

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO SIMPLE EN LOS
GENES DE CALPAINA Y CALPASTATINA EN OVINOS CRIOLLOS
COLOMBIANOS**

Jorge Enrique Molano Triana

Código: 150 211249

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA**

FUSAGASUGÁ 2016

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO SIMPLE EN LOS
GENES DE CALPAINA Y CALPASTATINA EN OVINOS CRIOLLOS
COLOMBIANOS**

Jorge Enrique Molano Triana

CÓDIGO: 150211249

Proyecto de grado opción investigación, como requisito parcial para la obtención de título de:

Zootecnista

Director

Susan Lorena Castro Molina

Bacterióloga MSc Microbiología

Línea de Investigación:

Genética y Mejoramiento Animal

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

FUSAGASUGÁ 2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Alexander Moreno

Nelson Arenas

Dedicatoria

A mis padres que me formaron en lo personal y en mi vida académica, a ti mamá gracias por el apoyo incondicional, por guiarme en el camino, por tus sabios consejos, por darme el apoyo y fuerza para continuar con mis metas, por estar junto a mí en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por enseñarme a superar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. A mi padre porque me enseñó los valores, los principios y el coraje para conseguir los objetivos.

A mis hermanos:

Por su gran amor y por estar siempre presentes, acompañándome en este largo recorrido.

Agradecimientos

A Dios por todas las bendiciones en mi vida, por brindarme su amor en los momentos más difíciles y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Mi más sincero agradecimiento a Susan Lorena Castro mi directora de tesis, por su apoyo, la inspiración, ejemplo intelectual, por su dedicación, sus críticas y aportes. Pero sobre todo por la motivación, porque siempre creyó en mí y en mis capacidades. Le agradezco profesora por enseñarme el mundo de la investigación y darme motivos para continuar con mi postgrado y seguir creciendo en mi vida profesional.

Al Doctor Fernando Ariza, por su innegable colaboración y aporte a este trabajo.

A Yurany Ortiz, por su colaboración en el desarrollo del trabajo de laboratorio.

A la doctora Laura Romero por el tiempo dedicado a leer este trabajo y por sus valiosas correcciones.

A mis amigos Wilson Jiménez y Eduardo Sabogal, por sus sabios consejos y por darme una palabra de aliento en cada dificultad que se me presentaba y especialmente, gracias por su amistad incondicional.

Resumen

El uso de herramientas como la genética aplicada al mejoramiento de las características de interés económico y productivo, hace que se puedan identificar animales élite para ser incluidos en programas de reproducción. Entre estas características se encuentra la terneza, la cual es influenciada de manera directa por la interacción de los genes Calpaina y Calpatatina, que juegan un papel significativo en la proteólisis durante la conversión del musculo en carne. El objetivo del estudio fue identificar SNPs en los genes CAPN y CAST en una población de 80 ovinos criollos provenientes de cuatro zonas de Colombia. Se tomaron muestras de sangre y se realizó la extracción de ADN genómico, los patrones (AA, AB, BB), las frecuencias alélicas para el marcador CAPN 316 fueron A 54.4, B 45,6 con un 38.75 % de heterocigotos, para el marcador CAST1 el alelo A presento mayor frecuencia con un 93.8% evidenciando un alto índice de heterocigotos para el genotipo AA con un 88.75 %. El análisis del equilibrio de Hardy Weinberg mostró que la población está en equilibrio ($p \leq 0,05$). Los resultados obtenidos demostraron que los dos marcadores son polimórficos, con esta información obtenida se logra aportar al conocimiento de la genética de los ovinos en Colombia que pueden ser de gran ventaja para los programas de mejoramiento y conservación de estos individuos.

Palabras claves: Alelos, Genotipos, Mutación, SNP, Terneza

Contenido	
Resumen	6
Lista de tablas	9
Lista de figuras.....	10
Lista de símbolos y abreviaturas.....	11
Introducción	12
Justificación	14
1. Marco Teórico.....	15
1.1 Estructura del tejido muscular	15
1.1.1 Tipos de fibras	16
1.1.2 El sarcómero	17
1.1.3 Proteínas involucradas en la contracción y relajación muscular ..	18
1.1.4 Fisiología de la contracción muscular.....	19
1.2 Conversión de músculo a carne	20
1.2.1 Muerte del animal	21
1.2.2 Falla respiratoria	21
1.2.3 Rigor mortis.....	22
1.2.4 Maduración	23
1.3. Terneza de la carne	25
1.3.1 factores <i>antemortem</i>	25
1.3.2 factores post-mortem.....	28
1.4 Tiernización de la carne Complejo Calpaina y Calpastatina	30
1.4.1 Calpainas	30
1.4.2 Calpastatina.....	33
1.5 Warner-Bratzler	35
1.6 Genética de la calidad de la carne	36
1.6.1 Mejoramiento genético	36
1.6.2 Mejoramiento genético en ovinos	37
1.7 Genes que afectan la terneza de la carne	38
1.7.1 Gen Calpaína (CAPN)	38
1.7.2 Gen Calpastatina (CAST).....	38
1.8 Herramientas usadas en el mejoramiento genético	39
1.8.1 Extracción de ADN	39
1.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (pcr)	39

1.8.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	39
1.8.4 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)	40
1.9 Polimorfismos de nucleótido Simple (SNP).....	40
1.10 Determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg.	42
2. Objetivos	43
2.1 Objetivo general.....	43
2.2 Objetivos específicos	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 Población	43
3.2 Evaluación genotípica	44
3.2.1 Extracción de DNA.....	44
3.2.2 Marcadores moleculares.....	45
3.2.3 Amplificación y genotipificación de los individuos	45
3.2.4 PCR-SSCP	46
3.3 Análisis estadístico.....	46
4. Resultados y discusión	47
4.1 Gen calpaina (CAPN).....	51
4.2 Gen calpastatina (CAST).....	52
5. Conclusiones y recomendaciones	58
Bibliografía	60

Lista de tablas

Cuadro 1: Marcadores de los genes CAPN y CAST.....	45
Cuadro 2: Frecuencias Alélicas y genotípica, de los marcadores CAPN316 Y CAST1.....	50
Cuadro 3: Frecuencia genotípica para los genes Calpaina y Calpastatina en machos y hembras	54
Cuadro 4: Valores de heterocigosidad para los marcadores CAPN y CAST.....	55

Lista de figuras

Figura 1. Organización estructural del músculo.....	16
Figura 2. Estructura de las proteínas del tejido muscular.....	19
Figura 3. Proceso de Rigor mortis durante el sacrificio del animal.....	23
Figura 4: comportamiento del pH en las carnes DFD, PSE y normal.....	24
Figura 5: subunidades larga y corta que conforman el heterodímero en las calpaínas.....	31
Figura 6: Dominios de la calpastatina con sus respectivas funciones.....	32
Figura 7: Tipos de Calpastatina que corresponden a diferentes tejidos de bovino.....	34
Figura 8: Visualización de ADN en gel de agarosa.....	47
Figura 9: Ubicación del fragmento amplificado del gen CAPN 316.....	48
Figura 10: Ubicación del fragmento amplificado del gen CAST 1.....	49
Figura 11: Genotipos del gen CAPN.....	49
Figura 12: Genotipos del gen CAST.....	50

Lista de símbolos y abreviaturas

°C	Grado Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CAPN	Gen Calpaina
CAST	Gen Calpastatina
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	fosfato inorgánico
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena simple
μM	Micromolar

Introducción

La producción de ovinos en Colombia ha sido desarrollada principalmente en los departamentos del Magdalena, Guajira, Cesar, Boyacá, Nariño, Cundinamarca y Córdoba (Márquez, 2014). Donde la principal representante es la oveja de pelo la cual presenta una alta habilidad al adaptarse al medio ambiente tropical, así mismo ha demostrado sobrevivir por su rusticidad, producción, prolificidad y mansedumbre, que le convierte en una innegable alternativa para contribuir al desarrollo de las comunidades, en especial las menos favorecidas (Vivas, 2012). El censo realizado por el instituto agropecuario ICA para el año 2012, la población ovina se estimó en 1.142.893 cabezas de ganado, las cuales están distribuidos por todo el territorio nacional (Ocampo,2014).

Hoy en día la ganadería ovina enfrenta problemáticas relacionadas principalmente con sistemas de producción extensivos, deficiencia en la toma de registros, ausencia de programas de selección genética, control reproductivo ineficaz y desconocimiento de los procesos sanitarios; producción de carne con calidad inadecuada siendo poco competitivos en el mercado estos problemas disminuyen de manera significativa la producción. A esto se le agrega la poca investigación científica que ha limitado el conocimiento de la productividad de las razas, debido a esto, la industria Colombiana tiene una estructura artesanal, donde hay una deficiencia en la comercialización y baja calidad del producto (Vivas, 2012). Para conseguir que la cadena ovina sea productiva es necesario generar bases de datos con información detallada de índices productivos, reproductivos, sanitarios, diversidad genética y genealogía, con el objetivo de que los productores e investigadores puedan disponer de estos datos y fomentar programas de mejoramiento genético, con la finalidad de ser competitivos en mercados internacionales (Ocampo, 2014).

Actualmente se tiene conocimiento que se ha exportado en mayor proporción a las Antillas Holandesas y en menor proporción a países como estados unidos, Uruguay, Venezuela y Perú (Espinal et al., 2006), del mismo modo con la apertura del tratado del libre comercio se pueden establecer nuevas oportunidades para el desarrollo competitivo de la ganadería ovina en Colombia. Con lo mencionado anteriormente como es bien sabido dentro de la comercialización de carne de cualquier especie la satisfacción del consumidor está ligada a un conjunto de propiedades entre las que se destacan la terneza, jugosidad y sabor. Sin embargo no se han desarrollado estudios donde se pueda identificar los niveles de terneza adecuados para los consumidores por lo tanto juega un papel importante trabajar en este atributo ya que es considerado como uno de los principales criterios de selección por parte del consumidor (Soria & Corva, 2004). Actualmente se consumen carnes duras que son desagradables para el consumidor, por lo que se generan pérdidas económicas en la industria cárnica, por este motivo los productores deben implementar tecnologías en búsqueda del mejoramiento genético, con el objetivo de ofrecer carnes con características organolépticas de excelente calidad.

Por eso el desarrollo de marcadores moleculares tiene un gran potencial para mejorar características que han sido un poco complejas, como la terneza de la carne. Para esto se busca marcadores eficaces que efectivamente identifiquen los alelos de una manera confiable que permitan la evaluación precisa del mérito genético en un locus basado únicamente en el genotipo de cada animal (Londoño, 2012).

El complejo enzimático encargado de la proteólisis muscular en el proceso de maduración está a cargo de dos enzimas denominadas Calpaina (CAPN) y Calpastatina (CAST), las cuales juegan un rol importante en la suavidad de la carne en el periodo post mortem (Pereira et al., 2015). El gen (CANP) está situado en el cromosoma veintiuno (Ensembl, 2015), del ovino y tiene un papel

fundamental en la lisis de la banda Z, que tiene un alto contenido en titina y nebulina, también degradan tropomiosina y a las troponinas T y I (Chacón, 2004). Por otro lado el gen CAST está ubicado en el quinto cromosoma y está involucrado en la formación de músculo y la terneza de la carne (Garbor, Trakovická & Miluchová, 2009). Estudios realizados en bovinos han demostrado variaciones en el ADN en los genes CAPN y CAST con una asociación altamente significativa a terneza de la carne, (Castro, 2013; Page et al., 2004; White et al., 2005). Por otro lado Ortiz et al., (2015), en una población de 160 ovinos criollos colombianos, realizó un estudio de asociación del componente genético del animal y la suavidad del músculo *Longissimus dorsi* mediante la técnica de Warner Bratzler y el uso de un microchip de alta densidad, reportando una asociación significativa de tres SNPs en el genoma relacionados con la terneza de la carne.

