

**SEGREGACIÓN DE POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN LOS
GENES DE μ -CALPAINA Y CALPASTATINA Y SU RELACIÓN
CON EL CRECIMIENTO CORPORAL Y CARACTERÍSTICAS DE
LA CANAL DE BOVINOS PARA CARNE EN PUERTO RICO**

Por

Jonael H. Bosques Méndez

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Industria Pecuaria

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

Danilo Cianzio, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Aixa Rivera, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Melvin Pagán, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Brian Irish, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

José R. Latorre, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Jorge H. Bosques Vargas y Frances Méndez Colón, ya que su apoyo y consejos me permitieron continuar adelante en los momentos en que más los necesitaba. También deseo dedicarle este trabajo a mi esposa Niomara Y. Nieves Jiménez, esta ha permanecido a mi lado brindándome su amor y comprensión en todo momento.

Dios los Bendiga.

AGRADECIMIENTOS

- ∞ A Dios, por las incontables bendiciones recibidas.

- ∞ A mi familia por sus oraciones y apoyo incondicional.

- ∞ Al Dr. Melvin Pagán Morales por su apoyo, por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y colaborar en la realización de este trabajo.

- ∞ A Bruce Quijano, Delvin Marrero, Warys Zayas, Prof. Américo Casas y Dr. Eduardo Casas por su colaboración en la realización de este proyecto.

- ∞ Al Dr. Paul Randel por su ayuda en la edición de este trabajo.

- ∞ A los Drs. Danilo Cianzio, Edna Negrón y a la Prof. Aixa Rivera por formar parte de mi Comité Graduado.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE AMPÉNDICES.....	XIII

RESUMEN.....	1
---------------------	----------

ABSTRACT.....	3
----------------------	----------

CAPÍTULO UNO

REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
------------------------------------	----------

1.1 INTRODUCCIÓN.....	5
-----------------------	---

1.2 ROL DEL SISTEMA DE CALPAINAS EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL GANADO BOVINO.....	7
---	---

1.2.1. Estructura de calpainas	8
--------------------------------------	---

1.2.2. Estructura de calpastatina.....	9
--	---

1.2.3. Regulación de calpainas	10
--------------------------------------	----

1.2.4 Calpastatina regula la acción de calpainas	12
--	----

1.2.5. Calpainas y su rol en la migración celular.....	13
--	----

1.2.6. Substratos de Calpainas	15
--------------------------------------	----

1.2.7	Calpainas y su Rol en el Desarrollo del Músculo	15
1.2.8	Calpastatina y su rol en el desarrollo del músculo	17
1.3.	IMPACTO EN LA SELECCIÓN GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES	19
1.3.1	Polimorfismos en los genes de μ -calpaina y calpastatina y su utilidad a nivel comercial ..	20
1.4	REFERENCIAS	23
	OBJETIVOS	36

CAPÍTULO DOS

	SEGREGACIÓN DE POLIMORFISMOS EN μ-CALPAINA Y CALPASTATINA EN GANADO PARA CARNE EN PUERTO RICO	37
--	---	----

2.1	RESUMEN	37
2.2	ABSTRACT	39
2.3	INTRODUCCIÓN.....	41
2.4	MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.4.1.	Colección de sangre.....	42
2.4.2.	Condiciones de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	42

2.4.3. Genotipificación de SNP en <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> por medio de espectrometría en masa (MALDI).....	43
2.4.4. Análisis Estadístico	43
2.5 RESULTADOS	44
2.5.1 Segregación global de polimorfismos en <i>CAPN1</i>	44
2.5.2. Segregación por Raza de Polimorfismos de <i>CAPN1</i>	44
2.5.3 Segregación de SNP en <i>CAST</i>	45
2.5.4 Segregación de SNP por raza en <i>CAST</i>	46
2.6 DISCUSIÓN.....	46
2.7 CONCLUSIONES	49
2.8 REFERENCIAS.....	50

CAPÍTULO TRES

EFFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN μ-CALPAINA Y CALPASTATINA EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN GANADO PARA CARNE EN EL PUERTO RICO.....	73
3.1 RESUMEN.....	73
3.2 ABSTRACT.....	74
3.3 INTRODUCCIÓN.....	75
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	76

3.4.1	Manejo y alimentación de los animales de la etapa de recría y ceba en Corozal, P.R.....	77
3.4.2	Tratamientos de suplementación nutricional del que se obtuvieron los toretes.....	77
3.4.3	Colección de sangre para el análisis de polimorfismos de nucleótidos simples.....	78
3.4.4	Condiciones de reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	79
3.4.5	Genotipificación de SNP en <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i> por medio de espectrometría en masa (MALDI).....	79
3.4.6	Análisis Estadístico.....	80
3.5.	RESULTADOS.....	81
3.5.1.	Asociación entre <i>CAPN1</i> -316 y características crecimiento y de carcasa	81
3.5.2.	Asociación entre <i>CAPN1</i> -4751 con características de crecimiento y carcasa.....	82
3.5.3.	Asociación entre <i>CAST</i> con características de crecimiento y de carcasa.....	82
3.5.4.	Asociación entre <i>CAPN1</i> con la terneza de la carne	83
3.6.	DISCUSIÓN.....	83
3.7.	CONCLUSIONES.....	87
3.8.	REFERENCIAS.....	89

CAPÍTULO CUATRO

4.1 CONCLUSIONES GENERALES	103
4.2 REFERENCIAS.....	106
APÉNDICES.....	108

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO UNO

Tabla 1.1. Substratos de CAPN envueltos en motilidad celular.....	33
--	----

CAPÍTULO DOS

Tabla 2.1 Distribución por raza de animales y lugar de procedencia	54
---	----

Tabla 2.2. Secuencia de iniciadores utilizados para la identificación de SNP en <i>CAPN1</i> y <i>CAST</i>	56
---	----

CAPÍTULO TRES

Tabla 3.1. Características de crecimiento evaluadas en Toretos de Finca Montaña en	92
---	----

Tabla 3.2. Características de canal y de calidad de la carne evaluadas en toretes de la fase de recría y ceba en la Estación Experimental Agrícola de Corozal.....	93
---	----

Tabla 3.3. Características de crecimiento previo al destete (Finca Montaña) de toretes en relación a los genotipos de <i>CAPN1-316</i>	94
---	----

Tabla 3.4. Características de la canal relacionadas a los genotipos de <i>CAPN1-316</i> de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	95
--	----

Tabla 3.5. Características de crecimiento previo al destete (Finca Montaña) de toretes en relación a los genotipos de <i>CAPN1-4751</i>	96
--	----

Tabla 3.6. Características de la canal relacionadas a los genotipos de <i>CAPN1-4751</i> de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	97
---	----

Tabla 3.7. Características de crecimiento previo al destete (Finca Montaña) de toretes en relación a los genotipos de <i>CAST</i>	98
--	----

Tabla 3.8. . Características de la canal relacionadas a los genotipos de <i>CAST</i> de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	99
Tabla 3.9. Asociación entre genotipos de <i>CAPN1</i> -316 con datos de ternera por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	100
Tabla 3.10. Asociación entre genotipos de <i>CAPN1</i> -4751 con datos de ternera por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	101
Tabla 3.11. Asociación entre genotipos de <i>CAST</i> con datos de ternera por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal).....	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO UNO

- Figura 1.1.** Diagrama esquemático de la proteína CAST bovina.....34
- Figura 1.2.** Localización (*) de los marcadores moleculares (SNP) identificados en el gen *CAPN1*.....35

CAPÍTULO DOS

- Figura 2.1.** Razas de animales muestreados para la fase I.....52
- Figura 2.2.** Localización de las fincas utilizadas en el estudio (n=9).....53
- Figura 2.3.** Colección de sangre vía vena coccigeal para extracción de ácido desoxirribonucleico y almacenamiento de leucocitos.....55
- Figura 2.4.** Regiones variables (genotipos de los SNP) de los genes *CAPN1* y *CAST*57
- Figura 2.5.** Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=219).....58
- Figura 2.6.** Frecuencia alélica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=219).....59
- Figura 2.7.** Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-4751 (n=256).....60
- Figura 2.8.** Frecuencia alélica para el SNP *CAPN1*-4751 (n=256).....61
- Figura 2.9.** Frecuencia Genotípica de *CAPN1*-316 para razas *Bos taurus*.62
- Figura 2.10.** Frecuencia Genotípica de *CAPN1*-316 para razas *Bos indicus*.....63
- Figura 2.11.** Frecuencia Genotípica de *CAPN1*-316 para toros cruzados y Charbray.64
- Figura 2.12.** Frecuencia Genotípica de *CAPN1*-4751 para razas *Bos taurus*.....65

Figura 2.13. Frecuencia Genotípica de <i>CAPN1</i> -4751 para razas <i>Bos indicus</i>	66
Figura 2.14. Frecuencia Genotípica de <i>CAPN1</i> -4751 para toros cruzados y Charbray.....	67
Figura 2.15 Frecuencia Genotípica global para <i>CAST</i> (n=261).....	68
Figura 2.16. Frecuencia Alélica Global para el polimorfismo <i>CAST</i> (n = 261).....	69
Figura 2.17. Frecuencia genotípica en las razas <i>Bos taurus</i> para el SNP <i>CAST</i>	70
Figura 2.18. Frecuencia Genotípica en las razas <i>Bos indicus</i> del los polimorfismos para <i>CAST</i>	71
Figura 2.19. Frecuencia Genotípica en animales Charbray y cruces del los polimorfismos para <i>CAST</i>	72

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Frecuencias genotípicas y alélicas globales de los SNP <i>CAPN1-316, CAPN1-4751 y CAST</i>	108
Apéndice 2. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP <i>CAPN1-316</i>	109
Apéndice 3. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP <i>CAPN1-4751</i>	110
Apéndice 4. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP <i>CAST</i>	111

RESUMEN

La ternera de la carne es grandemente influenciada por la genética del animal. Durante la conversión del músculo a carne que ocurre en el período de almacenamiento, la degradación proteolítica es regulada principalmente por el sistema de calpains (CAPN) / calpastatina (CAST). Las CAPN son miembros de una gran familia de proteasas de cisteína dependientes de calcio cuya actividad está grandemente regulada (inhibición) por CAST. Aparte de degradar las proteínas miofibrilares, CAPN han sido implicadas en varios procesos esenciales para la formación del músculo.

En ganado bovino se han identificados varios polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en los genes de *CAST* y μ -CAPN (*CAPN1-316* y *CAPN1-4751*). Para estos SNP se ha documentado una asociación con características de importancia económica. Como parte de esta investigación se realizaron dos estudios. El primero consistió en determinar la segregación de los SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST* en poblaciones de ganado para carne *Bos taurus* y *Bos indicus* localizadas en diferentes regiones de la isla de Puerto Rico. En el segundo experimento se evaluaron asociaciones entre estos SNP con características de crecimiento en un grupo de toros Senepol, Charolais y Senepol \times Charolais (n=99). También se evaluaron las posibles asociaciones de estos SNP con características de carcasa y de calidad de la carne en un subgrupo de 42 animales que estuvieron sometidos a un régimen de suplementación nutricional estratégica. Los SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST* se encontraron segregando dentro de la población estudiada. El SNP *CAPN1-316* fue asociado con: tasa de ganancia en peso a 205 y 240 d, peso vivo estimado a los 205 d,

edad al destete, peso de tejido de descarte y el peso de los músculos *Biceps femoris*, *Semitendinosus*, *Gastrocnemius* y *Gluteus* spp, porcentaje de canal trasero y delantero y área del músculo *Longissimus dorsi*. También se encontró una asociación entre *CAPN1*-316 y la fuerza de corte [Warner Bratzler (WB)] medida a 0 d. El SNP *CAPN1*-4751 fue asociado con el peso al nacimiento, pesos de canal fría y tejido de descarte, peso del músculo *Longissimus dorsi*, la relación músculo/hueso, y el porcentaje de hueso. En adición, *CAPN1*-4751 estuvo asociado con ternura por panel sensorial a 14 d. Ninguna asociación fue observada entre el SNP de *CAST* con las características de importancia económica evaluadas en este experimento. Se concluye que la sustitución de nucleótidos en el gen de *CAPN1* podría incorporarse en programas de selección asistida por marcadores moleculares para mejorar en el ganado bovino de carne tanto las características de crecimiento como la calidad del producto final.

ABSTRACT

Meat tenderness is greatly influenced by an individual's genetic composition. During the meat aging process, when the muscle is converted to meat, proteolytic degradation is mainly regulated by the calpain (CAPN) / calpastatin (CAST) system. The CAPN are members of a great family of calcium (Ca^{2+}) dependent cysteine proteases which activity is regulated (inhibited) by CAST. Aside from their proteolytic activity, CAPN have been implicated in various essential processes for adequate skeletal muscle formation.

In bovine livestock, various single nucleotide polymorphisms (SNP) have been identified in the CAST and μ -CAPN genes (*CAPN1-316* and *CAPN1-4751*). It has been previously documented that an association exists between these SNP and economically important traits. As part of this research two studies were conducted. The first, consisted of determining the segregation pattern of the SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* and *CAST* in *Bos taurus* and *Bos indicus* populations throughout different regions of Puerto Rico. In the second study, the associations between these SNP and growth traits were evaluated in Senepol, Charolais and Senepol x Charolais bulls ($n = 99$). Associations between these SNP were also compared to carcass and meat quality data pertaining to a subset of 42 animals subjected to strategic nutritional supplementation. The SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* and *CAST* were found to segregate in the population studied. The SNP *CAPN1-316* was associated with: daily weight gain at 205 and 240 d, live weight estimated at 205 d, weaning age, trimming weight and the following individual muscle weights: *Biceps femoris*, *Semitendinosus*, *Gastrocnemius* and *Gluteus* spp.; hindquarter and frontquarter percentage, and *Longissimus dorsi* area.

In addition, an association was established between *CAPN1*-316 and shear force [Warner Bratzler (WB)] measured at 0 d. The SNP *CAPN1*-4751 was associated with birth weight, weights of: cold carcass, trimming, *Longissimus dorsi*, muscle to bone ratio, and bone percentage. In addition, *CAPN1*-4751 was associated with WB at 0 d, juiciness (0 d) and tenderness (0 and 14 d) determined by sensory evaluation. No associations were found between the *CAST* SNP and any of the economically important traits measured in the experiment. It is been concluded that the nucleotide substitutions at the *CAPN1* gene could be incorporated into molecular marker assisted selection programs for beef cattle in Puerto Rico to improve growth as well as meat quality.

CAPITULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

En el año 2004, la industria de carne de res en Puerto Rico representó aproximadamente un 4.0% del ingreso bruto agrícola (D.A.P.R., 2005). Sin embargo, el público puertorriqueño consume grandes cantidades de carne de res importada ya que en el país no se produce suficiente cantidad para suplir la demanda local. Además, en muchos casos, las limitaciones económicas de esta industria en Puerto Rico no permiten que la carne de res posea perfiles de terneza aceptables para el consumidor.

La terneza es uno de los criterios de selección más importantes para el consumidor a la hora de comprar carne (Brooks et al., 2000). Esta característica se ve influenciada por varios aspectos genéticos y ambientales. En Puerto Rico, el ganado para carne alcanza el peso de matanza a mayor edad que en los principales países exportadores de dicho producto (Casas et al., 1997). Se ha documentado que el grado de terneza de la carne se reduce con un aumento en la edad a la matanza del animal (Purchas et al., 2002). Esto puede ser indicativo de que la carne de res que se produce en la Isla generalmente tiene unos perfiles de calidad no aceptables para el consumidor (Pagán et al., 2007).

La terneza de la carne depende grandemente de la proteólisis llevada a cabo durante el almacenamiento *post-mortem* de la misma (Geesink et al., 1999). A su vez, el nivel de proteólisis se ha correlacionado con el tipo racial del animal (Riley et al., 2003). La carne de animales *Bos indicus* generalmente posee menor grado de terneza que aquella de *Bos taurus* (Whipple et al., 1990; Shackelford et al., 1995; Wulf et al., 1996). De hecho, se ha encontrado una relación negativa donde a medida que

aumenta la proporción *Bos indicus* en un animal también se incrementa la fuerza necesaria para romper la fibra muscular. Sin embargo, el tipo racial *Bos indicus* posee muchos atributos deseables para su utilización en climas tropicales y subtropicales (Riley et al., 2003). Los animales *Bos indicus* poseen mayor resistencia a enfermedades, mayor tolerancia al ambiente caluroso, facilidad al parto (“calving ease”) y posibilidad de supervivencia al compararlas con las razas *Bos taurus* (Keele et al., 1999). Al mismo tiempo, el producto de cruzamientos entre especies *Bos indicus* × *Bos taurus* resulta en una mayor heterosis lo cual favorece la producción de animales para carne en los climas tropical y subtropical. Sin embargo, las ventajas del cruzamiento con *Bos indicus* han sido parcialmente opacadas por la inconsistencia en los perfiles de ternera (O’Connor et al., 1997).

La selección genética para los fenotipos deseados de las especies domésticas ha sido constante durante muchos siglos y ha tenido resultados dramáticos (Lande et al., 1990). Durante el siglo pasado y primeros años del presente, la investigación agrícola ha sido inmensamente exitosa en el desarrollo de nuevas tecnologías (Green et al., 2007). Estos avances han promovido dramáticamente el progreso en las áreas pecuarias de bovinos para carne y leche, porcinos, aves y acuicultura. En los últimos 20 años la biología molecular ha cambiado el rumbo de la investigación de animales de finca, principalmente en el área de la genómica (Green et al., 2007). Esta disciplina ha evolucionado desde identificar pedazos cortos de ADN hasta secuenciar el genoma entero de un organismo (Fadiel et al., 2005). Los avances recientes en dicha área prometen revolucionar las prácticas agrícolas (Lande et al., 1990).

El desarrollo de nuevas tecnologías que sirvan como herramientas para tomar decisiones de impacto económico a nivel de finca, podrían resultar en ganancias significativas como resultado de una predicción precisa por parte del agricultor (Martin, 1991; Davis et al., 1998). El estudio del efecto del sistema de calpainas/calpastatina en el ganado bovino del trópico podría ser la clave para obtener animales de mejor calidad utilizando nuevas herramientas para la selección genética.

1.2. ROL DEL SISTEMA DE CALPAINAS EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL GANADO BOVINO

La degradación proteolítica que ocurre durante la conversión de músculo a carne en el período de almacenamiento de la carcasa a temperaturas de refrigeración es regulada principalmente por el sistema de calpainas (**CAPN**) / calpastatina (**CAST**) (Koohmarie et al., 1994; Juszczuk et al., 2007).

Las CAPN son proteínas heterodiméricas que constan de una subunidad catalítica grande (80 kDa) y una regulatoria pequeña (28 kDa). La actividad de estas proteasas es grandemente regulada por CAST, una proteína inhibidora de CAPN (Murachi, 1984; Goll et al., 1992). La familia de las CAPN consiste de al menos 16 enzimas diferentes (Franco et al., 2005) las cuales pueden ser típicas o atípicas (con o sin la subunidad EF¹) dependiendo del tejido de procedencia (Goll et al., 2003). A pesar de que los miembros de esta familia se encuentran en todos los tejidos, las CAPN varían en cuanto a su concentración dependiendo del micro-ambiente celular. Goll et al. (2003) sugieren que estas enzimas tienen diversas funciones dependiendo de la región

¹ Subunidad EF – motif hélice-vuelta-hélice en proteínas. Consiste de dos alfa hélices posicionadas perpendicularmente y enlazadas por una región corta de vuelta (usualmente 12 aminoácidos) que generalmente sirve como sitio de anclaje para Ca²⁺ (Branden y Tooze, 1999).

donde se encuentran. En el músculo esquelético existen dos isoformas principales las cuales son: μ -CAPN y m-CAPN. Estas, aparte de su rol en la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento *post-mortem* de la carne, han sido implicadas en actividades importantes a nivel celular como son la transmisión de señales, apoptosis (muerte celular programada), regulación de ciclos, dispersión, anclaje, motilidad, e invasión de tejido por la célula (Atencio et al., 2000; Carragher et al., 2002; Dedieu et al., 2004). En relación a la miogénesis, Leloup et al. (2007) demostraron que las CAPN juegan un rol crítico en las etapas tempranas de este fenómeno como lo es la migración del mioblasto y su fusión para formar el miotubo.

1.2.1 Estructura de las calpainas

El sistema de CAPN consta primordialmente de 2 proteasas ricas en cisteína las cuales dependen de la presencia de calcio (Ca^{2+}) para ser activadas (Goll et al., 2003). La secuencia de aminoácidos de μ - y m-CAPN en vertebrados ha sido conservada con sobre un 90% de homología (DeLuca et al., 1993; Suzuki et al., 1996; Smith et al., 2001) indicando que ésta secuencia es de gran importancia fisiológica. Existen hasta cuatro dominios de calpainas enzimáticamente activos (Hosfield et al., 1999; Strobl et al., 2000; Sorimachi y Suzuki, 2001; Pal et al., 2003). Franco et al. (2005) determinaron que el dominio I es una α -hélice sencilla presente en el terminal N de algunas calpainas. Este puede interactuar con los dominios VI de subunidades no catalíticas y pueden ser importantes para la estabilidad de la proteína. El dominio II comprende la porción proteolítica, conteniendo la triada catalítica Cys₁₀₅, His₂₆₂ y Asn₂₈₆, en su sitio activo. Al momento de la activación, estos tres residuos se cambian y son alineados en

un espacio preciso debido a cambios estructurales que se llevan a cabo (Franco et al., 2005). El dominio III consiste de ocho láminas β superpuestas una encima de la otra. Esta región se encuentra envuelta en el enlace de Ca^{2+} y fosfolípidos (Tompa et al., 2001). El dominio IV y el VI en las subunidades catalíticas y regulatorias contienen cinco subunidades-EF, los cuales interactúan para ensamblarse con otras moléculas para hacer heterodímeros (Blanchard et al., 1997; Lin et al., 1997; Hosfield et al., 1999). El dominio V de la subunidad regulatoria aparenta tener una estructura flexible a consecuencia de tener un alto contenido de glicina, a lo que probablemente se deba que no se haya podido estudiar por cristalografía (Franco et al., 2005).

1.2.2 Estructura de calpastatina

Calpastatina no inhibe ninguna otra proteasa, solo a μ - y m-CAPN (Goll et al., 2003). Para verificar este hecho, su actividad ha sido probada aparente en otras proteasas ricas en cisteína como lo son papaina, catepsina B, bromelina y ficina (Crawford et al., 1990), sin embargo no se ha encontrado ningún tipo de inhibición. Se conoce que la molécula de CAST casi en su totalidad se encuentra en conformación de hélices aleatorias (Konno et al., 1997). La evidencia disponible indica que CAST es un monómero en solventes no-denaturalizantes y funciona como tal en células del músculo (Otsuka y Goll, 1987). Al igual que sus sustratos, la actividad de CAST depende de la presencia de Ca^{2+} . Calpastatina ha sido descrita como una estructura que consta de cuatro secuencias repetidas homólogas a un intervalo de 140 aminoácidos (dominios 1, 2, 3 y 4) y un dominio catalogado como L (terminal N alcalino; Figura 1.1). Tres regiones altamente conservadas dentro de los dominios 1 – 4

son responsables por la inhibición, donde una molécula de CAST puede neutralizar varias de CAPN (Lonergan, 1999). El dominio L no tiene efecto inhibitorio de CAPN, pero se ha sugerido que es importante para la interacción con proteínas de la membrana celular como los que componen los canales L de Ca^{2+} (Kameyama et al., 1998). Una región Terminal N conteniendo 68 aminoácidos (Dominio XL) ha sido descrita por Cong et al. (1998), y este dominio tiene tres sitios potenciales para la fosforilación de AMP cíclico.

