



**Facultad de Veterinaria**  
Universidad de la República  
Uruguay



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

# Asociación de SNPs con pH, color y capacidad de retención de agua en la carne bovina

---

**Signe Haakonsson**

Tesis de licenciatura en biología,  
orientación biotecnología

**Orientadora: Eileen Armstrong**

**14/11/2013**

## RESUMEN

La exportación de carne bovina de elevada calidad es muy importante para el país; así lo exigen los consumidores, por lo que es esencial seguir trabajando para mejorarla y seguir siendo competitivos a nivel internacional. El presente trabajo se enfoca en los caracteres pH, color y capacidad de retención de agua, los cuales son muy importantes para la calidad de la carne. Los marcadores moleculares como los SNPs son una herramienta muy útil para acompañar los métodos de selección tradicionales, sobre todo por ser aplicables para mejorar características que son difíciles de medir y de baja heredabilidad.

El presente trabajo comprende un análisis de los caracteres fenotípicos mencionados y un análisis poblacional y de asociación entre dichos caracteres y 37 SNPs ubicados en genes candidatos. El material genético y fenotípico proviene de 705 bovinos de la raza Aberdeen Angus de diferentes establecimientos del país. Las mediciones de pH de la canal se realizaron a las 24 horas post mortem. Para el color se evaluaron tres parámetros (L, a, b) mediante colorímetro automático. La capacidad de retención de agua (CRA) se evaluó a las 24 horas y diez días de maduración de la carne mediante la técnica de pérdidas por cocción. Se estudiaron ocho genes, todos relacionados con al menos uno de los caracteres fenotípicos analizados. El ADN se extrajo a partir de la carne de los animales y el genotipado se realizó en el exterior. El análisis estadístico descriptivo de los fenotipos se hizo mediante el programa Statgraphics Centurion y el análisis poblacional mediante el programa GENEPOP. El análisis de asociación se efectuó por regresión lineal múltiple utilizando R, incluyendo genotipo, tropa, planta frigorífica y sexo como efectos fijos, y estableciéndose el umbral de significación mediante 10.000 permutaciones.

En el análisis de los fenotipos se encontró una clara diferencia entre los sexos de los animales para los caracteres de color y pH. También se hallaron diferencias significativas entre algunas tropas, detectándose una relación entre color y pH de la carne. La CRA no presentó diferencias significativas entre sexos ni entre períodos de maduración, aunque sí entre tropas. Los parámetros poblacionales son similares a lo encontrado por otros autores, detectándose niveles de diversidad genética de moderados a bajos, por ser marcadores poco polimórficos y tratarse de una raza comercial fuertemente seleccionada. Se detectaron asociaciones significativas entre los caracteres fenotípicos analizados y cuatro SNPs situados en los genes *SCD*, *CAPN1*, *IGF2* y *CAST*, así como otros cercanos a la significación que ameritan otros estudios. De particular interés resulta la asociación detectada entre el sistema proteolítico calpaína-calpastatina (*CAPN1-CAST*) y los parámetros de color y CRA. Estos efectos son pequeños dado que los caracteres fenotípicos analizados son altamente poligénicos; sin embargo, estos resultados podrían utilizarse como base para futuros estudios en los mismos genes o para ser incluidos en una futura selección asistida por marcadores moleculares.

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	4
La producción de carne en Uruguay .....	4
Los parámetros: pH, capacidad de retención de agua y color, y su importancia para la calidad de la carne bovina .....	4
Marcadores moleculares en producción animal .....	6
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Muestra de animales.....	9
Fenotipos.....	9
Extracción de ADN y genotipado .....	10
Análisis estadísticos.....	10
RESULTADOS.....	12
Análisis de los fenotipos .....	12
Análisis general y por sexos de los animales .....	12
Análisis por tropas.....	14
pH .....	14
Color L.....	15
Color a.....	15
Color b .....	15
PPC 1 día .....	16
PPC 10 días.....	16
Parámetros poblacionales .....	17
Análisis de asociación genotipo-fenotipo.....	19
Resultados significativos y cercanos a la significación por gen .....	20
SCD .....	20
CAPN1.....	20
CAST.....	20
PPARA .....	21
PRKAG3.....	21
IGF2 .....	21
DISCUSIÓN.....	22
Análisis de los fenotipos .....	22

Parámetros Poblacionales .....	23
Asociaciones detectadas .....	24
Gen <i>SCD</i> .....	24
Gen <i>CAPN1</i> .....	25
Gen <i>CAST</i> .....	26
Gen <i>PPARA</i> .....	26
Gen <i>PRKAG3</i> .....	27
Gen <i>IGF2</i> .....	27
Conclusiones.....	28
AGRADECIMIENTOS .....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31
ANEXO .....	35
Protocolo de extracción de ADN.....	35

## INTRODUCCION

### **La producción de carne en Uruguay**

Uruguay es un país prominentemente ganadero que cuenta con un stock bovino de 11 millones de animales. En 2012 tuvo una faena total de más de 2 millones de cabezas de ganado y se exportaron más de 460.000 toneladas con un valor de más de 1,7 mil millones de dólares (INAC 2013). La carne vacuna representa el 6% del PBI y el 14% de las exportaciones totales (INIA 2013). Estos números muestran claramente la importancia que tiene la carne para el país. Sin embargo, analistas e investigadores coinciden en que Uruguay como país productor de carne será más importante por su calidad que por su cantidad. De esta manera una mejora continua en la calidad es fundamental para mantener los estándares de competitividad a nivel internacional (Franco 2010).

Las exigencias de calidad del mercado son cada vez mayores para los productos alimentarios destinados al consumo humano. Cuando se habla de calidad de carne en sentido amplio comprende toda la cadena cárnica, desde la producción e industrialización, que incluye parámetros como trazabilidad, datos de progenie y bienestar animal, hasta el consumo final que incluye parámetros nutricionales y caracteres sensoriales (terneza, sabor, jugosidad y color) (Hocquette et al. 2007; Almeida 2009; Franco 2010). En este trabajo, cuando se menciona la calidad de la carne se refiere a la calidad del producto final, especialmente a los atributos sensoriales.

Para este estudio se cuenta con datos fenotípicos de bovinos de la raza Aberdeen Angus. Esta raza británica es altamente especializada en la producción de carne de buena calidad a nivel internacional. Sus carnes se destacan por su terneza y sabor debido a su característico marmolado (grasa intramuscular), y es una de las más utilizadas a nivel mundial (Soc. Angus 2013).

### **Los parámetros: pH, capacidad de retención de agua y color, y su importancia para la calidad de la carne bovina.**

Al momento de consumir carne los caracteres que contribuyen más al valor de la misma son terneza, sabor y jugosidad. La apariencia de la carne a su vez es muy importante para el consumidor al momento de elegirla; en ese momento los caracteres que más influyen son el color y la cantidad de grasa visible (Aaslyng 2009; Armstrong 2011).

El consumidor elige según el color al momento de comprar carne y por lo tanto es muy importante entender qué variables y procesos afectan este atributo. El color del músculo varía entre colores rosados a rojos y el color de la grasa varía entre colores blancos a amarillos. El color varía en el tiempo dependiendo de los procesos químicos que afectan a la mioglobina, por lo tanto tiene que ser medido a tiempos fijos para poder ser comparado (Mancini & Hunt 2005; Alberti & Ripoll 2010).

Los pigmentos vegetales afectan el color de la grasa, que a su vez depende del forraje consumido por los animales. La concentración y tipo de pigmentos varían según la edad y la variedad del forraje, por ejemplo, el amarillo es aportado por las xantofilas y el naranja por los carotenoides. La alimentación con pasto tiende a aumentar el color amarillo de la grasa, lo

que puede producir rechazos de estas canales en algunos mercados. Los pigmentos animales como la mioglobina afectan el color del músculo dependiendo de su concentración y su estado de oxidación. El átomo de hierro de la mioglobina puede estar en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ); cuando está en estado ferroso la carne tiene un color oscuro o púrpura y absorbe la luz a cierta longitud de onda, mientras que cuando se encuentra en estado férrico absorbe a una longitud de onda diferente que confiere a la carne un color rosado brillante o rojo cereza más deseable (Alberti & Ripoll 2010).

Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para medir el color; los más utilizados para el estudio de la carne son:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .  $L^*$  es la luminosidad (*lightness*),  $a^*$  representa la oposición visual rojo-verde (rojo valores positivos) mientras  $b^*$  la amarillo-azul (amarillo valores positivos) (Alberti & Ripoll 2010).

El color de la carne es un parámetro asociado directamente con el pH, otro de los parámetros en los cuales se basa este trabajo y que se mide a 24 y/o 48 horas *post-mortem*. La evolución del pH luego del sacrificio tiene altos efectos sobre las propiedades de la carne, como la ternura, color, sabor, capacidad de retención del agua y vida útil. Los valores elevados de pH generan colores oscuros, que los consumidores asocian a carne poco fresca y menos sabrosa. Además los valores de pH alto reducen los tiempos de conservación por ser más susceptible a bacterias, por lo cual la carne con pH alto (mayor a 5,7-5,8) a las 24 horas post-mortem es rechazada por muchos mercados (Esmailzadeh Koshkoih et al. 2005; Feed 2010). Por otro lado, valores demasiado bajos de pH causan que las proteínas se desnaturalicen, por lo que la carne pierde la capacidad de retener el agua, y esto hace que la misma pierda jugosidad (ver siguiente sección) (Esmailzadeh Koshkoih et al. 2005). Los valores de pH óptimos deben encontrarse entre 5,3-5,7 (Gallo 2010). De esta manera el pH está tan relacionado con el color como con la capacidad de retención del agua. Los factores que influyen sobre el pH son varios, y entre los más importantes están: tipo de dieta, sexo, transporte y estrés, tiempo de espera pre y post-faena y factores genéticos (Feed 2010).

La capacidad de retención de agua (CRA), es la propiedad que presenta la carne para mantener el agua en las estructuras del tejido muscular en forma libre o inmovilizada. La CRA depende de la estructura y composición de la carne. El tamaño del espacio libre donde se retiene el agua, y de la existencia de moléculas que aportan cargas de manera que establecen enlaces con el agua, determinan la capacidad de retención de la misma. A su vez son importantes las proteínas de los distintos tejidos; las del tejido conectivo retienen el 10% del agua, las sarcoplásmicas el 20% y las proteínas miofibrilares el 70%. Mientras la carne pasa por los diferentes procesos *post-mortem* (como enfriamiento, despiece, congelamiento, descongelamiento y cocción), pierde parte de su capacidad de retener el agua, sin embargo la cocción es el proceso que genera mayor pérdida de agua y puede llegar hasta el 40%, mientras los otros procesos no llegan a más de 12%. La CRA es un parámetro muy importante porque está directamente relacionado con la jugosidad. Existen varios métodos para determinar la retención de agua y uno de ellos es medir directamente la pérdida por cocción (PPC), método utilizado en este trabajo (Feed 2010). Cuanto menor es la pérdida por cocción mayor es la CRA, y por tanto la jugosidad (Aaslyng 2009).

## Marcadores moleculares en producción animal

En las últimas décadas se han podido identificar regiones y loci en el genoma bovino que afectan caracteres importantes para la producción de carne y leche. Este avance ha permitido el uso de marcadores moleculares para la selección de ganado, estrategia que se conoce como MAS (Selección Asistida por Marcadores) (Dekkers 2004). Este método permite seleccionar animales con determinadas variantes genéticas asociadas con un efecto medible. No es un método que reemplaza los sistemas tradicionales de selección sino un método que complementa, permitiendo seleccionar animales con más eficiencia (Armstrong 2011).

El método tradicional de selección se basa en buscar variabilidad entre los animales, y seleccionar los que tienen superior potencial genético para el carácter de interés. Actualmente, para la selección de progenitores en la producción de Aberdeen Angus en Uruguay se usa un método que se basa en la evaluación de los progenitores a través de sus hijos. Se miden caracteres como peso al nacimiento, peso al destete, área del ojo del bife y el espesor de grasa subcutánea. El método utilizado es la DEP (Diferencias Esperadas en la Progenie) que es la diferencia que se espera observar en el promedio de los hijos de un animal evaluado, en relación al promedio de la población. Se calcula una DEP para cada carácter y estos valores luego son publicados en catálogos (Aberdeen Angus 2010; Lema & Ravagnolo 2012).