En Colombia son muy pocos los estudios genéticos que se han desarrollado para calidad de la carne en ovinos, por lo tanto esta investigación tiene como objetivo Identificar mutaciones puntuales en los genes candidatos a terneza CAPN y CAST en ovinos criollos colombianos y de esta manera aportar al conocimiento propio de esta raza.

Justificación

La ganadería ovina colombiana se maneja en un sistema de producción extensivo, deficiencia en la toma de registros, ausencia de programas de selección genética, control reproductivo ineficaz y desconocimiento de los procesos sanitarios; producción de carne con calidad inadecuada siendo poco competitivos en el mercado. A esto se le agrega la poca investigación científica que ha limitado el conocimiento de la productividad de las razas, debido a esto, la industria Colombiana tiene una estructura artesanal, donde hay una deficiencia en la comercialización y baja calidad del producto (Vivas, 2012).

Por otro lado, la demanda interna del producto por parte de individuos extranjeros establecidos en el país (asiáticos, judíos, árabes y europeos) y la población en general han generado la importación de carne de primera calidad provenientes de países como Uruguay, Nueva Zelanda y Chile, por medio de los supermercados o expendidos que manejan la cadena de importación. Según reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO), el sector ovino en Colombia ha tenido una evolución en los últimos ocho años, debido a esto el país está importando sementales para el mejoramiento genético del pie de cría, provenientes de países como México, Chile y Uruguay; se evidencia la apertura de mercados internacionales que demandan carne de alta calidad (Restrepo et al., 2010), estudios realizados por (Segura, 2013) afirman que la carne producida en Colombia es pretendida en países como Arabia Saudita, Dubai, Qatar, China y EE.UU, por eso uno de los grandes retos que tiene la producción ovina es mejorar la asistencia técnica como su genética. Con los acuerdos comerciales que se pueden establecer hay un futuro prometedor para el hato ovino y es el momento de aprovechar estas oportunidades. Al mismo tiempo, las condiciones geográficas colombianas son adecuadas para que esta producción se desarrolle.

Teniendo en cuenta que la ganadería ovina es una buena producción del sector agropecuario, por sus cualidades que presenta esta especie como lo son: bajos costos por unidad de producción, mejor capacidad de conversión de alimentos en carne, resistencia a las enfermedades, excelente demanda de sus carnes y por último la obtención de productos de alto valor comercial (Otero, 2013).

1. Marco Teórico

1.1 Estructura del tejido muscular

El músculo esquelético se encuentra constituido por fascículos, que a su vez, son conformados por un conjunto de fibras musculares. Estas estructuras se encuentran rodeadas de varias capas de tejido conjuntivo. El epimisio, la cual tiene como función cubrir la parte superficial del músculo,

en la mayoría de los músculos el epimisio y los tendones son los encargados de unir los músculos a los huesos. El perimisio asocia las distintas fibras musculares en haces de fibras y finalmente una delgada capa de tejido conectivo, llamada endomisio, se encarga de cubrir cada fibra muscular (Huff & Lonergan, 2005), en la figura 1 se puede detallar la estructura del músculo. Con referencia a lo anterior el músculo esquelético de los vertebrados contiene aproximadamente 75% de agua, 19% de proteína, 0,5-8% de lípidos, el 1% de glucógeno y se compone de varios tejidos como lo son: adipocitos intramusculares, tejido nervioso y tipos de células incluyendo principalmente las miofibras musculares que se caracterizan por sus propiedades contráctiles, rasgos morfológicos y metabólicos (Lefaucheur, 2010).

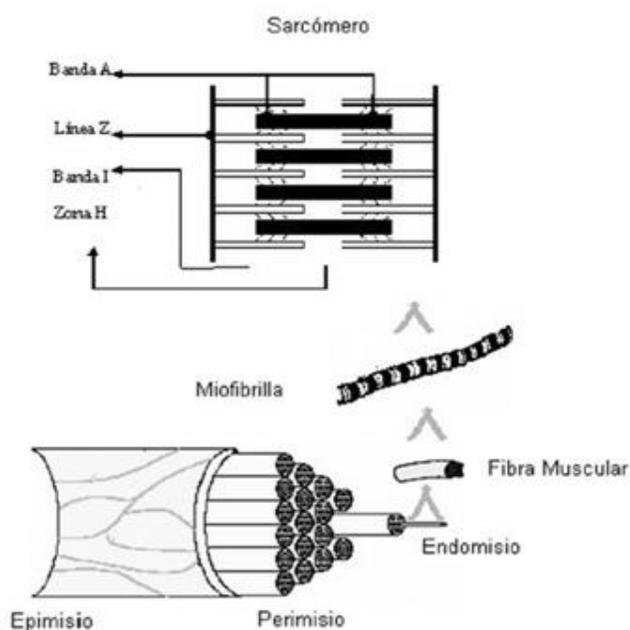


Figura 1: Organización estructural del músculo (Chacón, 2004).

1.1.1 Tipos de fibras

Existen tres tipos de fibras, que son únicas y se diferencian por sus distintas propiedades; Las fibras rojas ó tipo I, contienen numerosas mitocondrias, mioglobina, actividad enzimática oxidativa, alta

cantidad de lípidos, y su contracción es relativamente más lenta, sus procesos se dan fundamentalmente por vía aerobia ya que presenta irrigación de vasos sanguíneos. Las fibras blancas que están divididas en dos subtipos, intermediarias ó tipo IIA son intermediarias entre las fibras tipo I y tipo IIB asumiendo capacidades metabólicas alternativas, obteniendo la energía a partir de la vía aerobia como de la anaerobia mediante la lisis del glucógeno (Huff & Lonergan, 2005), según Choi & Kim (2009) describieron las fibras tipo IIB utilizan constantemente glucosa como fuente de energía, estas fibras tienen un sistema de túbulos T, que están ampliamente desarrollados para ejercer una contracción más rápida que las fibras tipo I, en efecto las fibras IIB se agotan rápidamente, pero tienen la destreza de transferir energía para una reacción muscular más rápida.

1.1.2 El sarcómero

En referencia a la clasificación anterior de las fibras, cada una de estas se compone por unidades de menor tamaño llamadas miofibrillas, estas a su vez están envueltas longitudinalmente por el retículo sarcoplasmático. La unidad funcional del músculo estriado es la sarcómera comprendida entre 2 bandas Z. Compuesta de pequeños filamentos unos gruesos de miosina o bandas A y unos finos de actina también denominados bandas i, (Huff, Zhang, & Lonergan, 2010). Durante el proceso de contracción, los filamentos finos de los sarcómeros adyacentes son empujados hacia el centro de la banda A, lo que produce el acortamiento del sarcómero. Como consecuencia de este proceso, se oblitera la banda H y disminuye la longitud de la banda I, sin que se modifique la longitud de la banda A, en la figura 1 se puede observar la estructura del sarcómero (Sparrow, 2009).

1.1.3 Proteínas involucradas en la contracción y relajación muscular

Las proteínas del músculo han sido clasificadas según su solubilidad en agua o soluciones salinas. Las proteínas sarcoplasmáticas son solubles en soluciones de baja fuerza iónica (0.05 M) y las proteínas miofibrilares son en alta fuerza iónica a (0.5 M). Las principales proteínas miofibrilares son: la actina, la miosina, las troponinas y la tropomiosina, en la figura 2 se pueden observar las proteínas involucradas en la contracción muscular. La forma básica de la actina es la actina G, esta es una cadena lineal delgada, dos cadenas de actina G se polimerizan dando como resultado la formación de una doble hélice lineal denominándose actina F. A estas se le suman la tropomiosina que es una molécula fibrosa lineal bicatenaria, que se adhiere al surco de la hélice que forman las dos actinas G cuando estas se agrupan para formar la actina F. Por consiguiente la tropomiosina a la vez se le unen las troponinas que son tres proteínas denominadas TnT, TnI y TnC con un peso molecular de 17.000 Da. La fracción TnT une a la troponinas restantes con la tropomiosina, la fracción TnI interacciona con la miosina y la TnC tiene como objetivo de ligar el Ca^{2+} (Chacón, 2004).

La miosina presente en musculo (miosina II), constituye un 55% de la proteína miofibrilar y es un hexámero lineal asimétrico de unos 46.000 Da. Está constituida por dos cadenas pesadas idénticas y dos pares de cadenas ligeras, cada cadena pesada consta de una cabeza globular y de una cola larga en α -hélice. Las colas en α -hélice de dos cadenas pesadas se entrelazan una alrededor de la otra en una estructura de espiral enrollada para formar un dímero y dos cadenas ligeras se asocian con el cuello de cada región de la cabeza para formar la molécula completa de miosina II. La parte globular de la proteína puede interactuar con el ATP mientras la parte lineal no globular se une a la actina F (Mooseker & Foth, 2008).

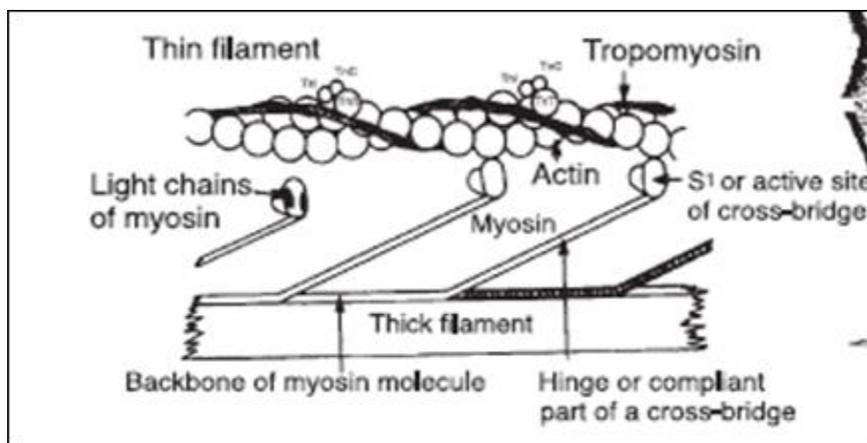


Figura 2: Estructura de las proteínas del tejido muscular (Goodship, Cunningham, & Kenwright, 1998).

1.1.4 Fisiología de la contracción muscular

El proceso de contracción comienza por un estímulo eléctrico por parte de la neurona motora, este estímulo traducido en un potencial de acción alcanza las partes terminales del axón generando la apertura de canales de calcio que permiten la entrada de iones Ca^{+2} al interior de la neurona, con el objetivo de liberar el neurotransmisor (acetilcolina) contenido en las vesículas presinápticas (Klein, 2013), una vez liberada la acetilcolina es recibida por los receptores muscarínicos y nicotínicos que son específicos para ésta, cuando esta unión entre el receptor y neurotransmisor (ligando) se produce, los canales iónicos dependiendo de ligando se abren para dar entrada a iones de Na^+ y simultáneamente la salida de iones de k^+ de esta manera se origina una despolarización que conlleva a la apertura de canales iónicos dependiendo de voltaje por donde ingresarán iones de Ca^{+2} extra celular que llegaran a los receptores de ryanodina (RyR2) del retículo sarcoplásmico (Calderón & Figueroa, 2009), cuyo objetivo es fomentar la liberación del Ca^{+2} intracelular, el cual se dirige al sarcómero donde se liga a la troponina C (TnC), generando la rotación de los filamentos de tropomiosina dejando expuesto el punto de unión para que la actina y la miosina interactúen, en este punto se produce un deslizamiento de filamentos gruesos de miosina y delgados de actina,

y así se genera una disminución en la longitud del sarcómero (Heinze & Bruggemann, 1994) . El ATP (Adenosíntrifosfato) se pega a la cabeza de miosina, aquí la enzima adenosintrifosfatasa hidroliza el ATP a adenosindifosfato (ADP) y fosfato inorgánico (pi), permaneciendo adheridos a la miosina, cuando esta se une con la actina hay una formación de puentes, la cabeza de la miosina en un entrecruzamiento a 45° se mueve sobre la actina débilmente liberando el pi y produciendo un golpe que permite el deslizamiento de la actina, liberando ADP y causando la contracción muscular así la cabeza de miosina empuja la actina. La unión de un nuevo ATP a la cabeza de miosina origina un cambio en la forma de la proteína, la cabeza se desdobla perdiendo la afinidad por la actina, rompiendo los puentes e iniciando el ciclo de nuevo (Klein, 2013).

