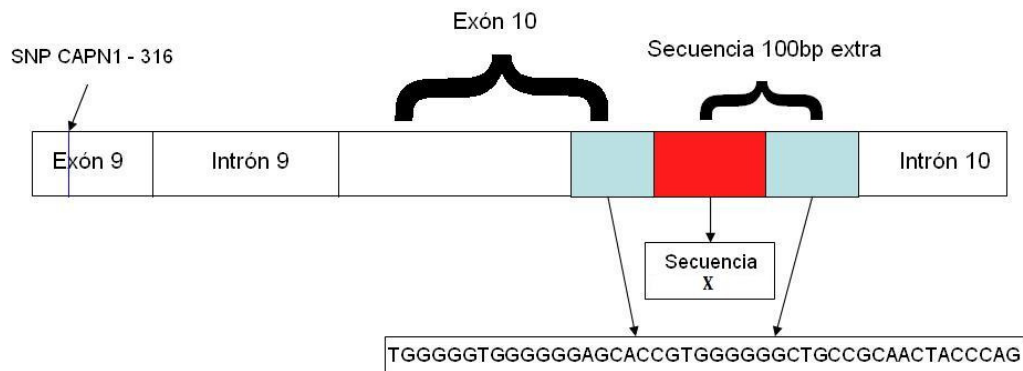


Figura 22: Resultado AS – PCR para CAPN1 – 316 en muestras Wagyu puros

Es por ésto que se escogió una muestra de genotipo heterocigoto y se procedió a secuenciar ambos alelos y a compararlos con la secuencia de la base de datos del NCBI. Al comparar la secuencia de la base de datos con la secuencia determinada para el alelo G de la muestra, no sólo se observó el SNP identificado en el alelo, sino también un alto porcentaje de igualdad entre ambas secuencias, sin embargo, al comparar la secuencia del alelo C, se observó un segmento de secuencia de 100 bp, entre las secuencias correspondientes al exón 10 y el intrón 10 del gen CAPN1.

Al analizar la secuencia 2D/001165474 alelo C en más detalle (Figura 23), se observó que de los 100 bp de secuencia extra, 45 bp, ubicados al extremo 3', son exactamente iguales a un segmento interno del exón 10 (representado en color gris), mientras que los 55 bp ubicados en el extremo 3' (marcado con color rojo), no poseen homología exacta dentro de la secuencia de la base de datos, sino una homología de aproximadamente 66% con parte de la secuencia presente en el exón 10.

Figura 23: Esquema de resultado de PCR para marcador SNP CAPN1 – 316 alelo C en muestra 2D/001165474



Estas secuencias (color gris) tienen características compatibles con los “directos repetidos”, es decir, un tipo de secuencia genética que consiste en dos o más repeticiones de una misma secuencia, separadas por una secuencia no repetida (Ussery *et al.*, 2008). Estas repeticiones son la evidencia de procesos de recombinación genética entre alelos en la cual ocurre conversión génica, la cual se describe como la transferencia no recíproca de información entre moléculas de DNA. En los casos en que esta conversión y la formación del heterodúplex, ocurren sobre parte de un gen, esta parte puede tener una secuencia idéntica o muy estrechamente relacionada con la de otro gen, mientras que la otra parte presenta más diferencias. El cambio en la secuencia puede tener como causa que los sistemas de reparación reconozcan bases mal apareadas en el heterodúplex, eliminando o sustituyendo una de las cadenas para restaurar la complementariedad, lo cual cambia la cadena de DNA de un alelo y pasa a tener la secuencia del otro alelo (Lewis, 1999). A la vez, el segmento repetido en la secuencia puede ser una evidencia del proceso de *arrastré de exones* (del inglés *exon – shuffling*) que sufrió el gen durante la evolución. El *arrastré de exones* se define como el mecanismo de evolución que genera exones mediante la recombinación de intrones en la secuencia de un gen, lo cual deriva en la variación y alteración sus productos

de codificación (Kolkman y Stemmer, 2001). Este proceso está íntimamente relacionado con la evolución de los eucariontes y se puede observar que mientras menor sea la relación entre la estructura exón – intrón del gen y la estructura modular de una proteína multidominio, mas antiguo es el proceso de evolución de ese gen. Ésto se debe al proceso de corrosión, propio de la inserción o delección de intrones, que ocurre durante la evolución del gen, dejando en evidencia que los genes con secuencias exón – intrón mas relacionadas fueron genes ensamblados mas recientemente (Patthy, 1999).