Muchos caracteres importantes para la producción de ganado son relativamente fáciles y poco costosos de medir en gran cantidad de animales (tales como peso y longitud de canal) por lo que pueden ser usados fácilmente para selección de animales mediante los métodos genéticos cuantitativos (tales como DEP), pero la mayoría de los caracteres importantes para la calidad sensorial no lo son. Por esta razón, caracteres como terneza, color y CRA son difíciles de mejorar mediante estos métodos tradicionales. A su vez, la mayoría de los caracteres de calidad de la carne solo pueden ser medidos luego del sacrificio del animal, y en muchos casos presentan baja heredabilidad, por lo que resulta difícil incorporarlos en sistemas de selección (Gill et al. 2009).

De esta manera, la evaluación directa de los caracteres hedónicos de la carne tales como color y terneza, no son utilizados en este momento en el país para seleccionar progenitores. Se intenta mejorar estos caracteres principalmente de forma indirecta mediante mejoramiento de los procesos *ante mortem* (que el animal se estrese lo menos posible antes de la faena, por ejemplo) y los procesos *post mortem* (tiempo de maduración) (Franco 2010; Gallo 2010). La selección asistida por marcadores permitiría seleccionar estos caracteres con una mayor eficiencia y menor costo (Macneil & Grosz 2002).

Los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) son un tipo de marcadores utilizados en MAS. Se trata de cambios de una base en una secuencia de ADN con dos posibles nucleótidos en ese sitio. Los SNPs son abundantes, fáciles de estudiar y representan las variaciones más frecuentes en el genoma de los mamíferos (Hocquette et al. 2007). Existen muchas evidencias de asociaciones entre SNPs en determinados genes y parámetros de la calidad de la carne (Hocquette et al. 2007; Allais et al. 2010; Gill et al. 2009 y 2012).

Para los productores existe la posibilidad de comprar un “panel de SNPs” denominado *GeneSTAR® Molecular Value Predictions* (MVP®s) que contiene 56 marcadores moleculares

asociados a la eficiencia alimentaria, marmolado (cantidad de grasa intramuscular) y ternera. Estos paneles ayudan a los productores a predecir el fenotipo esperado para estos caracteres (Zoetis Genestar 2013). Una herramienta anterior a ésta fue el panel GeneSTAR® que evalúa los mismos caracteres pero solamente contiene 12 SNPs. Una evaluación de este panel realizado por Johnston y Graser en 2010 con más de 9000 bovinos proveniente de diferentes razas, mostró que existen grandes diferencias entre las diferentes poblaciones y no encontró ninguna asociación entre los SNPs y el marmolado. Esto muestra que la búsqueda de marcadores no es sencilla y que requiere análisis de las poblaciones locales.

A su vez se encuentran disponibles en el mercado otros paneles que permiten genotipar miles de SNPs a la vez, a lo largo de todo el genoma y sin información *a priori* de asociaciones con caracteres fenotípicos, pero que igual pueden ser una herramienta poderosa para la selección de ganado. Uno de éstos es por ejemplo el BovineSNP50 que contiene más de 50.000 SNPs (Jiang et al. 2009), pero también hay de 770.000 SNPs (AGRF 2013). Se espera que en el futuro estos paneles o *chips* puedan ser una herramienta útil para predecir el desempeño de los animales (Hocquette et al. 2007).

Una estrategia para la búsqueda de SNPs relacionados con la calidad de la carne es utilizar SNPs situados en genes candidatos. Estos son genes que cumplen con una a varias condiciones, de manera que aumenta la posibilidad de que una mutación (polimorfismo) en dicho gen cause una variación en el carácter fenotípico de interés. Estas condiciones pueden ser por la función fisiológica que cumple el gen, su relación con cierta vía metabólica o sus efectos encontrados en otras especies u otras razas de la misma especie. También se debe evaluar si dicho gen se expresa en el tejido de interés o si se expresa en un momento clave en el desarrollo. A su vez, también pueden ser genes de los cuales existen animales *knock-out* para ese gen por lo cual su función queda revelada (Ron y Weller 2007; Armstrong 2011).

Para el presente trabajo se seleccionaron ocho genes: *GHR*, *PRKAG3*, *TNC*, *PPARA*, *SCD*, *CAPN1*, *IGF2* y *CAST*, los cuales presentan varias evidencias como genes candidatos al menos para uno de los caracteres fenotípicos de interés (pH, CRA y color).

El gen *SCD* codifica para la enzima estearoil-CoA-desaturasa, involucrada en la síntesis de ácidos grasos (Armstrong 2011). Este gen fue seleccionado para este estudio, dado que otros autores lo han encontrado relacionado con el color de la carne (Reardon et al. 2010; Li et al. 2013). Otro gen seleccionado para presente estudio es el *CAPN1*; este es un gen que habitualmente se relaciona con la ternera de la carne porque codifica para una proteasa del tejido muscular (Costello et al. 2007). Sin embargo más recientemente se han encontrado SNPs en este gen asociados con el color de la carne (Pinto et al. 2011; Li et al. 2013) y CRA (Leal 2013). El gen *CAST* es otro gen que se asocia con la ternera, ya que su proteína codificante (calpastatina) inhibe la actividad de las proteasas del músculo, como *CAPN1* (Schenkel et al. 2006). Sin embargo, también se ha encontrado a este gen asociado al color de la carne y las pérdidas por cocción (Reardon et al. 2010; Li et al. 2012).

El gen *PPARA* codifica para un receptor nuclear importante en la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa, controlando la síntesis, almacenamiento y consumo de lípidos (Bionaz et al. 2013). En este gen han encontrado SNPs que se asocian con el pH y la jugosidad (Gill et al. 2010) por lo que es un gen interesante para el enfoque de presente estudio.

*PRKAG3* codifica para la subunidad AMPK gamma-3 de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Este gen juega un rol importante en la regulación de la actividad de AMPK en el tejido muscular y en el metabolismo de la glucosa, que afecta el proceso de maduración y el pH (Roux et al. 2006). Por otro lado se han encontrado SNPs en este gen relacionados con pérdidas por cocción y color (Gill et al. 2009; Reardon et al. 2010), por lo que es un gen que podría asociarse con los tres caracteres fenotípicos analizados.

El gen *IGF2* codifica para un factor de crecimiento insulínico tipo 2 y su análisis es interesante dado que lo han encontrado asociado al pH (Han et al. 2008). El gen *GHR* por otro lado codifica para un receptor de la hormona de crecimiento (Sherman et al. 2008) y lo han encontrado relacionado con CRA (Di Stasio et al. 2005) y color (Reardon et al. 2010). Por último, el gen *TNC* se ha encontrado asociado a CRA y pH en cerdos, y codifica para una de las proteínas responsables de la formación de la matriz extracelular (Kayan et al. 2011). Se incluye en el presente estudio para analizar una posible relación similar entre SNPs en este gen y los caracteres de interés en bovinos.

El objetivo de este trabajo es analizar marcadores genéticos en bovinos uruguayos, situados en los genes mencionados, potencialmente aptos para mejorar y complementar los métodos tradicionales de selección para pH, color y capacidad de retención de agua.

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis:**

Existen polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes *GHR*, *PRKAG3*, *TNC*, *PPARA*, *SCD*, *CAPN1*, *IGF2* y *CAST* que pueden afectar la calidad de la carne y la canal bovinas.

### **Objetivo general:**

- Analizar SNPs en los genes *GHR*, *PRKAG3*, *TNC*, *PPARA*, *SCD*, *CAPN1*, *IGF2* y *CAST* que estén relacionados con parámetros de la calidad de la canal y la carne bovinas como son el pH, la capacidad de retención de agua y el color, en animales de raza Aberdeen Angus en Uruguay, mediante análisis estadístico poblacional y de asociación genotipo-fenotipo.

### **Objetivos específicos:**

- Obtener ADN genómico de los animales para los cuales ya existen datos fenotípicos (N = 705).
- Analizar mediante métodos de estadística descriptiva los caracteres fenotípicos de color (parámetros L, a, b), pH y CRA.
- Seleccionar SNPs en las bases de datos públicas y en la bibliografía, de los genes candidatos *GHR*, *PRKAG3*, *TNC*, *PPARA*, *SCD*, *CAPN1*, *IGF2* y *CAST*.
- Luego del genotipado de las muestras, analizar los SNPs desde el punto de vista genético poblacional.
- Analizar la probabilidad de asociación genotipo-fenotipo mediante regresión lineal múltiple entre los SNPs genotipados y los caracteres fenotípicos medidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra de animales

Los datos fenotípicos provienen de 705 bovinos de raza Aberdeen Angus, de los cuales 509 son novillos (72,2%) y 196 (27,8%) son vacas y vaquillonas. Estos animales provienen de diez establecimientos diferentes (diez tropas) de varios departamentos del país, y fueron faenados en seis frigoríficos distintos, cada tropa en una fecha diferente. Estos datos son importantes a tener en cuenta para el posterior análisis de asociación.

La presente tesis se llevó a cabo en el marco del proyecto PR\_FSA\_2009\_1383\_(Fondo INNOVAGRO-ANII), titulado: "Validación y detección de genes asociados a calidad de la carne y la canal en ganado Aberdeen Angus del Uruguay", del Área Genética de Facultad de Veterinaria, UdelaR.



Figura 1. Novillos de la raza Aberdeen Angus en Uruguay.

### Fenotipos

El pH fue medido en frigorífico a las 24 horas luego del sacrificio, en la media res izquierda a la altura de la 13ra costilla, utilizando un pHmetro estándar para carne. Luego del despiece se extrajeron muestras del bife angosto o entrecot (*Longissimus dorsi*) para su análisis. El color fue medido en frigorífico mediante los tres parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , utilizando un colorímetro Minolta luego de dejar orear a la carne durante al menos 40 minutos. Se realizaron tres medidas por bife, y luego se tomó el promedio de cada medida. La capacidad de retención del agua fue determinada según el método de pérdidas por cocción (PPC), en el cual se pesa la porción de carne antes y después de su cocción controlada. La diferencia entre ambas medidas se debe al agua perdida durante el proceso de cocción. Dicha medida se realizó dos veces, según la porción de carne que pudo ser extraída, a las 24 horas (PPC 1 día) y a los 10 días (PPC 10 días) de maduración a 4 grados. Los análisis de PPC fueron realizados por el personal del Laboratorio de Calidad de Carne de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía de Paysandú.

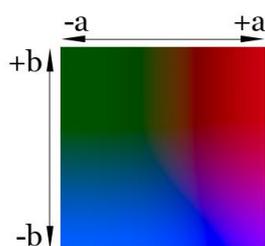


Figura 2. Se muestra lo que significa las medidas de colores. (Fuente de imagen: Wikipedia)

## **Extracción de ADN y genotipado**

Los datos genotípicos para los 705 bovinos fueron obtenidos mediante extracción de ADN del músculo y posterior genotipado. El método utilizado para la extracción se encuentra detallado en el anexo 1. El genotipado, a partir del ADN extraído, fue realizado por la empresa GENESEEK® de Estados Unidos mediante la estrategia “*custom assay genotyping*” utilizando métodos masivos de genotipado basados en espectrometría de masa (<http://www.neogen.com/Agrigenomics/ResearchDevelop.html#bottom>).

Para el genotipado se eligieron cuidadosamente 37 SNPs situados en 8 genes considerados buenos candidatos para estar asociados a los caracteres fenotípicos de interés relacionados a la calidad de la carne. La elección de SNP se hizo mediante búsqueda en publicaciones científicas y en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Se eligieron SNPs preferentemente situados en exones y que producen un cambio de aminoácido en el péptido resultante (no-sinónimos) y entre éstos, los que producen un cambio a un aminoácido no similar estructuralmente al anterior, para aumentar la posibilidad de encontrar una asociación entre el SNP y el carácter fenotípico de interés. A su vez se eligieron SNPs situados en dominios conservados, seleccionados utilizando la herramienta *online* “*Conserved Domains*” del NCBI.