Después de haberse realizado la contracción muscular se origina el impulso nervioso, la acetilcolinesterasa degrada a la acetilcolina en colina y acetil lo cual no puede desencadenar el potencial de acción, por lo tanto el Ca^{+2} nuevamente es almacenado en el retículo sarcoplásmico por acción de la calsecuestrina, por ende los complejos troponina, tropomiosina bloquean nuevamente los sitios de unión a la miosina de la actina y se produce la relajación muscular (Muscatello, 2008).

1.2 Conversión de músculo a carne

En vista al método en el que se desarrollan los animales productores de carne, en términos de crecimiento muscular, no se ha insistido en las diferencias que hay entre musculo y carne. Lo que se consume hoy en día como carne depende de la forma estructural y química de los músculos en su estado postmortem y difiere de los músculos en su desencadenamiento de cambios bioquímicos y biofísicos que se inician en el musculo al fallecimiento del animal. La oxidación y la proteólisis

son probablemente dos procesos involucrados en el desarrollo de una carne más tierna (Lawrie, 1998).

Por lo tanto los procesos de conversión de musculo a carne son:

1.2.1 Muerte del animal

Para un adecuado faenamiento, el animal debe ser aturdido (insensibilización) con una pistola de percutor, en el caso de los ovinos se insensibilizan eléctricamente o son anestesiados con dióxido de carbono, posteriormente se cortan las venas yugulares y arterias carótidas ubicadas en el cuello, produciendo el desangrado del animal, para iniciar el periodo de los cambios posmortem en el musculo. Después de la exanguinación del animal, todas las células estarán en anoxia y no recibirán más nutrientes. En estas condiciones, cada célula puede iniciar un proceso con destino a la apoptosis (Rincón & Sánchez, 2008).

1.2.2 Falla respiratoria

Después del sangrado del animal, todas las células y tejidos son privados de nutrientes y oxígeno. En estas condiciones la célula se programa para entrar en proceso de muerte celular o apoptosis, este puede estar coordinado por el sistema nervioso central o por la propia célula diana, la apoptosis está mediada por las peptidasas denominadas caspasas, las principales enzimas responsables de la muerte celular (Uzcátegui & Jerez, 2008). Por otro lado las mitocondrias son un elemento central en el proceso de apoptosis debido a que pierde su capacidad en la cadena respiratoria para oxidar el oxígeno molecular, la membrana externa de la mitocondria se vuelve permeable, permitiendo el ingreso de proteínas del espacio intermembrana, entre los que podemos destacar el citocromo C una caspatasa 9 activador central, el Ca^{2+} se libera del retículo endoplasmático causando alteraciones en su membrana interna. El oxígeno no será oxidado por la cadena respiratoria, por ende se formaran radicales libres, estos a su vez serán encargados de oxidar los compuestos

celulares, después de la muerte los radicales de oxígeno se pueden originar por la mitocondria y esto desencadenara el proceso autocatalítico (Herrera et al., 2006).

1.2.3 Rigor mortis

En la conversión de musculo a carne los procesos bioquímicos dan origen al rigor mortis, un proceso clave es la lisis de ATP originado en la célula muscular (miosito), este proceso es fundamental para mantener el sarcómero relajado (Pearce et al., 2011), bajo condiciones anaerobias, aquí el ciclo de krebs se detiene por completo. La célula ahora utilizara la vía glucolítica anaerobia, en este proceso por cada molécula de glucosa se generan dos moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato, consecutivamente la enzima lactato deshidrogenasa cataliza una reacción que integra un hidrogeno a la molécula de piruvato y posterior a esta reacción se genera el ácido láctico, la generación del ATP por vía anaerobia continuara hasta terminar las reservas del glucógeno. Posterior a esto se presenta un descenso del pH muscular debido a la acumulación de ácido láctico, alcanzando valores aproximados de 6.5 a 5.8 (Estévez, 2003).

Para la contracción y relajación del musculo se requiere de ATP como fuente energética, una vez que el musculo se empieza a agotar la fuente de energía, las cabezas de miosina empiezan a ser permanentemente unidas a los filamentos de actina, dando como resultado la formación del complejo actomiosina. Debido a que se agotó el ATP generado por la glucolisis anaerobia el musculo se endurece notablemente, y entra en estado que se denomina rigor mortis, este es alcanzado en un tiempo de 10 y 24 horas post mortem (Pearce et al., 2011). En la figura 3 se puede observar el proceso de rigor mortis.

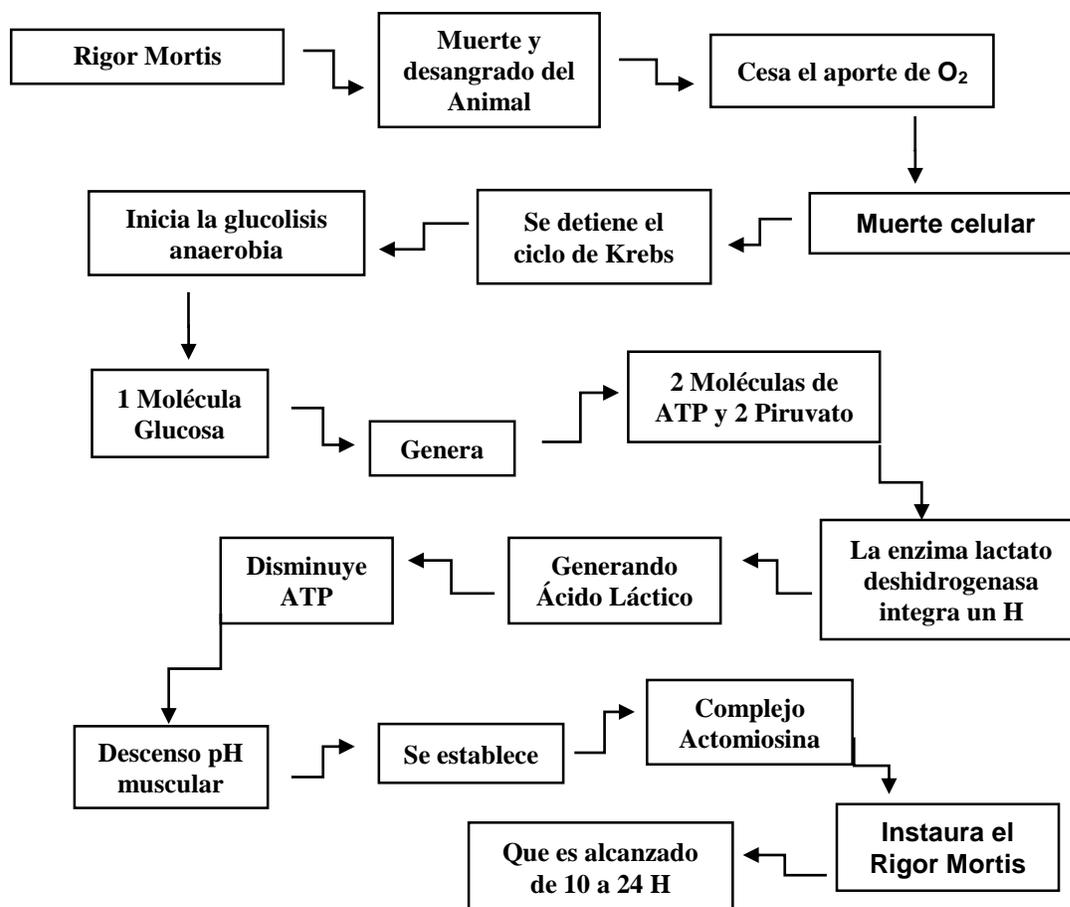


Figura 3: Proceso de Rigor mortis durante el sacrificio del animal.

1.2.4 Maduración

Las carnes PSE (pálidas blandas y exudativas) y DFD (oscuras, firmes y secas) son los dos principales problemas que afectan a la industria cárnica, la carne PSE se caracteriza por presentar una glucolisis rápida y un alta producción de ácido láctico, como consecuencia se produce un descenso del PH a 5.4 (figura 4) aun cuando la canal está caliente, todo este desencadenamiento afecta las características tales como el color, la textura y la retención de agua, esta anomalía es más frecuente en carne de cerdo (Castro, 2013; Gallo, 2006; Uzcátegui & Jerez, 2008). Las carnes DFD se caracterizan por ser oscuras debido a una elevación del pH final medido a las 24 h de expuesta la canal al frio, presentando un aspecto seco en su superficie, un color rojo oscuro y una

consistencia firme, esto se debe a que las reservas de glucógeno muscular fueron agotadas porque el animal fue sometido a factores que le generan estrés antes del sacrificio, estas características se presentan casi en todas las especies (Castro, 2013; Zimmerman, Sañudo, & González, 2008). En la figura 4 se observan las diferencias entre las curvas normales y las carnes DFD.

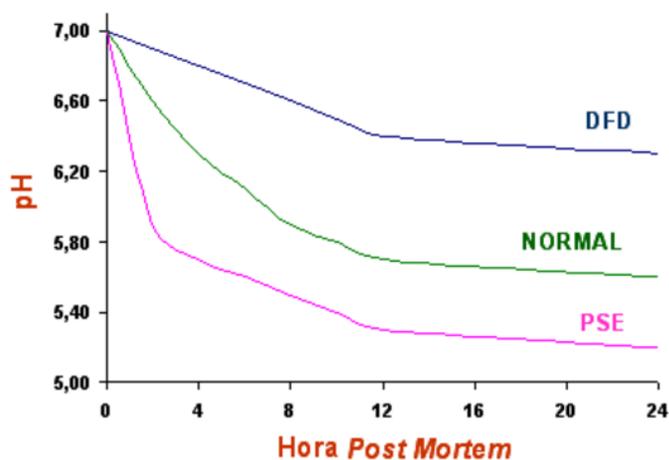


Figura 4: Representación del comportamiento del pH en las carnes DFD, PSE y normal (Zimmerman et al., 2008).

Una vez completada la fase de rigor mortis, se inicia la degradación de proteínas musculares, debido a que el músculo es sometido a temperaturas de refrigeración. En el proceso de maduración, los sistemas enzimáticos endógenos juegan un rol importante, ya que están relacionados con la ruptura de las proteínas miofibrilares que son las responsables de la estructura muscular (Jones et al., 1991).

Para que las enzimas proteolíticas se activen, estas se encuentran ligadas al pH que se da durante la formación del rigor mortis. Debido a esta variación fuerte del pH, se acelera el rompimiento de la membrana de los lisosomas, ya que estas son sensibles a los pH extremos, liberándose así las enzimas causantes de la actividad autolítica (Chacón, 2005). Según Motter et al., (2009) dice que el descenso del pH es de 7 hasta 5.8 o 5.4, en un rango de tiempo que va desde las 15 a las 36 hp

postmortem, este decrecimiento del pH y con bajas temperaturas entre 4 y 5°C a la cual se almacena la carne favorece la acción de las Calpainas.