Cualquiera sea el caso, la presencia de esta secuencia extra podría abrir una nueva alternativa de investigación sobre los posibles efectos de ésta en la característica de ternera. Ésto se fundamentaría en el hecho de lograr dilucidar si esta secuencia extra en el alelo C de este SNP posee alguna influencia en la funcionalidad de la μ - calpaina, en especial si ésta modifica la estructura del exón 10, el cual es parte de la secuencia que codifica el dominio III de la proteína. Ésto requiere de un estudio más acabado y específico, que apunte directamente a responder esta incógnita y en el caso de que si influya en alguna característica funcional de la enzima, se podrían desarrollar protocolos y sistemas de rápida detección de la secuencia y establecerla formalmente, como un futuro marcador utilizable para procesos de selección de animales para mejoramiento genético de ganado bovino.

CONCLUSIONES

Cada paso realizado en este estudio nos ha permitido llegar a ciertas conclusiones:

- ◆ La técnica de reacción de polimerasa en cadena alelo específica, permite determinar en forma eficiente la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido, previa implementación correcta de ésta.
- ◆ La secuenciación de las reacciones de PCR comprueba la efectividad de la técnica de AS – PCR.
- ◆ Se comprueba la hipótesis planteada, ya que esta técnica se presenta como una herramienta útil, de montaje sencillo y rápido para la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido, obteniendo resultados específicos y veraces.

BIBLIOGRAFÍA

AMSA. 1995. Research guidelines for cookery sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat. Am. Meat Sci. Assoc., Chicago, IL.

ATENCIO, I. A., RAMACHANDRA, M., SHABRAM, P., DEMERS, W. G. 2000. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 11: 247.

BARENDSE, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. Internacional patentapplication PCT/AU02/00122. International patent publication WO02/064820A1.

BARRERA, C., MAZZOLLI, A. B., PELLING, C., STOCKERT, J.C. 1993. Metachromatic staining of human nuclei after reduction of disulfide bonds. *Acta Histochemical (Jena)* 94: 141 – 149.

BARTLETT, J. M., STIRLING, D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol.* 226: 3 – 6.

BISHOP, M. D., KOOHMARAIE, M., KILLEFER, J., KAPPES, S. 1993. Rapid communication: Restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.* 71: 2277.

BOLEMAN, S. J., BOLEMAN, S. L., SAVELL, J. W., MILLER, R. K., CROSS, H. R., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D., MILLER, M. F., WEST, R. L., JOHNSON, D. D. 1995. Consumer evaluation of beef of known tenderness level. *J. Anim. Sci.* 75 (6): 1521-1524.

BRANDEN, C., TOOZE, J. 1999. *Introduction to Protein Structure* 2nd Ed. Garland Publishing: New York, NY. USA.

CAMOU, J. P., MARES, S. W., MARCHELLO, J. A., VAZQUEZ, R., TAYLOR, M., THOMPSON, V. F., GOLL, D. E. 2007. Isolation and characterization of μ - calpain, m - calpain and calpastatin from postmortem muscle. I. Initial steps. *J. Anim. Sci.* 85: 3400 – 3414.

CARRAGHER, N.O., FRAME, M. C. 2002. Calpain: A role in cell transformation and migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1539.

CASAS, E., SHACKELFORD, S. D., KEELE, J. W., STONE, R. T., KAPPES, S. M., KOOHMARAIE, M. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 76: 468 – 473.

CASAS, E. WHITE, S. N., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D. G., CHASE JR, C. C., JOHNSON, D. D., SMITH, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520 – 525.

CATENA, M., COBADEVILA, J. 1999. Evaluación del semen congelado. [en línea]. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.htm [Consulta: 15-03-2010].