1.2.3. Regulación de las calpainas

La actividad de CAPN está regulada por diversos mecanismos. El más estudiado de estos es el de activación por Ca^{2+} , de aquí se deriva el nombre de estas proteasas (Guroff, 1964). Las proteasas μ - y m - CAPN, no existen en células vivas los niveles requeridos para la activación de los dominios proteolíticos por Ca^{2+} . Por ello se teoriza que un mecanismo regulador de la actividad de esta proteasa disminuye los requerimientos de Ca^{2+} *in vivo* (Franco et al., 2005). Al activarse, las subunidades catalíticas de algunas CAPN son autolizadas. Cuando las CAPN se activan se remueve el dominio I y se libera el enlace entre el terminal N de las subunidades catalíticas y regulatorias. Con esta modificación, se permite el movimiento libre del dominio II (Suzuki et al., 1981a; Imajoh et al., 1986; Cong et al., 1989; Molinari et al., 1994; Baki et al., 1996; Elce et al., 1997; Guttmann et al., 1997; Suzuki y Sorimachi, 1998). La unidad catalítica activa tiene un requerimiento menor de Ca^{2+} (Suzuki et al., 1981b; Imajoh et al., 1986; Baki et al., 1996; Suzuki y Sorimachi, 1998;). Sin embargo, el requerimiento es solo para la progresión de la catálisis y no para la activación (Franco et al., 2005). El

enlace a fosfolípidos también disminuye el requerimiento de Ca^{2+} *in vitro* (Saido et al., 1992; Suzuki et al., 1992; Arthur y Crawford, 1996; Melloni et al., 1996; Tompa et al., 2001), pero *in vivo* su relevancia se desconoce.

Desde la caracterización de m-CAPN ha sido claro que la concentración de Ca^{2+} requerida para activar dicha enzima (400 – 800 μM) es mucho más alta que la existente en células normales, la cual es de 300 – 400 nM (Jacquemond, 1997; Maravall et al., 2000). Enzimáticamente μ -CAPN solamente trabaja bajo la presencia de concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Kaprell et al. (1989) encontraron que en bovinos μ -CAPN enlaza 5-8 iones de Ca^{2+} , mientras que m-CAPN lo hace a 11-20. Estas medidas son importantes para determinar el modo de acción de dichas enzimas y su actividad en distintas etapas fisiológicas del animal y de la maduración de la carne. Sin embargo la enzima proteolítica principal envuelta en la degradación miofibrilar es μ -CAPN.

Durante el almacenamiento *postmortem* de la carne a temperaturas de refrigeración (maduración), la actividad de m-CAPN permanece constante o disminuye levemente durante los primeros 7 d. Sin embargo, la actividad de μ -CAPN disminuye luego de 3 d de maduración (Camou et al., 2007). Se ha documentado que durante este período ratones carentes del gen de μ -CAPN presentaron poca degradación de nebulina, distrofina, metavinculina, desmina y troponina T. La degradación de estas proteínas por CAPN ha sido vinculada con el enternecimiento de la carne (Geesink et al., 2006). Estos hallazgos y aquellos de otros estudios demuestran que μ -CAPN, no m-CAPN es responsable por la proteólisis *postmortem* del músculo y por ende del

enternecimiento de la carne durante el proceso de maduración (Koochmarie, 1996; Geesink et al., 2000, 2006).

1.2.4. Calpastatina regula la acción de calpainas

Las CAPN son reguladas por su inhibidor más conocido: CAST, según Wendt et al. (2004). Los datos estructurales y bioquímicos indican que CAST puede pegarse con mayor preferencia a CAPN activas (Barnoy et al., 1999; Tullio et al., 1999), sugiriendo que este mecanismo es de atenuación más que de prevención. Morgan et al. (1993) determinaron que durante las primeras 24 h del proceso de maduración de la carne niveles de Ca^{2+} significativamente menores son requeridos para la activación de CAST comparada con μ - y m-CAPN.

Calpastatina es una proteína expresada en varias formas, teniendo uno, tres, o cuatro dominios de inhibición (Goll et al., 1999). Esta se asocia a los dominios IV y VI de las CAPN en presencia de Ca^{2+} e inhibe su actividad proteolítica (Lonergan, 1999). Diversos análisis cinéticos han demostrado que CAST es un inhibidor competitivo de μ - y m-CAPN (Maki et al., 1990). Intracelularmente CAST inhibe la acción de μ -CAPN y m-CAPN, las principales enzimas proteolíticas del músculo (Killefer et al., 1994, Koochmarie et al., 1994). Es por esto que tanto μ - y m-CAPN como CAST están estrechamente relacionadas con índices bajos de ternura en la carne proveniente de animales *Bos indicus* (Whimble et al., 1990, Riley et al., 2003). También existe evidencia que este sistema CAPN/CAST regula la degradación de proteínas que componen el citoesqueleto y el sarcómero de las células musculoesqueléticas

actuando así tanto en el desarrollo prenatal como en el crecimiento postnatal (Goll et al., 2003; Moyen et al., 2004; Leloup et al., 2006).

1.2.5. Calpainas y su rol en la migración celular

La importancia de la migración celular es evidente con respecto al proceso fisiológico del desarrollo de un organismo. Este depende de la regulación del movimiento celular durante el desarrollo embrionario, respuestas inmunológicas, mantenimiento y reparación de tejidos, y estados de enfermedad en los cuales existe una aberrante motilidad celular (ej. inflamación crónica, enfermedades vasculares y metástasis de tumores; Franco et al., 2005).

En respuesta a varias señales migratorias, comienzan a presentarse movimientos direccionales por la polarización de la célula. Al frente de la célula, la polimerización del citoesqueleto de actina conduce al surgimiento de una protuberancia en la membrana plasmática (en la cual ésta se reorganiza en pseudópodos) para formar un “filo” direccional (Potter et al., 1998). Subsiguientemente, este “filo” es estabilizado por el anclaje de la matriz extracelular a través de complejos de adhesión mediados por integrinas. Estos complejos sirven como centros receptores de señales que modulan la migración. Una vez asociados a los complejos de adhesión, el citoesqueleto de actina puede generar la fuerza necesaria para translocarse y moverse hacia delante. Finalmente, los contactos adhesivos de la célula en la parte posterior deben ser desensamblados para permitir el despegue de la célula, con el fin de completar el ciclo migratorio celular (Bhatt et al., 2002).

Las CAPN fueron implicadas por primera vez en procesos de migración celular cuando su inhibición resultó en una reducción de la tasa de desplazamiento mediada por integrinas (Huttenlocher et al., 1997; Palecek et al., 1998). Esta inhibición promueve la estabilidad de los complejos de adhesión y un aumento en la adhesividad entre células, reduciendo así la tasa de desacoplamiento por la parte posterior de las mismas. Esto tiene como consecuencia una disminución en la migración celular. Desde que se encontró que al inhibirse μ - y m-CAPN ocurría este fenómeno, se pensó que éstas regulaban la motilidad celular primeramente al desestabilizar la adhesión a la matriz extracelular y promover la separación posterior. Sin embargo, estudios subsiguientes han demostrado que las CAPN juegan un papel importante en migración, dispersión celular, creación de una protuberancia en la membrana, quimotaxis (migración celular dirigida por la atracción o repulsión de estas a un compuesto químico) y la formación / destrucción de complejos de adhesión.

El proceso de migración está directamente envuelto en el desarrollo del embrión (Leloup et al., 2007). La migración celular es una etapa esencial en cuanto al alineamiento y fusión del mioblasto durante las primeras etapas del embrión. El ensamblaje y destrucción de muchos complejos proteicos de adhesión celular y miofibrilares son regulados por calpainas (Dourdin et al., 1999; Goll et al., 1992). Los estudios de Deidieu et al. (2004), demostraron que al inhibir la actividad de μ - y m-CAPN se inhibió la migración del mioblasto.

1.2.6. Substratos de Calpainas:

Más de 100 proteínas han sido identificadas como substratos de μ -CAPN (Tabla.1.1). Entre estas se incluyen factores de transcripción, receptores transmembranales, enzimas envueltas en transmisión de señales intracelulares y proteínas citoesqueléticas (Franco et al., 2005). Aunque las CAPN actúen sobre la degradación extensiva de algunas de éstas, muchas son metabolizadas en forma limitada, resultando en fragmentos proteicos estables que pueden tener funciones distintas a las llevadas a cabo por su forma nativa (Glading et al., 2004). Evidencia de cómo las CAPN afectan la motilidad celular se debe a que existen numerosos complejos proteicos relacionados a la adhesión y migración celular. Estas proteínas han sido categorizadas como substratos para CAPN (Glading et al., 2001; Goll et al., 2003).

1.2.7. Calpainas y su rol en el desarrollo del músculo

Durante el desarrollo embrionario, la formación de las fibras musculoesqueléticas envuelve la diferenciación y fusión de mioblastos mononucleados a miofibras multinucleadas (Barnoy et al., 2005). Luego de varios ciclos de mitosis, los mioblastos abandonan el ciclo celular y luego de alinearse, estos se funden unos con otros para formar los miotubos (Koochmarie et al., 1999; Barnoy et al., 2005). Los miotubos son multinucleados y no vuelven a dividirse mitóticamente. Este proceso requiere reconocimiento entre células, alineamiento, fusión inicial y fusión tardía de los mioblastos para que el miotubo naciente tenga el tamaño y la forma adecuada (Horsley et al., 2004). Schollenmeyer (1988) fue posiblemente la primera persona en sugerir el

rol de CAPN en mitosis. Mellgren et al. (1996) demostraron que μ -CAPN es necesaria para la progresión de la fase G1 (primera fase de crecimiento) a la S (fase de síntesis) en el ciclo celular. Las CAPN son esenciales para la remodelación del citoesqueleto y la membrana celular requerida para la fusión del mioblasto (Koohmarie et al., 1999; Moyen et al., 2004). Durante la diferenciación del mioblasto, la expresión de genes específicos del músculo es inducida (Moyen et al., 2004). Similarmente, un aumento en el número de fibras musculares durante el crecimiento postnatal, y en la regeneración luego de un trauma, envuelve el aumento en número de núcleos mediante la fusión de mioblastos (Horsley et al., 2004). Luego del nacimiento, el sistema de CAPN ha sido implicado como el principal regulador del metabolismo proteico en el músculo, lo que está determinado por la actividad de las células satélites y la deposición de proteínas (Koohmarie et al., 1999).

Actualmente se conoce que las CAPN están envueltas en la regulación de expresión de algunos factores de transcripción (Watt y Molloy, 1993; Walowitz, et al., 1998; Pariat et al., 2000). En el músculo esquelético, los factores de transcripción miogénicos o MRFs (miogenina, MyoD, Myrf5 y MRF4), están directamente envueltos en la diferenciación celular de mamíferos. Estos factores de transcripción son regulados al degradarse particularmente por la acción de μ -CAPN (Moyen et al., 2004).

Aparte de entender el proceso por el cual las calpainas intervienen en la maduración de la carne, el elucidar su función en la formación musculoesquelética tiene suma importancia debido a que μ -CAPN juega un papel clave en el arreglo y desorganización de la estructura miofibrilar particular en casos de distrofia muscular, en donde esta proteasa es sobre expresada (Moyen et al., 2004).

Glading et al. (2002) demostraron que μ -CAPN está implicada en el proceso de dispersión celular y adhesión, lo cual explica su alta expresión antes de la migración mioblástica y su disminución durante este proceso. Más aun, se ha reportado que sobre-expresión de μ - y m-CAPN induce grandes cambios en la organización de las fibras de actina de células mioblásticas, posiblemente causando un descenso en su migración (Potter et al., 1998; Dourdin et al., 2001). Esto fue confirmado por Leloup et al. (2006) quienes realizaron “Western blots” a: 0 h luego de la eclosión del embrión, 5 h (al final de la elongación), 10 h y 24 h (migración completa de mioblastos). En este estudio se observaron cambios en μ -CAPN, al decrecer los niveles de ésta en un 56% de 0 a 24 h. En estos momentos, los niveles de m-CAPN aumentaron con un pico máximo a las 10 h de un 44%. Estos resultados demuestran que los patrones de expresión de cada una de las calpains durante la migración del mioblasto son totalmente diferentes. Sin embargo, hasta el presente ningún estudio ha implicado polimorfismos genéticos dentro del gen μ -CAPN (*CAPN1*) en diferencias en el crecimiento somático de humanos o animales domésticos.

1.2.8. Calpastatina y su rol en el desarrollo del músculo

Kosower et al. (1990) demostraron que la relación de CAPN:CAST determina el potencial de fusión entre células. En mioblastos de rata L8, se ha encontrado que los niveles de CAPN no cambian significativamente durante la diferenciación, mientras que los niveles de CAST disminuyen antes de la fusión de este, re-apareciendo pasada dicha etapa. La disminución de CAST permite la activación de CAPN por niveles adecuados de Ca^{2+} induciendo la proteólisis requerida para la fusión del mioblasto

(Baroy et al., 2005). Estudios previos demuestran que los roles de μ -CAPN y m-CAPN no cambian significativamente durante la diferenciación del mioblasto, sin embargo la expresión de CAST inhibió la fusión de los mismos, deteniendo de tal manera su formación en miotubos (Barnoy et al., 1996; Kent et al., 2004). La actividad de las CAPN, en adición a su función en la desorganización de la membrana celular, está envuelta en la activación de transcripción de ciertos factores miogénicos (Barnoy et al., 2005). La proporción CAPN:CAST es importante en la regulación de la expresión de estos factores de transcripción incluyendo miogenina (Barnoy et al., 2005). Miogenina es un factor de transcripción que determina la iniciación y mantenimiento del programa de miogénesis (Barnoy et al., 2005). Esta es activada durante el cese de la división celular. Miogenina sirve como un marcador de diferenciación del mioblasto y de la formación del miotubo (Olson y Molckentin, 1996; Conway et al., 2004).

La sobre expresión de CAST ha sido utilizada para estudiar las funciones de CAPN en: degradación proteica musculoesquelética, motilidad y dispersión celular (Potter et al., 1998; Deideu et al., 2003), crecimiento del fibroblasto (Xu et al., 2002), ensamblaje de los microbellos celulares (Potter et al., 2003) y la modulación de la expresión genética (Chen et al., 2000). Por otra parte, la sobre expresión de CAST ha sido utilizada en experimentos *in vivo* para explicar condiciones como: distrofia muscular, desuso muscular luego de isquemia y el enternecimiento *post mortem* de la carne (Spencer et al., 2002; Tidbal et al., 2002; Maekawa et al., 2003; Kent et al., 2004). Al igual que el caso de *CAPN1*, al presente no existen datos que expliquen el efecto de mutaciones en el gen de *CAST* sobre el desarrollo musculoesquelético en ganado bovino.

1.3. IMPACTO EN LA SELECCIÓN GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores genéticos pueden ser utilizados para identificar regiones específicas dentro de los cromosomas donde los genes envueltos en rasgos cuantitativos están localizados (Davis et al., 1998). Estas regiones son conocidas como loci de rasgos cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés). La selección genética asistida por marcadores (MAS por sus siglas en inglés) usa información acerca de estas regiones en programas de selección de ganado para identificar individuos con combinaciones favorables de distintos QTL (Davis et al., 1998). Estos QTL podrían representar herramientas útiles para la selección genética de animales para rasgos cuantitativos de difícil medición como lo es la ternura de la carne.

Estudios acerca del genoma del orden mamífero Cetartiodactyla, al cual los tipos raciales *Bos taurus* y *Bos indicus* pertenecen, es de sumo interés ya que representa un grupo de mamíferos filogenicamente distante a los primates (Larkin et al., 2003). Más aun, el trabajar con bovinos resulta de suma importancia ya que estos animales juegan un papel primordial para la economía a nivel internacional (Fadiel et al., 2005). Específicamente para el ganado vacuno, la identificación de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) hace posible que los geneticistas puedan encontrar asociaciones entre ciertos genes y diversos rasgos de interés. Estos hallazgos podrían conducir eventualmente a la producción de carne de res de calidad superior (Adam, 2002).

Se han identificado cientos de SNP a través del genoma bovino (Deckers et al., 2004). Sin embargo, poco se sabe del efecto de la presencia de muchas de estas mutaciones sobre características de importancia económica.

1.3.1. Polimorfismos en los genes de μ -calpaina y calpastatina y su utilidad a nivel comercial

En ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* se han identificados varios SNP en el gen de μ -CAPN (Figura 1.2) que se asocian con características de importancia económica (Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006). Esta proteasa está involucrada en el desarrollo muscular (Barnoy et al., 2005), pero la mayor importancia económica se le ha otorgado a su efecto en el grado de ternura de la carne (Koochmaraie et al., 1994; Geesink et al., 1999; Geesink et al., 2000; Riley et al., 2003; Rickner et al., 2006). Dicha característica constituye uno de los criterios de selección más importantes para el consumidor a la hora de comprar carne (Brooks et al., 2000). White et al. (2005) evaluaron el efecto de cinco marcadores distribuidos a lo largo de todo el gen de μ -CAPN y encontraron que dos SNP pueden ser utilizados para detectar una predisposición a variaciones en ternura en todas las especies de bovinos, incluyendo, bisontes (*Bos bison* y *Bos bonasus*) y yaks (*Bos grunniens*). Estos SNP fueron clasificados como *CAPN1-316* y *CAPN1-4751*.

El polimorfismo *CAPN1-316* se encuentra en el exón 9 de la región regulatoria (28 kDa) del gen en cuestión (Figura 1.2). Este SNP provoca que en esta región se sustituya una citosina por una guanina (alelos C \leftrightarrow G), según White et al. (2005). Dicha sustitución trae por consecuencia el cambio en un amino ácido de alanina por glicina (Ala \leftrightarrow Gly). El segundo polimorfismo de importancia, *CAPN1-4751*, se encuentra en el intrón 17 de la región catalítica (80 kDa) del gen de μ -CAPN (Figura 1.2) y consta de una inserción o eliminación de citosina por timina (alelos C \leftrightarrow T). Esta región es transcrita pero no traducida durante la expresión de *CAPN1*, sin embargo

posee un efecto aparente en la función de esta proteasa. El alelo C, tanto en *CAPN1*-316 (Page et al., 2002 y 2004; White et al., 2005) como en *CAPN1*-4751 (White et al., 2005; Casas et al., 2006) han sido asociados con valores favorables de terneza de la carne, sin embargo, se han encontrado una baja proporción de estos en las poblaciones de ganado para carne estudiadas (Page et al., 2002 y 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006).

En *CAST* se ha identificado un SNP que consta de una sustitución de bases entre citosina por timina (alelos C \leftrightarrow T) de acuerdo a Casas et al. (2006). Previamente, diversos estudios se realizaron para identificar asociaciones entre polimorfismos encontrados en otras regiones de *CAST* y características de importancia económica en ganado de carne. Lonergan et al. (1995) intentaron asociar polimorfismos de largo de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) con la actividad de dicha enzima y su potencial asociación con la terneza de la carne sin éxito aparente. Similarmente, Chung et al. (1999) trataron de asociar un polimorfismo de conformación de hebra sencilla (SSCP por sus siglas en inglés) con la fuerza de corte de la carne (Warner Bratzler), el índice de fragmentación miofibrilar, y con la actividad enzimática de *CAST*, no encontrándose resultados favorables. Por el contrario, Casas et al. (2006) publicaron el primer experimento en literatura científica donde documenta la existencia de un SNP en el gen *CAST* el cual está asociado a la terneza de la carne. En este experimento se confirmaron los resultados encontrados por Barendse (2002) donde los animales homocigotos para timina (TT) produjeron carne con menores valores de fuerza de corte que aquellos homocigotos para citosina (CC). Schenkel et al. (2006) describieron la presencia de otro SNP en *CAST* el cual

predisponía al animal a variaciones en la terneza similares a las descritas por Barendse (2002) y Casas et al. (2006). A diferencia de los estudios anteriores el SNP en cuestión consta de una sustitución de citosina por guanina (alelos C \leftrightarrow G). Este resulta en una menor fuerza de corte para el músculo *Longissimus dorsi* luego de 7 d *postmortem* en los animales homocigotos para el alelo C.

Actualmente se han desarrollado diversas pruebas comerciales para detectar predisposición a la terneza de la carne de ganado bovino utilizando estos SNP encontrados en el sistema de CAPN/CAST. La prueba comercial GeneSTAR Tenderness Panel (Bovigen LLC, Harahan, LA) esta compuesta por el SNP en la región 2959 no traducida del gen *CAST* (número de acceso AF159246) según descrito por Barendse (2002) y Casas et al. (2006). En adición, este panel incluye el SNP *CAPN1*-316 (región 5709, número de acceso AF252504; Page et al., 2002) y el SNP *CAPN1*-4751 (posición 6545; número de acceso AF248054; White et al., 2005). La prueba Ingenuity *Tender* –GENE (Merial Limited, Duluth, GA) consiste de los 2 SNP antes descritos para *CAPN1* y el reportado por Schenkel et al. (2006) en *CAST*. Este último se encuentra en la secuencia intrónica entre los exones 5 y 6 de *CAST* (base 282; número de acceso AY008267). Por lo tanto, ambas pruebas utilizan los mismos SNP para *CAPN1*, sin embargo para *CAST* estas mutaciones difieren (Van Eenaam et al., 2007).

1.4. REFERENCIAS:

- Adam, D. 2002. Draft cow genome heads the field. *Nature* 417: 778.
- Arthur, J.S. y C. Crawford. 1996. Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1293: 201.
- Atencio, I.A., M. Ramachandra, P. Shabram, y G.W. Demers. 2000. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 11: 247.
- Baki, A., P. Tompa, A. Alexa, O. Molnar, y P. Friedrich. 1996. Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem. J.* 318: 897.
- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Barnoy, S., T. Glaser y N.S. Kosower. 1996. The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 933.
- Barnoy, S., Y. Zipser, T. Glaser, Y. Grimberg, y N.S. Kosower. 1999. Association of calpain (Ca²⁺-dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *J. Cell Biochem.* 74: 522.
- Barnoy, S., M. Maki, y N.S. Kosower. 2005. Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion. *Biochem. and Biophys. Res.* 332: 697.
- Bhatt, A., I. Kaverina, C. Otey, y A. Huttenlocher. 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.* 115, 3415.
- Blanchard, H., P. Grochulski, Y. Li, J.S. Arthur, P.L. Davies, J.S. Elce y M. Cygler. 1997. Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* 4: 532.
- Branden C. y Tooze J. 1999. *Introduction to Protein Structure* 2nd Ed. Garland Publishing: New York, NY.
- Brooks, J.C., J.B. Belew, D.B. Griffin, B.L. Gwartney, D.S. Hale, W.R. Henning, D.D. Johnson, J.B. Morgan, F.C. Parrish Jr, J.O. Reagan, y J.W. Savell. 2000. National Beef Tenderness Survey-1998. *J. Anim. Sci.* 78:1852.

- Camou, J.P., S.W. Mares, J.A. Marchello, R. Vazquez, M.Taylor, V.F. Thompson, y D.E. Goll. 2007. Isolation and characterization of μ -calpain, m-calpain, and calpastatin from postmortem muscle. I. Initial steps. *J. Anim. Sci.* 85: 3400.
- Carragher, N.O., y M.C. Frame. 2002. Calpain: A role in cell transformation and migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1539.
- Casas, A., D. Cianzio, y A. Rivera. Comparison of Holstein, Charbray and Zebu Bulls for Beef Production under Rotational Grazing. II. Offal Components in Carcass Composition. Manuscript Submitted to the editorial board February 24, 1997.
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr., D.D. Johnson y T.P.L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Chen, P., L.M. Demers, V. Vallyathan, Y. Lu, V. Castranova, y X. Shi. 2000. Impairment of NF- κ B activation and modulation of gene expression by calpastatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C709.
- Chung H.Y., M.E. Davis, y H.C. Hines. 1999. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. *Anim Genet.* 30: 80.
- Cong, J., D.E. Goll, A.M. Peterson, H.P. Kapprell. 1989. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* 264: 10096.
- Cong, M., V.F. Thompson, D.E. Goll y P.B. Antin. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J. Biochem.* 273: 660.
- Conway, K., C. Pin, J.A. Kiernan y P. Merrifield. 2004. The E protein HEB is preferentially expressed in developing muscle. *Differentiation* 72: 327.
- Crawford C. 1990. Protein and peptide inhibitors of calpains. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC, p. 75.
- D.A.P.R. (Departamento de Agricultura de Puerto Rico), Oficina de Estadísticas Agrícolas. 2005. Compendio Estadístico del Ingreso Bruto Agrícola 2004.
- Davis G.P. y S. K. DeNise. 1998. The Impact of Genetic Markers on Selection. *J. Anim. Sci.* 76: 2331.
- Dedieu S., G. Mazeret, S. Poussard, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2003. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell.* 95: 615.