## **Análisis estadísticos**

Luego de recibir los datos genotípicos para los 37 SNPs se hizo un análisis genético poblacional mediante el programa Genepop (<http://genepop.curtin.edu.au>). Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas. Se analizó la existencia o no de equilibrio Hardy-Weinberg en cada marcador mediante el test exacto de Fisher, y se obtuvieron datos del índice de fijación de Wright  $F_{IS}$ . Se calcularon parámetros de diversidad genética tales como heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) para cada marcador y para la muestra en general.

Se hizo un análisis descriptivo de las variables fenotípicas mediante el programa Statgraphics Centurion XV Versión 15.02.06 para obtener la distribución, medias, desvíos, valores máximos y mínimos, y rangos de los datos. A su vez se efectuaron diferentes pruebas estadísticas para determinar si las diferencias encontradas entre sexos son significativas. Para comparación de medias se utilizó la Prueba t y para comparación de medianas se utilizó la prueba W de Mann-Whitney. Para estudiar si las diferencias encontradas entre las tropas son significativas se utilizó la prueba de rangos múltiples.

Los SNPs con frecuencia alélica del alelo minoritario (MAF) menor a 0,05 fueron excluidos del análisis de asociación para evitar sesgos en los datos. Luego se aplicó un análisis de regresión lineal múltiple para testear asociaciones entre genotipos y fenotipos utilizando el lenguaje de programación R (<http://www.r-project.org>). El paquete estadístico lme4 se utilizó para ajustar el modelo lineal a los datos. En este estudio se asumió que los efectos de los SNPs sobre los caracteres fenotípicos son completamente aditivos y que no hay interacciones entre los efectos fijos considerados. El efecto del SNP para cada carácter fue estimado mediante la inclusión del mismo como covariable en el modelo lineal.

El modelo utilizado para el estudio fue:

$$y = \mu + \text{tropa} + \text{planta} + \text{sexo} + g\alpha + e$$

Donde  $y$  es el carácter en cuestión,  $\mu$  es la media de la característica, *tropa* es el efecto combinado de tropa, origen y fecha de faena, *planta* es el efecto de la planta de faena, *sexo* es el efecto del sexo de los animales,  $g$  es el genotipo del SNP y  $\alpha$  es el efecto aditivo del SNP. Se incluyen todos los SNPs en la misma recta, en forma similar a como se procede con los análisis de genoma completo o GWAS. Debido a esto, para corregir por el testeo múltiple (*multiple testing*) en cada grupo se hizo un análisis de permutaciones para calcular el umbral de significación para cada carácter fenotípico. Luego el efecto de cada SNP fue estimado y el estadístico F fue utilizado para calcular la distribución de la hipótesis nula. Un total de 10000 permutaciones fueron utilizadas para calcular la distribución nula de la cual un umbral de 5% para cada experimento fue inferido.

## RESULTADOS

### Análisis de los fenotipos

#### Análisis general y por sexos de los animales

Dentro de las variables Color *L*, Color *a* y PPC 1 día se detectaron valores atípicos. Estos valores fueron eliminados del análisis debido a que probablemente se deben a errores durante la toma de los datos (tres datos de PPC 1 día, y un dato para Color *L* y Color *a* respectivamente).

En las tablas 1-3 se muestra un resumen del análisis estadístico de los caracteres fenotípicos mencionados. En la tabla 1 el análisis incluye la población total, en la tabla 2 sólo las hembras (vacas y vaquillonas) y en la tabla 3 solo los machos (novillos).

**Tabla 1. Resultado del análisis realizado para cada carácter fenotípico en la población total. Se muestra: número de animales (Recuento), promedio, desvío estándar, coeficiente de variación, valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango. PPC indica pérdidas por cocción.**

Carácter fenotípico	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mín.	Máx.	Rango
pH	545	5,69	0,24	4,29%	5,38	6,80	1,42
Color <i>L</i>	464	35,57	3,61	10,16%	24,40	45,53	21,13
Color <i>a</i>	464	18,76	5,54	29,51%	4,93	31,37	26,44
Color <i>b</i>	464	10,73	2,70	25,12%	4,33	18,20	13,87
PPC 1 día	420	0,28	0,04	14,38%	0,13	0,44	0,308
PPC 10 días	249	0,28	0,04	13,29%	0,17	0,40	0,226

Como muestra la tabla, el carácter fenotípico del cual se tiene más datos es el pH con 545 animales, mientras el carácter de la cual se tienen menos datos es la pérdida por cocción a los 10 días con 249. En la tabla 1 a su vez se pueden ver los promedios de cada carácter. Es interesante destacar que el promedio de pérdidas por cocción es igual con 1 día y 10 días de maduración. Los desvíos en general son bajos, pero los que presentan mayor desvío son el Color *a* y Color *b*, lo que está reflejado en el coeficiente de variación.

**Tabla 2. Resultado del análisis para cada carácter fenotípico analizado de la población de hembras (vacas y vaquillonas). Se muestra: número de animales (Recuento), promedio, desvío estándar, coeficiente de variación, valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango. PPC indica pérdida por cocción.**

Carácter fenotípico	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mín.	Máx.	Rango
pH	172	5,63	0,15	2,74%	5,40	6,22	0,82
Color <i>L</i>	187	36,39	2,95	8,11%	27,40	45,53	18,13
Color <i>a</i>	186	14,35	4,35	30,30%	4,93	23,87	18,94
Color <i>b</i>	186	11,89	2,75	23,12%	5,23	18,20	12,97
PPC 1 día	187	0,29	0,04	13,94%	0,20	0,44	0,24
PPC 10 día	152	0,28	0,04	12,69%	0,19	0,40	0,21

**Tabla 3. Resultado del análisis para cada carácter fenotípico analizado de la población de machos (novillos). Se muestra: número de animales (Recuento), promedio, desvío estándar, coeficiente de variación, valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango. PPC indica pérdida por cocción.**

Carácter fenotípico	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mín.	Máx.	Rango
pH	373	5,71	0,27	4,75%	5,38	6,80	1,42
Color <i>L</i>	277	35,01	3,91	11,16%	24,40	44,33	19,93
Color <i>a</i>	278	21,70	4,11	18,92%	10,67	31,37	20,70
Color <i>b</i>	278	9,96	2,37	23,80%	4,33	15,60	11,27
PPC 1 día	233	0,28	0,04	14,68%	0,13	0,36	0,23
PPC 10 días	97	0,27	0,04	14,15%	0,17	0,33	0,16

En general se obtuvieron más datos de novillos que de vacas y vaquillonas, excepto en el caso de PPC 10 días donde se obtuvo más datos para hembras (152 contra 97).

Como se puede observar mediante comparación de las dos tablas (2 y 3), existen diferencias en los promedios de los caracteres, excepto para el caso de PPC 1 día y PPC 10 días donde la diferencia es mínima (0,01).

Para los caracteres pH, Color *L*, Color *a* y Color *b* existe una diferencia significativa entre los sexos. Por ejemplo, en el caso de pH la Prueba W de Mann-Whitney da un valor p de 0,0169 y la Prueba t da un valor p de 0,000133, mientras para PPC1 1 día y PPC 10 días no existen diferencias significativas entre los sexos (Ver tabla 4).

**Tabla 4. Resultados del análisis estadístico para comparar los caracteres fenotípicos entre animales de distinto sexo. Se muestra el valor p de la prueba W de Mann-Whitney y el valor p de la prueba t.**

	Prueba W de Mann-Whitney (p-valor)	Prueba t (p-valor)
pH	0,01690	0,00013
Color <i>L</i>	0,00027	0,00005
Color <i>a</i>	0,00000	0,00000
Color <i>b</i>	0,02632	0,00000
PPC 1 día	0,36819	0,09779
PPC 10 días	0,74395	0,13860

Las hembras tienen menor pH promedio que los novillos con 5,63 contra 5,71, por lo cual los novillos están más cercanos a valor de pH que se rechaza por el mercado. A su vez las hembras presentan un valor más alto de luminosidad (Color *L*). Esto indica que el color de la carne es más claro (un valor de 100 corresponde a blanco, mientras un valor de 0 corresponde a negro). Esto coincide con lo anterior, dado que carnes oscuras tienden a tener valores más elevados de pH.

A la vez las hembras presentan un valor del Color *a* mucho menor que los novillos. Esto significa que las hembras tienen un color de la carne más rosado, que corresponde a colores más claros, lo que coincide también con los resultados para el Color *L* (Ver figura 2). Las hembras presentan un Color *b* más elevado que los novillos lo que significa que existen diferencias de tonalidad entre la carne de ambos grupos.

### Análisis por tropas

A continuación se muestra un análisis de los seis caracteres fenotípicos por tropa, para estudiar si existen sesgos dados por los diferentes orígenes de los animales o por la fecha de faena.

#### pH

En la tabla 5 se pueden observar los promedios de pH para las ocho tropas de las cuales se obtuvieron medidas de pH, y el resultado de la prueba estadística de rangos múltiples por medio de la cual se identificaron cuatro grupos homogéneos. Las tropas que son significativamente diferentes entre sí son las tropas que no tienen un X alineado. Por ejemplo, en el caso de la tropa 1 ésta es significativamente diferente de las tropas 4, 2, 8, 9 y 6. Se puede observar que la tropa 6 formada por 97 individuos es la que presenta el promedio más alto y que es significativamente diferente de todas las demás tropas. Al observar las figuras 3 y 4 se aprecia que esta tropa tiene una dispersión de valores muy distintiva comparada con las otras tropas (puntos en color lila en la figura 4), y a su vez 44,3% de los individuos de la tropa 6 presenta un pH mayor a 5,8, el cual es el valor de rechazo por el mercado.

Tabla 5. Prueba de Rangos múltiples para el pH por tropas (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se determinaron 5 grupos homogéneos.

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
4	32	5,52156	X
2	51	5,58	X
8	105	5,58571	X
3	49	5,61531	XX
1	123	5,66268	XX
5	59	5,72492	XX
9	29	5,76586	X
6	97	5,91928	X

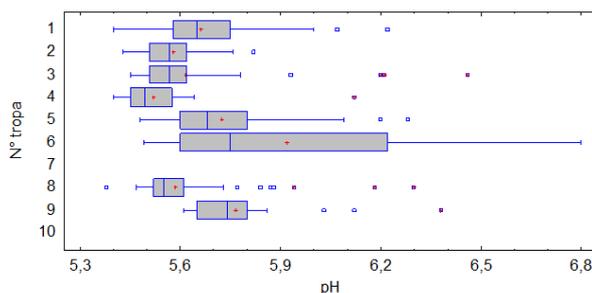


Figura 3. Gráfico de Cajas y Bigotes. Muestra la diferencia entre las tropas para el pH

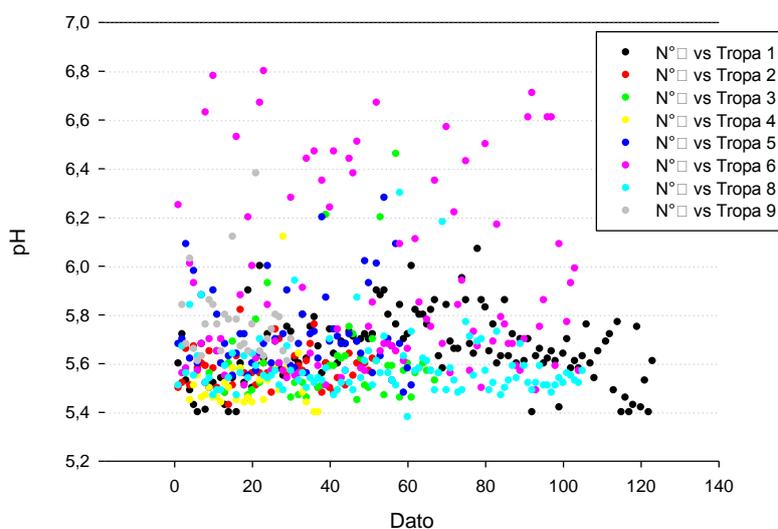


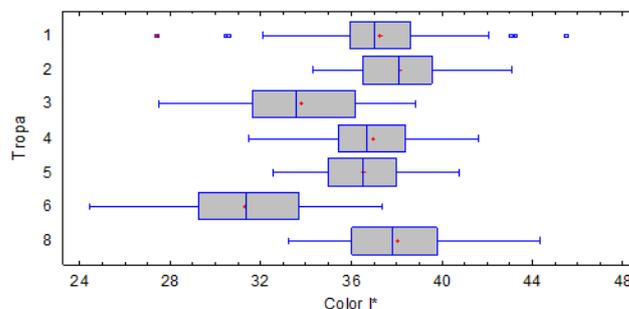
Figura 4. Distribución de valores de pH por las diferentes tropas. La tropa 6 muestra un patrón diferente de los demás tropas.