CHIEN, A., EDGAR, D. B., TRELA, J. M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 127: 1550–1557.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. 2006. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Prot.* 1: 581–585.

COATES, B. S., SUMERFORD, D. V., MILLER, N. J., KIM, K. S., SAPPINGTON, T. W., SIEGFRED, B. D., LEWIS, L. C. 2009. Comparative performances of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. *J. Hered.* June 12.

CORVA, P., SORIA, L., SCHOR, A., VILLARREAL, E., PÉREZ CENCI, M., MOTTER, M., MEZZADRA, C., MELUCCI, L., MIQUEL, C., PAVÁN, E., DEPETRIS, G., SANTINI, F., GRIGERA NAÓN, 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): 1064-1069.

CORVALÁN, A. 2002. *Molecular Biology in Infectious Diseases. Part I. Development and Methodologies.* *Rev. chil. infectol.* v.19 n.1

CUNNINGHAM, E. P., MEGHEN, C. M. 2001. Biological identification systems: Genetic markers. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20: 491 – 499.

CUSHWA, W. T., MEDRANO, J. F. 1993. Effects of blood storage time and temperature on DNA yield and quality. *Biotechniques.* 14(2): 204 – 207.

DAVIS, G. P., DENISE, S. K. 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76:2331 - 2339

DEDIEU, S., MAZERES, G., POUSSARD, S., BRUSTIS, J. J. COTTIN, P. 2003. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell.* 95: 615.

ELGIN, S. C. R., BONNER, J. 1970. Limited heterogeneity of the major nonhistone chromosomal proteins. *Biochemistry* 9 (22): 4440 - 4447.

ÉTIENNE, J. 2001. *Bioquímica General, biología molecular.* Ed. Elsevier. España.

FIA. 2009. [en línea] http://www.fia.gob.cl/contenido.asp?id_contenido=1513&id_tipo=4
[Consulta: 14/7/2009]

FRANCO, S.J., HUTTENLOCHER, A. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118: 17.

GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI A. H., KOOHMARAIE, M. 2006. μ - calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834 – 2840.

GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W. CONG., J. 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731.

GOMEZ – RAYA, L., OLSEN, H. G., LINGAAS, F., KLUNGLAND, H., VÅGE, D. I., OLSAKER, I., TALLE, S. B., AASLAND, M., LIEN, S. 2002. The use of genetic markers to measure genomic response to selection in livestock. *Genetics* 162 (3): 1381 – 3.

GUROFF, G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239: 149-155.

HANNA, R. A., CAMPBELL, R. L., DAVIES, P. L. 2008. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 10: 409 – 412

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030

HILZ, H., WIEGERS, U., ADAMIETZ, P. 1975. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *Eur. J. Biochem.* 56 (1): 103 – 108.

IBRAHIM, R. M., GOLL, D. E., MARCHELLO, J. A., DUFF, G. C., THOMPSON, V. F., MARES, S. W., AHMAD, H. A. 2008. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. *J. Anim. Sci.* 86: 1426-1433.

INDAP. 2007. *Genética Superior para la Agricultura Familiar Campesina. Catálogo Bovinos de Carne 2007*

JEFFREYS, A. J., WILSON, V., THEIN, S. L. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314: 67 – 73

JOO, R., DUPRÉ, E. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la mortalidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Invest. Mar.* 30 (2): 75 – 79.

KAPPREL, H. P., GOLL., D. E. 1989. Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 264: 17, 888

KOLKMAN, J. A., STEMMER, W. P. C. 2001. Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nature Biotechnology* 19: 423 – 428

KOOHMARAIE, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36:93.

KOOHMARAIE, M. 1998. The Biological Basis of Meat Tenderness and Potential Genetic Approaches for its Control and Prediction. *Reciprocal Meat Conference Proceedings. Volume 48.*

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125.

LEOUP, L., MAZÈRES, G., DAURY, L., COTTIN, P., BRUSTIS, J. J. 2006. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 38: 2049.