Durante el periodo de maduración, el aumento de la suavidad de la carne se da rápidamente durante los primeros 3 ó 7 días, etapa después de la cual esta mejoría es relativamente baja. La caída del pH, el rigor mortis y la maduración están estrechamente relacionadas, pero hay que tener en cuenta que entre mayor sea la dureza que alcanza el musculo en el periodo de rigor mortis, es mucho menor lo que la maduración puede lograr para revertir a esta (Chacón, 2005; Lawrie, 1998).

1.3. Terneza de la carne

1.3.1 factores *antemortem*

- **Músculo:** en este influye el pH final, que varía en una correlación inversamente proporcional al contenido del glucógeno en el momento del sacrificio. Siendo la velocidad metabólica de la glicólisis diferente en los dos tipos de músculos de fibras rojas y blancas. Los músculos de fibras rojas tienen un bajo contenido en glucógeno, al contrario que los músculos de fibras blancas, cada musculo está conformado por diferente número de fibras blancas y rojas, por ende sus valores de pH medidos en diferentes partes del musculo son distintos (Lawrie, 1998). Según Ruiz (2012), reporta que valores elevados de pH se encuentran en los músculos del tercio posterior debido a que durante el transporte y sacrificio estos músculos tienen mayor gasto de glucógeno que en los músculos del tercio anterior. Asimismo el músculo Semitendinosus de ovino es más sensible a la degradación del glucógeno por efecto del estrés que el músculo *Longissimusdorsi*.
- **Raza:** La terneza de la carne puede variar con la raza, ya que hay diferencias raciales en los tejidos conjuntivo y muscular. Asimismo los músculos que tengan mayor contenido de fibras blancas con menor cantidad de colágeno van a ser más susceptibles a la hidrólisis de

las proteínas en el periodo de maduración de la carne, dando como resultado una carne más tierna (Soria & Corva, 2004).

- **Edad:** el colágeno, que es una proteína que forma parte del tejido conjuntivo que envuelve las fibras musculares. El contenido de colágeno varía poco con la edad de los animales, pero los enlaces internos del colágeno aumentan con la edad (disminuyendo la solubilidad) (Garriz, 2001). Esto explica que la carne de los animales adultos tenga más dureza que la de los animales jóvenes, ya que presenta una menor solubilidad del colágeno (Lawrie, 1988).
- **Sexo:** según Hilton et al., (2004) reporta que hay diferencias entre sexos en ganado bovino, en cuanto al contenido del tejido conjuntivo, por otro lado analizo que los machos enteros tienen una mayor proporción de colágeno que los machos castrados. Ruiz (2012), reporto que las diferencias entre sexos están bien definidas, a la misma edad, las hembras tienen la carne más tierna que los machos y los animales castrados son más tiernos que los machos enteros. Sin embargo existen conclusiones contradictorias entre los diferentes autores al respecto. Onega & Ruiz (2003), afirma que los machos tienen mayor contenido de colágeno por eso presentan una carne más dura y una menor cantidad de grasa de infiltración que las hembras.
- **Nutrición:** el contenido de energía en la dieta mejoran la terneza de la carne, debido al incremento del contenido de grasa intramuscular (Sierra, 2010). Estudios realizados por Sullivan et al.,(2003) demostraron que la ración afecta la composición química de la carne de los bovinos, ya que las dietas basadas en la suplementación producen una mayor proporción de grasa en comparación con la carne procedente de animales alimentados con forrajes. La nutrición que se le suministre al individuo tiene una incidencia en el valor

nutritivo de la carne sobre su jugosidad, textura y terniza (Crouse et al., 1993).

- **Estrés:** Es un conjunto de estímulos fisiológicos y emocionales inducidos por el medio ambiente, que desencadenan en el cuerpo animal la activación de los sistemas nervioso (central y autónomo), endocrino, circulatorio y las glándulas adrenales, alterando la homeostasis interna y generando cambios en el organismo del individuo, en situaciones que corra riesgo su bienestar o su vida (Díaz et al., 2009; Romero et al., 2011).

Cuando en los animales son transportados y manejados, desde la granja hasta el frigorífico desarrollan una serie de factores que generan un estado fisiológico de estrés, debido a: el arreo con elementos punzantes, mezcla de animales con distinta procedencia, densidad de carga, ruido, cambios climáticos, privación de agua y alimento. Todas estas consecuencias dan origen a reacciones inevitables en los animales que se traducen en estrés físico, fisiológico y psicológico, debido a estas reacciones afectan las características fisicoquímicas de la carne después del faenado (Rincón & Sánchez, 2008; Romero et al., 2011).

Antes de la muerte del animal el estrés afecta las reservas de glucógeno a nivel muscular, esto se relaciona con la caída del pH y su valor final en el músculo, lo cual influye en el color y la terniza de la carne. La actividad del sistema enzimático responsable de la hidrólisis de proteínas musculares depende del pH, la temperatura y la concentración de Ca^{2+} (Muir, Deaker, & Bown, 1998). Los animales sometidos a estrés ante-mortem poseen menores reservas de glucógeno en las células musculares, debido a esto la producción de ácido láctico es menor y como consecuencia el pH final de la carne está en rangos más altos, lo que conlleva a una escasa proteólisis (Soria & Corva, 2004).

1.3.2 factores post-mortem

- **Enfriamiento:** la temperatura que tiene la canal tras el sacrificio oscila entre 37 a 39 °C, esta temperatura va ir descendiendo tras el faenado y la consiguiente refrigeración de hecho las canales tienen que alcanzar una temperatura inferior o igual a 7°C antes del despiece de la canal (García, 2006). Las bajas temperaturas post mortem pueden causar un alto acortamiento del musculo, originando el problema denominado acortamiento por el frio, este se presenta por la exposición de la canal caliente a bajas temperaturas por debajo de 10 °C antes de que se haya instaurado el rigor mortis, como consecuencias, genera la contracción de las fibras musculares y por ende el endurecimiento de la carne, por este motivo el enfriamiento de la canal debe ser lento (Locker & Hagyard, 1963). Estudios realizados por Hamm (1981), reporta que la causa de este proceso se relaciona con la imposibilidad del retículo sarcoplásmico para secuestrar el exceso de Ca^{2+} liberados por el mismo retículo sarcoplásmico y las mitocondrias, bajo la influencia de las bajas temperaturas y el descenso del pH en el músculo en pre rigor. Si se mantienen las canales a 37°C durante las primeras 2-4 horas post mortem, se incrementa la terneza.
- **Estimulación eléctrica:** Tanto en bovinos como en ovinos esta técnica es usada para prevenir el efecto negativo de un enfriamiento rápido sobre la terneza de la carne, este estímulo es de aproximadamente 300 voltios. Las canales estimuladas eléctricamente aceleran los procesos post mortem, causando una fuerte contracción del sarcómero, como consecuencia de la contracción muscular se agotan las reservas energéticas que van a producir un rápido descenso del pH y por lo tanto el rigor mortis se va a instaurar de forma rápida, como la temperatura de la canal esta elevada el retículo sarcoplásmico puede volver

a reabsorber el Ca^{2+} , todos estos procedimientos van a permitir el enfriamiento de las canales y así prevenir el acortamiento por frío (Franco et al., 2009). Estudios realizados por Bird et al., (1980) de mostraron que canales de bovino sometidas a estimulación eléctrica alcanzan el rigor mortis en 4 horas, cuando el tiempo estipulado es de 15 a 20 horas.

- **Congelación:** El rigor de la descongelación puede ser prevenido, retrasando la congelación de la carne, hasta completar el proceso de rigor mortis, o también puede ser por medio del proceso de estimulación eléctrica de la canal que acelera los procesos post mortem, permitiendo congelar la carne en fase pre rigor sin problemas posteriores (Utrera, Morcuende, & Estévez, 2014). Estudios realizados por López & Carballo (1991), reportan efectos de este fenómeno indeseable puede ser minimizado descongelando lentamente la carne. Además indican que la glicolisis continúa durante la congelación, y que un periodo suficiente de almacenamiento en congelación puede llegar a prevenir el rigor por descongelación.

Al descongelar la carne que se ha congelado en pre rigor, pasa por una etapa en la que las miofibrillas tienen la capacidad de contraerse, el retículo sarcoplasmático dañado por los cristales de hielo durante la congelación, es incapaz de detener la contracción. si se logra una temperatura elevada después de la congelación y todavía hay una alta presencia de ATP, el retículo sarcoplásmico puede retomar su función normal y por ende puede producirse la relación muscular (Onega & Ruiz, 2003).

- **Cocción:** durante este proceso la suavidad se mejora al transformase el colágeno de su forma viscosa en gelatina, dando un aspecto más suave, por otro lado las fibras musculares se tornan más duras por coagulación (González, Suárez, & Martínez, 2009). Debido al

calentamiento de la carne se presenta una coagulación de las proteínas musculares, que comienza entre 30 y 40 °C, al llegar a los 50°C se completa la degradación de la α -actina que es la más débil de todas las proteínas. A los 55°C se vuelven insolubles las cadenas ligeras de la miosina, y a los 70-80°C lo hace la actina. La miosina y la troponina2 son las proteínas que más resisten el calor y coagulan a 80°C, la degradación del colágeno comienza alrededor de los 70°C, pero la gelatinización completa no se produce hasta alcanzar los 100°C (Lawrie, 1998).

1.4 Tiernización de la carne Complejo Calpaina y Calpastatina

1.4.1 Calpainas

Las principales calpainas que se expresan en el tejido muscular son: calpaína 1 (μ -calpaína), calpaína 2 (m-calpaína) y calpaína 3 (P94) (Muto, Morton, & Palmer, 2015), se encuentran sustituidas por dos subunidades diferentes asociadas entre sí, debido a que cada calpaina es un heterodimero, están conformadas por una subunidad larga de aproximadamente de 80 kDa (kilo Dalton) denominadas μ CL, μ /mCL ó mCL de acuerdo al tipo de calpaína, y la subunidad pequeña de aproximadamente 30 kDa. En la figura 5 se puede observar la estructura de la calpaina, la unidad larga y corta, cada dominio presenta funciones diferentes. La unidad larga está conformada por cuatro dominios (I, II, III, IV). La función de los dominios I y III de la subunidad larga aún no ha sido establecida (Sorimachi, Ishiura, & Suzuki, 1997).

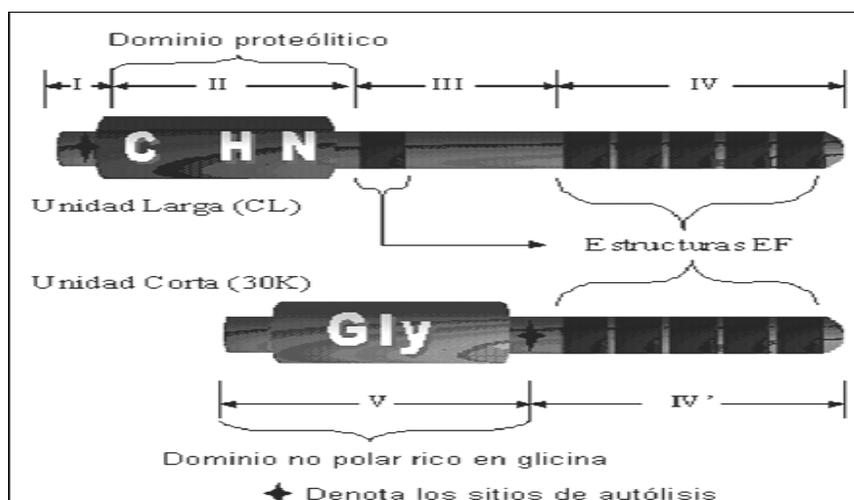


Figura 5: subunidades larga y corta que conforman el heterodímero en las calpaínas (Chacón-Villalobos, 2004).