### Color L

Para el Color L también se encontró una diferencia entre las tropas. En la tabla 6 se puede ver que la Prueba de Rangos Múltiples determina cinco grupos homogéneos. En este caso también es la tropa 6 la que se diferencia más, con una media mucho menor y significativamente diferente a todas las demás tropas. Estos resultados coinciden con lo encontrado para pH.

**Tabla 6. Prueba de Múltiples Rangos para el Color L por tropas (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se determinaron 5 grupos homogéneos.**

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
6	96	31,2782	X
3	68	33,809	X
5	58	36,5272	X
4	33	36,9427	XX
1	118	37,2636	XX
8	40	38,0552	XX
2	51	38,13	X



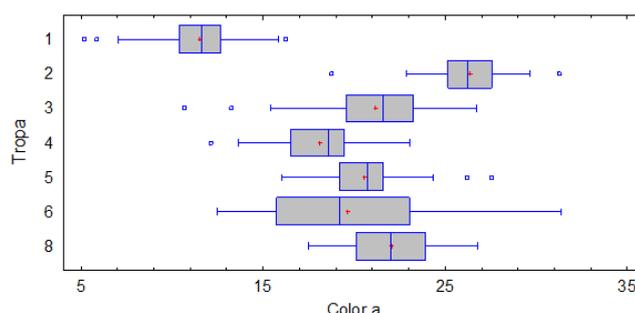
**Figura 5. Gráfico de Caja y Bigotes. Muestra la diferencia entre las tropas con respecto al color.**

### Color a

Para el Color a también se encontraron diferencias significativas entre las tropas utilizando las mismas pruebas estadísticas. En este caso se apreciaron seis grupos homogéneos. La tropa que más se diferencia es la tropa 1 que tiene una media mucho menor que las demás tropas (ver tabla 7 y figura 6). La tropa 1 es la única tropa que contenía vaquillonas, esto coincide con los valores menores del parámetro a, dado que los animales jóvenes tienden a tener carne más rosada. La tropa 6 se encuentra cercana al promedio general, pero presenta el mayor rango de valores de todas las tropas.

**Tabla 7. Prueba de Rangos Múltiples para el Color a por tropas. (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se determinaron 6 grupos homogéneos.**

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
1	118	11,5084	X
4	33	18,1415	X
6	96	19,6483	X
5	59	20,5973	XX
3	67	21,197	XX
8	40	22,043	X
2	51	26,3349	X



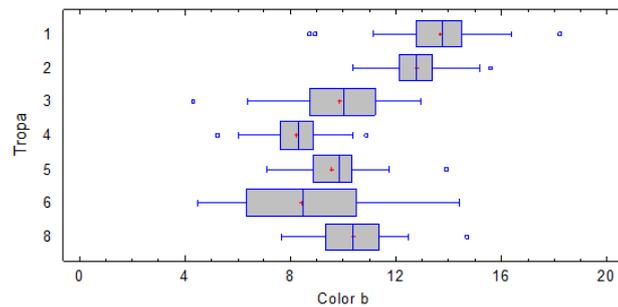
**Figura 6. Gráfico de Cajas y Bigotes para el Color a por tropas.**

### Color b

Para el Color b también se encontró una diferencia significativa entre las tropas utilizando la misma prueba estadística. En este caso se aprecian seis grupos homogéneos como el caso de Color a (ver tabla 8 y figura 7). La tropa 6, que fue la que presentó la carne más oscura, tiene un bajo valor de Color b, lo que indica que tiene un tono más hacia el azul (menos amarillo). Esto coincide dado que tonos hacia el azul son más oscuros. A su vez el grupo que se encuentra más hacia el amarillo es la tropa 1, que es el grupo donde se encontró carne menos roja y una de las más luminosas por lo que coincide los colores obtenidos de las tres medidas de colores.

**Tabla 8. Prueba de Rangos Múltiples para el Color *b* por tropas (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se determinaron 6 grupos homogéneos.**

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
4	33	8,23121	X
6	96	8,4074	X
5	59	9,55186	X
3	68	9,84618	XX
8	40	10,3782	X
2	51	12,7996	X
1	117	13,6852	X



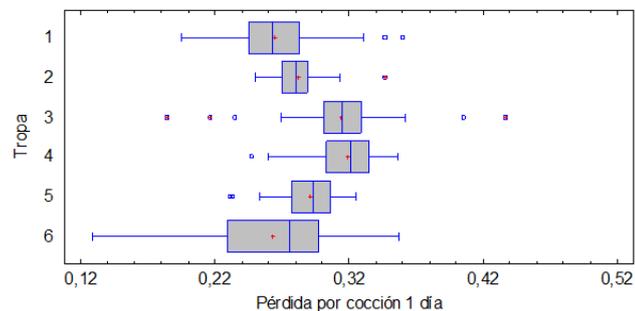
**Figura 7. Gráfico de Cajas y Bigotes para el Color *b* por tropas.**

PPC 1 día

En la tabla 9 se observan los resultados de la prueba estadística de Rangos Múltiples. Se apreciaron tres grupos homogéneos. Se puede ver que las tropas de las cuales se obtuvo más datos fueron las tropas 1 y 6, que a su vez se encuentran dentro del mismo grupo homogéneo presentando los menores promedios. La tropa 6 fue la tropa con mayor pH y carne más oscura, sin embargo es la tropa que presenta menor pérdida por cocción a las 24 horas de maduración, aunque presenta una gran variación (figura 8). La tropa que presenta menor capacidad de retención de agua a las 24 horas es la tropa 4, compuesta por vacas solamente.

**Tabla 9. Prueba de Rangos Múltiples para la Pérdida por cocción a 1 día de maduración por tropas (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se encontraron tres grupos homogéneos.**

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
6	101	0,262743	X
1	117	0,264239	X
2	50	0,28182	X
5	50	0,29084	X
3	68	0,314206	X
4	34	0,319147	X



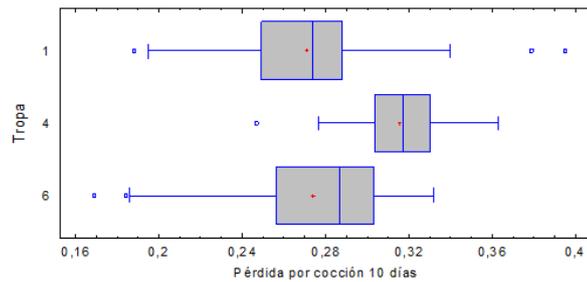
**Figura 8. Gráfica de Caja y Bigotes. Pérdida por cocción 1 día por tropa.**

PPC 10 días

En la tabla 10 se observan los resultados del test estadístico de Rangos Múltiples para la característica pérdidas por cocción a los 10 días de maduración. Se determinaron dos grupos homogéneos. Es el carácter del cual se obtuvo menos datos, dado que sólo fue posible extraer la carne necesaria para realizarlo en tres tropas. La tropa de la cual se obtuvo más datos es la tropa 1 y a su vez es la tropa que presenta la menor media. La tropas 1 y 6 se encuentran otra vez dentro de un mismo grupo homogéneo presentando mayor capacidad de retención de agua, mientras la tropa 4, significativamente diferente, presenta la menor capacidad de retención de agua. El orden encontrado es similar al de la pérdida por cocción con 1 día (24 horas) de maduración.

**Tabla 10. Prueba de Múltiples Rangos para la pérdida por cocción 10 días por tropas (Método: 95,0 porcentaje LSD). Se encontró 2 grupos homogéneos.**

Tropas	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
1	118	0,27111	X
6	97	0,273897	X
4	34	0,315412	



**Figura 9. Gráfica de Cajas y Bigotes. Pérdida por cocción 10 días por tropa.**

Estos análisis fueron realizados para demostrar posibles influencias de factores no genéticos sobre los caracteres fenotípicos analizados. Los resultados serán tomados en cuenta para el análisis de asociación genotipo-fenotipo, de manera que serán incluidos como factores independientes (efectos fijos) en la regresión múltiple.

### Parámetros poblacionales

La mayoría de los SNPs fueron genotipados con una eficacia elevada por lo que el recuento de animales para cada SNP es cercano al número total de animales, excepto el SNP *SCD 5* para el cual solo se pudo genotipar 81 animales.

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis poblacional realizado mediante el programa GENEPOP. Se encontró que ocho de los 37 SNPs están fijados en la población (frecuencia de uno de los alelos igual a cero). Otros siete se encontraron muy cercanos a la fijación, con una frecuencia de uno de los alelos menor a 0,05 (valores marcados en rojo en la tabla). En estos casos uno de los genotipos suele no estar representado, razón por la cual éstos SNPs no serán utilizados para el análisis de asociación dado que los resultados que se obtienen con ellos podrían estar sesgados. El resto de los SNPs analizados presentó frecuencias por encima de 0,05 para el alelo minoritario. Teniendo en cuenta sólo los SNPs cuyo alelo minoritario se encuentra en una frecuencia mayor o igual a 0,05, la heterocigosidad observada fluctúa entre 0,13 para el SNP *SCD 6* y 0,506 para el SNP *CAST 3*. En el caso de la heterocigosidad esperada, ésta fluctúa entre 0,148 para el SNP *SCD 6* y 0,486 para el SNP *SCD 4*. El promedio de la heterocigosidad observada de toda la muestra y para todos los SNPs es 0,250 y el de la heterocigosidad esperada es 0,265.

La mayor parte de los SNPs están en equilibrio Hardy Weinberg en la población, lo que se ve reflejado tanto en el estadístico  $F_{IS}$  como en el p-valor. Las excepciones son *TNC4*, *SCD 4*, *SCD 6*, *GHR2*, *CAPN 4751*, *CAST 2* y *CAST 3* que están fuera de equilibrio ( $p$  valor  $< 0,05$ ). Como se ve en la tabla, la mayoría de los SNPs tienen un valor de  $F_{IS}$  cercano a 0, excepto los SNPs mencionados que se encuentran fuera del equilibrio Hardy Weinberg. En estos SNPs el desequilibrio es provocado mayormente por una deficiencia de heterocigotas ( $F_{IS}$  positivo y elevado, como por ejemplo *TNC4* y *CAPN1 316*), mientras que en algunos casos existe un significativo exceso de heterocigotas ( $F_{IS}$  negativo y elevado, como por ejemplo *CAST 3*).

Tabla 10. Resumen del análisis poblacional de los 37 SNPs situados en los ocho genes analizados. Se muestra recuento (número total de animales genotipados), frecuencias alélicas, genotipos observados, heterocigosis observada (H<sub>O</sub>), heterocigosis esperada (H<sub>e</sub>), estadístico F<sub>IS</sub> y p-valor de la prueba de equilibrio Hardy Weinberg.