- Dedieu, S., S. Poussard, G. Mazères, F. Grise, E. Dargelos, P. Cottin, y J-J. Brustis, 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organisation. *Exp. Cell Res.* 292: 187.
- Dekkers, J. C. M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (E. Suppl.): E313.
- Deluca, C.I., P.L. Davies, J.A. Samis, y J.S. Elce. 1993. Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80-kDa subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1216: 81.
- Dourdin, N., D. Balcerzak, J.J. Brustis, S. Poussard, P. Cottin, y A. Ducastaing. 1999. Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp. Cell Res.* 246: 433.
- Dourdin N., A.K. Bhatt, P. Dutt, P.A. Greer, J.S. Arthur, J.S. Elce, y A. Huttenlocher. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276: 48382.
- Elce, J. S., C. Hegadorn, y J.S. Arthur. 1997. Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* 272: 11268.
- Fadiel, A., Anidi I. y K.D. Eichenbaum. 2005. Farm animal genomics and informatics: an update. *Nuc. Acids Res.* 33: 6308.
- Franco S.J., y A. Huttenlocher. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118: 17.
- Geesink, G. H., y M. Koohmaraie. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77: 2685.
- Geesink G.H. y M. Koohmaraie. 2000. Ionic strength-induced inactivation of μ -calpain in postmortem muscle. *J. Anim. Sci.* 78: 2336.
- Geesink, G.H., S. Kuchay, A.H. Chishti, y M. Koohmaraie. 2006. A-Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834.
- Glading, A., F. Uberall, S.M. Keyse, D.A. Lauffenburger, y A. Wells. 2001. Membrane proximal ERK signaling is required for m-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 23341.
- Glading, A., R.J. Bodnar, I.J. Reynolds, H. Shiraha, L. Satish, D.A. Potter, H.C. Blair y A. Wells. 2004. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 24: 2499.

- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., y Zalewska, T. 1992. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays*, 14: 549.
- Goll, D., V.F. Thompson y J. Cong. 1999. The calpain system: its proteins, properties, and secrets. *American Society of Animal Science Meat Science and Muscle Biology Symposium*.
- Goll D.E., V.F. Thompson H. Li, W. Wei, y J. Cong . 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731.
- Green R.D., M.A. Qureshi, J.A. Long, P.J. Burfening, y D.L. Hamernik. 2007. Identifying the Future Needs for Long-Term USDA Efforts in Agricultural Animal Genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 185.
- Guroff, G. 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 239: 149.
- Guttmann, R. P., J.S. Elce, P.D. Bell, J.C. Isbell, y G.V. Johnson. 1997. Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. *J. Biol. Chem.* 272: 2005.
- Hiwasa, T., Y. Arase, R. Hasegawa, S. Sugaya, K. Kita, T. Saido, H. Yamamori, M. Maki, y N. Suzuki. 2000. Increase in ultraviolet sensitivity by overexpression of calpastatin in ultraviolet-resistant UV-1 cells derived from ultraviolet-sensitive human RSa cells. *Cell Death Differ.* 7: 531.
- Hosfield, C. M., J. S. Elce, P. L. Davies, y Z. Jia. 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺ -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO. J.* 18: 6880.
- Horsley, V., y G.K. Pavlath. 2004. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion, *Cells Tissue Organs* 176: 67.
- Huttenlocher, A., S.P. Palecek, Q. Lu, W. Zhang, R.L. Mellgren, D.A. Lauffenburger, M.H. Ginsberg, y A. F. Horwitz. 1997. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* 272: 32719.
- Imajoh, S., H. Kawasaki, y K. Suzuki. 1986. Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca²⁺ requirement is due to the NH₂-terminal processing of the large subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 100: 633.
- Jacquemond V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73: 920.

- Juszczuk-Kubiak E., J. Wyszyn´ska-Koko, K. Wicin´ska, y S. Rosochacki. 2007. A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Mol. Biol. Rep.* 10: 11033.
- Kameyama M., A. Kameyama, E. Takano, y M. Maki. 1998. Run-down of the cardiac L-type Ca²⁺ channel: partial restoration of channel activity in the cell-free patches by calpastatin. *Pflugers Arch.* 435: 344.
- Kaprel H.P., y D.E. Goll. 1989. Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 264: 17,888.
- Keele, J.W., S.D. Shackelford, S.M. Kappes, M. Koohmaraie, y R.T. Stone. 1999. A Region on Bovine Chromosome 15 Influences Beef *Longissimus* tenderness in Steers. *J. Anim. Sci.* 77: 1364.
- Kent, M.P., M.J. Spencer, y M. Koohmaraie. 2004. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. *J. Anim. Sci.* 82: 794.
- Killefer, J., y M. Koohmaraie. 1994. Bovine Skeletal Muscle Calpastatin: Cloning, Sequence Analysis, and Steady-State mRNA Expression. *J. Anim. Sci.* 72: 606.
- Konno T., N. Tanaka, M. Kataoka, E. Takano, y M. Maki. 1997. A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1342: 73.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36:93.
- Koohmarie, M., D.J. Nonneman, y G.H. Geesink. 1999. Possible role of the calpain proteolytic system in muscle growth and development. *J. Anim. Sci.* 77: 120.
- Kosower, N.S., y T. Glaser. 1990. The calpain–calpastatin system and membrane fusion, in: R.L. Mellgren, T. Murachi (Eds.), *Intracellular Ca²⁺-dependent Proteolysis*. CRC Press, Boca Raton, FL. 163.
- Lande R., y R. Thompson. 1990. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. *Genetics* 124: 743.
- Larkin DM, A. Everts-van der Wind, M. Rebeiz, P.A. Schweitzer, S. Bachman, C. Green, C.L. Wright, E.J. Campos, L.D. Benson, J. Edwards, L. Liu, K. Osoegawa, J.E. Womack, P.J. de Jong, y H.A. Lewin. 2003. A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. *Genome Res.* 13:1966.
- Leloup L., G. Maz`eres, L. Daury, P. Cottin, y J-J. Brustis. 2006. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 38: 2049.

- Lin, G.D., D. Chattopadhyay, M. Maki, K.K. Wang, M. Carson, L. Jin, P.W. Yuen, E. Takano, M. Hatanaka, y L.J. DeLucas. 1997. Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* 4: 539.
- Lonergan, S.M. 1999. Molecular features of striated muscle calpastatin. *J. Anim. Sci.* 77: 120.
- Maekawa, A., J.K. Lee, T. Nagaya, K. Kamiya, K. Yasui, M. Horiba, K. Miwa, M. Uzzaman, M. Maki, Y. Ueda, y I. Kodama. 2003. Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 1277.
- Maki, M., H. Hatanaka, E. Takano, y T. Murachi. 1990. Structure-function relationship of calpastatin. *Intracellular calcium-dependent proteolysis.*, R. L. Mellgren y Muracji, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 37.
- Maravall M., Z.F. Mainen, B.L. Sabatini, y K. Svoboda. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* 78: 2655.
- Martin, G. 1991. Returns from research: Meat and livestock. *Agric. Sci.* 4: 21.
- Mellgren R.L., Q. Lu, W. Zhang, M. Lakkis, E. Shaw, y M.T. Mericle. 1996. Isolation of a chinese hamster ovary cell clone possessing decreased μ -calpain content and a reduced proliferative growth rate. *J. Biol. Chem.* 271: 15568.
- Melloni, E., M. Michetti, F. Salamino, R. Minafra, y S. Pontremoli. 1996. Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 193.
- Molinari, M., J. Anagli, y E. Carafoli. 1994. Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269: 27992.
- Morgan J. B., T. L. Wheeler, M. Koohmaraie, J. W. Savell, y J. D. Crouset. 1993. Meat Tenderness and the Calpain Proteolytic System in Longissimus Muscle of Young Bulls and Steers. *J. Anim. Sci.* 71: 1471.
- Moyen C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 728.
- Murachi, T. 1984. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: calpain and calpastatin. *Biochem. Soc. Symposium.* 49: 149.

- O'Connor, S.F., J.D. Tatum, D.M. Wolf, R.D. Green, y G.C. Smith. 1997. Genetic Effects on Beef Tenderness in *Bos indicus* Composite and *Bos taurus* Cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 1822.
- Olson, E.N., y J.D. Molkenin. 1996. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet.* 6: 445.
- Otsuka Y., y D.E. Goll. 1987. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J. Biol. Chem.* 262: 5839.
- Pariat, M., C. Salvat, M. Bebien, F. Brockly, E. Altieri, S.Carillo, I. Jariel-Encontre, y M. Piechaczyk. 2000. The sensibility of c-jun and c-fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. *Biochem. J.*345: 129.
- Pagán, M., A. Casas, y D. Cianzio. 2007. Physical and sensory characteristics of hidquarter muscles of young Holstein, Brahman and Charbray bulls grown under grazing. *J. Agric. Univ. P.R.* 91. In Press.
- Page, B.T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T. L. Wheeler, M. Koochmaraie, J. W. Keele, y T. P. L. Smith. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 3077.
- Page, B. T., E. Casas, R. L. Quaas, R. M. Thallman, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koochmaraie, S. N. White, J. W. Keele, y 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.
- Pal, G.P., T. De Veyra, J.S. Elce, y Z. Jia. 2003. Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca²⁺ requirement. *Structure (Camb.)* 11: 1521.
- Palecek, S.P., A. Huttenlocher, A.F. Horwitz, y D.A. Lauffenburger. 1998. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J. Cell Sci.* 111: 929.
- Potter, A.P., J.S. Tirnauer, R. Janssen, D.E. Croall, C.N. Hughes, K.A. Fiacco, J.W. Mier, M. Maki, y I.M. Herman. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* 141: 647.
- Potter, D.A., A. Srirangam, K.A. Fiacco, D. Brocks, J. Hawes, C. Herndon, M. Maki, D. Acheson, y I.M. Herman. 2003. Calpain regulates enterocyte brush border actin assembly and pathogenic *E. coli*-mediated effacement. *J. Biol. Chem.* 278: 30403.

- Purchas, R.W., D.L. Burnham, y S.T. Morris. 2002. Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. J. Anim. Sci. 80: 3211.
- Riley D.G., C.C. Chase, Jr., T.D. Pringle, R.L. West, D.D. Johnson, T.A. Olson, A.C. Hammond, y S.W. Coleman. 2003. Effect of sire on μ - and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. J. Anim. Sci. 81: 2440.
- Rickner, C.B., N.A. Pyatt, L.L. Berger, y D.B. Faulkner. 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny difference in early weaned Simmental steers J. Anim. Sci. 84: 686.
- Saido, T.C., M. Shibata, T. Takenawa, H. Murofushi, y K. Suzuki. 1992. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. J. Biol. Chem. 267: 24585.
- Schenkel F.S., S.P. Miller, Z. Jiang, I.B. Mandell, X. Ye, H. Li, y 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.
- Schollmeyer, J.E. 1998. Calpain II involvement in mitosis. Science. 240: 911.
- Shackelford, S.D., T.L. Wheeler, y M. Koohmaraie. 1995. Relationship Between Shear Force and Trained Sensory Panel Tenderness Ratings of 10 Major Muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* Cattle. J. Anim. Sci. 73: 3333.
- Smith T.P.L., F.A. Simmen, G. Zhao, y J.L. Vallet. 2001. Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. J. Anim. Sci. 79: 552.
- Sorimachi, H., y K. Suzuki. 2001. The structure of calpain. J. Biochem. (Tokyo) 129: 653.
- Spencer, M.J., y R.L. Mellgren. 2002. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. Hum. Mol. Genet. 11: 2645.
- Strobl, S., C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, y H. Bartunik. 2000. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 588.
- Suzuki A., K. Kim, y Y. Ikeuchi. 1996. Proteolytic cleavage of connectin/titin. Adv. Biophys. 33: 53.

- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota, y K. Imahori. 1981a. Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. J. Biochem. (Tokyo) 90: 1787.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota, y K. Imahori. 1981b. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. J. Biochem. (Tokyo) 90: 275.
- Suzuki, K., T.C. Saido, y S. Hirai. 1992. Modulation of cellular signals by calpain. Ann. New York Acad. Sci. 674: 218.
- Suzuki, K., y H. Sorimachi. 1998. A novel aspect of calpain activation. FEBS. Lett. 433: 1.
- Tidball, J.G., y M.J. Spencer. 2002. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse, J. Physiol. 545: 819.
- Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki, y P. Friedrich. 2001. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280: 1333.
- Tullio, R. D., M. Passalacqua, M. Averna, F. Salamino, E. Melloni, y S. Pontremoli. 1999. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. Biochem. J. 343: 467.
- Watt, F., y P.L. Molloy. 1993. Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. Nuc. Acids Res. 21: 5092.
- Walowitz, J.L., M.E. Bradley, S. Chen, y T. Lee. 1998. Proteolytic regulation of the zinc finger transcription factor YY1, a repressor of muscle-restricted gene expression. J. Biol. Chem. 273: 6656.
- Wendt, A., V.F. Thompson, y D.E. Goll. 2004. Interaction of calpastatin with calpain: a review. Biol. Chem. 385: 465.
- Whipple, G., M. Koohmaraie, M.E. Dikeman, J.D. Crouse, M.C. Hunt, y R.D. Klemm. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. J. Anim. Sci. 68: 271.
- White, S.N., E. Casas, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase, Jr., D.D. Johnson, J.W. Keele, y T.P.L. Smith. 1995. 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.

- Wulf, D.M., J.B. Morgan, J.D. Tatum, y G.C. Smith. 1996. Effects of Animal Age, Marbling Score, Calpastatin Activity, Subprimal Cut, Calcium injection, and Degree of Doneness on the Palatability of Steaks from Limousin Steers. *J. Anim. Sci.* 74: 569.
- Van Enennaam, A.L., J. Li, R. M. Thallman, R.L. Quaas, M.E. Dikeman, C.A. Gill, D.E. Franke, y M.G. Thomas. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891.
- Xu, Y., y R.L. Mellgren. 2002. Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. *J. Biol. Chem.* 277: 21474.

Tabla 1.1. Substratos de CAPN envueltos en motilidad celular^{1,2}.

Substrato	In Vitro	Cultivo de Células	Isoformas in vitro	Isoformas en cultivo de células	Referencias
<i>α-actina</i>	No	Si	-	ND	Goll et al., 1991; Selliah et al., 1996
<i>β-integrinas</i>	Si	Si	<i>CAPN2</i>	ND	Du et al., 1995; Pfaff et al., 1999
<i>β-catenina</i>	Si	Si	<i>CAPN1</i>	<i>CAPN2</i>	Rios-Doria et al., 2004
<i>Cadherinas</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	ND	Covault et al., 1991; Rios-Doria et al., 2003
<i>Cortactina</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	<i>CAPN2</i>	Huang et al., 1997
<i>Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal</i>	Si	Si	ND	ND	Gates and King, 1983; King y Gates, 1985; Stoscheck et al., 1988
<i>Quinasa Focal de Adhesión 2</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	<i>CAPN2</i>	Carragher et al., 1999; Cooray et al., 1996; Franco et al., 2004a
<i>Filamina</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2,3</i>	<i>CAPN2,3</i>	Huff-Lonergan et al., 1996; Kwak et al., 1993; Verhallen et al., 1987
<i>Quinasa reguladora de afinidad microtubular</i>	Si	Si	<i>CAPN2</i>	<i>CAPN1,2</i>	Dedieu et al., 2003; Dulong et al., 2004a
<i>Quinasa de cadena liviana de miosina</i>	Si	Si	ND	ND	Kambayashi et al., 1986; Kosaki et al., 1983
<i>Paxillina</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	<i>CAPN2</i>	Carragher et al., 1999; Franco et al., 2004a
<i>Tirosina fosfatasa-1B</i>	Si	Si	<i>CAPN1</i>	ND	Frangioni et al., 1993; Schoenwaelder et al., 1997
<i>Rho Activo</i>	Si	Si	<i>CAPN1</i>	ND	Kulkarni et al., 2002
<i>Espectrina</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	<i>CAPN2</i>	Croall et al., 1986; Fox et al., 1987; Franco et al., 2004a
<i>Proteína Src</i>	ND	Si	ND	ND	Oda et al., 1993
<i>Talina I</i>	Si	Si	<i>CAPN1,2</i>	<i>CAPN2</i>	Carragher et al., 1999; Franco et al., 2004 ^a
<i>Vinculina</i>	ND	Si	ND	ND	Serrano and Devine, 2004

¹*CAPN1* = μ-CAPN, *CAPN2* = m-CAPN, *CAPN3* = CAPN pequeña, ND = no determinada.

² Fuente: J. Cell Sci. 2005. 118: 3829 – 3838.

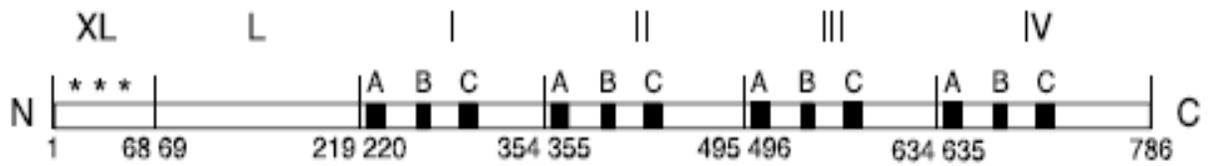


Figura 1.1. Diagrama esquemático de la proteína CAST bovina. Este diagrama muestra los diferentes dominios determinados por la secuencia de aminoácidos. Los dominios I, II, III, y IV poseen sitios activos para la inhibición de CAPN. Fuente: *Physiol. Rev.* 83: 731 – 801.

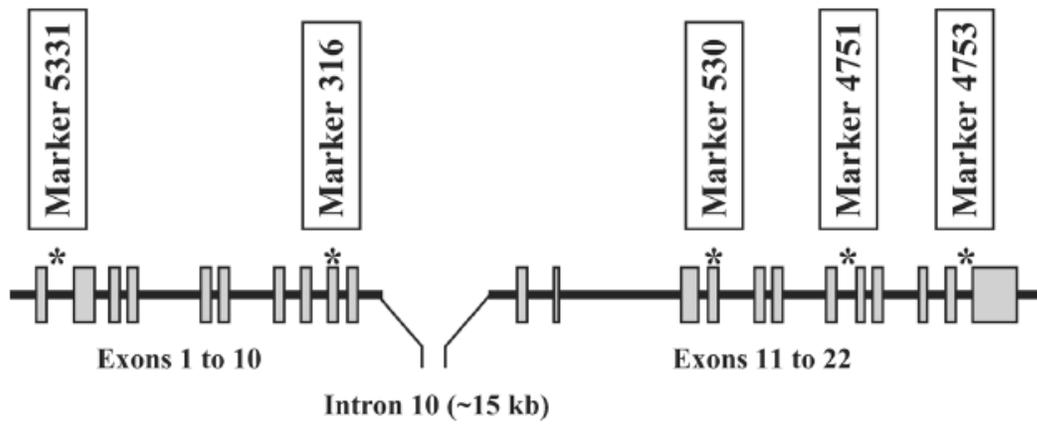


Figura 1.2. Localización (*) de los marcadores moleculares (SNP) identificados en el gen *CAPN1*. Fuente: J. Anim. Sci. 2005. 83:2001 - 2008.

OBJETIVOS

El presente estudio tuvo los siguientes objetivos:

1. Determinar la distribución poblacional de polimorfismos identificados en el gen de *CAPN1* (*CAPN1*-316 y 4751) y *CAST*.
2. Analizar la asociación de estos polimorfismos con características de importancia económica en bovinos de carne.

CAPÍTULO DOS

SEGREGACIÓN DE POLIMORFISMOS EN μ -CALPAINA Y CALPASTATINA EN GANADO PARA CARNE EN PUERTO RICO

2.1. RESUMEN

Se determinó la distribución de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP por sus siglas en inglés) en dos regiones de Calpaina (**CAPN1-316** y **CAPN1-4751**) y una en Calpastatina (**CAST**) en ganado para carne criado en Puerto Rico (n=271). Las frecuencias genotípicas y alélicas se determinaron para cada SNP en las razas Senepol (n=53), Charolais (n=49), Angus (n=27), Charbray (n=38), Brahman (n=16), Cebú (n=16) y toros cruzados (n=72). Para *CAPN1-316*, las frecuencias genotípicas globales (n=219) fueron 0.07/CC (n=15), 0.38/CG (n=83) y 0.55/GG (n=121) con frecuencias alélicas de 0.26/C y 0.74/G. El genotipo CC estuvo ausente en las razas Charbray, Charolais, Angus, Cebú y Brahman. En toros Charolais, Cebú, Brahman y Charbray el genotipo GG fue mayor que el CG y lo inverso fue observado en toros Senepol. En animales Angus y en los cruces, los genotipos CG y GG se encontraron equitativamente distribuidos. Las frecuencias genotípicas globales (n=256) para *CAPN1-4751* fueron 0.17/CC (n=44), 0.45/CT (n=114) y 0.38/TT (n=98). Las frecuencias alélicas fueron 0.39/C y 0.61/T. Animales con el genotipo CT fueron más frecuentes en Charolais, Senepol, Angus y cruces. Los animales TT fueron más comunes en razas Charbray y Brahman. Para *CAST*, las frecuencias genotípicas globales (n=261) fueron 0.04/CC (n=10), 0.26/CT (n=68), y 0.70/TT (n=183), respectivamente, con frecuencias alélicas de 0.17/C y 0.83/T. No se encontraron

animales de genotipo CC en Charolais, Angus y Brahman. El genotipo TT estuvo en mayor proporción en todas las razas y en los animales cruzados. La segregación de polimorfismos en *CAPN1* y *CAST* puede estar implicada en diferencias en características de importancia económica en bovinos para carne criados en Puerto Rico. Esto debe ser confirmado mediante la genotipificación de un número grande de animales los cuales posean registros de producción, previo a la incorporación de estos marcadores moleculares en programas de selección genética.

2.2. ABSTRACT

The distribution of single nucleotide polymorphisms (SNP) in two regions of Calpain (*CAPN1*-316 and *CAPN1*-4751) and a SNP in Calpastatin (*CAST*) was determined in beef cattle grown in Puerto Rico (n=271). Genotypic and allelic frequencies were determined for each SNP in Senepol (n=53), Charolais (n=49), Angus (n=27), Charbray (n=38), Brahman (n=16), Zebu (n=16) and crossbred bulls (n=72). For *CAPN1*-316, the global genotypic frequencies (n=219) were 0.07/CC (n=15), 0.38/CG (n=83) and 0.55/GG (n=121) with allelic frequencies of 0.21/C and 0.74/G. The CC genotype was absent in Charbray, Charolais, Angus, Zebu and Brahman bulls. In Charolais, Zebu, Brahman and Charbray the GG genotype was in greater proportion than CG, while the inverse was observed in the Senepol breed. In Angus and crossbred animals, the CG and GG genotype were found in equal distribution. The global genotypic frequencies for *CAPN1*-4751 (n=256) were 0.17/CC (n=44), 0.45/CT (n=114) and 0.38/TT (n=98). The allelic frequencies were 0.39/C and 0.61/T. Animals inheriting the CT genotype were more frequent in Charolais, Senepol, Angus and crossbred bulls, while the TT were more common in Charbray and Brahman. For *CAST*, the global genotypic frequencies (n=261) were 0.04/CC (n=10), 0.26/CT (n=68), and 0.70/TT (n=183), respectively. The global allelic frequencies were 0.17/C and 0.83/T. The CC genotype was not found in Charolais, Angus and Brahman breeds. The TT animals were more frequent in all breeds, as well as in the crossbred population. The segregation of polymorphisms in *CAPN1* and *CAST* could potentially be associated with differences in economically important traits for beef cattle grown in Puerto Rico. This

need to be determined by genotyping a broad range of animals with detailed phenotypic data before the incorporation of these SNP into marker assisted selection programs.