Sorimachi et al., (1997) plantean que el dominio I puede estar relacionado con la activación de la enzima, por otro lado el dominio II tiene que ver con la parte proteolítica que contiene residuos catalíticos de cisteína, asparagina e histidina, este dominio corresponde a las subunidades largas, la actividad de hidrólisis de las calpaínas es realizada por estas subunidades del dominio II, el dominio III tiene un papel en la identificación de los sustratos y finalmente el dominio IV corresponde a una sección proteica y su respectiva función es ligar el Ca^{2+} por medio de cinco estructuras llamadas EF (figura 5), una sexta estructura EF se encuentra ubicada entre el medio de los dominios II y III. La subunidad corta está constituida por dos dominios, el dominio V corresponde a una región N-terminal formada por residuos de glicina. Finalmente está el dominio IV el cual es muy similar al dominio IV de la subunidad larga, este dominio también es el encargado de ligar el Ca^{2+} y posee igualmente 5 estructuras EF. Sin embargo la estructura EF terminal no liga Ca^{2+} sino que está relacionada con la formación del heterodímero.

Ono, Sorimachi, & Suzuki, (1998) han sugerido que las unidades largas como las cortas pueden asociarse, en ausencia de Ca^{2+} , para generar la estructura de un heterodimero, debido a la interacción no polar recíproca de la quinta estructura C terminal EF de los dominios IV y IV respectivamente. La función de la 30K no es del todo comprendida, aunque su presencia es indispensable para la actividad proteolítica, algunos autores reportan que esta subunidad actúa como chaperona de la subunidad larga regulando la sensibilidad de esta por el calcio. En la figura 6 se puede observar la estructura de la calpaina con la función de cada dominio.

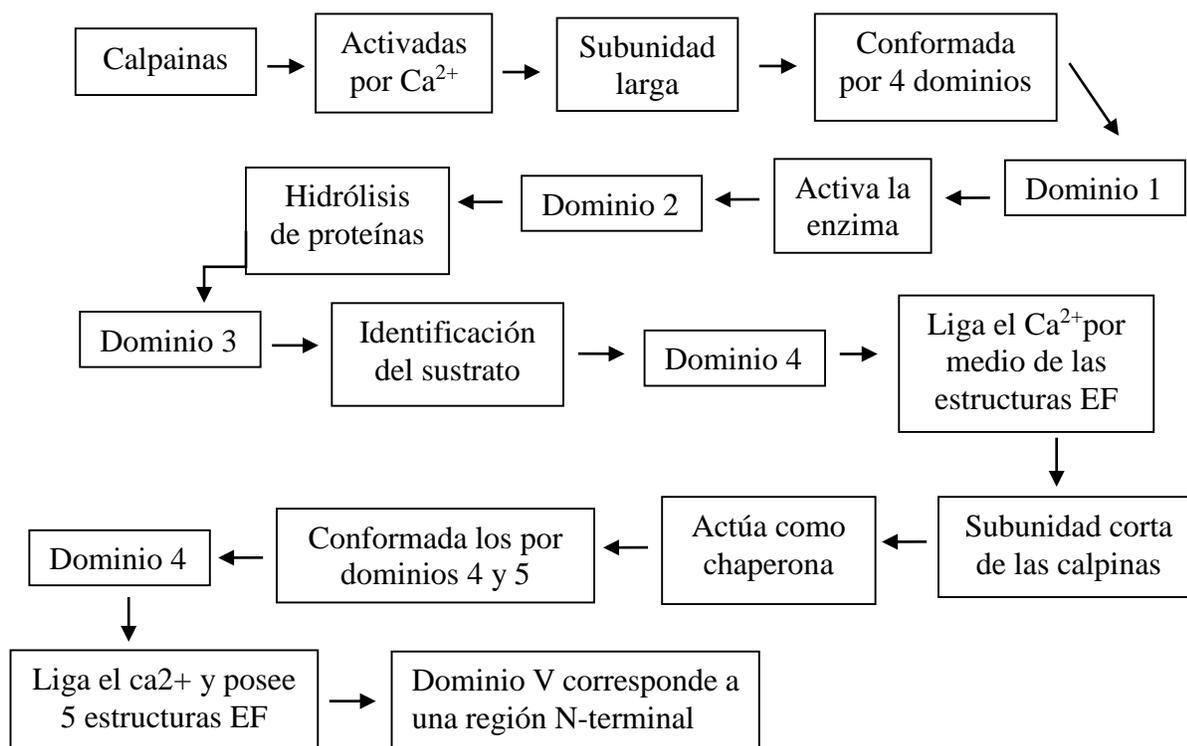


Figura 6: Dominios de la calpastatina con sus respectivas funciones.

Según Geesink et al., (2000) el papel de las calpains 1, 2 y 3 en terneza de la carne concluyeron: la terneza post mortem es causada principalmente por la μ -calpaína, haciendo la lisis de proteínas del enrejado muscular. Su actividad en condiciones post-mortem in vitro e in situ han sido

confirmadas, estudios realizados en ovinos por (Geesink & Koohmaraie, 1999) en μ -calpaína obtuvieron como resultados que la lisis muscular es producida durante el almacenamiento post mortem de la carne y que la proteólisis dura hasta los 21 días. Por otro lado la m-calpaína no está involucrada en la terneza post-mortem muscular, debido al insuficiente Ca^{2+} para su activación, esta enzima se activa cuando los niveles de Ca^{2+} son elevados artificialmente. El papel que desempeña la P94 en la terneza de la carne queda por determinar, sin embargo algunos estudios realizados en calpaína 3 determinaron que se expresa en el músculo esquelético, uniéndose a la titina efectuando la lisis post mortem, se ha sugerido que juega un papel importante en la terneza, algunos resultados discordantes se han obtenido, una correlación positiva entre la calpaína 3 y el nivel de expresión de terneza en corderos (Gandolfi et al., 2011). Su estructura es similar a la subunidad grande de las calpains 1 y 2 con sus cuatro respectivos dominios y tres secuencias específicas NS, IS1, IS2 y situadas en el extremo N-terminal, en el dominio de proteasa DII y DIII y entre el DIV donde se liga el Ca^{2+} (Muto et al., 2015).

1.4.2 Calpastatina

Está formada por cuatro dominios que van del (I a IV), cada dominio está conformado por tres subdominios (A, B y C), a través de estos se une a las calpains. El subdominio B es esencial para la actividad inhibitoria, el tetrapéptido Glu10, Leu11, Gly12, Lys13 del subdominio IB de calpastatina forma un loop que es esencial para la unión a la μ -calpaína. Además de los cuatro dominios con acción directa sobre las calpaínas, la calpastatina presenta un dominio en el extremo NH2 denominado L, el que no tiene acción directa sobre las calpaínas, pero su función es determinar la localización de la enzima en la célula. Hay diferentes isoformas de esta enzima, estas están denominadas en cuatro tipos (I, II, III y IV). Las tres primeras han sido identificadas en bovinos en el músculo esquelético, cardíaco e hígado, la tipo IV sólo actúa en testículo. En la

figura 7 se puede observar la estructura de la Calpastatina, la región XL, L y I a IV corresponden a cada dominio. A, B y C son los tres subdominios, con la numeración se demuestran los aminoácidos. (***) Sitios fosforilados por proteinkininas (Motter et al., 2009).

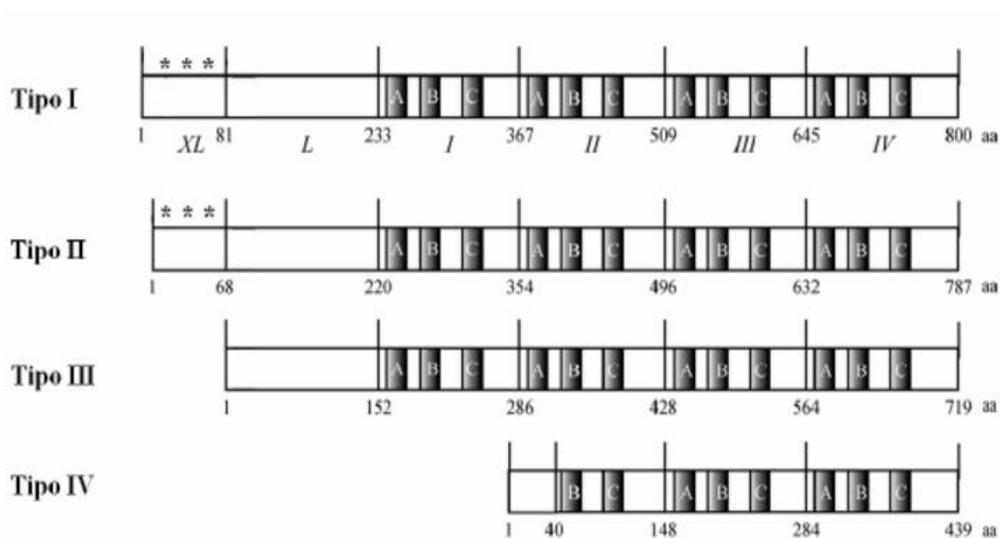


Figura 7. Tipos de Calpastatina que corresponden a diferentes tejidos de bovino (Motter et al., 2009).

Se ha demostrado que en presencia Ca^{2+} una molécula de calpastatina inhibe hasta cuatro moléculas de calpains, este ion es fundamental para que la interacción se produzca, por otro lado la calpastatina inhibidor específico de las calpains, se unen a los dominios IV y IV de las subunidades cortas y largas evitando que el Ca^{2+} se una a esta zona. De esta manera se reduce tanto la velocidad como la actividad proteolítica de las calpains. Varios estudios realizados demuestran que la μ -calpaina es la responsable de la proteólisis y por ende la ternura de la Carne (Uzcátegui & Jerez, 2008).

La calpastatina y la calpaina están ubicadas intracelularmente en forma exclusiva, no se encuentran libres en el citoplasma del miosito, estas enzimas están localizadas en la línea Z de los sarcómeros, y en menor cantidad se encuentran presentes en la banda I estudios realizados por Dayton & Schollmeyer (1981), han demostrado el papel de las calpainas es la hidrólisis de la línea Z, rica en titina y nebulina, y de otras proteínas que sirven de unión entre las miofibrillas y la membrana plasmática, esta proteólisis está directamente relacionada con la terneza de la carne post mortem. Las calpainas degradan a la tropomiosina y a las troponinas T y I. Estas proteínas contribuyen a la estabilidad de los filamentos gruesos de miosina y en el mantenimiento de los monómeros de actina en la forma filamentosa, también lisan la nebulina, desamina y titina, la función de estas proteínas es mantener la estabilidad del enrejado que forman los filamentos gruesos y delgados. Los tres tipos de calpainas son las encargadas de la proteólisis que le dan la estructura al sarcómero por igual, estas enzimas hacen el principal sistema proteolítico responsable de la hidrólisis post mortem (Goll et al., 1991).

1.5 Warner-Bratzler

La terneza de la carne es una característica de gran importancia que influye en la satisfacción del consumidor, esta puede ser evaluada utilizando métodos objetivos, métodos instrumentales o sensoriales con un grupo de paneles entrenados o de una forma subjetiva con un panel de consumidores (Silva et al., 2015). El protocolo de Warner-Bratzler es utilizado desde 1930 para estimar la dureza de la carne, midiendo la cantidad de fuerza necesaria para cortar las fibras musculares, para llevar a cabo el corte se puede realizar en muestras crudas y cocidas, estas se deben llevar al horno hasta alcanzar una temperatura interna de 71 °C (Girard et al., 2012).