SNP	Recuento	Frecuencias Alélicas		Genotipos observados			H <sub>O</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	Equilibrio H-W (P-valor)
<i>TNC 1</i>	647	T 1	G 0	TT 647					-	-
<i>TNC 2</i>	645	G 0,986	T 0,014	GG 627	GT 18	TT 0	0,028	0,028	-0,013	1
<i>TNC 3</i>	643	G 0,986	T 0,014	GG 625	GT 18	TT 0	0,028	0,028	-0,013	1
<i>TNC 4</i>	606	T 0,8053	C 0,1947	TT 440	CT 96	CC 70	0,158	0,314	0,496	0
<i>TNC 5</i>	541	G 0,9926	C 0,0074	GG 533	CG 8	CC 0	0,015	0,015	-0,007	1
<i>TNC 6</i>	637	C 1	G 0	CC 637			0,000	0,000	-	-
<i>PRKAG3 1</i>	639	G 0,6362	A 0,3638	GG 267	AG 279	AA 93	0,437	0,463	0,058	0,156
<i>PRKAG3 2</i>	644	T 1	C 0	TT 644			0,000	0,000	-	-
<i>PRKAG3 3</i>	647	G 0,9946	C 0,0054	GG 640	CG 7	GG 0	0,011	0,011	-0,005	1
<i>PPARA 1</i>	645	G 1	A 0	GG 645					-	-
<i>PPARA 2</i>	650	T 0,9985	A 0,0015	TT 648	AT 2	AA 0	0,003	0,003	-	1
<i>PPARA 3</i>	646	T 1	G 0	TT 646			0,000	0,000	-	-
<i>PPARA 4</i>	640	A 0,7445	C 0,2555	AA 362	AC 229	CC 45	0,358	0,380	0,060	0,139
<i>SCD 1</i>	627	A 0,8525	G 0,1475	AA 460	AG 149	GG 18	0,238	0,251	0,056	0,213
<i>SCD 2</i>	641	C 0,8354	T 0,1646	CC 451	CT 169	TT 21	0,264	0,275	0,042	0,316
<i>SCD 3</i>	632	G 0,6733	A 0,3267	GG 297	GA 257	AA 78	0,407	0,440	0,077	0,058
<i>SCD 4</i>	613	A 0,5824	G 0,4176	AA 224	AG 266	GG 123	0,434	0,486	0,109	0,009
<i>SCD 5</i>	81	T 0,7099	C 0,2901	TT 41	CT 33	CC 7	0,407	0,412	0,017	1
<i>SCD 6</i>	640	T 0,9195	C 0,0805	TT 547	CT 83	CC 10	0,130	0,148	0,124	0,01
<i>GHR 1</i>	644	T 1	C 0	TT 644			0,000	0,000	-	-
<i>GHR 2</i>	637	A 0,8085	C 0,1915	AA 432	AC 166	CC 39	0,261	0,310	0,159	0,001
<i>GHR 3</i>	646	A 0,8406	G 0,1594	AA 457	AG 172	GG 17	0,266	0,268	0,007	0,884
<i>GHR 4</i>	643	T 0,9627	G 0,0373	TT 598	CT 42	CC 3	0,065	0,072	0,092	0,052
<i>CAPN1 1</i>	645	G 0,9512	A 0,0488	GG 585	AG 57	AA 3	0,088	0,093	0,050	0,179
<i>CAPN1 316</i>	629	G 0,6558	C 0,3442	GG 298	CG 229	CC 102	0,364	0,451	0,194	0
<i>CAPN1 4751</i>	650	C 0,7000	T 0,3000	CC 312	CT 286	TT 52	0,440	0,420	-0,469	0,244
<i>CAPN1 530</i>	643	G 0,8453	A 0,1547	GG 454	AG 179	AA 10	0,278	0,262	-0,063	0,130

<i>CAPN1 2</i>	650	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>						
		1	0	650			0,000	0,000	-	-
<i>CAPN1 3</i>	645	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
		0,8798	0,1202	498	139	8	0,216	0,212	-0,019	0,850
<i>CAST 1</i>	608	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>				
		0,7196	0,2804	317	241	50	0,396	0,404	0,019	0,704
<i>CAST 2</i>	648	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>GG</b>	<b>AG</b>	<b>AA</b>				
		0,9035	0,0965	535	101	12	0,156	0,174	0,107	0,013
<i>CAST 3</i>	625	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>TT</b>	<b>CT</b>	<b>CC</b>				
		0,6688	0,3312	260	316	49	0,506	0,443	-0,141	0,001
<i>CAST 4</i>	642	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>				
		0,7157	0,2843	326	261	52	0,407	0,407	0,002	1
<i>CAST 5</i>	641	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
		0,741	0,259	352	242	45	0,378	0,384	0,017	0,681
<i>IGF2 1</i>	638	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>				
		0,7939	0,2061	404	205	29	0,321	0,327	0,019	0,628
<i>IGF2 2</i>	645	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>GG</b>						
		1	0	645			0,000	0,000	-	-
<i>IGF2 3</i>	644	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>GG</b>	<b>CG</b>	<b>CC</b>				
		0,8905	0,1095	514	119	11	0,185	0,195	0,053	0,224

### Análisis de asociación genotipo-fenotipo

En la tabla 12 se muestran los resultados generales del análisis de asociación, listándose los SNPs que se encontraron significativamente relacionados con un carácter fenotípico (p valor < p valor umbral) y los que se encontraron cercanos a la significación.

El Color *b* se encontró relacionado con los SNPs *SCD 5*, *CAPN1 3*, *PPARA 4* y *PRKAG3*. La pérdida por cocción a los 10 días de maduración se encontró relacionada a los SNPs *CAPN1 3*, *CAPN1 4751* y *PRKAG3*. La pérdida por cocción a 1 día de maduración se encontró relacionada con *CAST 3*. Finalmente se encontró el pH relacionado con el gen *IGF2 1*. Este último carácter se analizó con y sin la tropa 6, dado que esta tropa se encontró muy diferenciada en el análisis de los fenotipos, especialmente para pH. La relación encontrada fue cuando se excluyó la tropa 6 del estudio.

Los caracteres Color *a* y Color *L* no se encontraron relacionados con ninguno de los SNPs analizados.

**Tabla 12. Resultados generales del análisis de asociación genotipo-fenotipo. Se muestran solamente los SNPs que se encontraron asociados a uno o más caracteres fenotípicos, en forma significativa y cercana a la significación.**

	Carácter	SNP	P valor	P valor umbral
<b>SNPS significativos</b>				
	Color <i>b</i>	<i>SCD 5</i>	0,0117	0,0247
	Color <i>b</i>	<i>CAPN1 3</i>	0,0195	0,0247
	PPC 10d	<i>CAPN1 3</i>	0,0100	0,0122
	PPC 1 d	<i>CAST 3</i>	0,0051	0,0088
<b>SNPS cercanos a significación</b>				
	Color <i>b</i>	<i>PPARA 4</i>	0,0426	0,0247
	Color <i>b</i>	<i>PRKAG3 1</i>	0,0886	0,0247
	PPC 10d	<i>CAPN1 4751</i>	0,0418	0,0122
	PPC 10d	<i>PRKAG3 1</i>	0,0420	0,0122
<b>SNPS significativos (sin tropa 6)</b>				
	pH	<i>IGF2 1</i>	0,0125	0,0157

### Resultados significativos y cercanos a la significación por gen

Dentro de los ocho genes analizados, en sólo dos genes no se encontró ninguna asociación con los caracteres fenotípicos estudiados. Uno fue el gen *TNC*, en el cual de los cinco SNPs analizados cuatro se habían encontrado fijados o cercanos a la fijación; el otro gen es *GHR*. Dentro de los otros seis genes se encontró al menos una asociación entre un SNP y un carácter fenotípico. (Ver tabla 12).

#### SCD

El SNP *SCD 5* situado en el gen de la enzima esteroil-CoA-desaturasa se encontró significativamente asociado al Color *b* (Ver tabla 13). Los animales con genotipo TT tienen carne más oscura (tendencia hacia más azul y menos amarillo). El efecto es pequeño, de 0,3 desviaciones típicas.

**Tabla 13. Resultados del análisis de asociación para el gen *SCD*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. Efecto/DT: efecto del SNP medido en desviaciones típicas del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.**

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
Color <i>b</i>	<i>SCD 5</i>	TT	-0,8231	0,3049	0,3251	6,4105	0,0117	0,0247	1,9325	1,6889

#### CAPN1

Como el gen *SCD*, el gen de la u-calpaína fue encontrado asociado al color de la carne (Tabla 14). Para el SNP *CAPN1 3*, los animales con el genotipo GG presentan carne más clara, con un color tendiente más al amarillo y menos al azul (parámetro *b*). A su vez este gen fue encontrado asociado con la pérdida de agua por cocción a los 10 días de maduración. Individuos con genotipo GG para el SNP *CAPN1 3*, tendrían una menor capacidad de retención de agua, por tener mayores pérdidas por cocción (0,011% más) que los del genotipo opuesto.

A su vez, el SNP *CAPN1 4751*, situado en el mismo gen, también se encuentra cercano a la significación para la pérdida por cocción a los 10 días de maduración, aunque este efecto es muy menor (0,0075%).

**Tabla 14. Resultados del análisis de asociación para el gen *CAPN*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.**

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
Color <i>b</i>	<i>CAPN1 3</i>	GG	0,3892	0,1441	0,1660	5,4972	0,0195	0,0247	1,3793	1,6889
PPC 10d	<i>CAPN1 3</i>	GG	0,0111	0,2783	0,0043	6,7342	0,0100	0,0122	1,9988	1,9143
PPC 10d	<i>CAPN1 4751</i>	TT	0,0075	0,1866	0,0036	4,1890	0,0418	0,0122	1,3793	1,9143

#### CAST

El SNP *CAST 3* ubicado en el gen de la calpastatina (*CAST*) se encontró significativo para la pérdida de agua por cocción a las 24 horas de maduración. Los animales con genotipo TT tienen mayor capacidad de retención de agua, por tener menor pérdida por cocción que los de genotipo CC. Como se puede ver en la tabla 15 este efecto es pequeño (0,008%, o 0,20 desviaciones típicas).

Tabla 15. Resultados del análisis de asociación para el gen CAST. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
PPC 1d	CAST 3	TT	-0,0083	0,2076	0,0029	7,9285	0,0051	0,0088	2,2924	2,0538

### PPARA

El SNP *PPARA* 4 situado en el gen del receptor alfa activado por peroxisomas (“peroxisome proliferator-activated receptor alpha”) se encontró asociado al parámetro *b* del color de la carne. Los animales de genotipo CC tienden a tener carne de color más clara que los de genotipo opuesto (tendencia hacia el amarillo y menos hacia el azul). Este efecto no es significativo sino cercano a la significación (tabla 16).

Tabla 16. Resultados del análisis de asociación para el gen *PPARA*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
Color <i>b</i>	<i>PPARA</i> 4	CC	0,2535	0,0939	0,1247	4,1336	0,0426	0,0247	1,3704	1,6889

### PRKAG3

*PRKAG3* codifica para la subunidad gamma-3 de la AMPK (proteín kinasa activada por AMP). El SNP *PRKAG3* 1 situado en este gen presenta un efecto cercano a la significación sobre el Color *b* y la pérdida por cocción a los 10 días de maduración. En ambos casos los efectos son pequeños (tabla 17).

Tabla 17. Resultados del análisis de asociación para el gen *PRKAG3*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
Color <i>b</i>	<i>PRKAG3</i> 1	GG	0,1917	0,0710	0,1123	2,9122	0,0886	0,0247	1,0526	1,6889
PPC 10d	<i>PRKAG3</i> 1	GG	0,0062	0,1560	0,0031	4,1787	0,0420	0,0122	1,3767	1,9143

### IGF2

El SNP *IGF2* 1 situado en el gen del factor de crecimiento insulínico tipo 2 presenta un efecto significativo sobre el pH. Este resultado dio significativo luego de excluir la tropa 6 del análisis. Los genotipos TT presentan un valor de pH mayor que los genotipos CC (ver tabla 18).

Tabla 18. Resultados del análisis de asociación para el gen *IGF2*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. SE: error estándar de la regresión. Fval: estadístico F de la regresión. Pval: valor de p de la regresión. Pval umbral: P valor umbral de la regresión.

Carácter	SNP	Genotipo	Efecto	Efecto/DT	SE	Fval	Pval	Pval umbral	-Log(Pval)	-Log(Pval umbral)
pH sin tropa 6	<i>IGF2</i> 1	TT	0,0319	0,1327	0,0127	6,2868	0,0125	0,0157	1,9022	1,8030

## DISCUSIÓN

### Análisis de los fenotipos

Para todos los caracteres fenotípicos menos los de pérdida de agua por cocción, se obtuvieron diferencias significativas entre los sexos, tanto entre las medias como las medianas. Es esperable encontrar una diferencia de caracteres entre sexos dado que ya han sido encontrados en otros estudios, por expresión diferencial condicionada debido al ambiente hormonal u otros factores (Choat et al. 2006; Gill et al. 2009; Park et al. 2002). El hecho de que la mayoría de las hembras de este estudio son vacas de descarte (más de cuatro años) seguramente también esté incidiendo, teniendo en cuenta que las vaquillonas y los novillos son de aproximadamente dos años y medio de edad. Las diferencias también pueden deberse a que se compara un número muy desigual de animales, dado que el número de hembras es mucho menor para la mayoría de los caracteres. (Ver resultados tabla 2 y 3).