2.3. INTRODUCCIÓN

En estudios pasados se ha determinado que en el mercado existe una variación excesiva en cuanto a la terneza de la carne (Morgan et al., 1991; Hamby, 1992; Shackelford et al., 1997). A su vez, la selección genética tradicional para mejorar esta característica resulta muy difícil ya que sólo se puede coleccionar datos fenotípicos del animal sacrificado (Geesink et al., 2006). La selección de animales basándose en marcadores moleculares asociados a tan importante característica podría representar una ruta alterna, y una herramienta adicional a los esquemas normalmente utilizados en la producción animal (White et al., 2005).

La terneza de la carne puede ser afectada por un sinnúmero de factores ambientales, sin embargo, la genética juega un papel de importancia fundamental (Shackelford et al., 1994). Se han identificado regiones en el genoma bovino que influyen en la terneza de la carne (Smith et al., 2001). Mediante el análisis de loci para características cuantitativas (QTL por sus siglas en inglés) se encontraron dos regiones asociadas con variaciones en la terneza de la carne: una en el cromosoma 7 (BTA 7 por sus siglas en inglés; Keele et al., 1999) y otra en la región telomérica del BTA 29 (Casas et al. 2000; Smith et al., 2001). En la región del QTL del BTA 7 se encuentra el gen de μ -calpaina (*CAPN1*) y en el BTA 29 el de *calpastatina* (*CAST*). Posteriormente se han identificado diversos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP por sus siglas en inglés) en dichos genes los cuales pueden provocar diferencias en cuanto al grado de terneza de la carne de bovinos (Page et al., 2002, Page et al., 2004, White et al., 2005, Casas et al., 2006). Sin embargo estudios similares no han sido realizados en el trópico. Por lo tanto el objetivo de este estudio fue determinar la segregación de dos

SNP en *CAPN1* y uno en *CAST* dentro de las principales razas de bovinos utilizadas en Puerto Rico para la producción de carne.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de sangre de animales de las razas Senepol, Brahman, Charoláis, Angus, Charbray, Cebú y sus cruces (Figura 2.1) vía vena coccigea en diferentes fincas de Puerto Rico (Figura 2.2). El número total de animales colectados de cada raza y sus fincas de procedencia se presenta en la Tabla 2.1.

2.4.1. Colección de sangre

Se colectaron 8.0 ml de sangre por animal (Figura 2.3). De esta cantidad se destinaron 300 μ l al método de extracción de ácido desoxirribonucleico utilizando el “Aquapure DNA Isolation Kit” (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). El resto de la sangre colectada fue sometida a extracción de células blancas (“buffy cotas”). Esta última se almacenó en un ultra-congelador a temperaturas menores de -50°C para análisis futuros.

2.4.2. Condiciones de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las regiones donde se localizan los diferentes SNP fueron amplificadas utilizando PCR según descrito por White et al. (2005) y Casas et al. (2006). La lista de iniciadores utilizados se presenta en la Tabla 2.2. Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en geles de 2% de agarosa utilizando el amortiguador 1X TBE y mediante visualización por tinción con bromuro de etidio. Estos luego se

fotografiaron utilizando Quality One® v 4.1 software en un sistema de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA).

2.4.3. Genotipificación de SNP en CAPN1 y CAST por medio de espectrometría en masa (MALDI)

Para identificar los genotipos de las regiones específicas 316 y 4751 del gen de *CAPN1* y el de *CAST*, las muestras se sometieron a espectrometría en masa (MALDI-TOF Mass Spectrometry; Figura 2.4), según Stone et al. (2005). Respecto a la primera y segunda región variable estudiada (*CAPN1*-316 y 4751 respectivamente), los SNP constan de una transverción de citosina (C) por guanina (G) y una transición de citosina (C) por timina (T), respectivamente. El SNP *CAST* consiste de una transición entre C/T.

2.4.4 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias en cuanto al equilibrio poblacional Hardy-Weinberg se utilizó la ecuación $p^2+2pq+q^2$, donde:

p^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

$2pq$ = frecuencia predicha para heterocigotos

q^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m

Las diferencias en frecuencias alélicas fue determinada utilizando la ecuación

de Chi cuadrado $\Sigma (E - O)^2 / E$, donde:

E = valor esperado

O = valor obtenido

2.5. RESULTADOS:

2.5.1. Segregación global de polimorfismos de CAPN1

Para *CAPN1*-316 se observó que la frecuencia del genotipo CC fue de solamente 7.00% de la población global (n=219; Figura 2.5). En cambio los genotipos CG y GG constituyeron el 55.00 y 38.00% de los animales, respectivamente. El alelo C constituyó el 26% del total mientras que el G formó 74% (Figura 2.6). La distribución alelica se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2 P = 0.99$).

En el análisis de *CAPN1*-4751 se observó que la frecuencia genotípica para CC, CT y TT fue 17.00, 45.00 y 38.00%, respectivamente (Figura 2.7). Los animales que presentaron el alelo C representaron el 39.00% de la población total (n=256), mientras que los T constituyeron el 61.00% (Figura 2.8). Al igual que el marcador anterior, *CAPN1*-4751 también se encontró en equilibrio ($X^2 P = 0.11$).

2.5.2. Segregación por raza de SNP en CAPN1

Para *CAPN1*-316, se observó el genotipo CC solamente en la raza Senepol y en animales cruzados (Figura 2.9). En estos grupos el genotipo CC tuvo una frecuencia de 23.00% y 5.00%, respectivamente, y el genotipo CG fue el más frecuente (50.00 y 49.00% respectivamente). Para las razas Charbray, Charolais, Brahman y animales Cebú el genotipo más frecuente fue el GG (Figuras 2.10 - 2.12). Por el contrario, en la raza Angus la frecuencia genotípica de CG y GG fue similar. Los animales Brahman y Cebú no presentaron el genotipo CC en la región (Figura 2.11) y la frecuencia genotípica para la sustitución CG fue mayor en las razas Charbray, Senepol, Angus, y

animales cruzados (Figuras 2.10 - 2.12). Sin embargo, en la raza Brahman y Cebú, el genotipo observado con mayor frecuencia fue el GG con un 91.00 y 85.00%, respectivamente (Figura 2.10).

En cuanto a *CAPN1-4751*, para las razas Charolais, Senepol y Angus, se observó que existe una mayor frecuencia de animales con el genotipo CT (Figura 2.12). La frecuencia del genotipo CC en los animales Charolais y Angus fue de 18.00%, mientras que en Senepol se observó un mayor nivel (32.00%). En los animales *Bos indicus* (Brahman y Cebú) no se observó el genotipo CC, mientras que el TT se encontró en mayor proporción (82.00% y 53.00%, respectivamente) que el genotipo CT (Figura 2.13). Todos los genotipos fueron observados en los toros Charbray y Cruces (Figura 2.14). Sin embargo, los animales cruzados presentaron una mayor proporción del genotipo CT, mientras que en los Charbray el genotipo TT fue el más observado.

2.5.3. Segregación de SNP en CAST

Para *CAST* se observó una frecuencia genotípica global para CC de 4.00% (Figura 2.15). Los genotipos CT y TT abarcaron el 26.00 y 70.00 % de los animales, respectivamente. Según la Figura 2.16, el alelo C constó de 17.00% mientras que el T de 83.00%. La distribución de alelos se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2P = 0.73$).

2.5.4. Segregación de SNP por raza en CAST

Con respecto al marcador *CAST*, no se observó el genotipo CC en las razas Charolais, Angus y Brahman, mientras que el genotipo más común en este estudio fue el TT que se observó en las razas y cruces (Figuras 2.17 – 2.18). Solamente en los toros cruzados, en los Senepol, Cebú y Charbray el genotipo CC fue observado (Figuras 2.17 – 2.19).

2.6. DISCUSIÓN:

Los objetivos del presente estudio fueron determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST* en toros para carne de Puerto Rico.

El sistema de calpainas/calpastatina juega un papel importante a nivel molecular en la diferenciación celular y en la degradación de proteínas musculares (Van den Maagdenberg et al., 2007). Estas proteínas están envueltas en la regulación de la miogenénesis y se ha propuesto que la relación μ -*CAPN1/CAST* se halla en estrecha relación con la degradación de proteínas de la membrana celular durante la fusión de los mioblastos al formarse el miotubo y de células satélites (Moyen et al., 2004). En adición, la acción del sistema de *CAPN1/CAST* es de suma importancia en el crecimiento muscular ya que sería responsable del balance existente entre la síntesis y la degradación de proteínas en la miofibrilla (Van den Maagdenbeg et al., 2007).

Los polimorfismos estudiados en el presente trabajo fueron previamente asociados con diferencias en terneza de la carne, y propuestos como indicadores exclusivos de dicha característica (Casas et al., 2006). Sin embargo, el sistema

CAPN1/CAST está ligado a diversos factores los cuales regulan el crecimiento y desarrollo celular en etapas pre- y post-natales (Casas et al., 2006; Chung et al., 2007; Van den Maagdenberg et al., 2007). En un estudio realizado en Argentina por Miquel et al. (2007) se encontró que el SNP *CAPN1*-316 estuvo relacionado con variaciones para las características de ganancia en peso vivo y peso a la matanza en animales de las razas Angus y Brangus criados a pastoreo y sacrificados a un espesor de grasa dorsal promedio de 6.0 mm.

En los estudios de Page et al. (2002 y 2004), White et al. (2005) y Casas et al. (2005 y 2006) se identificaron SNP que afectan la morfología de la proteína de *CAPN1* de tal modo que su acción podría variar a medida que cambia la base nitrogenada. Page et al. (2004) describieron dos SNP responsables de variación en actividad del gen de μ -calpaina. El primero se denominó *CAPN1*-316 debido a que provoca un cambio en el aminoácido # 316 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transversión consta de la sustitución de bases C/G, que a su vez se traduce en un cambio de glicina por alanina. El segundo SNP de importancia se denominó *CAPN1*-530 puesto que afecta la identidad del amino ácido 530 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transición de A/G se traduce en un cambio de valina por isoleucina según White et al. (2005). Ambos polimorfismos han sido intensamente estudiados en varias poblaciones y subespecies bovinas (White et al., 2005). El resultado de estas investigaciones demuestra que *CAPN1*-316 se relaciona con variaciones en terneza de la carne de todas las subespecies bovinas, mientras que *CAPN1*-530 ejerce un efecto similar solamente en el ganado *Bos taurus*.

Un tercer polimorfismo fue identificado en el gen de *CAPN1*. Este se denomina *CAPN1-4751* (Casas et al., 2006). Su nombre no lleva ninguna relación con la cadena polipeptídica de *CAPN1* a diferencia del caso de los dos SNP anteriores (White et al., 2005). Este polimorfismo se encuentra en el intrón # 17 de la región regulatoria de dicho gen. El mismo consta de una inserción/eliminación de C/T según Casas et al. (2006). Este SNP ha sido asociado con diferencias en el grado de ternura de la carne de para todas las subespecies bovinas incluyendo *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bubalis* (Bisonte de agua), *Bos bison* (Bisonte americano) y *Bos grunniens* (Yak) según White et al. (2005).

En este estudio se evaluaron las frecuencias de los genotipos de *CAPN1-316* y *CAPN1-4751* debido a su conocida actividad en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*. Previamente se habían asociado los genotipos CC de ambos marcadores como aquellos que predisponían al animal a producir carne más tierna (White et al., 2005; Casas et al., 2006). En Puerto Rico se observaron patrones de segregación similares a los reportados previamente, siendo el genotipo CC el menos frecuente para todas las razas muestreadas (Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2005; Van Eenaam et al., 2007), aunque se observó una cantidad considerable de animales heterocigotos para ambos SNP. Es interesante el hecho de que el genotipo CC fue observado con mayor frecuencia en los animales Senepol con respecto a las otras razas muestreadas. En el caso de *CAPN1-316*, esta raza fue la única que presentó todos los genotipos. Esto puede ser indicativo que dicha raza no tan solo presenta características favorables de tolerancia a las condiciones ambientales en el clima del trópico húmedo, resistencia a parásitos y un temperamento dócil, sino que también

presenta una predisposición genética para la producción de carne con perfiles de ternera aceptables.

El SNP encontrado en *CAST* se ubica en la región no traducible 3', según Barendse (2002). Este polimorfismo consta de una transición entre C/T. Previamente se había asociado el genotipo TT con la predisposición animal a un mayor grado de ternera (Casas et al., 2006). Dicho genotipo se encuentra en una alta proporción dentro de la población genotipificada en este estudio irrespectivamente de la raza, confirmando lo reportado por Casas et al. (2006) y Van Enennaam et al. (2007).

2.7. CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento revelaron los patrones de segregación de dos marcadores moleculares en *CAPN1* y uno en *CAST* de posible importancia económica en sistemas de producción de carne en Puerto Rico. Aunque estos se encuentran segregando en las razas bovinas de Puerto Rico, es interesante que el genotipo CC para ambos SNP en *CAPN1*, aunque fue el de menor frecuencia, ha sido asociado a mayor ternera de la carne. Este genotipo, para ambos SNP fue observado únicamente en la raza Senepol. Esta raza fue la única que presentó todos los SNP en *CAPN1* y *CAST* analizados en este estudio, lo que podría sugerir una mayor variabilidad genética y por ende, mayores posibilidades de selección. Sin embargo, se precisan estudios adicionales con mayor número de animales para caracterizar cada una de las razas en cuestión con una mayor exactitud. Sería deseable que nuevos muestreos incluyan razas predominantes en otros países e islas del Caribe donde las razas criollas podrían constituir un acervo genético interesante.

2.8 REFERENCIAS:

- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Casas, E., S.D. Shackelford, J.W. Keele, R.T. Stone, S.M. Kappes, y M. Koohmaraie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78: 560.
- Casas, E., S.N. White, D.G. Riley, T.P.L. Smith, R.A. Brenneman, T.A. Olson, D.D. Johnson, S.W. Coleman, G.L. Bennett, y C.C. Chase, Jr. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83:13.
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr., D.D. Johnson, y T.P.L. Smith. 2006. Effects of *calpastatin* and μ -*calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Chung H., B. Choi, G. Jang, K. Lee, H. Kim, S. Yoon, S. Im, M. Davis, y H. Hines. 2007. Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *J. Appl. Genet.* 48:61.
- Geesink, G.H., S. Kuchay, A.H. Chishti, y M. Koohmaraie. 2006. A-Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834.
- Hamby, P. 1992. Palatability problems in restaurant beef. In: G. C. Smith (Ed.) *The Final Report of the National Beef Quality Audit-1991*. Colorado State Univ., Fort Collins and Texas A&M Univ., College Station.
- Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Koohmaraie, y R. T. Stone. 1999. A region on bovine chromosome 15 influences beef *longissimus* tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 77: 1364.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36: 93.
- Miquel, M., E. Villareal, C. Mezzadra, L. Melucci, L. Soria, P. Corva, y A. Schor. 2007. Growth and carcass traits of steers on pasture discriminating genotypes of *CAPN1* 316 marker. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú. PB041.
- Morgan, J. B., R. K. Miller, F. M. Mendez, D. S. Hale, y J.W. Savell. 1991. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *J. Anim. Sci.* 69: 4469.

- Moyen C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 728.
- Page , B.T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele, y T.P.L. Smith. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 3077.
- Page, B.T., E. Casas, R.L. Quaas, R.M. Thallman, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, S.N. White, J.W. Keele, y 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.
- Shackelford, S.D., M. Koohmaraie, L.V. Cundiff, K.E. Gregory, G.A. Rohrer, y J.W. Savell. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857.
- Shackelford S.D., T.L. Wheeler, y M. Koohmaraie. 1997. Tenderness classification of beef: I. Evaluation of beef longissimus shear force at 1 or 2 days postmortem as a predictor of aged beef tenderness. *J. Anim. Sci.* 75: 2417.
- Smith T.P.L., F.A. Simmen, G. Zhao, y J.L. Vallet. 2001. Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. *J. Anim. Sci.* 79: 552.
- Stone, R.T., E. Casas, T.P.L. Smith, J.W. Keele, G. Harhay, G.L. Bennett, M. Koohmaraie, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, y W.M. Snelling. 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: Development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 83: 2280.
- Van Enennaam, A.L., J. Li, R. M. Thallman, R. L. Quaas, M. E. Dikeman, C. A. Gill, D. E. Franke, y M. G. Thomas. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891.
- Van den Maagdenberg, K., E. Claeys, A. Stinckens, N. Buys, y S. De Smet. 2007. Effect of age, muscle and insulin-like growth factor-II genotype in pigs on muscle proteolytic and lipolytic enzyme activities. *J. Anim. Sci.* 10: 2527.
- White, S.N., E. Casas, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase, Jr., D.D. Johnson, J.W. Keele, y T.P.L. Smith. 1995. 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.



Figura 2.1. Razas de animales muestreados para la fase I. Las razas utilizadas fueron Senepol, Charolais, Cebú, Angus, Brahman, Charbray y animales cruces (no ilustrados).



Figura 2.2. Localización de las fincas utilizadas en el estudio (n=9). Estas se encuentran en las zonas oeste, sur, sureste, noroeste, norte y central de Puerto Rico.

Tabla 2.1. Distribución por raza de animales y lugar de procedencia.

Raza	Número	Origen
Senepol	60	UPRM (Aguadilla y Corozal)
Charolais	62	UPRM (Aguadilla y Corozal), Finca Agropecuaria Inc., Finca Ponce Fantauzzi, Finca Ruiz
Charbray	43	Finca Agropecuaria Inc., Finca Ponce Fantauzzi, Finca Altamira,
Brahman	19	Finca Ponce Fantauzzi, Finca Ruiz, Finca Agropecuaria Inc.
Angus	39	Finca Altamira, Hacienda Las Carolinas
Cebú	17	Finca Agropecuaria Inc.
Cruces	132	UPRM (Aguadilla y Corozal), Finca Agropecuaria Inc., Finca Ponce Fantauzzi, Finca Ruiz, Finca Altamira, Hacienda Las Carolinas
Total	372	



Figura 2.3. Colección de sangre vía vena coccigeal para extracción de ácido desoxirribonucleico y almacenamiento de leucocitos.

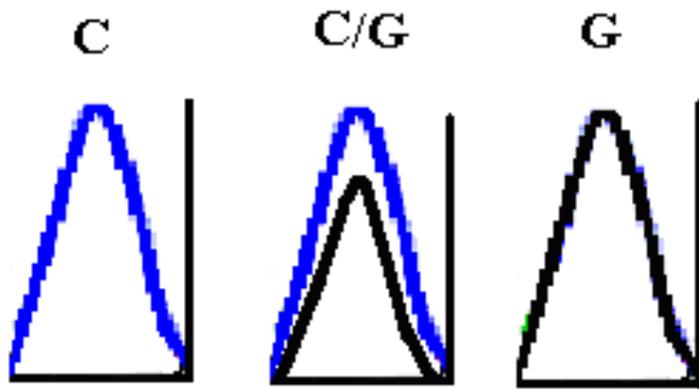
Tabla 2.2. Secuencia de iniciadores utilizados para la identificación de SNP en *CAPN1* y *CAST*.

Iniciador¹	Secuencia	Localización	Dirección
<i>CAPN1-316</i>	5'-GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT-3'	Exón 9	5' – 3'
<i>CAPN1-316</i>	5'-CCTTGCTGGCTAGAGACCAA-3'	Exón 9	3' – 5'
<i>CAPN1-4751</i>	5'-AAGGGACAGATGTGGACAGG-3'	Intrón 17	5' – 3'
<i>CAPN1-4751</i>	5'-GAGGGGTGTTCTCTGAGTGC-3'	Intrón 17	3' – 5'
<i>CAST</i>	5'-CATTGGAAAACGATGCCTCAC-3'	3'UTR ²	5' – 3'
<i>CAST</i>	5'-TCTACGATTAGCAGCTCAAGAGGAG-3'	3'UTR	3' – 5'

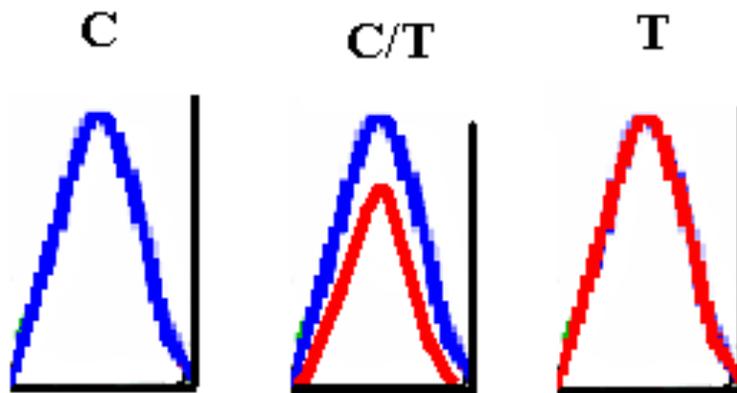
¹Secuencia de iniciadores según Page et al. (2002) y Barendse (2002).

²Región en el terminal tres primo del gen donde no ocurre traducción.

A. SNP *CAPN1*-316



B. SNP *CAPN1*-4751



C. SNP *CAST*

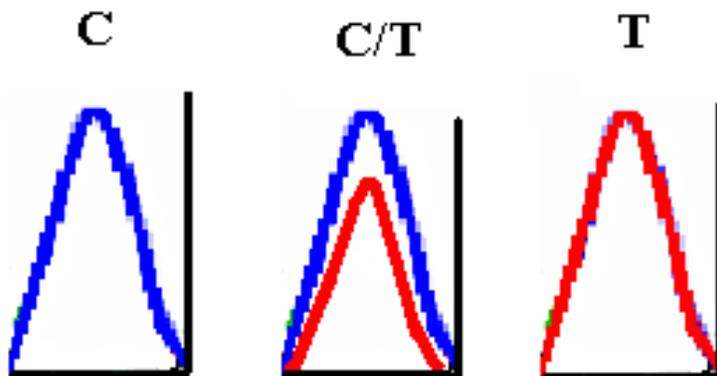


Figura 2.4. Regiones variables (genotipos de los SNP) de los genes *CAPN1* y *CAST*.

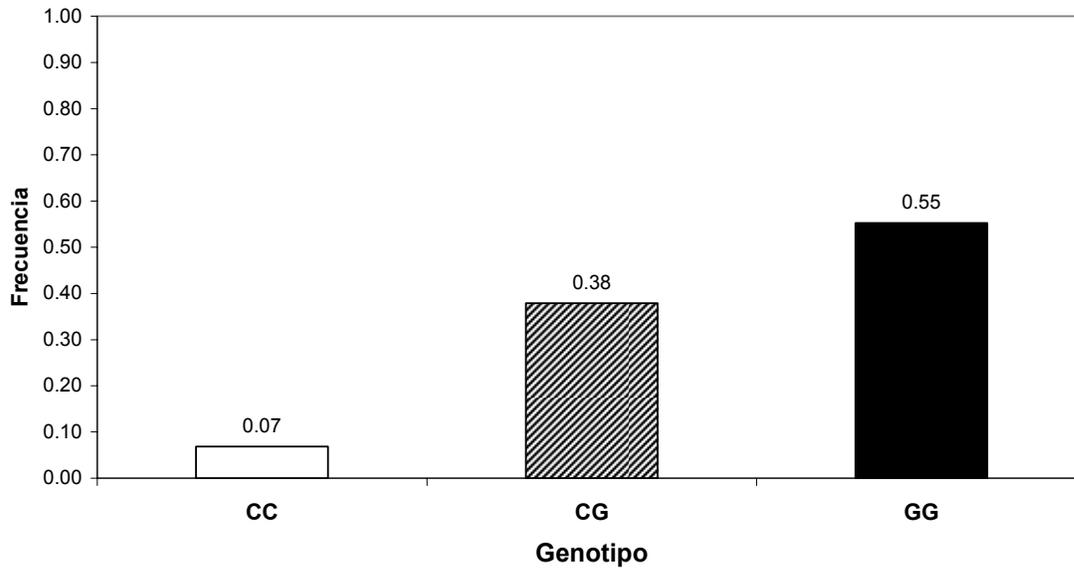


Figura 2.5. Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=219). El genotipo de mayor frecuencia fue el GG (55.00%) seguido por CG (38.00%), siendo el CC (7.00%) el menos común.