LEWIS, B. 1999. *Genes VII*. 7th edition. Oxford University Press, USA

LIPPMAN, Z., MATIENSSEN, R. 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431 (7006): 364 – 370.

MACKAY, T. F. C. 2001. The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics* 35: 303 – 339

MADDOCK, K. R., HUFF-LONERGAN, E., ROWE, L. J., LONERGAN, S. M. 2005. Effect of pH and ionic strength on μ -calpain and m-calpain inhibition by calpastatin. *J. Anim. Sci* 83: 1370 -1376

MAKI, M., HATANAKA, H., TAKANO, E., MURACHI, T. 1990. Structure-function relationship of calpastatin. *Intracellular calcium-dependent proteolysis*. R. L. Mellgren y Muracji, eds., CRC Press. Inc. Boca Raton. FL. 37.

MARAVALL, M., MAINEN, Z. F., SABATINI, B. L., SVOBODA, K. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* 78: 2655.

MARTOS, G. I., MINAHK, C. J., FONT DE VALDEZ, G. 2004. Liofilización de *Lactobacillus delbrueckii* Susp. *Bulgaricus*: Crioprotectores y Fluidez de Membrana. II Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas, Tucumán – Argentina. Libro de Resúmenes: 80.

MAS, E., POZA, J., CIRIZA, J., ZARAGOZA, P., OSTA, R., RODELLAR, C. 2001. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev. Acuatic* 15. Univ. Zaragoza. España.

MASRI, S. A., NGUYEN, P. T., GALE, S. P., HOWARD, C. J., JUNG, S. C. 1997. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. *Can J Vet Res* 61: 15-20

MAZUMDER, B., SESHADRI, V., FOX, P. L. 2003. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci.* 28 (2): 91-8.

MILLER, B. 1992. Understanding consumers. *Beef Today* 8: 40

MORGAN, J. B., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., SAVELL, J. W., CROUSET, J. D. 1993. Meat Tenderness and the Calpain Proteolytic System in Longissimus Muscle of Young Bulls and Steers. *J. Anim. Sci.* 71: 1471.

MORIN, P. A., LUIKART, G., WAYNE, R. K. 2004. The SNP Workshop Group SNPs in ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol Evol.* 19: 208–215

MORRIS, C.A., CULLEN, N. G., HICKEY, S. M., DOBBIE, P. M., VEENVLIET, B. A., MANLEY, T. R., PITCHFORD, W. S., KRUK, Z. A., BOTTEMA, C. D. K., WILSON, T. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness cooked M. longissimus steaks from Jersey X Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics* 37: 411 - 414

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF S., SAIKA R., HORN G, ERLICH H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA "in vitro": the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 51: 263 – 273

NAGASE, H., YAMASHITA, S., IRIE, S. 1968. Protective effects of sugar against freezing injury of bull spermatozoa. VI Congr. Animal Reprod. Artif. Insemin. II: 1111

NEWTON, C. R., GRAHAM, A., HEPTINSTALL, L.E., POWELL, S.J., SUMMERS, C., KALSHEKER, N., SMITH, J.C., MARKHAM, A.F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 17 (7): 2503 – 2516

OKITANI, A., GOLL, D. E., STROMER, M. H., ROBSON, R. M. 1976. Intracellular inhibitor of a Ca^{+2} - activated protease involved in myofibrillar protein turnover. *Federation Proc* 35: 1746

OTSUKA, Y., GOLL, D. E. 1987. Purification of the Ca^{+2} - dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} - dependent proteinase. *J Biol Chem* 262: 5839 – 5851

PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P., CULLEN, N. G., HYNDMAN, D. L., MORRIS, C. A., CRAWFORD, A. M., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., KEELE, J. W., SMITH, T. P. L. 2002. Evaluation of single – nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association whit meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80:3077 – 3085

PAGE B. T., CASAS E., QUAAS R. L., THALLAMAN R. M., WHEELER T. L., SHACKELFORD S. L., KOOHMARAIE M., WHITE S. N., BENNET G. L., KEELE J. W., DIKEMAN M. E., SMITH T. P. L. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. Anim. Sci.* 82: 3474 – 3481