En el estudio de Gill et al. (2009) se encontró que las hembras tienden a tener un índice mayor de grasa corporal. La deposición diferencial de lípidos puede afectar el color de la carne si dicha deposición es intramuscular (Reardon et al. 2010). En el presente estudio se encontró que la carne de las hembras es más clara (36,39 contra 35,01 para el parámetro  $L$  y 14,35 contra 21,70 para el parámetro  $a$ ) por lo que una expresión diferencial de lípidos podría ser una razón para las diferencias encontradas en los caracteres de color entre sexos.

En el caso del pH también se encontró una diferencia significativa entre los sexos como ya se mencionó, pero esta diferencia existe sólo si se incluye tropa 6 (solo novillos). Sin esa tropa, las diferencias ya no son significativas. La tropa 6 es la tropa que presentó el promedio de pH más alto de toda la muestra; dicha tropa está compuesta solamente por machos y a su vez tiene un alto número de individuos (97); estos dos factores hacen que esta tropa afecte mucho el análisis entre sexos para todas las tropas lo que podría explicar porqué el análisis da significativo sólo cuando dicha tropa se incluye en el estudio. Sin embargo es esperable encontrar diferencias entre sexos debido a que los novillos tienden a tener carne más oscura que las hembras (Gallo 2010).

Lo mismo pasa en el caso del Color  $L$ . Al sacar la tropa 6 del análisis tampoco da un resultado significativo. El Color  $a$  y Color  $b$  son significativos independientemente de si se incluye o no la tropa 6 en el análisis estadístico. La razón de estas diferencias observadas para pH y color en la tropa 6 son desconocidas, pero podrían deberse a fallas en el manejo *ante mortem* de los animales, como por ejemplo un excesivo estrés provocado durante el transporte (viaje muy prolongado, animales excesivamente apretados en el camión, etc.) o por tener mucha espera en ayunas en el frigorífico (Gallo 2010).

Las pérdidas de agua por cocción con 1 día y 10 días de maduración no presentaron diferencias entre los sexos; ambos caracteres presentaron rangos y desvíos muy reducidos (Ver tablas 1-3).

Los siete caracteres fenotípicos estudiados presentan variaciones significativas entre las tropas, lo cual es esperable dado que el factor tropa representa varios "sub-factores", tales como fecha de faena (época del año, planta, operarios, etc.), establecimiento de origen, tiempo y tipo de transporte hasta el lugar de faena, cantidad y tipo de alimento recibido, etc.

Además, las variables sexo y edad se encuentran anidados dentro del factor tropa. Las tropas que más se distinguieron de las demás fueron la tropa 6, que ya se mostró su relevancia para el pH y el Color  $L$ , y la tropa 1 para el Color  $a$ .

### Parámetros Poblacionales

Como se indica en los resultados, se encontraron ocho SNPs totalmente fijados en la población. Los SNPs utilizados fueron todos tomados de las bases de datos GENBANK y ENSEMBL. Estos SNPs son reportados desde diferentes lugares del mundo, de muchas razas y poblaciones distintas; esto explica por qué algunos de los SNPs analizados se encuentran fijados, dado que el presente estudio sólo incluye una raza bovina. Además, al ser una raza comercial, sometida a una fuerte y continua selección artificial para la producción de carne, la diversidad alélica tiende a ser menor en comparación con poblaciones de bovinos menos seleccionados. Aún siendo animales de uso comercial, no se pueden descartar otros mecanismos naturales de la evolución, como selección natural y deriva genética, que van fijando y eliminando alelos en las diferentes poblaciones.

Otros siete alelos se encontraron muy cercanos a la fijación, con una frecuencia de uno de ellos menor a 0,05 (valores marcados en rojo en la tabla). Las causas de esto podrían ser las mismas que las mencionadas en el párrafo anterior. Otra posible explicación de encontrar SNPs cercanos a la fijación en genes que se relacionan con caracteres de la calidad de la carne es que estos genes muchas veces se encuentran bajo mecanismos de selección indirectos, de manera que ciertos alelos son seleccionados indirectamente al mejorar las características carniceras de un rodeo, aumentando su frecuencia alélica en la población, en detrimento de otros alelos.

Los promedios de la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada fueron 0,250 y 0,265 respectivamente. Usualmente, los índices de diversidad genética de los SNPs, como la heterocigosidad, suelen ser de medios a bajos, dado que la mayoría de los SNPs sólo presentan dos alelos. En rodeos comerciales, y especialmente si se trata de animales de una misma raza, la diversidad genética tiende a ser relativamente baja, con una mayor tendencia a la homocigosis (Kantanen et al. 2000). Esto explicaría los índices de heterocigosidad esperada y observada hallados en este estudio.

En general se encontró la mayoría de los SNPs en equilibrio Hardy Weinberg, como es usual en estos estudios (Van Eenennaam et al. 2007; Gill et al. 2010). Los que se encontraron fuera de equilibrio fueron *TNC 4*, *SCD 4*, *SCD 6*, *GHR 2*, *CAPN1 316*, *CAPN1 4751*, *CAST 2*, y *CAST 3*. En estos SNPs el desequilibrio es provocado mayormente por una deficiencia de heterocigotas, como por ejemplo *TNC4* y *CAPN1 316*, como indican los índices  $F_{IS}$  y en concordancia con lo hallado en los índices de heterocigosidad. El desequilibrio encontrado puede ser generado por los efectos indirectos de la selección actuando a favor de cierto tipo de homocigota en detrimento del otro, por posibles efectos de la endogamia (por la utilización de pocos toros reproductores e inseminación artificial), o de la deriva genética. En el caso del *SNP 316* es plausible pensar que la deficiencia encontrada se deba a efectos indirectos de la selección artificial, dado que este SNP es un marcador de uso comercial por su asociación con caracteres de calidad de la carne documentada; el efecto sería indirecto dado que en el Uruguay no se ha hecho selección en animales de carne usando marcadores. En algunos casos existe un exceso

de heterocigotas con respecto a lo esperado, como por ejemplo en el caso de *CAPN1 4751* y *CAST 3*, pero son excepciones. Gill y colaboradores (2009) hallaron en rodeos escoceses de la misma raza en el SNP *CAPN 4751* frecuencias alélicas similares a las del presente estudio (0,65 y 0,35), mientras Van Eenennaam y colaboradores (2007) en rodeos Red Angus de Estados Unidos encontraron frecuencias de 0,53 y 0,47. A diferencia de lo hallado en presente estudio, el SNP fue hallado en equilibrio en estas dos poblaciones. El exceso de heterocigotas detectado puede deberse a que los animales provienen de 10 establecimientos diferentes, lo que en cierto modo aumenta la diversidad genética de la muestra más que lo esperado por equilibrio Hardy Weinberg. Por otro lado, el aumento de heterocigotas también puede ser un reflejo de la selección indirecta en favor del alelo menos frecuente, lo que aumenta transitoriamente la cantidad de heterocigotas.

Para el SNP *CAPN 316* la frecuencia del alelo G hallada en el presente estudio fue similar a la hallada por Page y colaboradores (2004) (0,66 contra 0,59), mientras Gill y colaboradores (2009) hallaron una frecuencia más dispar (0,78) para este alelo, que a su vez encontraron favorable para la terneza. El SNP *CAST 1* del presente estudio también fue analizado por Gill y colaboradores (2009); en este caso las frecuencias alélicas también fueron dispares (0,72 para el alelo C en el presente trabajo contra 0,64). Esto muestra que es común encontrar diferencias en las frecuencias alélicas entre diferentes poblaciones de una misma raza, por lo que los estudios tendientes a demostrar la utilidad de un marcador para su uso en producción animal deben ser validados en cada país.

## **Asociaciones detectadas**

### **Gen *SCD***

La enzima esteroil-CoA-desaturasa (*SCD*) convierte ácidos grasos saturados en monoinsaturados (MUFA) mediante la introducción de un doble enlace en la posición 9. Cataliza la síntesis de ácido oleico afectando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana y los ésteres y triglicéridos de colesterol (Armstrong 2011).

Varios autores han determinado la relevancia del gen *SCD* en la síntesis de ácidos grasos, el metabolismo lipídico y la acumulación de grasa (Taniguchi et al. 2004; Graugnard et al. 2009; Orrù et al. 2011; Bionaz et al. 2013). Jiang y colaboradores (2009) encontraron tres SNPs en este gen relacionados con la composición de ácidos grasos. Sin embargo, Reardon y colaboradores (2010) y Li y colaboradores (2013) han encontrado SNPs en este gen relacionados con el color de la carne. Los primeros a su vez encontraron asociación con grasa intramuscular en el mismo SNP, por lo que surgieron que la relación con el color podría estar dada justamente por el aumento de cantidad de grasa intramuscular (generando un color más claro o luminoso) o por el aumento de MUFA que cambia la susceptibilidad de oxidación de la carne (y de esta manera también su color). El color de la carne depende de la concentración de pigmentos (mioglobina), su estado químico y las propiedades de dispersión de la luz de la misma. Los pigmentos absorben la luz a diferentes longitudes de onda dependiendo de su estado de oxidación que a su vez depende del pH de la carne (Alberti & Ripoll 2010). Esto explica por qué un aumento de MUFA podría cambiar el color de la carne y por qué es posible encontrar relación con el color dado por polimorfismos en este gen.

En el presente trabajo se encontró una relación significativa entre el parámetro *b* del color y el SNP *SCD 5*. Si bien este SNP tuvo un bajo rendimiento de genotipado y sólo 87 animales fueron analizados, es posible que la relación entre el color y este SNP del gen *SCD* se deba al porcentaje de MUFA o a la cantidad y composición de lípidos como sugieren Reardon y colaboradores (2010). A su vez este SNP se encuentra en la región 5' cercano a un potenciador con rol crítico para la transcripción identificado por Keating y colaboradores (2006). Este SNP se encuentra en el microarray Illumina BovineHD Beadchip, panel comercial que contiene 777.000 SNPs por lo que el estudio de este SNP en las poblaciones locales es interesante.

### **Gen *CAPN1***

*CAPN1* es un gen que habitualmente se relaciona con la terneza de la carne, dado que este gen codifica para la u-calpaína, proteasa activada por el calcio intracelular que junto a otras enzimas es responsable del proceso proteolítico que ocurre durante la maduración de la carne, aumentando su terneza (Costello et al. 2007). Muchos autores ya han encontrado SNPs en este gen asociados con la terneza, específicamente los SNPs *CAPN1 316*, *530* y *4751* (Page et al. 2004; Esmailzadeh Koshkoi et al. 2005; White et al. 2005; Van Eenennaam et al. 2007; Gill et al. 2009).

Sin embargo más recientemente se han encontrado SNPs en este gen asociados con el color de la carne (Pinto et al. 2011; Li X et al. 2013) y CRA (Leal 2013), que fue el motivo por el cual se incluyó este gen en el presente estudio. Pinto y colaboradores (2011) encontraron que el SNP de uso comercial *CAPN 4751* se asocia con el Color *a* y Color *b*, de manera que el genotipo TT aumenta las intensidades rojas y amarillas respectivamente. En el presente estudio se analizó este mismo SNP para los mismos caracteres y no se encontraron dichas asociaciones. Sin embargo, se encontró relación entre el Color *b* y un SNP situado en la región 3' del mismo gen (SNP *CAPN1 3*). La relación entre color y el gen *CAPN1* no está clara, pero como se discute más adelante, las calpaínas son muy importantes en la regulación de la proteólisis *post-mortem* en los músculos. Durante la maduración de la carne ocurren varios procesos que son dependientes entre sí; cambios en el pH, por ejemplo, pueden cambiar las interacciones entre enzima y sustrato, y/o el color de la carne (Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

A su vez el SNP *CAPN1 3*, fue encontrado asociado con las pérdidas por cocción a los 10 días de maduración. Individuos con genotipo GG para el SNP *CAPN1 3*, tendrían una menor capacidad de retención del agua, por tener mayores pérdidas por cocción que los del genotipo opuesto. Leal (2013) encontró asociación en este mismo gen y CRA en el SNP *CAPN1 530*. El SNP *CAPN1 4751* también se encuentra cercano a la significación para las pérdidas por cocción a los 10 días de maduración, aunque este efecto es menor.