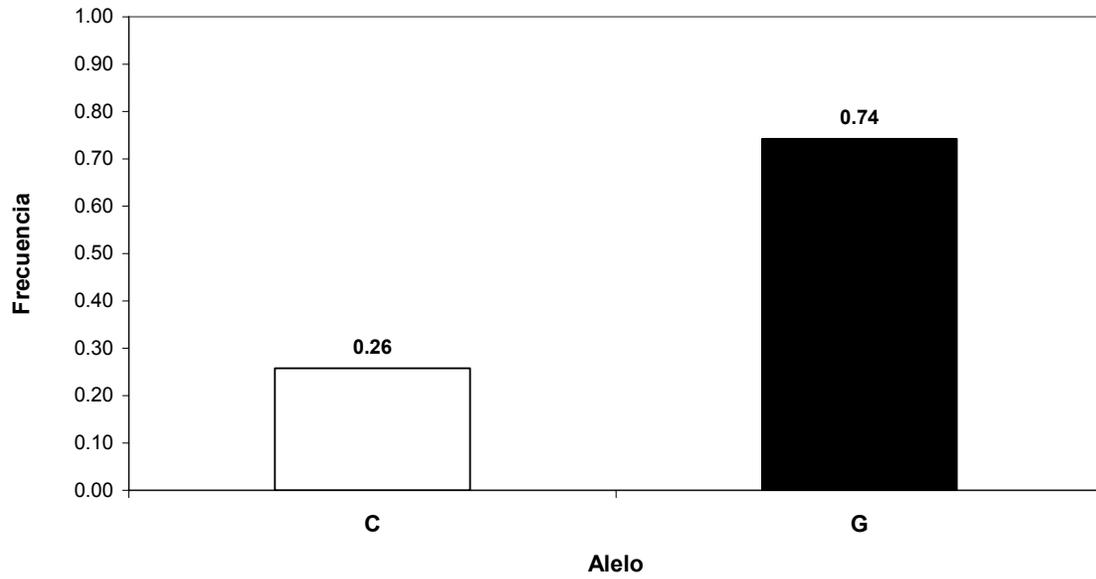


Figura 2.6. Frecuencia alélica global para el SNP *CAPN1*-316 (n=219). El alelo G (74.00%) se encontró en mayor frecuencia en la población muestreada ($X^2P = 0.99$).

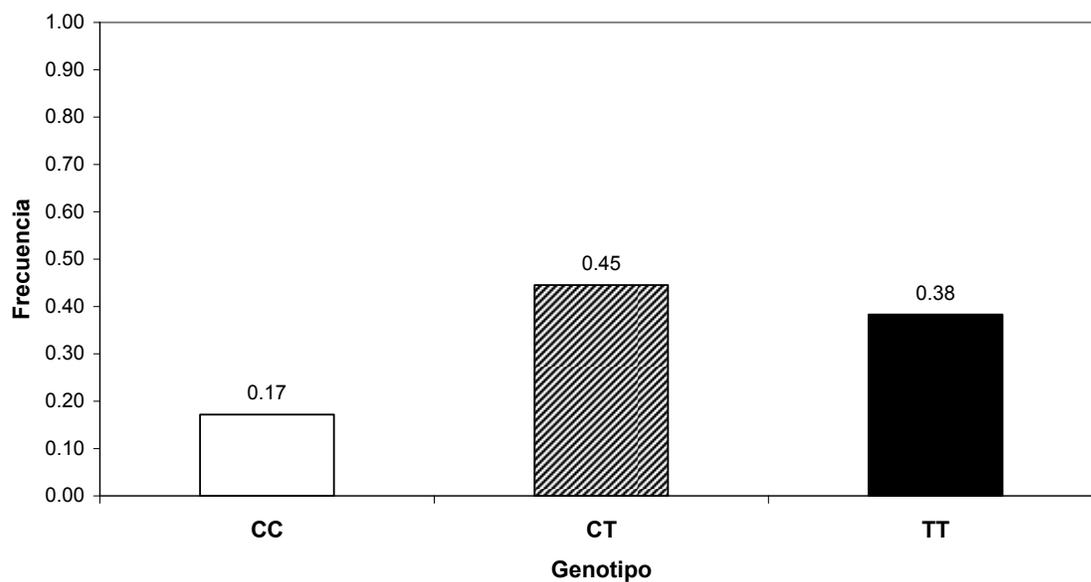


Figura 2.7. Frecuencia genotípica global para el SNP *CAPN1*-4751 (n=256). El genotipo CT (45.00%) fue catalogado como el de mayor frecuencia, seguido por el TT (38.00%), siendo el CC (17.00%) el menos común.

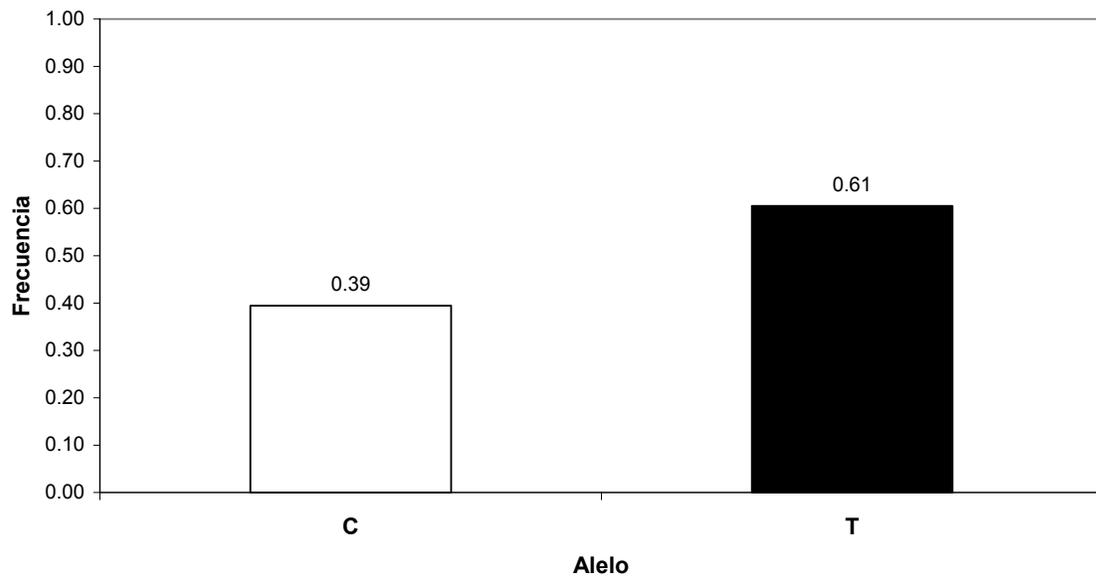


Figura 2.8. Frecuencia alélica global para el SNP *CAPN1*-4751 (n=256). El alelo T se encontró en el 61.00% de los animales muestreados, mientras que el C solo se encontró en un 39.00% ($X^2P = 0.11$).

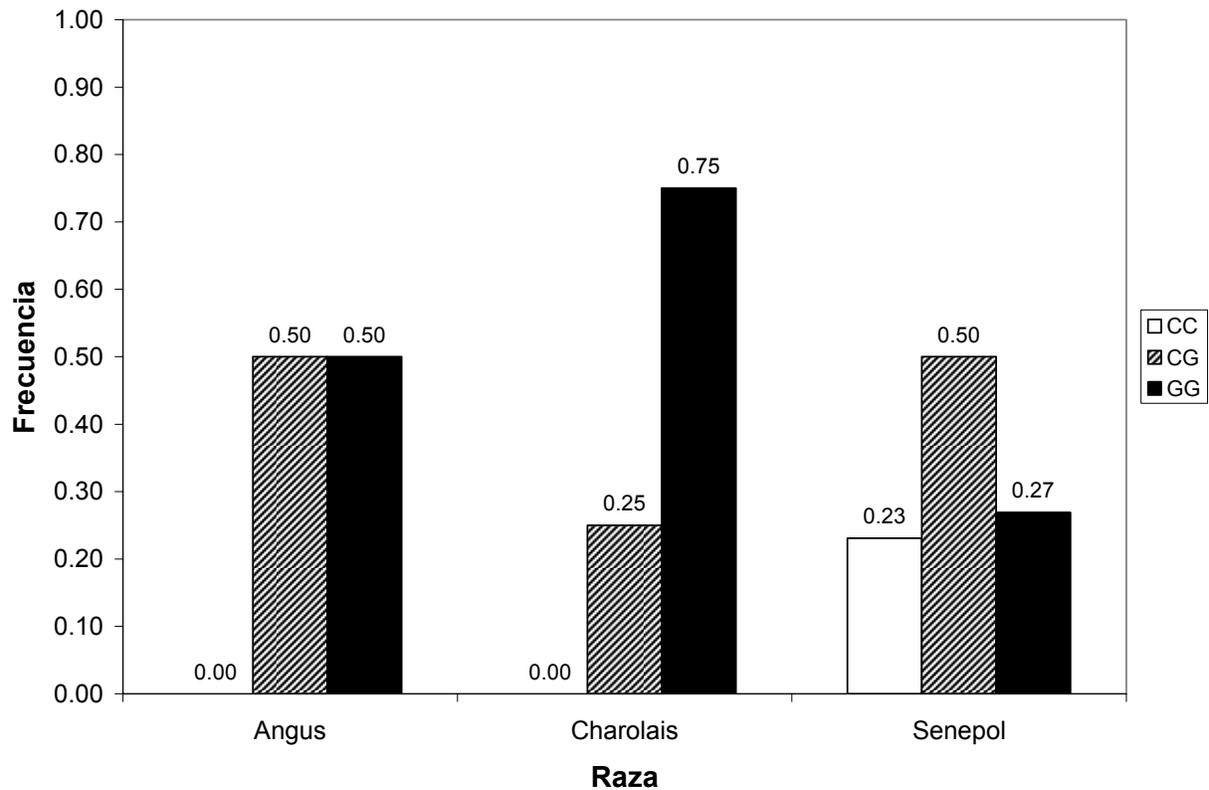


Figura 2.9. Frecuencia genotípica de *CAPN1-316* para razas *Bos taurus*. El genotipo CC fue observado únicamente en la raza Senepol (23.00%). En esta raza el genotipo dominante fue el CG (50.00%). Una frecuencia similar fue observada para el genotipo CG y el GG en la raza Angus (50.00%), mientras que el mismo fue el más frecuente en los animales de la raza Charolais (75.00%).

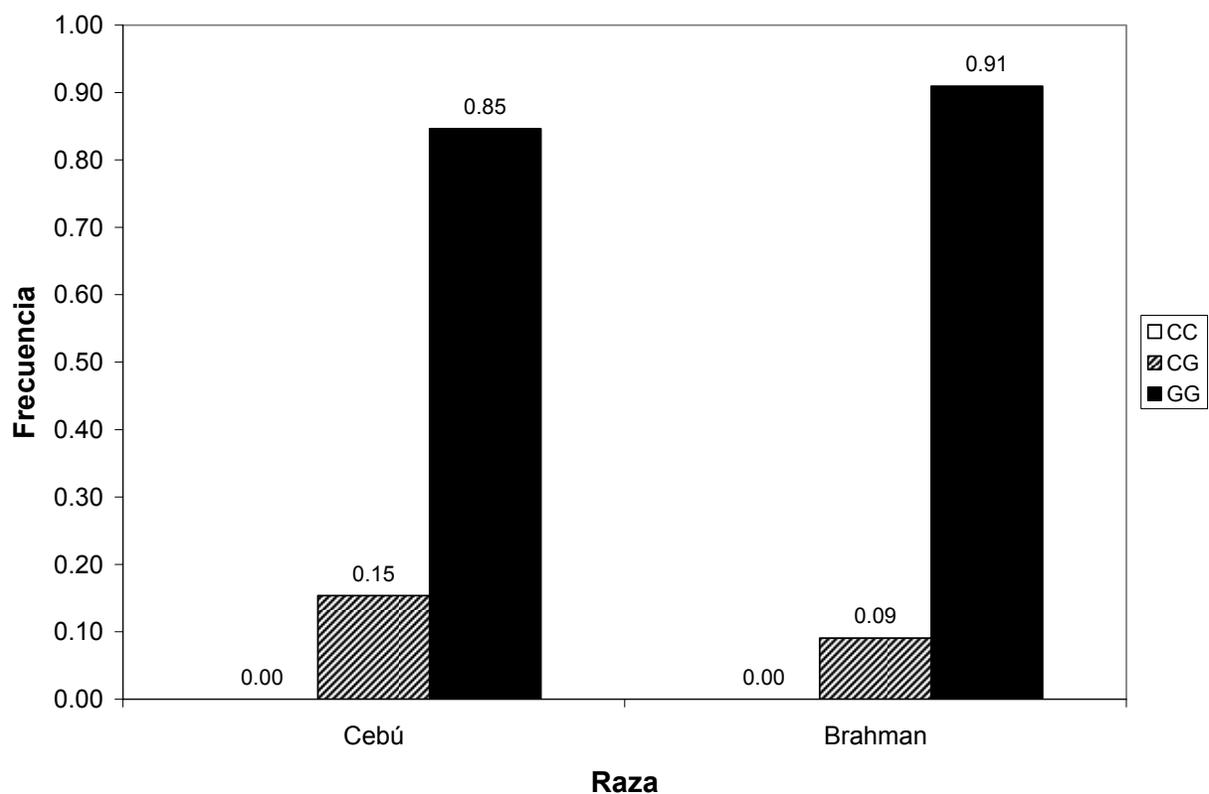


Figura 2.10. Frecuencia genotípica de *CAPN1-316* para razas *Bos indicus*. En ninguna de las dos razas muestreadas se observó el genotipo CC. La frecuencia de animales heterocigotos fue baja en las razas Brahman y en animales Cebú (9.00 y 15.00% respectivamente). Sin embargo frecuencias altas del genotipo GG (91.00 y 85.00% respectivamente) fueron encontradas en ambos grupos.

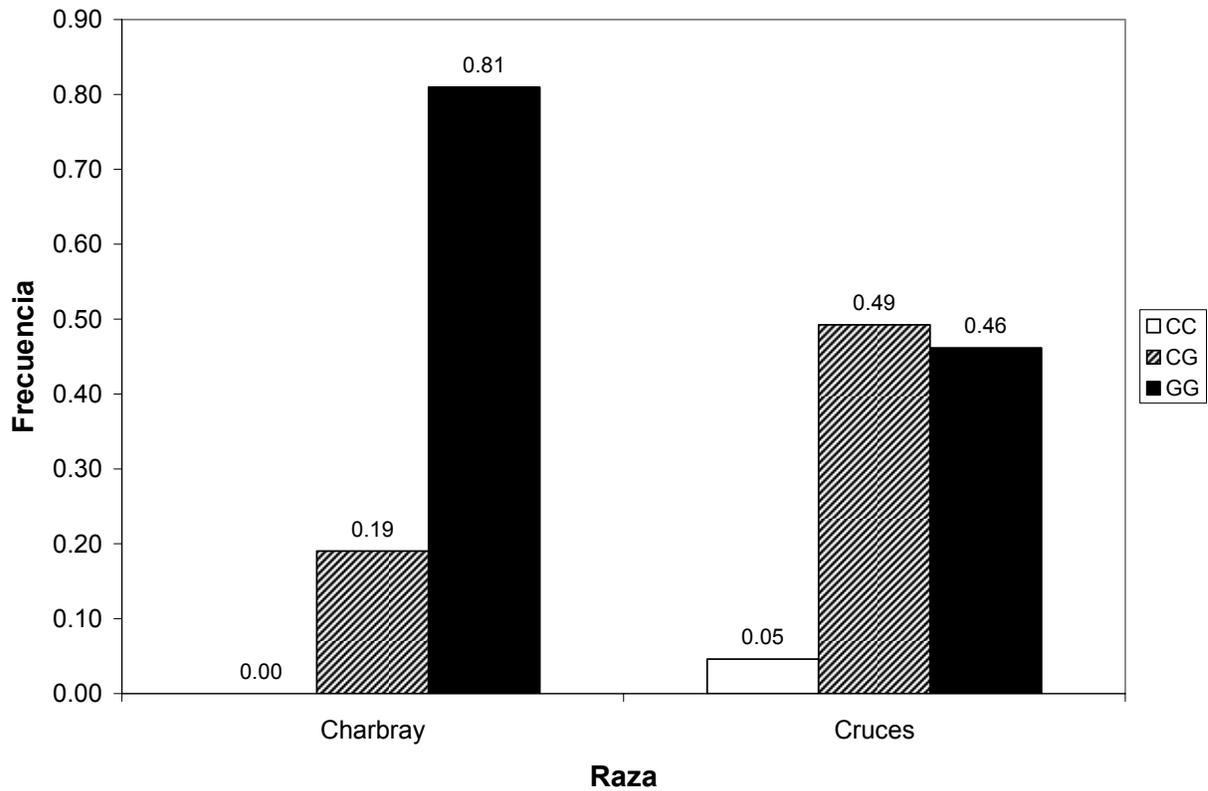


Figura 2.11. Frecuencia genotípica de *CAPN1-316* para toros cruzados y Charbray. En el grupo de animales cruces la frecuencia genotípica para CC fue de un 5.00%, mientras que no se observaron animales CC Charbray. Una frecuencia similar de animales CG y GG fue encontrada en la población de animales cruzados. El 81.00% de los animales Charbray portaban el genotipo GG, mientras que un 19.00% resultó ser heterocigoto.

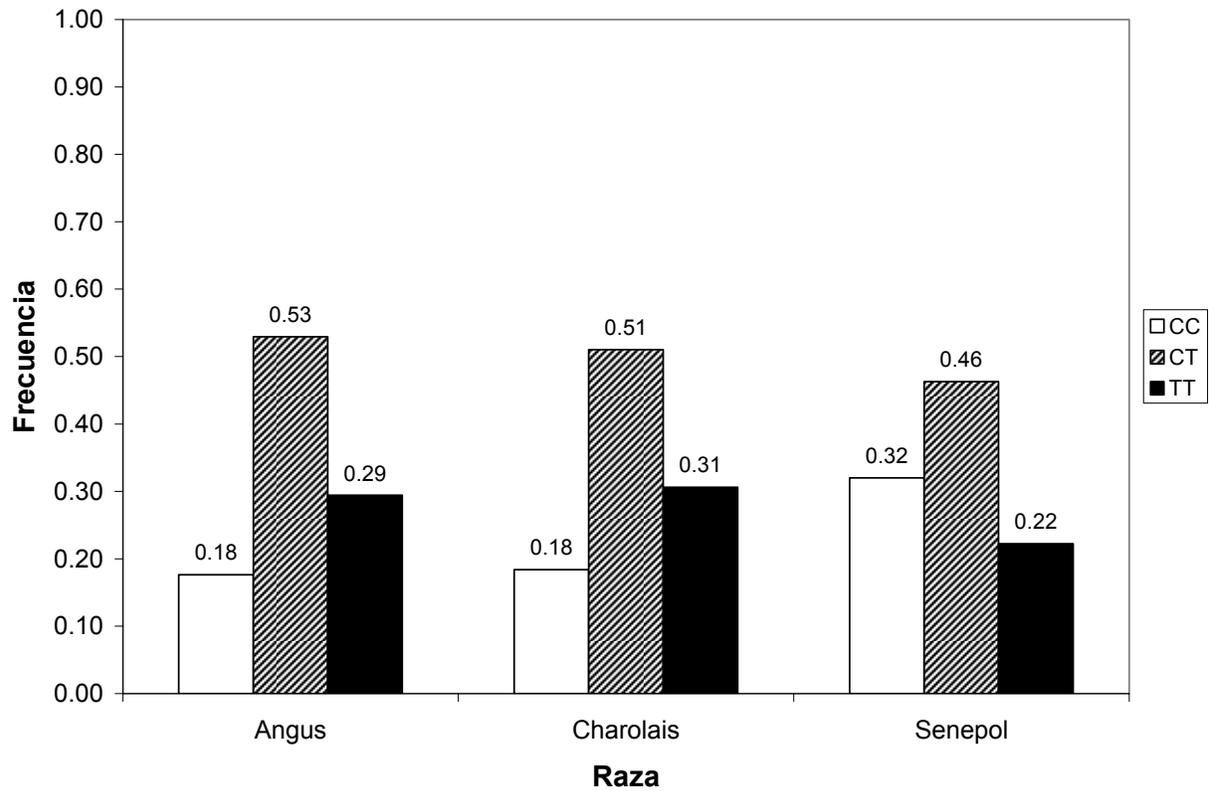


Figura 2.12. Frecuencia genotípica de *CAPN1-4751* para razas *Bos taurus*. En todas las razas, el genotipo CC fue observado, sin embargo fue más frecuente en la raza Senepol (32.00%). El genotipo más frecuente en todas las razas *Bos taurus* fue el CT. En las razas Charolais y Angus la frecuencia genotípica de GG fue de 32.00 y 29.00% respectivamente.

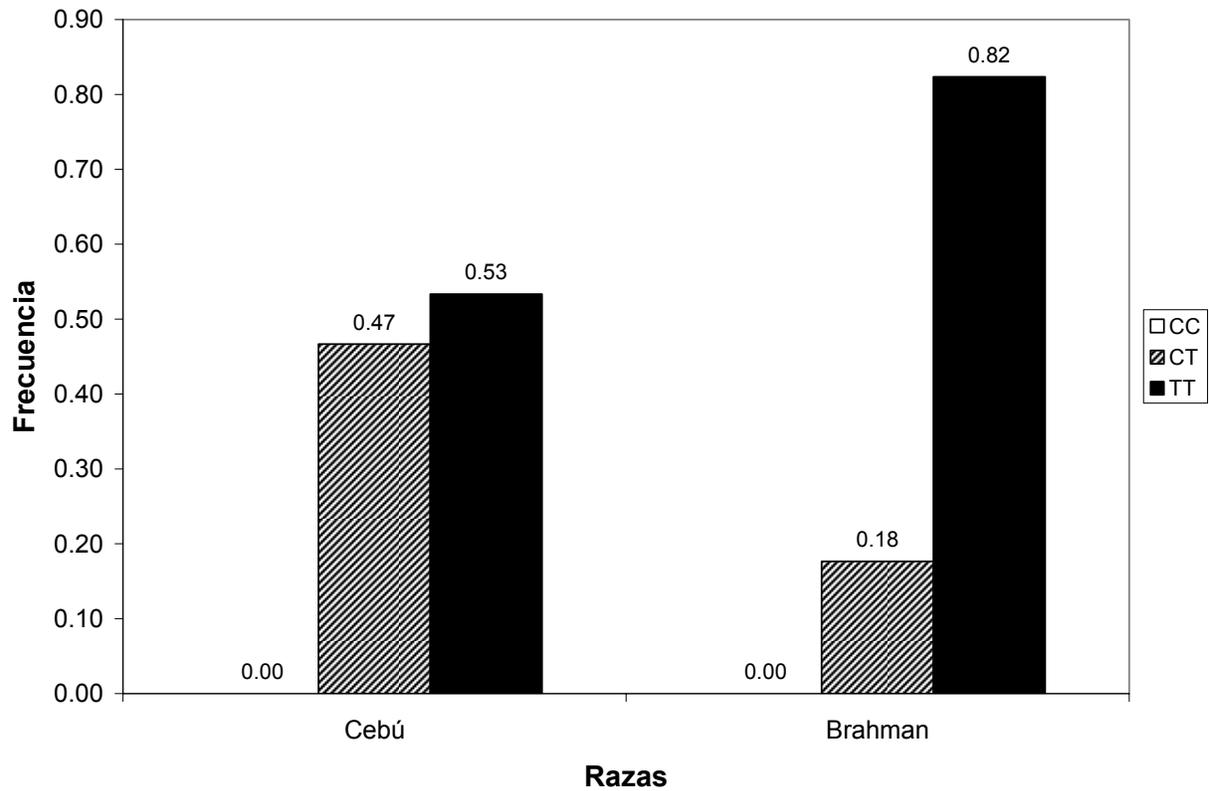


Figura 2.13. Frecuencia genotípica de *CAPN1-4751* para razas *Bos indicus*. En ninguna de estas razas se observó el genotipo CC. Sin embargo, valores similares de los genotipos CT y GG fueron observados en animales Cebú (47.00 y 53.00% respectivamente), mientras que en la raza Brahman la frecuencia de GG fue mucho más alta (82.00%).