Para realizar la evaluación de terneza se utiliza un equipo de célula Warner-Bratzler aplicada a un texturómetro instron® para medir la fuerza máxima de corte (shear force kg), arrojando valores de

resistencia al corte de una muestra de carne en forma de cilindro o prisma, este corte con la célula se debe realizar con un trozo de carne, deshuesado, cortado en forma perpendicularmente a la dirección de las fibras musculares, la muestra debe tener un espesor aproximado de 2.5 cm, al cual previamente se le retira la grasa periférica o subcutánea, con la ayuda de dos cuchillas, una de estas tiene forma triangular. La máquina toma la fuerza máxima del corte que es ejercida durante la ruptura completa del tejido (Braña et al., 2011).

Estudios realizados por Safari et al., (2002) en canales de cordero comercializadas en almacenes de cadena y diferentes expendidos de carne en Australia. Fueron tomadas muestras del músculo *Longissimus lumborum caudal* y se midió la terneza objetivamente mediante el protocolo de Warner-Bratzler (WB) determinando la fuerza de corte, encontrando resultados de más de 5 Kg, además, el 20,3% de las muestras registraron valores de fuerza de corte WB por encima de 5 kg, un valor por encima del cual los consumidores Australianos consideran que la carne de cordero no tiene una terneza aceptable. Por otro lado estudios realizados por Belew et al., (2003) en bovinos, los músculos fueron clasificados de acuerdo a los valores que presentaron ante la fuerza al corte como: carnes muy suaves (<3.2 kg), suaves (entre 3.2 y 3.9 kg) y duras valores superiores a 4.0 kg.

1.6 Genética de la calidad de la carne

1.6.1 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético es la principal herramienta para resolver los problemas de baja productividad en animales con fines zootécnicos, en conjunto con el avance de otras ciencias como la reproducción, la nutrición y el manejo de cada explotación, han buscado crear métodos de

producción enfocados en una genética eficiente para transformar las materias primas en productos (Herrera, 2011).

Con lo mencionado anteriormente el mejoramiento genético tiene como objetivo seleccionar las frecuencias de los genes productivos dentro de una población, para llevar a cabalidad dicho objetivo hay que implementar un plan de mejoramiento genético, seleccionando los animales élite con las características deseables que un animal es capaz de transmitir a su descendencia (Ossa & Suárez, 2008). Sin embargo las necesidades que tiene el mercado y el propósito de los productores es tomar decisiones en base a ciertas características relacionadas con el valor económico de la producción, se han tenido en cuenta una serie de aspectos para ser implementados en los planes de mejoramiento genético enfocados a la calidad de carne, entre los que podemos encontrar: el área del músculo y su variedad de cortes, porcentaje de grasa y terneza, algunas de estas características son complejas imposibles de medir en el animal vivo, por lo que pueden ser evaluadas por medio de la genética molecular (Montaldo & Barría, 1998).

1.6.2 Mejoramiento genético en ovinos

En Uruguay las evaluaciones genéticas de las razas ovinas empezaron con Diferencias Esperadas en la Progenie (DEP), para identificar las características de interés económico en la producción, el uso de esta herramienta no solo permite la evaluación de los padres utilizados, sino que también todas las de su descendencia (machos y hembras), es una manera segura y eficaz con el objetivo de aumentar el beneficio de los productores (Ciappesoni, Gimeno, & Coronel, 2011).

Por otro lado los avances en técnicas moleculares que identifican mutaciones puntuales (SNP), en el genoma animal, a muy temprana edad, aportando información acerca de su composición genética con respecto a una característica deseable (Marín, Cadavid, & Muñoz, 2013). En ovinos ya se ha diseñado un panel de marcadores (chip) que permiten evaluar más de 54.000 SNP en cada

animal, en Colombia (Ortiz et al., 2015) realizaron un estudio con un microchip de alta densidad identificando 3 SNPs asociados a terneza de la carne. Por otro lado la producción ovina del país, está realizando planes de mejoramiento genético con la importación de sementales provenientes de países como Chile, Mexico y Uruguay, con el fin de mejorar el pie de cría que se tiene actualmente en Colombia (Restrepo et al., 2010).

1.7 Genes que afectan la terneza de la carne

1.7.1 Gen Calpaína (CAPN)

El gen de la calpaína localizado en el cromosoma 21 del ovino, está conformada por 25 exones (Ensembl, 2015), estudios realizados por Zhou, Hickford, & Fang (2007) en ovinos de raza Merino, Corriedale y Romney se identificaron tres polimorfismos en el exón 10 los cuales fueron C>T, G>T, C>T sin ningún tipo de asociación. Todas las sustituciones de los nucleótidos son sinónimas y la secuencia de los aminoácidos no tuvo ninguna variación en esta región.

1.7.2 Gen Calpastatina (CAST)

La Calpastatina es una enzima inhibidora de la actividad proteolítica de las calpainas, esta codificada por el (gen CAST), este se encuentra localizado en el cromosoma 5 del ovino y está constituido por 29 exones, la proteína tiene 786 aminoácidos (ensembl, 2015), en bovinos este gen expresa diferentes isoformas de calpastatina debido a la existencia de cuatro promotores, estos se localizan en el extremo extremo 5' de los exones 1xa, 1xb, 1u y 14t de dicho gen (Raynaud et al., 2005). Según Dagong et al., (2012) en ovejas de la raza Priangan y Fat Tail encontraron un polimorfismo en el exón 6, de una sustitución de nucleótido A>T, era una mutación no sinónima que habría incluido una sustitución de un aminoácido Gln por Leu.

1.8 Herramientas usadas en el mejoramiento genético

1.8.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza con las técnicas fenol-cloroformo-álcool isoamílico o un Kit comercial, con la finalidad de separar los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en solventes orgánicos. La etapa de lisis celular consiste en desestabilizar las estructuras que rodean al citoplasma y así liberar el material genético que hay en ellas. Para ser utilizado con fines investigativos (Moore & Dowhan, 2003).

1.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica especializada innovadora para el estudio del DNA, se identifica por ser una técnica de alta eficiencia, que arroja resultados confiables en corto tiempo y fáciles de analizar. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* donde se amplifica una secuencia de ADN millones de veces, durante varios ciclos repetidos donde la secuencia diana es copiada finalmente. Para que esta reacción se lleve a cabo hay que introducir la muestra en un termociclador el cual cumple con las condiciones ideales de temperatura y el tiempo estipulado (Tamay 2013).

1.8.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Este método se lleva a cabo con la técnica PCR y la digestión con enzimas de restricción, el ADN puede ser genómico o mitocondrial, con el uso de primers se amplifica el fragmento diana y posterior a esto se procede a la digestión de la muestra, este método es ideal ya que detecta las mutaciones puntuales que afectan los puntos de restricción (Jiménez & Collada, 2000).

1.8.4 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)

El Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) es una técnica utilizada para el rastreo de mutaciones, especialmente entre 150 a 200 nucleótidos, el rango de sensibilidad que tiene este método está entre el 80 al 90% para detectar polimorfismos menores a 200 Pb, la técnica se fundamenta que bajo condiciones no desnaturalizantes una cadena individual de DNA toma una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia nucleotídica, esta conformación es dependiente de la hibridación entre diferentes lugares del segmento de DNA replegado sobre sí mismo. De acuerdo a la forma adquirida por la molécula esta migrara con mayor o menor facilidad a través de un gel de electroforesis, logrando observar dos hebras de DNA, donde sus secuencias son muy similares, esta técnica tiene una alta potencia, debido a que la variación de un solo nucleótido es capaz de hacer que la cadena adquiera una conformación tridimensional totalmente distinta (Estrada et al., 2005; Herrera, 2011).

1.9 Polimorfismos de nucleótido Simple (SNP)

Los cambios en el DNA son llamados mutaciones, estos son originados por los errores en los mecanismos de replicación y reparación del DNA, tan bien se pueden dar por factores ambientales. Las mutaciones pueden tener efectos deletéreos y pueden causar enfermedades, las mutaciones que dan origen a lo que se conoce como polimorfismo, los cuales dan variación alélica ente los individuos y diversidad de la misma especie. Un SNP o polimorfismo es una sustitución de un sólo nucleótido de una base por otra, esto se da entre genomas de individuos de la misma especie (Caratachea, 2007).

Un SNP puede estar presente en las regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido por otro, estas mutaciones son conocidas como no sinónimas. Otro tipo de SNP son los sinónimos o silenciosos, estos no alteran la conformación del gen, sin embargo, algunas mutaciones de estas

pueden generar consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (Nebert, 1997). Además, existen variaciones funcionales que están asociadas a alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, se pueden encontrar localizadas en la región promotora del gen, influyendo en la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en los intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de splicing (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Caratachea, 2007).

- **Mutaciones de pequeña escala**

Están divididas en dos tipos: las transiciones, se presentan por la sustitución de una base púrica (adenina o guanina) y es remplazada por otra base púrica o una base pirimidínica (citosina, timina y uracilo) es sustituida por otra base pirimidínica. Por otro lado encontramos las transversiones, estas se originan cuando hay el cambio de una base púrica por una base pirimidínica, o viceversa. Estas sustituciones se pueden dar por que algunos de los átomos de hidrogeno de cada una de las cuatro bases pueden cambiar sus posiciones, para originar formas tautoméricas (isómeros que se originan por la emigración intramolecular de un átomo pequeño) distintas a las usuales, en una proporción muy baja (Valenzuela, 2003).

Las mutaciones por pérdidas e inserción de bases son más graves que las mencionadas anteriormente, ya que a partir de la delección o adición, todos los codones de bases estarán cambiados, por lo tanto el mensaje codificado será totalmente diferente. Se producirá un emparejamiento anómalo durante la replicación de la hebra molde y la que se está sintetizando (Estrada et al., 2005).

1.10 Determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) es clave para el estudio de asociaciones entre mutaciones genéticas y enfermedades, estableciendo la composición genética de un grupo de individuos, que permanece en equilibrio mientras no intervenga la selección natural y no se genere una mutación (Lessa, 2001).

La genética de poblaciones tras una generación de apareamientos al azar, las frecuencias genotípicas de un gen individual se fijaran en un valor de equilibrio particular, también define que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. Un gen diploide que tiene dos variantes alélicas, puede generar solamente tres genotipos diferentes (AA, Aa y aa), si un animal hereda alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el EHW pronostica que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es P^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y el homocigoto recesivo aa es q^2 (Uribe, 2001), Posteriormente se hace una comparación entre las frecuencias esperadas (esp) y observadas (obs), las diferencias entre estas son mínimas, luego se realiza una prueba de chi cuadrado, que se usa para observar si las desviaciones entre las frecuencias (esp y obs) tienen significancia. Calcular el chi cuadrado e interpretación del resultado teniendo en cuenta que existe un grado de libertad. Como resultado si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg quiere decir que está cumpliendo con las siguientes hipótesis: está conformada por organismos diploides, su reproducción es sexualmente, no fue sometida a migración o selección, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación (Lessa, 2001).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar mutaciones puntuales en los genes candidatos a terneza *calpaina* (CAPN μ) y *calpastatina* (CAST) en ovinos criollos colombianos.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener ADN de alta calidad mediante la utilización y estandarización de dos técnicas a partir de muestras de musculo y sangre de ovinos criollos Colombianos.
- Determinar la presencia de cambios nucleotídicos tanto en regiones intergénicas como codificantes en los genes (CAPN μ) y (CAST).
- Establecer la frecuencia alélica y genotípicas de la mutación en los genes candidatos propuestos en el estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población

Animales: Se evaluaron 80 Ovinos de la raza Camuro, entre los 8 y 12 meses de edad, 23 provenientes de las zonas de piedemonte (Meta y Caquetá), 26 animales de los valles interandinos (Tolima, caldas y Palmira) y 31 individuos de la Llanura del Caribe (Córdoba). Para la realización de este proyecto, fueron utilizadas muestras de músculo y sangre procedentes del banco de tejidos del laboratorio de Biología Molecular Animal de la Universidad Nacional de Colombia, pertenecientes a animales obtenidos a través del desarrollo exitoso de los proyecto *EVALUACION GENOMICA ASOCIADA A LA CALIDAD DE CARNE DE CAMURO CRIOLLO COLOMBIANO* durante el periodo de 2013 a 2014 y *ANÁLISIS GENÓMICO DE POBLACIONES OVINAS*

MEDIANTE EL USO DE UN MICROARREGLO DE ALTA DENSIDAD ASOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y CALIDAD DE LA CARNE, CON UNA APROXIMACIÓN A UN SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE CANALES". Estos animales fueron alimentados bajo un sistema de pastoreo, las praderas estaban compuestas por mezclas de diferentes gramíneas dependiendo de la zona. Los animales fueron sacrificados y el músculo *Longissimus dorsi* fue evaluado para varias características de calidad en las instalaciones de la planta piloto de carnes del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA).