Es interesante que en este estudio se hayan encontrado dos SNPs dentro del mismo gen relacionados con el mismo carácter, lo que apoya dicha asociación. Esta relación no es sorprendente, dado que las calpaínas tienen un rol importante en la regulación de la proteólisis del músculo durante condiciones *post-mortem* (Huff-Lonergan & Lonergan 2005), y que la retención del agua dentro del músculo depende justamente de las proteínas presentes en el mismo (Feed 2010; Leal 2013). En estado *post-mortem* los filamentos presentes en el músculo sufren proteólisis catalizada por las calpaínas. Esta proteólisis permite la formación de una fase más estable con el agua (formación agua-proteína), de manera que disminuye la

pérdida de agua, conocido como efecto esponja. Una mayor actividad de las calpaínas produce entonces una menor pérdida de agua (Leal 2013). Basado en esto, un polimorfismo en este gen podría cambiar la actividad de la proteína, por ejemplo, si este produce una alteración del sitio activo de la enzima, afectando de esta manera la proteólisis de los filamentos y por ende la capacidad de retención del agua de la carne. x

Estos hallazgos muestran que este gen es importante, no solo para la terneza sino también para varios caracteres asociados a la calidad de la carne.

### **Gen CAST**

El gen CAST que codifica para la enzima calpastatina es un gen que se asocia con terneza, ya que la calpastatina inhibe la actividad de u-calpaína y m-calpaína, regulando el proceso proteolítico *post-mortem* ya mencionado. El aumento de su actividad está asociado a una disminución de terneza (Schenkel et al. 2006); sin embargo, también como el caso de *CAPN1* se ha encontrado asociado con otros caracteres de la carne. Li y colaboradores (2012) han encontrado SNPs de este gen relacionados con el color de la carne y las pérdidas por cocción. A su vez Reardon y colaboradores (2010) también encontraron SNPs relacionados con el color.

En este trabajo se encontró asociación significativa entre el SNP *CAST 3* y el carácter pérdidas por cocción. Esta relación entre CRA y CAST se puede explicar del mismo modo que con *CAPN1* por formar parte del mismo sistema proteolítico. Las calpastatinas inhiben a las calpaínas que actúan *post-mortem* lisando proteínas musculares. Este polimorfismo en particular (*CAST 3*) genera un cambio de aminoácido de valina a alanina. De esta manera una posible explicación para la asociación podría ser que este cambio de aminoácido disminuye la actividad de la calpastatina, aumentando la capacidad de retención de agua por el aumento de la actividad de la calpaína.

### **Gen PPARA**

El gen *PPARA* codifica para un receptor nuclear activado por factores proliferadores de peroxisomas. Una de sus funciones más importantes es la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa, controlando la síntesis, almacenamiento y consumo de lípidos. Se expresa en muchos tejidos diferentes, mayoritariamente en hígado y riñón, pero también en tejido muscular y tejido adiposo intramuscular (Bionaz et al. 2013). Se han encontrado SNPs en este gen asociados a pH y jugosidad (Gill et al. 2010).

En este estudio no se encontró ninguna asociación significativa entre SNPs en este gen y los caracteres fenotípicos analizados, pero el SNP *PPARA 4* se encontró cercano a la significación para el parámetro *b* del color de la carne. Esta asociación se podría esperar dada la relación entre el color y el pH, y/o por la relación entre el color y el perfil de lípidos en el tejido muscular, como se mencionó para el gen *SCD*. Gill y colaboradores (2010) surgieron que la relación encontrada con jugosidad se explica por su relación con la capacidad de retención de agua y grasa intramuscular, por lo que este gen se relaciona con varios caracteres importantes para la calidad de la carne. Podría relacionarse con los tres caracteres fenotípicos analizados en el presente trabajo.

### Gen *PRKAG3*

*PRKAG3* codifica para la subunidad AMPK gamma-3 de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Este gen juega un rol importante en la regulación de la actividad de AMPK en el tejido muscular y en el metabolismo de la glucosa. El contenido de glucógeno en el músculo está relacionado con la calidad de la carne dado que afecta el proceso de maduración y el pH (Roux et al. 2006).

No se encontró ninguna asociación significativa entre los SNPs analizados en este gen y los caracteres fenotípicos analizados, aunque el SNP *PRKAG3* 1 se encontró cercano a la significación para el Color *b* y las pérdidas por cocción a los 10 días de maduración. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que han encontrado asociaciones entre SNPs en este gen y dichos caracteres (Gill et al. 2009; Reardon et al. 2010). También se han encontrado asociaciones entre este gen y pH, color y pérdidas por cocción en cerdos (Ciobanu et al. 2001; Chen et al. 2008), lo que refuerza estos hallazgos.

El AMPK influye fuertemente sobre el nivel de glucógeno en el músculo *post mortem* (Roux et al. 2006). La disminución de glucógeno se encuentra directamente relacionada con carnes de color oscuro y con el pH (Franco 2010). Esto es una posible explicación de la relación entre el color y el SNP de *PRKAG3* encontrada, dado que lo que podría pasar es que este polimorfismo genere un cambio en la actividad de la AMPK de manera que disminuya el nivel de glucógeno.

Las pérdidas por cocción se relacionan asimismo con el pH, por lo que la asociación encontrada podría explicarse mediante esta relación. Sin embargo, no se encontró asociación entre este SNP y el pH. Se requieren más estudios para apoyar esta hipótesis.

Estos resultados y los estudios anteriores mencionados evidencian la importancia de este gen en la calidad de carne, lo que significa que SNPs en este gen podrían ser importantes como marcadores en producción de carne.

### Gen *IGF2*

El SNP *IGF2* 1 situado en el gen del factor de crecimiento insulínico tipo 2 presenta un efecto significativo sobre el pH al excluir la tropa 6. Han y colaboradores (2008) encontraron asociaciones entre este gen y pH como en el presente estudio, así como con marmolado y terneza. Otros caracteres que se encuentran relacionados con este gen son masa corporal, porcentaje de grasa y caracteres asociados con la tasa de crecimiento (Sherman et al. 2008; Huang et al. 2013).

Este SNP fue el único marcador asociado directamente con el pH. Su relación con el factor de crecimiento insulínico no es tan evidente como en otros genes, pero el hecho de que otros autores encontraron la misma relación apoya este hallazgo. El pH es un carácter muy importante para la calidad de la carne, como ya fue mencionado, sobre todo porque constituye un parámetro de rechazo de la carne (pH>5,8), afectando la comercialización del producto. Por otro lado este carácter también es importante porque afecta la actividad de las proteasas (Huff-Lonergan & Lonergan 2005) y de esta manera puede afectar otros caracteres de la calidad de la carne como CRA y terneza (Leal 2013). Encontrar SNPs relacionados con este carácter para luego utilizarlos en la selección podría ser un elemento para disminuir pérdidas económicas. Se estima una pérdida anual a nivel país de USD 26 millones debido a cortes

oscuros (pH alto) (Franco 2010). Esto muestra la importancia de saber más sobre los factores que influyen sobre este carácter. De todas formas es relevante también enfatizar la importancia de los procesos pre-faena para mejorar el pH.

No se encontraron asociaciones entre SNPs de los genes *TNC* y *GHR* y los caracteres fenotípicos estudiados. En estos genes sólo fueron realizados análisis de asociación con uno y dos SNPs respectivamente, dado que los demás SNPs se encontraron fijados o con frecuencias alélicas de uno de los dos alelos menor a 0,05. En caso del gen *TNC* se podría haber esperado encontrar una relación con pH o color por las asociaciones detectadas en cerdos por Kayan y colaboradores (2011). En el caso del gen *GHR* se han hallado SNPs en este gen relacionado con color y con CRA como ya se ha mencionado, por lo que se podría haber esperado encontrar relación con estos caracteres. A su vez ambos polimorfismos se encuentran en exones y los dos causan un cambio no sinónimo en la proteína, lo que aumenta la posibilidad de encontrar un cambio a nivel fenotípico.

Las causas por las cuales no se detectaron asociaciones entre SNPs en estos dos genes y los caracteres fenotípicos analizados pueden ser varias, y son las mismas posibles causas que explican por qué no se encontraron asociaciones entre algunos de los SNPs en los otros genes estudiados. Puede pasar que los SNPs seleccionados no generan ningún cambio en la estructura y/o función de la proteína, o que el cambio que generan no tenga efecto sobre los caracteres analizados, o de la misma manera puede ser que el cambio que generan es tan pequeño que no se detecte. A su vez existen miles de SNPs que no fueron analizados en este estudio que tienen efecto sobre los caracteres fenotípicos -altamente poligénicos- analizados, en estos u otros genes. Asimismo, puede detectarse una asociación entre un SNP y un carácter que pueda deberse a que este SNP se encuentre ligado a otro SNP, que es a su vez la causa real del efecto encontrado (mutación causal; Ron & Weller 2007). Esto refleja la gran complejidad que presentan los caracteres relacionados con la calidad de la carne.

## **Conclusiones**

En el presente estudio se encontraron varias asociaciones entre determinados polimorfismos en los genes seleccionados y los caracteres fenotípicos analizados, que ameritan otros estudios futuros. En todos los casos analizados los efectos detectados de los SNPs sobre las características fenotípicas fueron muy pequeños, no llegando en ningún caso a una desviación típica de magnitud. Ninguno de los efectos de los SNPs alcanza a explicar el 1% del carácter en cuestión. Sin embargo, estos resultados son esperados en estudios de asociación con SNPs; por un lado porque coinciden con los resultados encontrados por otros autores, y por otro lado porque es muy difícil encontrar un solo SNP que explique una parte importante de la variación de un carácter productivo (Dekkers 2004; Armstrong 2011). Eso se debe a que los caracteres de la calidad de la carne son altamente complejos e involucran muchos genes, cada uno contribuyendo con una pequeña fracción de la variación fenotípica observada (Yang et al. 2011). Asimismo, existe una gran influencia del ambiente, la cual ya fue demostrada en este trabajo con el ejemplo del pH de la carne. El método estadístico utilizado para el análisis de asociación, la regresión múltiple, toma en cuenta muchos de los efectos ambientales al incluirlos en la regresión, disminuyendo las tasas de falsos positivos, pero también

disminuyendo la probabilidad de detectar asociaciones. Esto puede ser una posible explicación por la cual no se encontraron asociaciones significativas en algunos casos esperados.

Una manera de aumentar la variación fenotípica explicada por los SNPs es mediante otros tipos de análisis estadísticos que analizan muchos SNPs en conjunto y no de forma individual para explicar cada carácter, como ya se ha realizado en otros estudios. En estos casos no es posible detectar el efecto individual de cada SNP. Yang y colaboradores (2011) han logrado explicar el 45% de la variación de la altura en humanos (otro carácter complejo) considerando casi 300.000 SNPs simultáneamente. Sin embargo hay una gran parte de la variación genética que no se logra explicar por los SNPs; esta parte es conocida como la heredabilidad perdida (*"missing heritability"*). Existen diferentes hipótesis para explicar este fenómeno, como por ejemplo interacciones entre genes o interacciones gen-ambiente (Yang et al. 2011). Estas interacciones son difíciles de medir y esto dificulta encontrar asociaciones entre SNPs y caracteres fenotípicos complejos, con lo que se puede explicar también por qué no se encuentran efectos más importantes entre un solo SNP y un carácter. Para futuros estudios con la misma base de datos de fenotipos podría ser interesante genotipar muchos más SNPs utilizando el mismo banco de ADN, para lograr hacer un estudio similar al de Yang y colaboradores (2011) y ver si es posible explicar una parte mayor de la variación fenotípica observada para estos mismos caracteres. Una posibilidad menos costosa podrían ser los estudios de haplotipos, donde se incluyan como un solo bloque varios SNPs situados en el mismo gen.