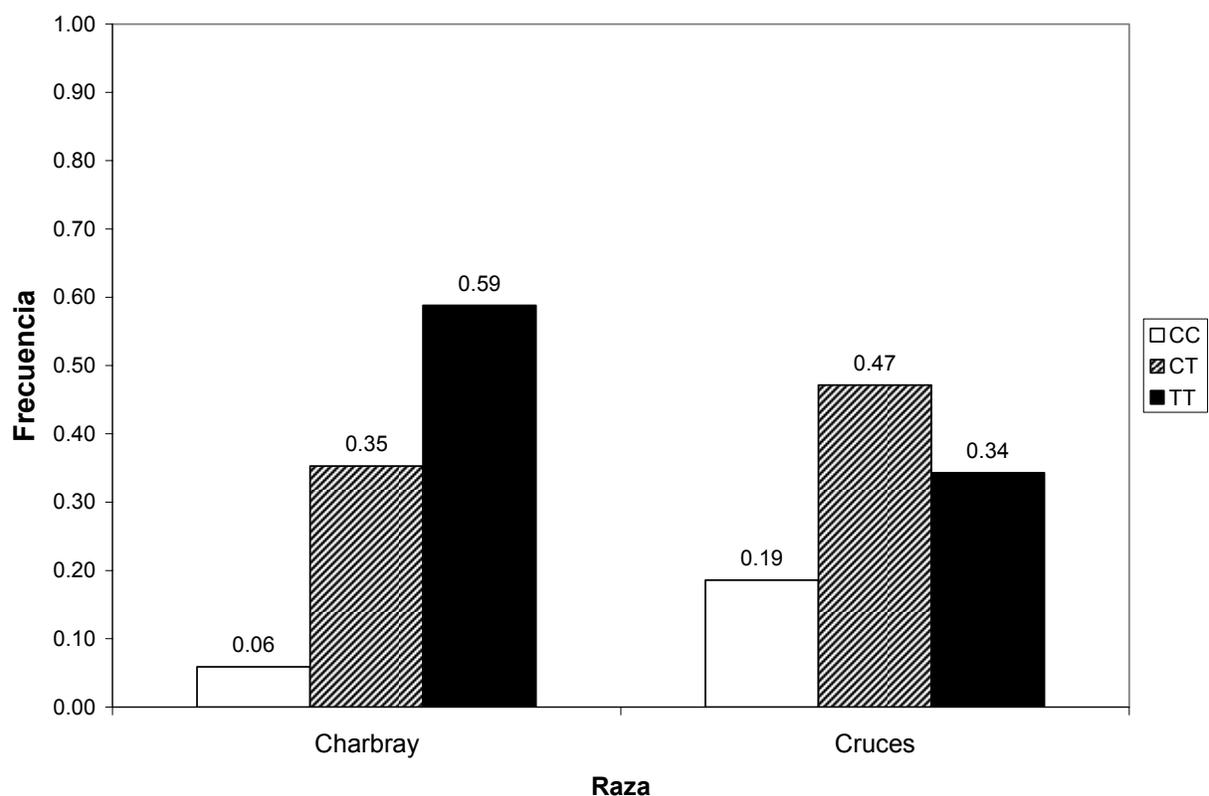


Figura 2.14. Frecuencia genotípica de *CAPN1-4751* para toros cruzados y Charbray. En ambos grupos de animales se observó el genotipo CC, pero en los animales cruzados su frecuencia alcanzó el 19.00%. En este mismo grupo, el 47.00% fue heterocigoto y el 34.00% fue homocigoto para G. En la raza Charbray la frecuencia de GG fue 59.00%.

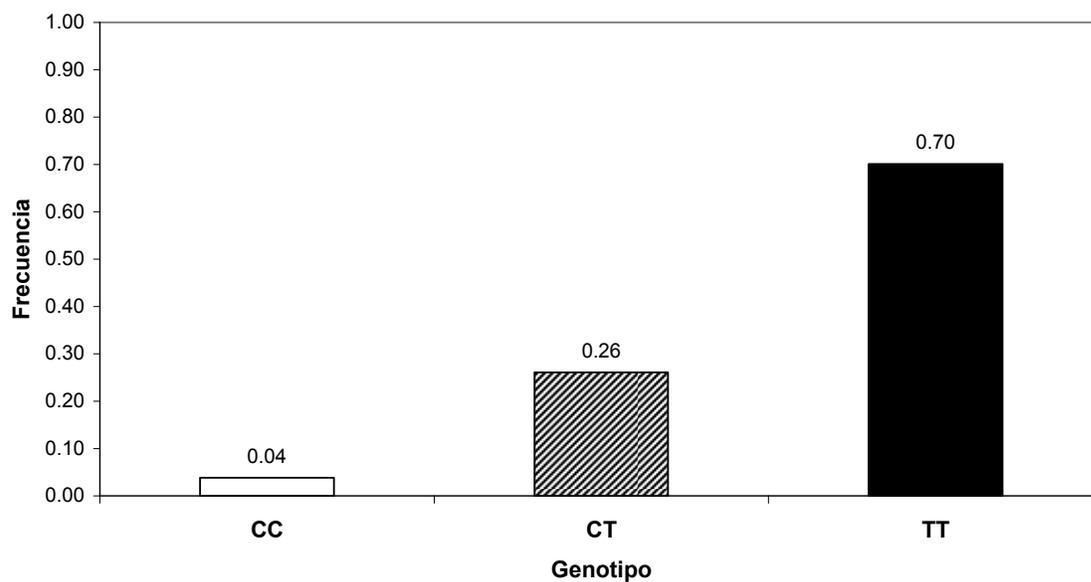


Figura 2.15. Frecuencia genotípica global para *CAST* (n=261). El genotipo más frecuentemente observado en la población muestreada fue TT (70.00%), seguido por CT (26.00%) mientras el de menor frecuencia fue el CC (4.00%).

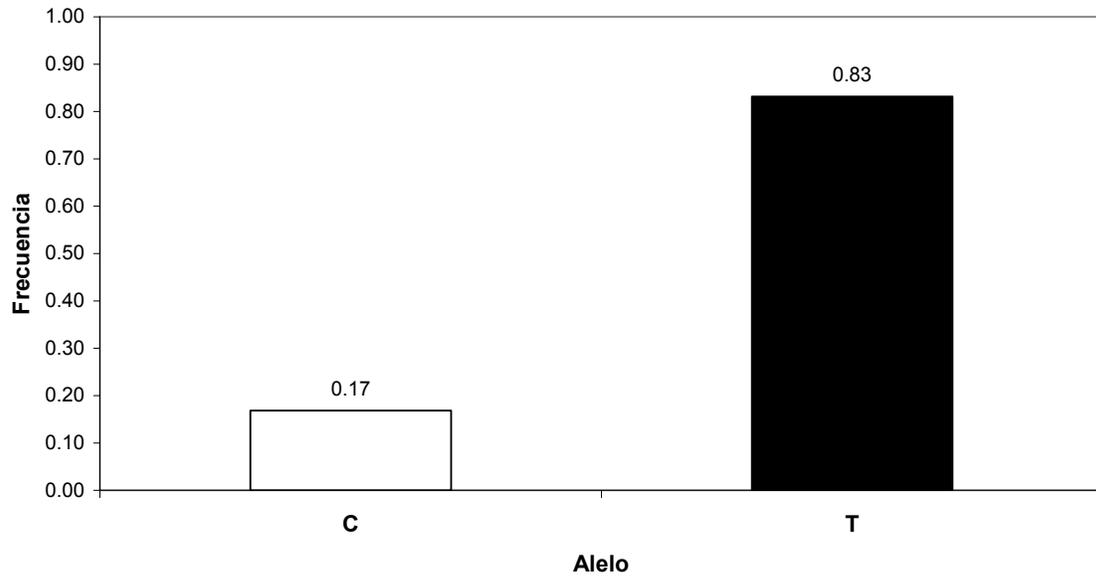


Figura 2.16. Frecuencia alélica global para *CAST* (n=261). El alelo de mayor frecuencia fue el T (83.00%) mientras que la frecuencia alélica para C fue de un 17.00% ($X^2P=0.72$).

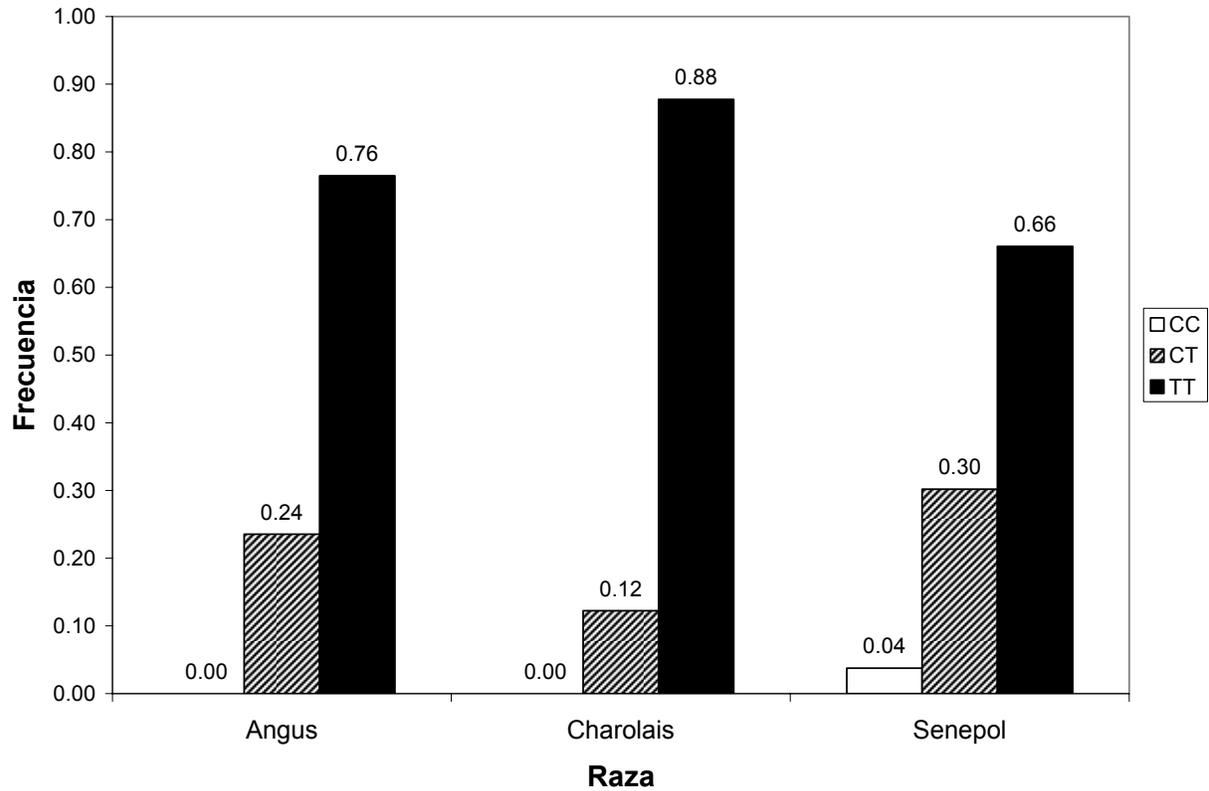


Figura 2.17. Frecuencia genotípica en las razas *Bos taurus* para CAST. El genotipo CC fue observado solamente en la raza Senepol (4.00%) y el TT fue encontrado con más frecuencia en todas las razas.

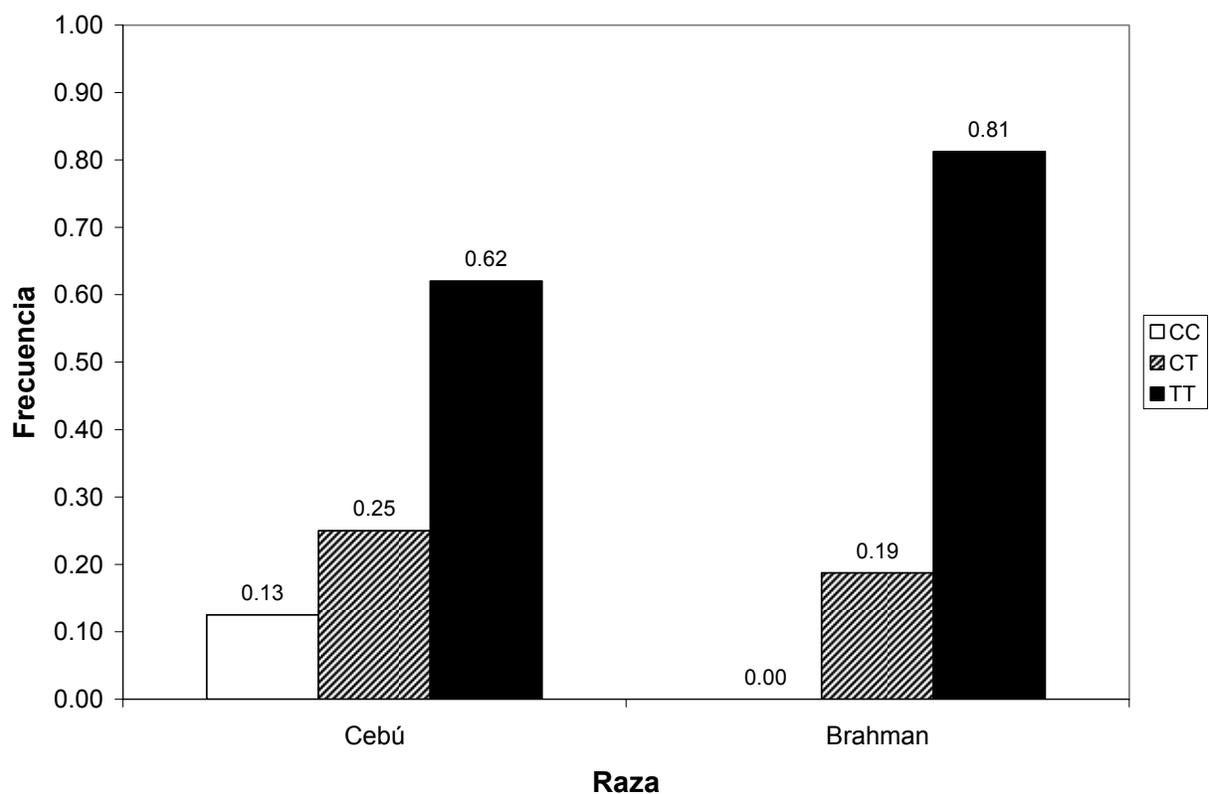


Figura 2.18. Frecuencia genotípica para *CAST* en las razas *Bos indicus*. Solamente en animales Cebú se encontró el genotipo CC (13.00%). Al igual que en las razas *Bos taurus*, el genotipo de mayor frecuencia fue el TT.

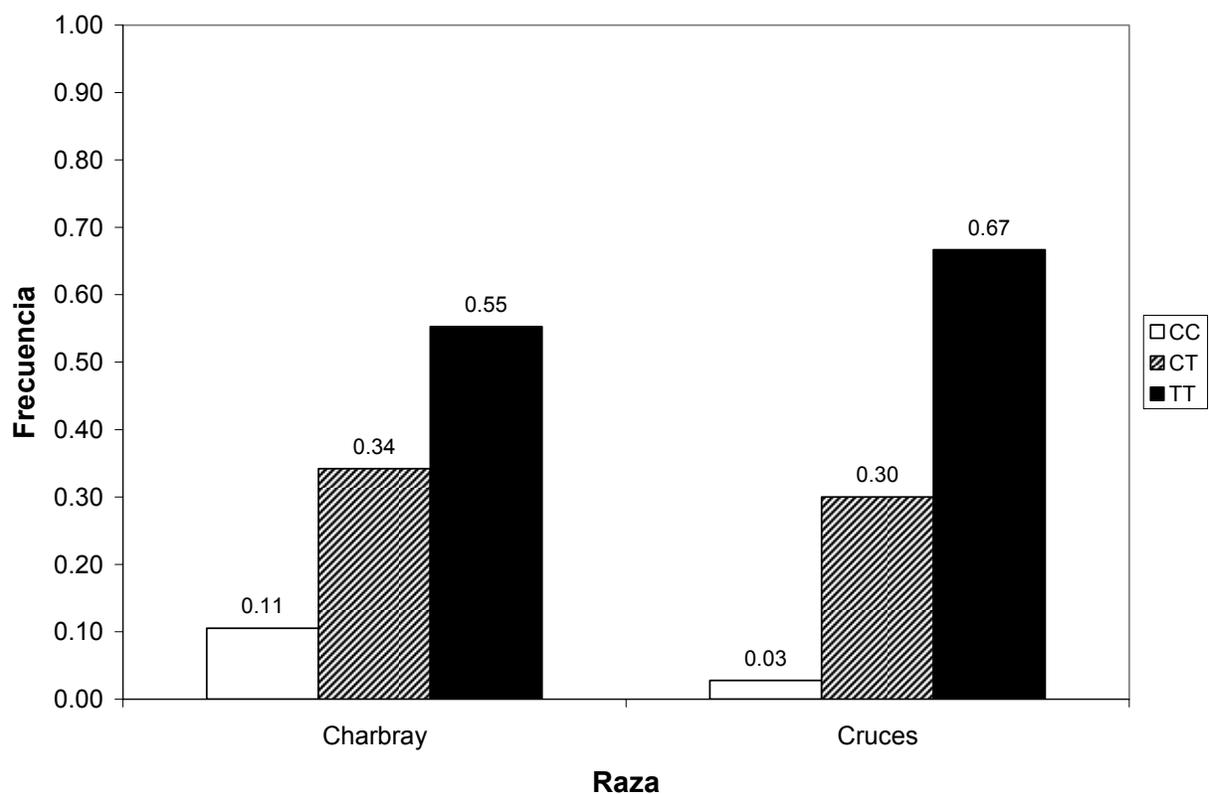


Figura 2.19. Frecuencia genotípica para *CAST* en animales Charbray y cruces. La frecuencia genotípica para el polimorfismo CC fue baja en ambos grupos de animales (3.00% cruces y 11.00% Charbray, respectivamente). Al igual que lo observado previamente, el genotipo de mayor frecuencia fue el TT para ambos grupos, mientras se observó una frecuencia similar para el genotipo heterocigoto (30.00 cruces y 34.00% Charbray, respectivamente).

CAPÍTULO TRES

EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN μ -CALPAINA Y CALPASTATINA EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN GANADO PARA CARNE EN PUERTO RICO

3.1. RESUMEN

Se evaluaron asociaciones entre polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en el gen de μ -calpaina (*CAPN1*-316 y *CAPN1*-4751) y en calpastatina (*CAST*) con características de crecimiento en un grupo de toros Senepol, Charolais y Senepol \times Charolais (n=99). En otro estudio se buscaron asociaciones entre estos SNP con características de canal y de calidad de la carne de 42 animales sometidos a tres tratamientos dietéticos. El SNP *CAPN1*-316 estuvo asociado con tasa de ganancia en peso y peso vivo estimado a los 205 y 240 d, y con edad al destete, siendo animales del genotipo CG más pesados, presentaron mayor ganancia en peso, y fueron más jóvenes al destete que los GG. Este último genotipo presentó músculos *Biceps femoris*, *Semitendinosus*, y *Gluteus spp.* más pesados, sin embargo, los animales CG tuvieron mayor área del músculo *Longissimus dorsi*. El SNP *CAPN1*-4751 se asoció con el peso al nacimiento, peso del músculo *Longissimus dorsi* y relación músculo a hueso, siendo los animales TT superiores a los CT. Los alelos C de *CAPN1*-316 y *CAPN1*-4751 fueron asociados con diferencias encontradas en cuanto a la terneza de la carne a 0 d *postmortem*. Para el SNP de *CAST*, ninguna asociación fue observada. Los resultados de este estudio destacan el hallazgo de que la sustitución de nucleótidos en el gen de *CAPN1* da lugar a diferencias en crecimiento somático del ganado bovino seleccionado para producción de carne en Puerto Rico.

3.2. ABSTRACT

The association between single nucleotide polymorphisms (SNP) in the μ -calpain (*CAPN1*-316 and *CAPN1*-4751) and calpastatin (*CAST*) genes with growth traits were evaluated in a population of Senepol, Charolais and Senepol×Charolais bulls (n=99). In another study, associations were evaluated between these SNP and carcass traits of a subgroup of 42 animals that were submitted to three dietary treatments. The SNP *CAPN1*-316 was associated with daily weight gain at d 205 and 240, and with weaning age, where CG animals were heavier, presented better weight gain, and were younger at weaning than GG. The latter presented heavier *Biceps femoris*, *Semitendinosus*, y *Gluteus spp.* muscles, but CG animals had a superior *Longissimus dorsi* area. *CAPN1*-4751 was related with birth weight, *Longissimus dorsi* weight, and with muscle to bone ratio, which for these traits the TT genotype was superior to the CT genotype. *CAPN1*-316 and *CAPN1*-4751 C alleles were found to be correlated with differences found in meat tenderness measured at 0 d *postmortem*. The *CAST* SNP was not found to be associated with any of the traits evaluated in this experiment. From our results, we find that the nucleotide substitution in *CAPN1* gene can produce differences in somatic growth in young bulls selected for beef production in Puerto Rico.

3.3. INTRODUCCIÓN

La venta de carne con perfiles de terneza inaceptable para el público consumidor ha perjudicado la industria de producción de carne de res en los Estados Unidos (Wheeler et al., 1994). Este problema es más marcado al tratarse de animales productos de cruces con *Bos indicus* (Keele et al., 1999). Durante las primeras 24 h *postmortem* el músculo se vuelve rígido, pero subsiguientemente esta etapa concluye y la carne comienza un proceso de enternecimiento (Veiseth et al., 2004; Camou et al., 2007). Sin embargo, en este proceso se observa gran variabilidad en el ganado bovino (Veiseth et al., 2004).

La evidencia disponible indica que el sistema de calpainas/calpastatina es el principal responsable del desarrollo de la terneza de la carne *postmortem* (Koochmarie et al., 1994; Goll et al., 1999; Casas et al., 2006). Es un hecho bien establecido que μ -calpaina (*CAPN1*) juega un papel importante en el proceso de degradación de proteínas miofibrilares en el músculo durante el almacenamiento *postmortem*, en el cual se observa una mejora en el grado de terneza de la carne (Geezink et al., 2000; Koochmaraie et al., 2002; Goll, 2007). También se han identificado diversos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) los cuales pueden provocar diferencias en cuanto al grado de terneza de carne bovina posiblemente en asociación a cambios en la actividad enzimática de estas proteasas (Page et al., 2002; Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006).

El gen de calpastatina (*CAST*), inhibidor natural de *CAPN1*, posee diversos marcadores moleculares los cuales modulan su función (Barendse, 2002; Casas et al., 2006). Estudios previos (Barendse, 2002; Page et al., 2002; Page et al., 2004; White et

al., 2005; Casas et al., 2006) han evaluado diversos marcadores en los genes de *CAST* y *CAPN1*. En estos se han detectado asociaciones individuales entre los SNP encontrados en *CAST* y *CAPN1* con el grado de terneza de la carne de bovinos en razas de clima templado y frío (Casas et al., 2006). Sin embargo, estudios similares no han sido realizados en el trópico.

Es por esto que el objetivo del presente estudio fue el de establecer asociaciones entre tres de los polimorfismos encontrados en el sistema de calpaina/calpastatina y diversas características de importancia económica para la población de ganado para carne de Puerto Rico.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron animales (n=99) de las razas Senepol, Charoláis, y Senepol×Charolais divididos en dos estudios. La fuente de animales para la primera fase (evaluación de la asociación de los SNP antes descritos con características de crecimiento pre-destete) fue el hato del Proyecto de Ganado de Carne del Departamento de Industria Pecuaria del Colegio de Ciencias Agrícolas (**CCA**) en Finca Montaña en Aguadilla, PR. Los animales de la segunda fase (evaluación de la asociación de los SNP antes descritos con características de la canal y calidad de la carne) provinieron de estudios de recría y ceba que se efectúan en el CCA-Estación Experimental Agrícola en Corozal, P.R.