3.2 Evaluación genotípica

3.2.1 Extracción de DNA

El aislamiento de ADN se realizó a partir de 0,015 gramos de músculo y 3 ml de sangre procedentes del banco de tejidos del laboratorio de Biología Molecular Animal de la Universidad Nacional de Colombia, mediante el uso del protocolo Kit Instruction for Invisorb Spin Tissue Mini Kit ® y fenol cloroformo.

La cuantificación de la concentración del ADN se realizó mediante espectrofotometría utilizando luz UV. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula posee una absorbancia máxima a 260 nm. Para determinar pureza, se utilizó la razón de ADN/proteínas. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. La visualización se realizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con SYRB green® (Invitrogen™, USA). La concentración final de trabajo será 10 ng/ μ l ADN en buffer T10E1. El ADN se rotulo con el número de identificación de cada individuo, se depositaron en cajas plásticas marcadas con el nombre del proyecto, la fecha de extracción y el responsable de las muestras. Finalmente se almacenaron a -4°C y -20°C respectivamente.

3.2.2 Marcadores moleculares

Para la amplificación de los marcadores de *CAPN* y *CAST* se utilizaron los primers descritos por (Page et al., 2004; Majidi et al., 2009).

Cuadro 1

Marcadores de los genes CAPN y CAST

Locus	Región amplificada	Secuencia del primer (5' → 3')	Peso del fragmento (pb)
<i>CAPN316</i>	exones 8, 9,10 y el intron 8 y 9	F:GGGCCAGATGGTGAACCTGA R: TTGCGGAACCTCTGGCTCTT	739
<i>CAST1</i>	exones 10, 11 y el intron 10	F:AGCAGCCACCATCAGAGAAA R: TCAGCTGGTTCGGCAGAT	1552

Locus, método, región del fragmento amplificado, secuencia del iniciador (5' → 3') F: forward y R: reverse, peso del producto de los genes Calpaina y Calpastatina.

3.2.3 Amplificación y genotipificación de los individuos

Las reacciones de PCR para los marcadores fueron llevadas a un volumen total de 17.3 µl. Las reacciones consisten en 1X de Buffer de PCR, MgCl₂ a una concentración final de 2.5 µl, 4,2 ul de concentración para cada uno de los dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) más 0,20 ul de ADN polimerasa Tth (*Thermus thermophilus*) y 1,6 ul de cada cebador (delantero y marcha atrás), 5,7 ul de agua ultra pura, así como 1,5 ul de ADN genómico ovino. Las muestras fueron amplificadas bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95 °C por 5 min; 32 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 seg; temperatura de anillamiento correspondiente a cada marcador (*CANP* 316) 61.1°C y (*CAST* 1) 60.1 °C por 1 min; extensión 72 °C por 1 min posteriormente 1 ciclo de

extensión final 72 °C por 10 min usando un termociclador PCR Multigene Gradient (Labnet, International). Los productos de amplificación fueron evaluados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con SYRB-GREEN (Invitrogen, USA) Para la amplificación se empleó un termociclador MULTIGENE (Labnet, Inc., USA). Metodología estandarizada por el laboratorio de genética y biología molecular animal.

La Identificación de polimorfismos se realizó mediante el uso de la técnica SSCP (polimorfismo conformacional de cadena simple) (Schenkel et al., 2006), donde los genotipos fueron visualizados en geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata (Taylor, 1997).

3.2.4 PCR-SSCP

La genotipificación de los genes CAPN y CAST se realizó mediante la técnica de PCR-SSCP (Sheffield et al., 1993) después de amplificadas las muestras se les adiciono 10 ul de buffer de carga para acrilamida, la mezcla se denaturo a 95°C por 5 minutos y se refrigero a -20 °C por 5 minutos, posterior a esto 10 µl de la mezcla fue sembrada y corrida en geles de poliacrilamida (89:1 acrilamida-bisacrilamida) con una concentración del 10% durante 12 horas para el marcador CANP 316 Y 17 horas para el marcador CAST1 a 30 W, la electroforesis se realizó en buffer TBE1X. Los fragmentos fueron visualizados por medio de tinción de nitrato de plata (Benbouza et al., 2006).

3.3 Análisis estadístico

Para cada uno de los marcadores tipo SNPS se determinaron las frecuencias genotípicas, alélicas, heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) y el coeficiente de endogamia (Fis). Mediante el uso del ofware libre GenAIEX (Peakall & Smouse, 2006)

4. Resultados y discusión

- **Cuantificación de ADN**

El ADN extraído de los ovinos criollos Colombianos provenientes del banco de tejidos se encontró en óptimas condiciones, para determinar sus concentraciones



Figura 8: Visualización de ADN en gel de agarosa al 1.5%, carril 1 al 9 muestras de ADN.

La identificación de mutaciones puntuales en el genoma de un individuo permite que los genetistas puedan identificar la asociación de los SNPs con características de importancia económica, esta información permitirá hacer la selección de los animales élite de acuerdo a su genotipo (la identificación se puede hacer por la selección asistida por marcadores tipo SNPs), lo que es un gran avance en los rasgos cuantitativos que es compleja su medición como es el caso de la terneza.

Los marcadores CAPN 316 y CAST 1 fueron elegidos para la presente investigación, han sido evaluados por la comunidad científica en poblaciones bovinas por su asociación con características de terneza de la carne, por esta razón se buscó la homología de estos SNPS en el genoma ovino, esta investigación fue realizada haciendo uso de la herramienta bioinformática BLAST perteneciente a la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Encontrando la homología de los marcadores (CAPN 316 y CAST 1) que fueron totalmente complementarios a la secuencia del genoma ovino.

- **Genotipificación**

A partir del ADN genómico extraído de los animales, se amplificaron los fragmentos correspondientes a los genes CAPN y CAST ver figuras 9 y 10, haciendo uso de la técnica PCR, se utilizaron los primers que se muestran en la cuadro 1, la identificación de los genotipos se realizó utilizando la técnica SSCP para la detección de los polimorfismos diferentes conformaciones de las cadenas se detectaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, identificándose tres patrones los cuales fueron denominados como genotipo AA, AB, BB para los dos marcadores, dando como resultado que fueron polimórficos ver figuras 11 y 12.

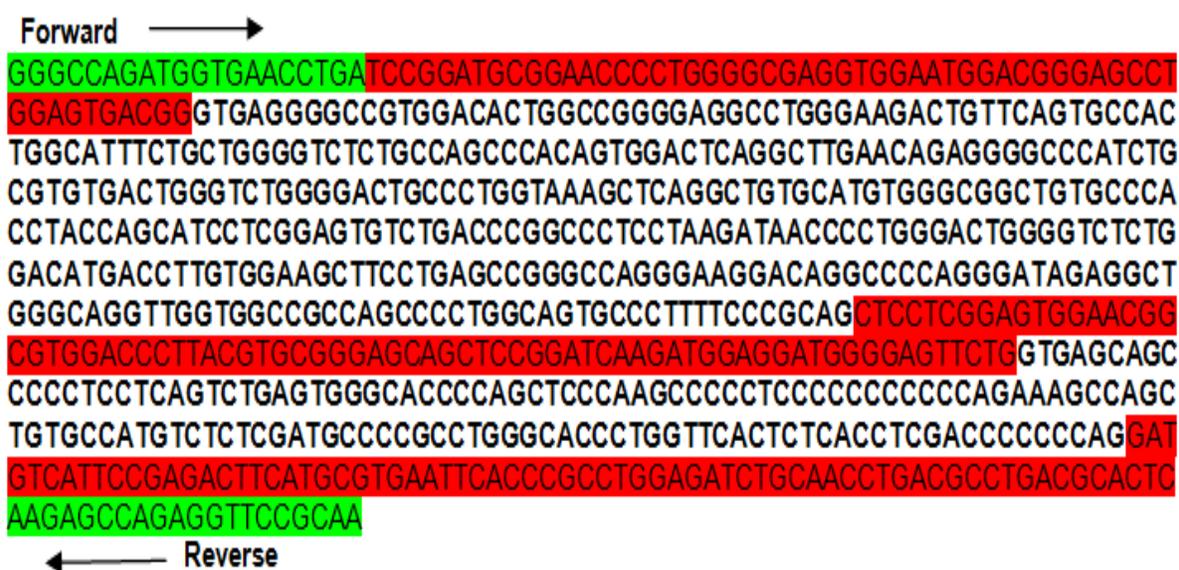


Figura 9: Ubicación del fragmento amplificado del gen CAPN 316, resaltado en verde: primers, en rojo los exones 8, 9,10 y en negrilla los intrones 8,9 y su Peso es de 739 Pb.

Forward →

AGCAGCCACCATCAGAGAAA TCAACAAAACCAAAG GTAAA TAAAGCAGACAGATAGATGAAAGAAA
 GAAAGTGAAGTCCTCAATCGTGCCAACCTTTGAGACCCCA TGGTTCCCCCAGGAACCTGCCAA
 GTTCTCTGTCCACGGAA TTTCCAGGCAAGAGTGCAGGAG TGGGTGCCA TTTCTTCTCCAGGG
 GATCCCAGCCAGGGATTGAACCCAGGTCCTCTGCA TTG TAGGCAGATGCTTTACCAGGTGGATAG
 ATGGGGAAACACTAA TGTCAGCTAGGGGA TAAGATACAGATCC TCTGCCTATACTGA TGTGTGCAG
 GTGACTCTTTCGGAGCTA TGCCAAATGTA TC TGGTATAG TCAAGATTTGGTGTTATCACTTTTCTGGT
 GTTGCAAATAGCCTTGAGGGGACCTGGGACTA TGTAAGGCC TGAGGAGGGGCA TCAGA TGGGTCTG
 AGGGATGTTCCATCACACCC TGCCACTGCCAGCAAGCAG TGCCAG TTG TGACCTTGAGGGGAGC
 AGGCTCTGGTGTCTTACAGAGAGGAAGCTGGGAGTTGAGGC TGCTCC TGCACCCCTCTCC TCA TG
 GTGGTTTAGTTGCCAAGTTGTGTC TGATGCTTGCAACCCCA TGGACTGTAGCCCACCAGGTTCTCT
 GTCGGGATTC TCCAGGCCAGAA TACTGGAG TGGGTCACCA TTTCTTCTTTAGGGGA TCTTCCCGA
 CCGAGGGA TCGAACCTGGGTCTCCACA TTGCGGGCAGA TGA TTTACCAGCTGAGCTA TGAGGGGA
 AGCCCTCTCC TTATGGACTG TGGGAA TTCACA TGCCCTGCG TGA TCTGC TCCTTACC TGGAGGTC TT
 AGAA TTTTGTGGCTCT TTACTGGAGACA TCAAC TTACAGAGCCAAAAAATTAGAAAA TA TTTCTGTA
 TTTCCAGAAGTAACAGTAG TCATATATAAGAAGAA TAAGCA TCCGTGAGAAGAACTTTTTCA TTA TG
 AGCTCTTGGAAGACCATATATCTCG TACACAACAA TA TACCTTGATCAGGA TTGCTGTGTGGCCCA
 CCAGCTACAGCCACTTGTGTG TTC TA TTTGGC TTACCA TAA TCAAAA TGAA TTTTCTAG TTAGCTGCCA
 ACAGTCACAGTCAGAA TAG TTCACA TAAAATGCCAA TGTC TAGC TTCTCTTGAAGAAC TGGAAATCGC
 TGGCAGCAGTGGGCCCCCATGGCAACAC TTGACTGGCATCCC TGCAGCC TGGTGTGAGCC TCCCC
 GGCCCACTTCACTG TG TGT TTTACCCACGTGGCC TC TG TAAGC TC TGGAGTCCAGC TC TG TG TCCC
 CCACA TTGCA TCA TG TCCAGCAGAAGCTAG TGACCA TTTCTC TACAAGA TGTCCACGAGGGGAAAC
 GGGCTCCC TGG TAACA TTTGAAA TGTATGA TC TTGAAA TGGGCA TTCAAAGTTAAC TTAGTTCTGT
 CGATCTTTCAG ACCAAGTCACAGGACGAGATTTCCGGTGGTGGAAAGAGCGCTGTTCTCTGCTGTTGC
 AGCTGCAGCATCTGCCGAACCAAGCTGA