PAL, G. P., DE VEYRA, T., ELCE, J. S., JIA, Z. 2003. Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca^{2+} requirement. *Structure (Camb.)* 11: 1521

PATTHY, L. 1999. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling — a review. *Gene* 238: 103 – 114

PELUFFO, M., MONTEIRO M. 2002. Terneza, una característica a tener en cuenta. [en línea]. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/02-terneza.htm [Consulta: 10-04-2008]

PRINGLE, T. D., WILLIAMS, S. E., LAMB, B. S., JOHNSON, D. D., WEST R. L. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers J Anim Sci 75: 2955 – 2961

ROBINSON, R. 2003. Macmillan Encyclopedia of Genetics. Volume 1 – 4. The Gale Group Inc editorial. New York. USA.

SCHENKEL., F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z., MANDELL, I. B., YE, X., LI, H., WILTON, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J. Anim. Sci. 84: 291 – 299

SHACKELFORD, S. D., WHEELER, T. L, KOOHMARAIE, M. 1995. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of ten major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. J. Anim. Sci. 73: 3333 – 3340

SHANNON, J.D., GOLL, D.E. 1985. Properties of a protein that is purified from bovine skeletal muscle that inhibits the Ca²⁺-dependent proteinase. In: Intracellular Protein Catabolism, edited by Khairallah EA, Bird JWC, and Bond JS. New York: Liss, 1985, p. 257 – 259

SMITH, T. P. L., CASAS, E., REXROAD III, E., KAPPES, S. M., KEELE, W. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. J. Anim. Sci. 78: 2589 – 2594

SOLEIMANI, V. D., BAUM, B. R., JOHNSON, D. A., 2003, Efficient Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Plants by Allele-Specific PCR, With an Example From Barley, Plant Molecular Biology Reporter 21: 281–288

SUZUKI, K., TSUJI, S., KUBOTA, S., KIMURA, Y., IMAHORI, K. 1981. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J. Biochem. (Tokyo)* 90: 275 – 278

SUZUKI, K., SORIMACHI, H. 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 433: 1 – 4

TOMPA, P., EMORI, Y., SORIMACHI, H., SUZUKI, K., FRIEDRICH, P. 2001. Domain III of calpain is a Ca⁺²-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1333

USSERY, D. W., WASSENAAR, T., BORINI, S. 2008. Word Frequencies, Repeats, and Repeat-related Structures in Bacterial Genomes. *Computing for Comparative Microbial Genomics: Bioinformatics for Microbiologists. Computational Biology.* 8 (1 ed.). Springer. p. 133 – 144

VAN EENENNAAM, A., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E., Thomas, M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891 – 900

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, R., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT J., PELEMAN, J., KUIPER, M. 1995. AFLP — a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407 – 4414

WATERHOUSE, K. E., GJELDNE, A., TVERDAL, A., DE ANGELIS, P. M., FARSTAD, W., HÅÅRD, M., KOMMISRU, E. 2009. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 117(1-2): 34 – 42

WATSON, J. D., BAKER, T. A., BELL, S. P., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK. 2004. *Molecular Biology of the Gene*, Fifth edition edición, San Francisco, USA

WENDT, A., THOMPSON, V. F., GOLL, D. E. 2004, Interaction of calpastatin with calpain: a review, *Biological Chemistry* 385: 465 – 472

XING, C., SCHUMACHER, F.R., XING, G., LU, Q., WANG, T., ELSTON, R.C. 2005. Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and composite markers derived from SNPs in linkage analysis. *BMC Genetics*. 6(Suppl 1): S29.

ZHAO, Z., FU, Y. X., HEWETT-EMMETT, D., BOERWINKLE, E. 2003. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene*. 17: 207 – 213

ZHU, Y., SPITZ, M.R., AMOS, C.I., LIN, J., SCHABATH, M.B., WU, X. 2004. An evolutionary perspective on single nucleotide polymorphism screening in molecular cancer epidemiology. *Cancer Res*. 64: 2251 – 2257