3.4.1. Manejo y alimentación de los animales en la etapa de recría y ceba en Corozal, P. R.

Los animales utilizados en este estudio provinieron de un proyecto de investigación con suplementación al pastoreo de dos años que se efectuó en la Estación Experimental de Corozal, Puerto Rico, ubicada en la región montañosa, a una altura de 200 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura diaria promedio de 20 a 24° C a través del año, y una precipitación anual promedio de 1,524 a 2,034 mm. La crianza de los animales se llevó a cabo en un área de 14.57 ha de potreros cuya vegetación es una asociación de *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst var. *nlemfuensis*, *Eriochloa polystachya* H.B.K. y *Brachiaria purpurascens* Henr. Las pasturas recibieron fertilización sintética a razón de 73.38 kg/ha de una fórmula 15-5-10 (N-P-K) anualmente, dividida en dos aplicaciones (mayo y noviembre). Este proyecto de recría y ceba utilizó por año 48 becerros destetados de las razas Senepol, Charolais, y cruzas (Senepol x Charolais) de 9 meses de edad promedio. De ellos se evaluaron para el análisis de SNP 24 toretes nacidos entre febrero y abril de 2005 y otros 24 nacidos entre febrero y abril de 2006.

3.4.2. Tratamientos de suplementación nutricional del que se obtuvieron los toretes

Hubo tres tratamientos en un diseño de bloques completamente aleatorizados con dos replicaciones por tratamiento. En el control (T1), los animales tuvieron acceso a forraje de pastoreo como ración única y con una carga animal de 0.45 animales/ha). En el tratamiento de suplementación alimentaria moderada (T2), a los animales en pastoreo de 0.53/ha Esta suplementación estratégica (proteica/energética) empleó

afrecho de trigo. Este se ofreció a niveles crecientes progresivamente de 0.35 a 0.55% diario del peso vivo promedio a través del periodo experimental, resultando en consumos diarios de 1.0 a 2.63 kg/animal. En el tratamiento (T3) la suplementación fue de alto nivel y la carga animal a pastoreo aumentó a 0.61 animales/ha. En este caso también se procuraba una suplementación estratégica (proteica/energética) basada en afrecho de trigo. En el T3 se duplicó la cantidad de afrecho de trigo ofrecida relativo a la de T2, incrementando progresivamente el ofrecimiento de 0.35 a 1.2% del peso vivo promedio dando consumos diarios de 1.0 a 5.21 kg/animal a través de un período que terminó 60 d previos a la matanza. Durante los últimos 60 días, los animales en T3 recibieron una ración de cebsa compuesta por afrecho de trigo y maíz partido (14% proteína bruta) ofrecido a 80% de su consumo voluntario estimado equivalente a 2.2% del peso vivo diariamente (NRC, 1996), por lo cual se procuraba permitir que los animales consumieran como mínimo el restante 20% en forma de pasto durante esta etapa.

3.4.3. Colección de sangre para el análisis de polimorfismos de nucleótidos simples

Se colectaron 8.0 ml de sangre por animal (Figura 2.3) en los años 2005 y 2006. De esta cantidad se destinaron 300 μ l al método de extracción de ácido desoxirribonucleico utilizando el “Aquapure DNA Isolation Kit” (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA). El resto de la sangre colectada fue sometida a extracción de células blancas (“buffy coats”). Esta última se almacenó en un ultra-congelador a temperaturas menores de -50°C para análisis futuros.

3.4.4. Condiciones de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las regiones donde se localizan los diferentes SNP fueron amplificadas utilizando PCR según descrito por White et al. (2005) y Casas et al. (2006). La lista de iniciadores utilizados se presenta en la Tabla 2.2. Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en geles de 2% de agarosa utilizando el amortiguador 1X TBE y mediante visualización por tinción con bromuro de etidio. Estos luego se fotografiaron utilizando Quality One® v 4.1 software en un sistema de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA).

Las regiones variables estudiadas en *CAPN1* (*CAPN1*-316 y *CAPN1*-4751) fueron amplificadas por medio de varios iniciadores. En el caso de la región *CAPN1*-316 la secuencia de iniciadores fue la siguiente: 5'-GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT-3' y 5'-CCTTGCTGGCTAGAGACCAA-3' (Page et al., 2004). Los iniciadores utilizados para la amplificación de la región *CAPN1*-4751 fueron: 5'-AAGGGACAGATGTGGACAGG-3' y 5'-GAGGGGTGTTCTCTGAGTGC-3' (White et al., 2005).

Las regiones variables estudiadas en *CAST* se amplificaron por varios iniciadores. Para la región *CAST* se utilizaron los iniciadores con las siguientes secuencias: 5'-CATTTGGAAAACGATGCCTCAC-3' y 5'-TCTACGATTAGCAGCTCAAGAGGAG-3' (Barendse, 2002).

3.4.5. Genotipificación de SNP en *CAPN1* y *CAST* por medio de espectrometría en masa (MALDI)

Para identificar los genotipos de las regiones específicas 316 y 4751 del gen de *CAPN1* y el de *CAST* (Figura 2.4), las muestras se sometieron a espectrometría en masa (MALDI-TOF Mass Spectrometry), según Stone et al. (2005). Respecto a la

primera y segunda región variable estudiada (*CAPN1*-316 y 4751 respectivamente), los SNP constan de una transverción de citosina (C) por guanina (G) y una transición de citosina (C) por timina (T), respectivamente. El SNP *CAST* consiste de una transición entre C/T.

3.4.6. Análisis estadístico

Para evaluar la asociación entre los marcadores de *CAPN1* y *CAST* con características de importancia económica (Tabla 3.1; 3.2), se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de separación de medias de Tukey (SAS. 2000, Cary, NC).

Para las características de crecimiento pre-destete el modelo lineal utilizado fue:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + M_j + e_{ijk}, \text{ donde:}$$

y_{ijk} = observación k concerniente al tipo genético i (raza o cruce) y al genotipo j de *CAPN1* o *CAST*

μ = media total

G_i = tipo genético del animal

M_j = genotipo *CAPN1* o *CAST*

e_{ijk} = error experimental

El peso al nacimiento sirvió como covariable en este modelo.

Para las características de canal y calidad de carne el modelo lineal fue:

$$y_{ijklm} = \mu + G_i + M_j + T_k + B_l + MT_{jk} + e_{ijklm} \text{ donde:}$$

y_{ijklm} = observación m concerniente al tipo genético i (raza o cruce), al genotipo j de *CAPN1* o *CAST*, al tratamiento k , al Bloque l , y a la interacción de jk

μ = media total

G_i = tipo genético del animal

M_j = genotipo *CAPN1* o *CAST*

T_k = tratamiento de suplementación *k* anidado dentro del bloque *l*

B_l = bloque experimental

MT_{jk} = interacción del genotipo *j* con el tratamiento *k*

e_{ijklm} = error experimental

Dependiendo de la característica bajo evaluación se utilizó el peso del cuarto trasero izquierdo de la canal, contenido de grasa intramuscular, pérdida de líquido durante la cocción y edad a la matanza como covariables.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Asociación entre *CAPN1-316* y características de crecimiento y de carcasa

En la fase de crecimiento pre-destete, *CAPN1-316* estuvo relacionado al peso vivo estimado a los 205 y 240 d ($P < 0.05$; Tabla 3.3) donde animales de genotipo CG fueron más pesados que los GG. También se encontraron diferencias en ganancia en peso a los 205 y 240 d entre los genotipos del SNP *CAPN1-316*. Los animales con genotipo CG ganaron peso más rápidamente que sus contrapartes GG. El SNP *CAPN1-316* fue relacionado con diferencias la edad al destete, donde los animales GG fueron cronológicamente mayores que los CG. Para estas características el genotipo CC fue similar a los restantes genotipos ($P > 0.05$; Tabla 3.3).

En la fase de recría y ceba, el marcador *CAPN1-316* estuvo asociado con varias características de canal (Tabla 3.4). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$)

en el peso de los músculos: *Biceps femoris*, *Gastrocnemius*, *Semitendinosus* y *Gluteus spp.* (GG>CG). Lo contrario se observó para el peso de tejido de descarte y el área del músculo *Longissimus dorsi* ($P<0.05$). Debido a que en el presente estudio solamente se encontró un animal CC, las asociaciones entre este genotipo y las características estudiadas no fueron consideradas. No se detectó interacción entre los genotipos de *CAPN1-316* y los tratamientos de suplementación.

3.5.2. Asociación entre *CAPN1-4751* con características de crecimiento y carcasa

Se encontró que al nacimiento, toretes con el genotipo CT de *CAPN1-4751* fueron más livianos que el homocigoto TT ($P<0.05$; Tabla 3.5). Respecto al peso de canal fría y al de tejido de descarte, toretes con una copia del alelo T tuvieron mayores valores que los CC ($P<0.05$; Tabla 3.6). En adición, los animales CT presentaron pesos menores en el músculo *Longissimus dorsi* y una relación músculo a hueso más baja en comparación con los TT. Al mismo tiempo el porcentaje de hueso fue superior en los CT. No se encontró interacción entre los genotipos de *CAPN1-4751* y los tratamientos de suplementación.

3.5.3. Asociación entre *CAST* con características de crecimiento y de carcasa

No se encontró ninguna asociación entre el polimorfismo encontrado en *CAST* y las características de crecimiento o de la canal incluidas en este experimento ($P>0.05$; Tablas 3.7 y 3.8).

3.5.4. Asociación entre CAPN1 con la ternera de la carne

Se estableció una asociación entre el genotipo de *CAPN1*-316 y el valor de ternera de la carne determinado por Warner Bratzler (WB) al d 0 *postmortem* ($P < 0.05$), presentando el genotipo CG menor fuerza de corte que los GG (Tabla 3.9). Esta diferencia desapareció luego de un período de maduración de 14 d.

El panel de evaluación sensorial no encontró diferencias entre genotipos para la jugosidad, ternera y aceptabilidad en la carne expuesta o no a maduración *postmortem*. Sin embargo y en términos generales, el panel de probadores detectó que el período de maduración de 14 d mejoró la palatabilidad de la carne. Esto también se reflejó en la fuerza de corte WB. Lo mismo fue observado para *CAPN1*-4751, con la diferencia de que luego de 14 d de maduración, el genotipo CC fue catalogado por el panel sensorial como más tierno que el TT ($P < 0.05$; Tabla 3.10). Ninguna asociación fue establecida entre el marcador *CAST* y la data de panel sensorial y ternera por WB (Tabla 3.11).

3.6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue investigar posibles asociaciones entre los polimorfismos *CAPN1*-316, *CAPN1*-4751 y *CAST* con características de crecimiento, de la carcasa y calidad de la carne de toros para carne en Puerto Rico.

El sistema de CAPN/*CAST* ha sido implicado con diferencias en ternera de la carne (Koohmarie, 1994; Geesink et al., 1999a; Page et al., 2002 y 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006; Camou et al., 2007; Van Eenennaam et al., 2007). A nivel molecular las CAPN juegan un papel importante en la diferenciación celular y en la

degradación de proteínas musculares (Goll et al., 2007; Van den Maagdenberg et al., 2007). Estas proteasas están envueltas en la regulación de la miogénesis (Moyen et al., 2004), y se teoriza que la relación CAPN/CAST se encuentra estrechamente asociada a la degradación de proteínas de la membrana celular durante la fusión de las células satélites al formarse el miotubo (Dourdin et al., 1999). Por esto se estudia la acción del sistema de CAPN/CAST en el crecimiento muscular. Van den Maagdenbeg et al. (2007) afirmaron que el crecimiento muscular es el resultado de un balance positivo existente entre la síntesis y la degradación de proteínas en la miofibrilla.

En el presente estudio se observó una relación entre los SNP encontrados en el gen de *CAPN1* (*CAPN1*-316 y 4751) con diferentes características fenotípicas de crecimiento en toros de las principales razas para carne utilizadas en Puerto Rico. *CAPN1*-316 fue asociado con variaciones en ganancia en peso diaria a 205 y 240 d, peso estimado a los 205 d y la edad al destete de animales de razas Senepol, Charolais y sus cruces. El marcador *CAPN1*-4751 a su vez fue asociado con variaciones en el peso al nacimiento. Estos polimorfismos estudiados habían sido previamente asociados únicamente con diferencias en terneza (Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006), y propuestos como indicadores exclusivos de dicha característica. Sin embargo, a diferencia del presente estudio, los animales utilizados por Page et al. (2004), White et al. (2005) y Casas et al. (2006), con excepción de los Brahman, eran producto de cruzamientos. Mas aun, en investigaciones previas se ha establecido que el sistema CAPN/CAST estaba ligado a diversos factores que regulan el crecimiento y desarrollo celular en etapas pre- y post-natales (Chung et al., 2007; Van den Maagdenberg et al., 2007). En un estudio

realizado por Miquel et al. (2007) se encontró una asociación entre el SNP *CAPN1*-316 y la ganancia diaria en peso vivo y el peso a la matanza en ganado Angus y Brangus criado a pastoreo. Para estas características el genotipo GG fue superior a los demás ($P < 0.05$). Esto difiere con los hallazgos del presente estudio donde el genotipo CG presentó mayor ganancia diaria y redundó en un peso corporal mayor en relación a los GG. Esto a su vez se reflejó en una mayor edad al destete para los animales GG comparado con los CG. Estas discrepancias entre ambos estudios se pueden deber a que la data fenotípica utilizada en el presente estudio provino de animales Senepol, Charolais, y sus cruces. Además, los animales de Miquel et al. (2007) fueron sacrificados a un espesor de grasa dorsal promedio de 6.0 mm (edad matanza), mientras que la edad a la matanza para el presente estudio fue de 20 meses en promedio. Sin embargo, los animales en el presente estudio, irrespectivamente de su genotipo, fueron superiores para ambas características a los de Miquel et al. (2007).

Arthur et al. (2000) estudiaron el efecto de la modificación en la subunidad CAPN4 presente en el los genes de m y μ -CAPN. Al alterar la secuencia de bases del gen de μ -CAPN (clasificado en el presente estudio como *CAPN1*) se encontró que el desarrollo fetal se afectaba y por consiguiente no se completaba. Esto indica que la alteración del gen *CAPN1* puede ser crucial para el desarrollo y supervivencia del feto. En otros estudios similares, al disminuir la expresión de *CAPN1* mermó la proteólisis muscular (Xu et al., 2007; Camou et al. 2007). Dichos experimentos demostraron que una alteración en la ruta regulatoria de *CAPN1* puede comprometer la proliferación celular y el desarrollo de estructuras dependientes de migración.

En el presente estudio, los SNP *CAPN1-316* y *CAPN1-4751* fueron asociados con variaciones en características de la carcasa. El SNP *CAPN1-316* fue relacionado con diferencias en pesos de músculos del cuarto trasero al igual que con el peso del tejido de descarte, y el área del músculo *Longissimus dorsi*. Similarmente, *CAPN1-4751* fue asociado con los pesos de canal fría, del músculo *Longissimus dorsi*, con la cantidad de tejido de descarte, la relación músculo a hueso, y con el porcentaje de hueso en el cuarto trasero izquierdo.

En diversos estudios a nivel genómico se han identificado regiones variables dentro de los genes *CAPN1* y *CAST* (Page et al., 2002 y 2004; White et al., 2005 y Casas et al., 2006). En estas investigaciones se identificaron SNP que afectan la estructura molecular de μ -CAPN mediante la sustitución de una base nitrogenada, lo que resulta en un cambio de identidad del aminoácido específico. De acuerdo a White et al. (2005) y Casas et al. (2006), los alelos C de *CAPN1-316* y *CAPN1-4751* han sido catalogados como responsables por la producción de carne con perfiles de terneza aceptables en ganado bovino, lo que concuerda con los resultados del presente experimento. En este trabajo se observó que el alelo C de *CAPN1-316* estuvo relacionado a variaciones en la terneza determinada por WB a 0 d *postmortem* (1.25 kg de diferencia entre los genotipos CG y GG). El alelo C de *CAPN1-4751* se encontró asociado a variaciones detectadas por panel sensorial en la terneza de la carne expuesta a maduración a 14 d, resultando en una clasificación de moderadamente tierna. Aunque para *CAPN1-4751* no se encontró un efecto estadísticamente significativo entre genotipos ($P > 0.05$), la presencia del alelo C estuvo asociado a una reducción en la fuerza de corte 1.16 kg a 0 d y de 0.44 kg a 14 d.

Por otro lado, Barendse et al. (2002), Casas et al. (2006) y Van Eenennaam et al. (2007) obtuvieron evidencia de una asociación entre el alelo T del SNP *CAST* con valores superiores de terneza de la carne determinados por WB, siendo el alelo C aquel que predisponía al animal a producir carne más dura. A nivel estadístico, los resultados del presente estudio no presentan estas observaciones, por lo que parecería no recomendable extrapolar los resultados de esta investigación a la población general de ganado para carne de Puerto Rico sin antes ser validados utilizando un número superior de animales. Van Eenennaam et al. (2007) reportó una reducción en la fuerza de corte de 0.15 kg para la sustitución del alelo C por el T a 14 d *postmortem*. Esta diferencia fue idéntica a la observada en el presente estudio y fue más marcada a 0 d (0.35 kg) lo que compara favorablemente con lo reportado por Casas et al. (2006) a 14 d.

3.7. CONCLUSIONES

Esta investigación aporta evidencia para la existencia de una asociación entre los marcadores moleculares en el gen de μ -calpaina: *CAPN1-316* y *CAPN1-4751* con características de importancia económica en bovinos para carne. Sin embargo, se precisan estudios futuros con mayor número de animales para esclarecer si realmente los polimorfismos en el sistema de *CAPN/CAST* afectan características de crecimiento y de la carcasa como son los pesos del músculo *Longissimus dorsi*, la cantidad de tejido de descarte, etc., aparte de las ya establecidas para la terneza de la carne. Con respecto a *CAST*, no se observó una asociación entre este y las características evaluadas en este trabajo. Los hallazgos del presente estudio sugieren que los

polimorfismos genéticos evaluados en *CAPN1* podrían tener un impacto significativo en el crecimiento de los animales durante su desarrollo al igual que en la composición de la carcasa. Previamente se han estudiado estos SNP en razas de clima templado y frío, y en animales en lotes de alimentación utilizando dietas altas en energía. El presente estudio provee evidencia de que estos marcadores podrían predecir el desempeño de los bovinos para carne a nivel de finca en cuanto a características de importancia económica en el clima tropical.

3.8. REFERENCIAS

- Arthur, J.S., y C. Crawford. 1996. Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1293: 201.
- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Camou, J.P., J. A. Marchello, V.F. Thompson, S.W. Mares, y D.E. Goll. 2007. Effect of *postmortem* storage of μ - and m-calpain in five different bovine muscles. *J. Anim. Sci.* 10.2527/jas.2007-0164.
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr., D.D. Johnson, y T.P.L. Smith. 2006. Effects of *calpastatin* and μ -*calpain* markers in beef cattle on tenderness traits^{1,2}. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Chung H., B. Choi, G. Jang, K. Lee, H. Kim, S. Yoon, S. Im, M. Davis, y H. Hines. 2007. Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *J. Appl. Genet.* 48(1):61.
- Dourdin, N., D. Balcerzak, J.J. Brustis, S. Poussard, P. Cottin, y A. Ducastaing. 1999. Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp. Cell Res.* 246: 433.
- Geesink, G.H., y M. Koohmaraie. 1999a. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *postmortem* conditions. *J. Anim. Sci.* 77: 2685.
- Geesink, G.H., y M. Koohmaraie. 2000. Ionic strength-induced inactivation of μ -calpain in postmortem muscle. *J. Anim. Sci.* 78: 2336.
- Geesink, G.H., S. Kuchay, A.H. Chishti, y M. Koohmaraie. 2006. A-Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834.
- Goll, D., V.F. Thompson, y J. Cong. 1999. The calpain system: its proteins, properties, and secrets. American Society of Animal Science Meat Science and Muscle Biology Symposium.
- Goll, D.E., G. Neti, S. W. Mares, y V. F. Thompson. 2007. Myofibrillar protein turnover: the proteosome and the calpains. *J. Anim. Sci.* 10.2527/jas.2007-0395.
- Keele, J.W., S.D. Shackelford, S.M. Kappes, M. Koohmaraie, y R.T. Stone. 1999. A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 77: 1364.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36: 93.

- Miquel, M., E. Villareal, C. Mezzadra, L. Melucci, L. Soria, P. Corva, y A. Schor. 2007. Growth and carcass traits of steers on pasture discriminating genotypes of *CAPN1* 316 marker. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú. PB041 .
- Moyen, C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis, y P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36: 728.
- NRC. 1996. Nutrients requirements of beef cattle. Seventh Revised Ed. National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C.
- Page, B.T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele, y T.P.L. Smith. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 3077.
- Page, B.T., E. Casas, R.L. Quaas, R.M. Thallman, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, S.N. White, J.W. Keele, y 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.
- SAS. 2000. SAS/STAT_ User's Guide. Release 8.0. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Stone, R.T., E. Casas, T.P.L. Smith, J. W. Keele, G. Harhay, G. L. Bennett, M. Koohmaraie, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, y W.M. Snelling. 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: Development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 2005. 83:2280–2288.
- White, S.N., E. Casas, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase, Jr., D.D. Johnson, J.W. Keele, y T.P.L. Smith. 1995. 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.
- Wheeler, T.L., y M. Koohmaraie. 1994. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 72: 1232.
- Van Enennaam, A.L., J. Li, R.M. Thallman, R.L. Quaas, M.E. Dikeman, C.A. Gill, D.E. Franke, y M.G. Thomas. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891.
- Van der Maagdenberg, K., E. Claeys, A. Stinckens, N. Buys, y S. De Smet. 2007. Effect of age, muscle and insulin-like growth factor-II genotype in pigs on muscle proteolytic and lipolytic enzyme activities. *J. Anim. Sci.* 10: 2527.

Veiseth E., S.D. Shackelford, T.L. Wheeler, y M. Koohmaraie. 2004. Indicators of tenderization are detectable by 12 h *postmortem* in ovine longissimus. J. Anim. Sci. 82:1428.

Xu, Y., y R.L. Mellgren. 2002. Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. J. Biol. Chem. 277: 21474.

Tabla 3.1. Características de crecimiento evaluadas en toretes de Finca Montaña¹.

Características de Crecimiento

Peso al nacer (kg)

Ganancia en peso diaria a 205 d (kg)

Peso estimado a los 205 d (kg)

Peso al destete (kg)

Edad al destete (d)

Ganancia en peso a 240 d (kg)

Peso estimado a 240 d (kg)

¹Fase previa al destete.

Tabla 3.2. Características de canal y de calidad de la carne evaluadas en toretes de la Estación Experimental Agrícola de Corozal¹.

Características	
Edad de Matanza (d)	Tejido de Descarte (kg)
Peso de Matanza (kg)	Grasa Intermuscular (kg)
Peso Canal Caliente (kg)	Relación Músculo-Hueso
Izquierda	Porcentaje de Hueso
Derecha	Peso de Músculo Total (kg)
Total	Porcentaje Comestible (%)
Peso Canal Fría (kg)	Área <i>Longissimus dorsi</i> (cm ²)
Izquierda	Grasa Subcutánea (kg)
Merma (kg)	Pierna Izquierda
Peso Hueso Total (kg)	Peso (kg)
Peso Individual de Músculos (kg):	Largo (cm)
<i>Semitendinosus</i>	Ancho (cm)
<i>Semimembranosus</i>	Porcentaje de Canal Trasera
<i>Longissimus dorsi</i>	Terneza por Warner Bratzler ²
<i>Psoas major</i>	Panel Sensorial ² :
<i>Rectus femoris</i>	Terneza
<i>Gluteus medius</i>	Jugosidad
<i>Biceps femoris</i>	Aceptación General
<i>Obliquous</i>	
<i>Gastrocnemius</i>	

¹Fase de recría y ceba.

²Estas características fueron determinadas en el músculo *Longissimus dorsi*.