Los resultados del presente estudio podrían ser utilizados para verificar los polimorfismos en otras poblaciones locales. Luego los polimorfismos pueden ser utilizados para diseñar paneles comerciales que incluyan SNPs seleccionados, dando una idea general del potencial genético de los toros. De esta forma se espera complementar los métodos de selección de reproductores, con el objetivo de mejorar la calidad de las carnes uruguayas y contribuir así al progreso de nuestro país.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Eileen Armstrong, por su dedicación, disponibilidad, ideas y consejos, y por su paciencia para compartir su conocimiento conmigo.

A mis compañeros de estudio por acompañarme y alentarme a lo largo de este camino, en especial a Lucia, Moira, Majito, Valentina y Sofía.

A mis nuevos compañeros de limnología por compartir el día a día y por sus buenos consejos para hacerme el camino más sencillo.

A mi familia, por el apoyo, la contención y el aliento constante durante todos estos años. Siempre recuerdo una frase de mi hermano en un momento difícil: "Un paso hacia atrás en un camino equivocado también es avanzar".

Y en especial a Ale, por todo su amor, por toda su comprensión y por enseñarme a pelear por lo que uno quiere.

Mi más sincero agradecimiento a todos ellos y a todos aquellos que han llegado a leer esta parte de mi trabajo. :)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Australian Genome Research Facility Ltd. (AGRF). 2013. Bovine Genotyping, [online]. Australian Genome Research Facility Ltd [Consultado 14/10 2013]. Disponible en: ><http://www.agrf.org.au/index.php?id=147> <
- Aaslyng, M. 2009. Trends in meat consumption and the need for fresh meat and meat products of improved quality, p. 3–18. *En* J. Kerry & D. Ledward [eds.], Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat. Woodhead Publishing Ltd.
- Alberti, P. & G. Ripoll. 2010. Los pigmentos de la carne y factores que afectan su color, p. 115–118. *En* G. Bianchi & O. Feed [eds.], Introducción a la ciencia de la carne. Editorial Hemisferio Sur.
- Allais, S., H. Levéziel, N. Payet-Duprat, J. F. Hocquette, J. Lepetit, S. Rousset, C. Denoyelle, C. Bernard-Capel, L. Journaux, A Bonnot, G. Renand. 2010. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J. Anim. Sci.* **88**: 446–54.
- Almeida, P. 2009. Uruguay país productor de carnes de calidad programas de certificación y trazabilidad, atributos esenciales para los mercados de alto valor. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* **22**: 346–351.
- Armstrong, E. 2011. Detección y análisis de genes asociados a la calidad de carne en bovinos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Pp. 183.
- Bionaz, M., S. Chen, M. J. Khan, J. J. Loor. 2013. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Res.* **2013**: 1–28.
- Chen, J. F., L. H. Dai, J. Peng, J. L. Li, R. Zheng, B. Zuo, F. E. Li, M. Liu, K. Yue. 2008. New Evidence of Alleles ( V199I and G52S ) at the PRKAG3 ( RN ) Locus Affecting Pork Meat Quality. *Asian-Australian Assoc. Anim. Prod. Soc.* **21**: 471–477.
- Choat, W. T., J. A. Paterson, B. M. Rainey, M. C. King, G. C. Smith, K. E. Belk, R. J. Lipsey. 2006. The effects of cattle sex on carcass characteristics and longissimus muscle palatability. *J. Anim. Sci.* **84**: 1820–6.
- Ciobanu, D., J. Bastiaansen, M. Malek, J. Helm, J. Woollard, G. Plastow, M. Rothschild. 2001. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics.* **159**: 1151–62.
- Costello, S., E. O'Doherty, D. Troy, C. Ernst, K. Kim, P. Stapleton, T. Sweeney, A. Mullen. 2007. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine M. longissimus dorsi. *Meat Sci.* **75**: 551–557.
- Dekkers, J. C. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock : Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* **82**: 313–328.

- Esmailzadeh Koshkoih, A., W. Pitchford, Z. . Kruk, C. Morris, N. Cullen, A. Crawford, C. D. Bottema. 2005. QTL for meat colour and pH IN Bos Taurus cattle. *Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* **16**: 111–114.
- Feed, O. 2010. Metodología para la evaluación de las características cualitativas de la canal y de la carne, p. 181–215. *En* G. Bianchi & O. Feed [eds.], *Introducción a la ciencia de la carne*. Editorial Hemisferio Sur.
- Franco, J. 2010. Importancia de los factores productivos tecnologicos y de manejo en la calidad de la canal y de la carne vacuna, p. 303–353. *En* G. Bianchi & O. Feed [eds.], *Introducción a la ciencia de la carne*. Editorial Hemisferio Sur.
- Gallo, C. 2010. Bienestar animal y buenas practicas de manejo animal relacionadas con la calidad de la carne, p. 455–494. *En* G. Bianchi & O. Feed [eds.], *Introduccion a la ciencia de la carne*. Editorial Hemisferio Sur.
- Gill, J. L., S. C. Bishop, C. McCorquodale, J. L. Williams, P. Wiener. 2009. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genet. Sel. Evol.* **41**: 36.
- Gill, J. L., S. C. Bishop, C. McCorquodale, J. L. Williams, P. Wiener. 2010. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Sci.* **86**: 985–93.
- Gill, J. L., S. C. Bishop, C. McCorquodale, J. L. Williams, P. Wiener. 2012. Identification of polymorphisms in the malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic and nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 genes and their associations with meat and carcass quality traits in commercial Angus cattle. *Anim. Genet.* **43**: 88–92.
- Graugnard, D. E., P. Piantoni, M. Bionaz, L. L. Berger, D. B. Faulkner, J. J. Looor. 2009. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics* **10**: 142.
- Hocquette, J.-F., S. Lehnert, W. Barendse, I. Cassar-Malek, B. Picard. 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* **1**: 159–73.
- Huff-Loneragan, E. & S. M. Lonergan. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* **71**: 194–204.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). 2013. Programa Nacional de Investigación Producción de Carne y Lana, [online]. Fabio Montossi [Consultado 14/10 2013]. Disponible en:  
>URL:<http://www.inia.org.uy/online/site/315838I1.php> <
- Instituto Nacional de Carnes (INAC). 2013. Anuario estadístico 2012, [online]. Instituto Nacional de Carnes. [Consultado 24/9 2013]. Disponible en:  
>URL:[http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/8655/1/innova.net/anuario\\_estadistico\\_2012](http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/8655/1/innova.net/anuario_estadistico_2012)<

- Jiang, Z., J. J. Michal, J. Chen, T. F. Daniels, T. Kunej, M. D. Garcia, C. T. Gaskins, J. R. Busboom, L. J. Alexander, R. W. Wright, M. D. Macneil. 2009. Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. *Int. J. Biol. Sci.* **5**: 528–42.
- Kantanen, J., I. Olsaker, L. E. Holm, S. Lien, J. Vilkki, K. Brusgaard, E. Eythorsdottir, B. Danell, S. Adalsteinsson. 2000. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *J. Hered.* **91**: 446–57.
- Kayan, A., M. U. Cinar, M. J. Uddin, C. Phatsara, K. Wimmers, S. Ponsuksili, D. Tesfaye, C. Looft, H. Juengst, E. Tholen, K. Schellander. 2011. Polymorphism and expression of the porcine Tenascin C gene associated with meat and carcass quality. *Meat Sci.* **89**: 76–83.
- Leal. 2013. Marcadores moleculares asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en carne de *Bos indicus* y sus cruces. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Pp. 140.
- Li, X., M. Ekerljung, K. Lundstrom, A. Lunden. 2013. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Sci.* **94**: 153-58.
- Li, Y. X., H. G. Jin, C. G. Yan, K. S. Seo, L. C. Zhang, C. Y. Ren, X. Jin. 2012. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in Yanbian cattle of China. *Mol. Biol. Rep.* **40**: 1875-81.
- Macneil, M. D. & M. D. Grosz. 2002. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford × composite double backcross populations. *J. Anim. Sci.* **80**: 2316–2324.
- Mancini, R. A & M. C. Hunt. 2005. Current research in meat color. *Meat Sci.* **71**: 100–21.
- Orrù, L., G. Cifuni, E. Piasentier, M. Corazzin, S. Bovolenta, B. Moioli. 2011. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Sci.* **87**: 344–348.
- Page, B. T., E. Casas, R. L. Quaas, R. M. Thallman, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, S. N. White, G. L. Bennett, J. W. Keele, M. E. Dikeman, T. P. L. Smith. 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**: 3474–81.
- Park, G. B., S. S. Moon, Y. D. Ko, J. K. Ha, J. G. Lee, H. H. Chang, S. T. Joo. 2002. Influence of slaughter weight and sex on yield and quality grades of Hanwoo ( Korean native cattle ) carcasses. *J. Anim. Sci.* **80**: 129–136.
- Pinto, L. F. B., J. B. S. Ferraz, V. B. Pedrosa, J. P. Eler, F. V Meirelles, M. N. Bonin, F. M. Rezende, M. E. Carvalho, D. C. Cucco, R. C. G. Silva. 2011. Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genet. Mol. Res.* **10**: 2057–64.
- Reardon, W., a M. Mullen, T. Sweeney, R. M. Hamill. 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine M. longissimus and M. semimembranosus. *Meat Sci.* **86**: 270–5.

- Roux, M., A. Nizou, L. Forestier, A. Ouali, H. Levéziel, V. Amarger. 2006. Characterization of the bovine PRKAG3 gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts. *Mamm. Genome* **17**: 83–92.
- Schenkel, F. S., S. P. Miller, Z. Jiang, I. B. Mandell, X. Ye, H. Li, J. W. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* **84**: 291–9.
- Sherman, E. L., J. D. Nkrumah, B. M. Murdoch, C. Li, Z. Wang, A. Fu, S. S. Moore. 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit. *J. Anim. Sci.* **86**: 1–16.
- Taniguchi, M., T. Utsugi, K. Oyama, H. Mannen, Kobayashi, Y. Tanabe, A. Ogino, S. Tsuji. 2004. Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm. Genome* **15**: 142–148.
- Van Eenennaam, A. L., J. Li, R. M. Thallman, R. L. Quaas, M. E. Dikeman, C. a Gill, D. E. Franke, M. G. Thomas. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* **85**: 891–900.
- White, S. N., E. Casas, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase, D. D. Johnson, J. W. Keele, T. P. L. Smith. 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J. Anim. Sci.* **83**: 2001–2008.
- Yang, J., B. Benyamin, B. P. Mcevoy, S. Gordon, A. K. Henders, R. Dale, P. A. Madden, A. C. Heath, N. G. Martin, G. W. Montgomery, M. E. Goddard, P. M. Visscher. 2011. Common SNPs explain a large proportion of heritability for human height. *Nat. Genet.* **42**: 565–569.
- Zoetis (Zoetis Genestar). 2013. Genestar Molecular Value Predictions, [online]. Zoetis [Consultado 18/08 2013]. Disponible en: >URL <https://online.zoetis.com/US/EN/Products/Pages/GENESTARMVP.aspx><

## **ANEXO**

### **Protocolo de extracción de ADN**

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA ph 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl ( 5 M), TE 1X ph.8 (autoclavado) y etanol absoluto a -20 °C.

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 y machacar el tejido con tip quemado en la punta.
2. Agregar 500 ul de buffer de lisis y 11 ul de proteinasa K.
3. Incubar a 55°C toda la noche.
4. Centrifugar al máximo por 20 min.
5. Pipetear sobrenadante a un tubo limpio de 1,5 ml y agregar 300 ul de cloruro de sodio.
6. Agitar brevemente y centrifugar al máximo por 40 min.
7. Pipetear 400 ul del sobrenadante a un tubo limpio. (2 por muestra)
8. Agregar el doble volumen de etanol frio (800 ul).
9. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.
10. Centrifugar al máximo por 40 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
11. Lavar breve y cuidadosamente con 1 ml de etanol 70% y centrifugar 40 min.
12. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
13. Resuspender en 50 ul 1xTE y guardar en frio.