Tabla 3.3. Características de crecimiento previo al destete de toretes (Finca Montaña) en relación a los genotipos de *CAPN1-316* *.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CG	GG
Peso al nacer, kg	0.20	39.03	41.40	42.68
Ganancia en peso diaria a 205 d, kg **	0.001	1.00 ^{ab}	1.08 ^b	0.96 ^a
Peso estimado a los 205 d, kg **	0.001	244.80 ^{ab}	260.75 ^b	237.04 ^a
Peso al destete, kg **	0.34	251.40	270.99	278.00
Edad al destete, d **	0.04	221.61 ^{ab}	225.77 ^b	254.72 ^a
Ganancia en peso diaria a 240 d, kg **	0.0001	1.02 ^{ab}	1.08 ^b	0.94 ^a
Peso estimado a 240 d, kg **	0.0001	284.79 ^{ab}	298.12 ^b	265.86 ^a

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol, Charolais y sus cruces (n=99).

**El análisis de estas características fue ajustado por el peso al nacimiento.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.4. Características de la canal relacionadas a los genotipos de *CAPN1*-316 de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal)*.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CG	GG
Peso de canal caliente izquierda, kg ¹	0.79	134.31	139.77	141.33
Peso de canal caliente derecha, kg ¹	0.85	134.20	140.12	139.66
Peso de canal caliente total, kg ¹	0.87	270.16	281.38	280.57
Peso de canal fría, kg ¹	0.42	141.05	141.04	138.12
Peso de pierna izquierda, kg**	0.10	57.05	61.85	62.90
Peso de hueso de cuarto trasero, kg**	0.34	13.38	11.30	10.90
Peso de músculos individuales, kg**				
- <i>Biceps femoris</i>	0.001	5.95	5.70 ^a	6.31 ^b
- <i>Longissimus dorsi</i>	0.51	3.01	3.39	3.46
- <i>Rectus femoris</i>	0.23	4.46	4.95	5.22
- <i>Semimembranosus</i>	0.13	7.01	7.45	7.90
- <i>Gluteus spp.</i>	0.02	4.93	4.64 ^a	4.95 ^b
- <i>Psoas major</i>	0.12	1.82	1.96	2.07
- <i>Semitendinosus</i>	0.01	2.11	2.24 ^a	2.48 ^b
- <i>Obliquous</i>	0.11	3.10	4.23	4.83
- <i>Gastrocnemius</i>	0.02	3.64	3.64 ^a	4.20 ^b
Peso de tejido de descarte, kg**	0.02	5.29	7.98 ^a	6.16 ^b
Peso de grasa intermuscular, kg**	0.17	1.60	2.51	2.21
Peso de tendón, kg**	0.52	0.81	1.32	1.32
Rendimiento de canal**	0.14	54.58	55.11	56.04
Porcentaje de canal trasero	0.05	40.00	43.97	44.97
Porcentaje de canal delantero	0.05	60.00	56.03	55.03
Relación músculo/hueso	0.51	3.37	4.17	4.21
Porcentaje de hueso	0.27	22.41	17.90	17.57
Peso de músculo total de cuarto trasero, kg**	0.67	42.73	44.48	43.98
Porcentaje de músculo	0.71	73.55	71.24	71.02
Porcentaje comestible	0.46	76.17	78.91	79.01
Área de <i>Longissimus dorsi</i> , cm ²	0.02	33.45	34.70 ^a	32.13 ^b
Peso de grasa subcutánea, kg**	0.69	1.04	1.22	1.37
Largo de pierna, cm	0.31	104.28	111.51	112.57
Ancho de pierna, cm	0.26	62.70	71.68	68.71
Peso de matanza, kg	0.27	495.65	514.32	470.32
Edad a la matanza, d	0.56	639.00	612.00	613.80

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por el peso de matanza.

**El análisis de estas características fue ajustado por el peso de canal caliente izquierda.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.5. Características de crecimiento previo al destete de toretes (Finca Montaña) en relación a los genotipos de *CAPN1-4751**.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CT	TT
Peso al nacer, kg	0.04	42.59 ^{ab}	39.87 ^a	43.08 ^b
Ganancia en peso diaria a 205 d, kg ^{**}	0.51	0.99	1.03	1.01
Peso estimado a los 205 d, kg ^{**}	0.51	243.36	251.42	247.35
Peso al destete, kg ^{**}	0.72	263.96	273.76	274.81
Edad al destete, d ^{**}	0.95	241.43	240.39	244.24
Ganancia en peso diaria a 240 d, kg ^{**}	0.50	0.93	0.97	0.97
Peso estimado a 240 d, kg ^{**}	0.50	263.91	273.08	271.93
Peso actual a 205 d, kg ^{**}	0.73	242.05	249.00	252.68

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol, Charolais y sus cruces (n=99).

**El análisis de estas características fue ajustado por el peso al nacimiento.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.6. Características de la canal relacionadas a los genotipos de CAPN1-4751 de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal)*.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CT	TT
Peso de canal caliente izquierda, kg ¹	0.32	136.27	142.88	138.17
Peso de canal caliente derecha, kg ¹	0.35	135.48	138.00	142.45
Peso de canal caliente total, kg ¹	0.42	272.63	283.78	279.18
Peso de canal fría, kg ¹	0.03	128.77 ^a	142.33 ^b	135.76 ^{ab}
Peso de pierna izquierda, kg**	0.95	62.02	62.17	62.46
Peso de hueso de cuarto trasero, kg**	0.23	10.99	11.54	10.48
Peso de músculos individuales, kg**				
- <i>Biceps femoris</i>	0.10	6.15	5.89	6.30
- <i>Longissimus dorsi</i>	0.04	3.54 ^{ab}	3.31 ^a	3.66 ^b
- <i>Rectus femoris</i>	0.94	5.09	5.02	5.09
- <i>Semimembranosus</i>	0.47	7.78	7.52	7.86
- Gluteus spp.	0.53	4.89	4.75	4.68
- <i>Psoas major</i>	0.31	1.97	1.92	2.03
- <i>Semitendinosus</i>	0.07	2.39	2.27	2.51
- <i>Obliquous</i>	0.14	5.09	4.20	4.76
- <i>Gastrocnemius</i>	0.66	3.90	3.85	4.08
Peso de tejido de descarte, kg**	0.03	5.32 ^a	7.70 ^b	6.27 ^{ab}
Peso de grasa intermuscular, kg**	0.75	2.19	2.39	2.29
Peso de tendón, kg**	0.48	1.37	1.22	1.41
Rendimiento de canal**	0.53	55.53	55.32	55.99
Porcentaje de canal trasero	0.70	44.43	44.21	44.94
Porcentaje de canal delantero	0.70	55.57	55.79	55.06
Relación músculo/hueso	0.01	4.05 ^{ab}	3.79 ^a	4.57 ^b
Porcentaje de hueso	0.01	18.61 ^{ab}	19.59 ^a	16.11 ^b
Peso de músculo total de cuarto trasero, kg**	0.96	43.92	4.21	44.19
Porcentaje de músculo	0.19	72.30	72.80	70.80
Porcentaje comestible	0.12	79.24	78.29	79.86
Área de <i>Longissimus dorsi</i> , cm ²	0.80	32.99	33.22	33.88
Peso de grasa subcutánea, kg**	0.32	0.94	1.27	1.33
Largo de pierna, cm	0.30	113.66	113.35	109.89
Ancho de pierna, cm	0.44	68.09	71.21	69.52
Peso de matanza, kg	0.79	513.46	490.56	489.48
Edad a la matanza, d	0.59	621.60	615.90	610.80

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por el peso de matanza.

**El análisis de estas características fue ajustado por el peso de canal caliente izquierda.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.7. Características de crecimiento previo al destete de toretes (Finca Montaña) en relación a los genotipos de CAST*.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CT	TT
Peso al nacer, kg	0.22	41.59	38.14	40.40
Ganancia en peso diaria a 205 d, kg**	0.94	0.99	1.01	1.02
Peso estimado a los 205 d, kg**	0.93	248.48	246.96	248.56
Peso al destete, kg**	0.23	331.97	276.46	270.59
Edad al destete, d*	0.15	308.75	245.57	240.41
Ganancia en peso diaria a 240 d, kg**	0.84	0.92	0.96	0.97
Peso estimado a 240 d, kg**	0.83	261.39	269.70	272.27
Peso actual a 205 d, kg**	0.10	318.96	252.21	248.30

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol, Charolais y sus cruces (n=99).

**El análisis de estas características fue ajustado por el peso al nacimiento.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.8. Características de la canal relacionadas a los genotipos de CAST de toretes provenientes de la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal)*.

Características	Valor P	CC [^]	Genotipo	
			CT	TT
Peso de canal caliente izquierda, kg ¹	0.38	-	137.33	141.49
Peso de canal caliente derecha, kg ¹	0.19	-	135.79	141.10
Peso de canal caliente total, kg ¹	0.10	-	270.68	284.14
Peso de canal fría, kg ¹	0.72	-	138.72	138.70
Peso de pierna izquierda, kg ^{**}	0.72	-	62.00	62.40
Peso de hueso de cuarto trasero, kg ^{**}	0.66	-	11.32	11.02
Peso de músculos individuales, kg ^{**}				
- <i>Biceps femoris</i>	0.08	-	5.76	6.15
- <i>Longissimus dorsi</i>	0.74	-	3.38	3.43
- <i>Rectus femoris</i>	0.72	-	5.01	5.10
- <i>Semimembranosus</i>	0.33	-	7.90	7.59
- <i>Gluteus spp.</i>	0.60	-	4.69	4.77
- <i>Psoas major</i>	0.27	-	1.91	1.99
- <i>Semitendinosus</i>	0.28	-	2.26	2.39
- <i>Obliquous</i>	4.30	-	4.23	4.59
- <i>Gastrocnemius</i>	0.56	-	4.07	3.91
Peso de tejido de descarte, kg ^{**}	0.93	-	6.92	7.00
Peso de grasa intermuscular, kg ^{**}	0.67	-	2.25	2.37
Peso de tendón, kg ^{**}	0.42	-	1.42	1.27
Rendimiento de canal ^{**}	0.16	-	54.89	55.81
Porcentaje de canal trasero	0.66	-	44.21	44.59
Porcentaje de canal delantero	0.46	-	55.05	55.74
Relación músculo/hueso	0.44	-	3.98	4.19
Porcentaje de hueso	0.51	-	18.55	17.78
Peso de músculo total de cuarto trasero, kg ^{**}	0.96	-	44.16	44.21
Porcentaje de músculo	0.44	-	71.79	70.90
Porcentaje comestible	0.36	-	78.29	79.11
Área de <i>Longissimus dorsi</i> , cm ²	0.92	-	33.30	33.43
Peso de grasa subcutánea, kg ^{**}	0.36	-	1.07	1.27
Largo de pierna, cm	0.96	-	112.32	112.20
Ancho de pierna, cm	0.78	-	70.73	70.06
Peso de matanza, kg	0.94	-	492.16	494.46
Edad a la matanza, d	0.26	-	621.90	612.00

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por el peso de matanza.

^{**}El análisis de estas características fue ajustado por el peso de canal caliente izquierda.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.9. Asociación entre genotipos de *CAPN1*-316 con datos de terneza por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal)*.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CG	GG
Terneza por Warner Bratzler 0 d, kg ^{1**}	0.02	6.32	4.64 ^a	5.89 ^b
Terneza por Warner Bratzler 14 d, kg ^{1**}	0.95	3.55	3.61	3.73
Terneza 0 d ^{1,2**}	0.88	5.39	4.82	4.79
Terneza 14 d ^{1,2**}	0.13	6.46	5.94	5.53
Jugosidad 0 d ^{1,2**}	0.89	5.06	4.58	4.55
Jugosidad a 14 d ^{1,2**}	0.83	5.40	5.17	5.05
Aceptabilidad a 0 d ^{1,2**}	0.91	4.73	4.92	4.79
Aceptabilidad a 14 d ^{1,2**}	0.86	5.85	5.49	5.56

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por la edad a la matanza.

^{**}El análisis de estas características fue ajustado por el contenido de grasa intramuscular.

²Escala hedónica: 1=extremadamente seca, dura e inaceptable; 8=extremadamente jugosa, tierna y aceptable.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.10. Asociación entre genotipos de *CAPN1-4751* con datos de terneza por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Coroza)^{*}.

Características	Valor P	Genotipo		
		CC	CT	TT
Terneza por Warner Bratzler 0 d, kg ^{1**}	0.06	5.25	4.76	6.17
Terneza por Warner Bratzler 14 d, kg ^{1**}	0.30	3.85	3.40	4.06
Terneza 0 d ^{1,2**}	0.23	4.84	5.04	4.38
Terneza 14 d ^{1,2**}	0.04	6.13 ^a	5.85 ^{ab}	5.29 ^b
Jugosidad 0 d ^{1,2**}	0.06	4.84	4.86	4.06
Jugosidad a 14 d ^{1,2**}	0.30	5.06	5.27	4.83
Aceptabilidad a 0 d ^{1,2**}	0.15	5.04	5.06	4.34
Aceptabilidad a 14 d ^{1,2**}	0.09	5.93	5.59	5.26

^{*}Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por la edad a la matanza.

^{**}El análisis de estas características fue ajustado por el contenido de grasa intramuscular.

²Escala hedónica: 1=extremadamente seca, dura e inaceptable; 8=extremadamente jugosa, tierna y aceptable.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Tabla 3.11. Asociación entre genotipos de CAST con datos de terneza por Warner Bratzler y panel sensorial para toretes en la fase de recría y ceba (Estación Experimental en Corozal)*.

Características	Valor P	CC	Genotipo	
			CT	TT
Terneza por Warner Bratzler 0 d, kg ^{1**}	0.57	-	5.51	5.16
Terneza por Warner Bratzler 14 d, kg ^{1**}	0.68	-	3.78	3.63
Terneza 0 d ^{1,2**}	0.98	-	4.83	4.82
Terneza 14 d ^{1,2**}	0.60	-	5.62	5.78
Jugosidad 0 d ^{1,2**}	0.72	-	4.67	4.54
Jugosidad a 14 d ^{1,2**}	0.91	-	5.14	5.11
Aceptabilidad a 0 d ^{1,2**}	0.95	-	4.83	4.86
Aceptabilidad a 14 d ^{1,2**}	0.09	-	5.22	5.64

*Solo se utilizaron los datos de toretes Senepol×Charolais (n=42).

¹El análisis de estas características fue ajustado por la edad a la matanza.

^{**}El análisis de estas características fue ajustado por el contenido de grasa intramuscular.

²Escala hedónica: 1=extremadamente seca, dura e inaceptable; 8=extremadamente jugosa, tierna y aceptable.

^{a,b}Dentro de una fila, medias con distinto exponente son estadísticamente diferentes (P<0.05).

[^]El genotipo CC no fue observado para la población estudiada.

CAPÍTULO CUATRO:

4.1. CONCLUSIONES GENERALES

El agricultor necesita herramientas efectivas para la selección genética a nivel de finca. Estas permitirán ofrecerle al público un producto de alta calidad a un precio razonable. De la mano con la satisfacción del consumidor, una producción eficiente podría garantizar el éxito de cualquier empresa agrícola.

El poder predecir el grado de ternera de la carne, la tasa de crecimiento entre otras características de importancia económica, podría mejorar el estatus actual de la industria de ganado para carne de Puerto Rico. Es de amplio conocimiento que el público consumidor utiliza la ternera como criterio de selección a la hora de comprar carne (Shackelford et al., 1994; Brooks et al., 2000; Casas et al., 2006). También se conoce que la producción local de ganado bovino se basa en el pastoreo, sistema que podría promover la producción de animales con peso de matanza a mayor edad comparada con la de los principales países exportadores de dicho producto (Casas et al., 1997).

Las calpains (CAPN) son proteasas de cisteína las cuales han sido implicadas en el proceso de maduración y enterneamiento de la carne (Koohmarie et al., 1994; Goll et al., 2003). En el músculo esquelético existen dos isoformas principales las cuales son: μ -CAPN y m-CAPN. Estas enzimas proteolíticas junto con su inhibidor calpastatina (CAST) han sido implicadas a su vez en el desarrollo del músculo, comunicación entre células y otros procesos esenciales los cuales podrían delinear el índice de producción de carne en el animal adulto (Dourdin et al., 2001; Moyon et al., 2004; Franco et al., 2005; Casas et al., 2006). Diversos estudios han demostrado que

variaciones en estas proteasas están involucradas en ciertas diferencias encontradas en características de importancia económica (Koohmarie et al., 1994; Barendse et al., 2002; Morris et al., 2006).

En los genes de μ -CAPN (*CAPN1*) y *CAST* se han identificado diferentes polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) los cuales afectan la terneza de la carne. White et al. (2005) describió que los SNP *CAPN1*-316 y *CAPN1*-4751 afectan la terneza de la carne en las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, las mismas que se utilizan para la producción de carne en Puerto Rico. Los polimorfismos encontrados en el SNP *CAPN1*-316 son CC, CG y GG, mientras que para ambos, *CAPN1*-4751 y *CAST*, estos son CC, CT y TT (Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006).

Los objetivos del presente estudio fueron:

1. Determinar la distribución poblacional de polimorfismos identificados en el gen de *CAPN1* (*CAPN1*-316 y 4751) y *CAST*.
2. Analizar la asociación de estos polimorfismos con características de importancia económica en bovinos de carne.

En el presente estudio se evaluó la frecuencia genotípica y alélica global para 271 toros provenientes de diferentes fincas a través de la isla de Puerto Rico. Las razas y tipos genéticos para estos animales fueron Angus, Charolais, Senepol, Brahman, Cebú, Charbray y sus cruces. Se calculó la frecuencia genotípica por cada raza para determinar si los tres SNP se encontraban segregando en Puerto Rico.

Como resultado del presente estudio se observó que los SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST* se encontraban segregando en la población de ganado para carne de Puerto Rico. La identificación de los genotipos asociados a estos marcadores dentro de las diferentes razas de vacunos para carne podría resultar en la selección de animales con predisposición genética para el mejoramiento de los índices de terneza a nivel local y posiblemente mundial. En el trópico húmedo la utilización de la raza Senepol en programas de mejoramiento genético podría resultar beneficiosa debido a la proporción favorable presentada de los alelos en *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST* catalogados como “tiernos”. A su vez, estos SNP fueron asociados con diversas características de importancia económica, aparte de la terneza de la carne, en animales Senepol, Charolais y Senepol×Charolais.

El establecer un programa de selección incorporando la información provista por los SNP *CAPN1-316* y *-4751* podría resultar en el mejoramiento del ritmo de crecimiento y en la calidad de la carne en vacunos. Sin embargo, debido a la cantidad limitada de animales en las que estas observaciones fueron realizadas en Puerto Rico experimentos futuros deben realizarse para la validación correspondiente

4.2. REFERENCIAS

- Barendse, W.J. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Brooks, J.C., J.B. Belew, D.B. Griffin, B.L. Gwartney, D.S. Hale, W.R. Henning, D.D. Johnson, J.B. Morgan, F.C. Parrish Jr, J.O Reagan, y J.W. Savell. 2000. National Beef Tenderness Survey-1998. *J. Anim. Sci.* 78: 1852.
- Casas, A., D. Cianzio, y A. Rivera. Comparison of Holstein, Charbray and Zebu Bulls for Beef Production under Rotational Grazing. II. Offal Components in Carcass Composition. Manuscript Submitted to the editorial board February 24, 1997.
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr., D.D. Johnson y T.P.L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Dourdin N., A.K. Bhatt, P. Dutt, P.A. Greer, J.S. Arthur, J.S. Elce, y A. Huttenlocher. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276: 48382.
- Franco S.J., A. Huttenlocher. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118: 17.
- Goll DE, V.F. Thompson H. Li, W. Wei y J. Cong . 2003. The calpain system. *Physiol Rev.* 83: 731.
- Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36:93.
- Page, B. T., E. Casas, R. L. Quaas, R. M. Thallman, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, S. N. White, J. W. Keele, y 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.
- Morris C.A., N.G. Cullen, S.M. Hickey, P.M. Dobbie, B.A. Veenvliet, T.R. Manley, W.S. Pitchford, Z.A. Kruk, C.D. Bottema, y T. Wilson. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim. Genet.* 37: 411.
- Moyen C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis y P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (*CAPN 1*) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36:728.

Shackelford, S. D., M. Koohmaraie, L. V. Cundiff, K. E. Gregory, G. A. Rohrer, y J. W. Savell. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857.

White, S.N., E. Casas, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase, Jr., D. D. Johnson, J. W. Keele, y T. P. L. Smith. 1995. 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.

APÉNDICES

SNP	Número de Animales	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Alélica	Valor X ² P
<i>CAPN1-316</i>	219	0.07 CC 0.38 CG 0.55 GG	0.26 C 0.74 G	0.99
<i>CAPN1-4751</i>	256	0.17 CC 0.45 CT 0.38 TT	0.39 C 0.61 T	0.11
<i>CAST</i>	261	0.04 CC 0.70 CT 0.26 TT	0.27 C 0.73 T	0.72

Apéndice 1. Frecuencias genotípicas y alélicas globales de los SNP *CAPN1-316*, *CAPN1-4751* y *CAST*.

Raza	Número de Animales	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Alélica	Valor X ² P
Angus	0	0.00/CC	.25/C	0.46
	7	0.50/CG	.75/G	
	7	0.50/GG		
Brahman	0	0.00/CC	0.04/C	0.99
	1	0.09/CG	0.95/G	
	10	0.91/GG		
Charbray	0	0.00/CC	0.09/C	0.89
	4	0.19/CG	0.90/G	
	17	0.81/GG		
Charolais	0	0.00/CC	0.13/C	0.63
	11	0.25/CG	0.87/G	
	32	0.75/GG		
Cruces	3	0.05/CC	0.29/C	0.31
	32	0.49/CG	0.71/G	
	30	0.46/GG		
Senepol	12	0.23/CC	0.48/C	0.99
	26	0.50/CG	0.52/G	
	14	0.27/GG		
Cebú	0	0.00/CC	0.08/C	0.96
	2	0.15/CG	0.92/G	
	11	0.85/GG		

Apéndice 2. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP *CAPN1-316*.

Raza	Número de Animales	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Alélica	Valor X ² P
Angus	3	0.18/CC	.44/C	0.95
	9	0.53/CT	.56/T	
	5	0.29/TT		
Brahman	0	0.00/CC	0.09/C	0.92
	3	0.18/CT	0.91/T	
	14	0.82/TT		
Charbray	2	0.06/CC	0.24/C	0.99
	12	0.35/CT	0.76/T	
	20	0.60/TT		
Charolais	9	0.18/CC	0.44/C	0.73
	29	0.51/CT	0.56/T	
	15	0.31/TT		
Cruces	13	0.19/CC	0.42/C	0.96
	33	0.47/CT	0.58/T	
	24	0.34/TT		
Senepol	17	0.31/CC	0.55/C	0.88
	25	0.46/CT	0.45/T	
	12	0.22/TT		
Cebú	0	0.00/CC	0.23/C	0.50
	7	0.47/CT	0.77/T	
	8	0.53/TT		

Apéndice 3. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP CAPN1-4751.

Raza	Número de Animales	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Alélica	Valor X ² P
Angus	0	0.00/CC	0.26/C	0.19
	14	0.24/CT	0.74/T	
	13	0.76/TT		
Brahman	0	0.00/CC	0.09/C	0.92
	3	0.19/CT	0.91/T	
	13	0.81/TT		
Charbray	4	0.11/CC	0.28/C	0.67
	13	0.34/CT	0.72/T	
	21	0.55/TT		
Charolais	0	0.00/CC	0.06/C	0.90
	6	0.12/CT	0.94/T	
	43	0.88/TT		
Cruces	2	0.03/CC	0.18/C	0.96
	22	0.30/CT	0.82/T	
	48	0.67/TT		
Senepol	2	0.04/CC	0.19/C	0.99
	16	0.30/CT	0.81/T	
	35	0.66/TT		
Cebú	2	0.15/CC	0.25/C	0.41
	4	0.25/CT	0.75/T	
	10	0.63/TT		

Apéndice 4. Frecuencias genotípicas y alélicas por raza del SNP CAST.