Reverse ←

Figura 10: Ubicación del fragmento amplificado del gen **CAST1**, resaltado en verde: primers, en rojo los exones 8,9 y en negrilla los intrones 8 y su Peso es de 1552 Pb



Figura 11: Gel de acrilamida genotipos del gen **CAPN**. Carril 1, 3,4 genotipos BB, carril 2, 6, 8,11 genotipo AB carril 5, 7, 9,10 genotipo AA



Figura 12: Gel de acrilamida genotipos del gen CAST. En los carriles 1, 3, 4, 5 genotipo AA, carril 2 genotipo BB carriles 6 y 7 genotipo AB.

Frecuencias Alélicas y Genotípicas

En la cuadro 2 se presentan los valores de las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores tipo SNPS CAPN Y CAST, serán discutidos para cada marcador.

Cuadro 2

Frecuencias Alélicas y genotípica, de los marcadores CAPN316 Y CAST1.

Locus	Frecuencia Alélica %		Frecuencia Genotípica %		
	A	B	AA	AB	BB
CAPN	54.4	45.6	35	38.75	26.25
CAST	93.7	6.3	88.75	10	1.25

4.1 Gen calpaina (CAPN)

En bovinos hay diversas variantes del gen CAPN localizado en la región del cromosoma 29, se han asociado por tener efectos sobre la terneza de la carne, el SNP 316 está localizado en el exón 9 de la región reguladora (28k Da) y su nombre se debe a que hay un cambio en el aminoácido 316 de la cadena de polipéptidos (Bracho, 2011; Van et al., 2007), el resultado es una transversión Citosina por Guanina (C/G) en la posición 5544 del gen ocasionando un cambio en los aminoácidos de una Glicina por una Alanina, este SNP es no sinónimo y fue reportado en ganado *Bos taurus* (Page et al., 2002), en los ovinos el gen CANP está localizado en el cromosoma 21 y ha sido poco estudiado en esta especie (Ensembl, 2015).

Para el presente estudio en el SNP 316 se observaron frecuencias génicas para A y B las cuales fueron 54.4 % y 45.6 % respectivamente, y en cuanto a las frecuencias genotípicas se evidencio un 38.7% de heterocigotos, Ver cuadro 2 Page et al., (2004) reportaron en ganado *Bos taurus* una asociación de la variante alélica C a una reducción en la fuerza de corte Warner Bratzler (FCWB). Sin embargo (White et al., 2005) realizaron un estudio en animales cruzados con *Bos indicus*, donde obtuvieron una disminución significativa (FCWB) de 0,55 Kg para el genotipo homocigoto CC y 0,18 Kg para el heterocigoto CG, cabe resaltar que está presente la variante alélica C que tiene una asociación con la terneza. Parra & Sifuentes (2007), encontraron las frecuencias alélicas para C con un 46% y G con 54 % en ganado Brahman, mientras que Cuetia et al.,(2012) realizaron un estudio en bovinos criollos Colombianos y reportaron una frecuencia del 21% para el alelo C, por otro lado Corva et al., (2007) observaron alelos C Y G con frecuencias de 0.29 y 0.71% en animales Brangus de Argentina. En los estudios mencionados anteriormente se encontró que el alelo G es más frecuente que el alelo C en las poblaciones estudiadas, hay que resaltar que el alelo

C presenta una reducción en la fuerza de corte en la prueba de Warner Bratzler, por esta razón es importante hacer una secuenciación del fragmento del gen calpaina para identificar claramente cuál es la modificación genética que sucede en estos animales. Lo que indicaría que al hacer la secuenciación en la población de ovinos se encuentra presente el alelo C se debe llevar a cabo un plan reproductivo en donde se pueda incrementar las frecuencias con los genotipos favorables en la población de ovinos criollos colombianos.

4.2 Gen calpastatina (CAST)

Diversos trabajos científicos han confirmado que la Calpastatina es un inhibidor de las enzimas dependientes de calcio la u-calpaína y la m-calpaina, Sin embargo hay una alta asociación del complejo enzimático encargado de la proteólisis muscular en el proceso de tiernización de la carne, donde una alta concentración de calpastatina al momento del faenado del animal, es considerado un factor correlacionado con la reducción de la terneza de la carne (Castro, 2013; Motter et al., 2009), la proteólisis muscular *postmortem* determina la terneza de la carne, este proceso también está relacionado con la raza del animal. La carne de animales *Bos indicus* generalmente posee menor terneza que la obtenida de animales de razas *Bos taurus* (Motter et al., 2009).

En los bovinos el gen Calpastatina está ubicado en el cromosoma siete (Bracho, 2011), varios SNP han sido reportados en literatura y asociados con la fuerza de resistencia al corte (Casas, 2006; Reardon et al., 2010; Schenkel et al., 2006). El marcador CAST1 ha sido reportado como un SNP localizado en el intrón 6 del gen CAST donde una pirimidina es sustituida por otra pirimidina, citosina por timina (C/T) en la posición 7615 (Castro, 2013).

Para el marcador CAST1 el alelo A se encontró en frecuencia del 93.8% y el B 6.3%, se observó que los animales con genotipo AA presentaron la mayor frecuencia con un 88.75% ver cuadro 2. Por el contrario (Majidi et al., 2009) tomaron una población de ganado Nelore e identificaron

alelos A y B con frecuencias de 42 y 58 %, respectivamente reportando un alto índice de heterocigotos para el genotipo AB con un 58.53 %, las frecuencias reportadas fueron muy diferentes a las del presente estudio. En bovinos *Bos indicus* por *Bos indicus* y *Bos taurus* por *Bos indicus* encontraron variantes alélicas para C y T de 60 y 40% respectivamente (Castro, 2013). Leal (2013), encontraron frecuencias similares para los alelos C y T con un 63 y 37%. Estos estudios coinciden que el alelo C es más frecuente en las poblaciones estudiadas, en la presente investigación se observó que el patrón denominado alelo A fue más predominante en la población que el alelo B, por eso el paso a seguir es secuenciar el fragmento de ADN para identificar si el patrón A corresponde al alelo C o al alelo T o cual es la sustitución que se está presentando en dicho fragmento, es pertinente hacer pruebas de Warner Bratzler para determinar cuáles son los genotipos que presentan menores valores de fuerza de corte.

De los 80 animales muestreados 52 son machos, donde se evidencio que el genotipo AA presentó un mayor índice para los dos marcadores, sin embargo en el marcador CAST1 se identificó un individuo para el genotipo BB, en contraste las 28 hembras donde se observó la misma frecuencia en los genotipos AB y BB con un 39 % para el SNP 316, por otro lado el genotipo AA presentó el índice más alto para el marcador CAST1 (Cuadro 3).

La producción ovina inicia con la cría de machos y el reemplazo de hembras productoras, estas son las encargadas de mantener el rebaño para la producción de animales tipo carne, en el estudio se evidenció una presencia elevada de machos, se puede considerar que estos animales son destinados para la cría, ceba y posterior a esto el sacrificio, ya que su desarrollo es más precoz. Por este motivo es esencial Implementar programas de mejoramiento genético con el objetivo de realizar estudios más profundos en los genes que estén asociados a calidad de carne.

Cuadro 3

Frecuencia genotípica para los genes Calpaina y Calpastatina en machos y hembras.

Marcador	Genotipo	Frecuencia	
		Machos %	Hembras %
CAPN	AA	42.3	21.4
	AB	38.4	39
	BB	19.2	39
CAST	AA	88.4	89
	AB	9.6	11
	BB	2	-
Total		52	28

El equilibrio genético de la población se evaluó mediante la prueba de X^2 , se estimaron los valores de heterocigosidad esperada (h_e) y observada (h_o) (ver tabla 4) en la presente investigación no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a la prueba de X^2 dando valores de 3.84 y 1,72 lo que indica que la población está en equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) con lo que se puede confirmar con el coeficiente de endogamia o índice de fijación (FIS) que describe la distribución de los genotipos dentro de una población, en términos de exceso o deficiencia de heterocigotos. El valor de este índice está dentro de un rango de -1 y 1 cuando este tiende a 0 significa que la población está cerca del EHW (los apareamientos fueron estrictamente al azar), si el valor es negativo, quiere decir que se tiene un exceso de heterocigotos mientras que un valor positivo indica una deficiencia significativa de estos (Bejarano et al., 2012) en el presente estudio el índice Fis fue 0.219 y 0.147 para CAPN y CAST respectivamente, los resultados encontrados

mostraron una clara tendencia hacia un valor positivo esto es un indicativo que hay una deficiencia de heterocigotos en la población estudiada. Sutikno, Yamin, & Sumantri (2011), define que una población está en EHW cuando se cumplen las siguientes hipótesis: las frecuencias genotípicas y génicas se mantienen constantes de generación en generación, el apareamiento es totalmente al azar y la población es suficientemente grande, por otra parte Vasconcellos et al., (2003) dicen que la selección, endogamia y deriva genética son factores que pueden alterar el equilibrio de la población porque aumentarían los índices de consanguinidad, se llevaría a cabo la selección genética y habrían estrategias de mejoramiento genético. Nuevamente se reitera que la población se encuentra en EHW, ya que cumple con los supuestos mencionados anteriormente, a pesar que la producción ovina en Colombia es manejada sin registros y sin mayores conocimientos técnicos lo que conlleva a un alto índice de consanguinidad de los animales, perdiendo los estándares de calidad en la producción cárnica.

Cuadro 4:

Valores de heterocigosidad para los marcadores CAPN y CAST.

Locus	Ho	He	FIS	X ²
CAPN	0.38	0.49	0,219	3.84
CAST	0.1	0.11	0,147	1,72

Grados de libertad (número de alelos -1), ($p \leq 0,05$), (Ho) Heterocigosidad observada, (He) Heterocigosidad esperada, índice de fijación (Fis) y prueba de chi-cuadrado (X²).

Algunas investigaciones realizadas en otra región del genoma ovino, han demostrado que existen otros polimorfismos en los genes Calpaina y Calpastatina y que pueden estar asociadas a ternieza de la carne. Kumar et al., (2015) realizó un estudio en 100 corderos de raza Bandur, donde se

evidencio una mayor frecuencia del alelo A con 82 % con respecto al alelo B 18 %, también observaron genotipos AA y AB con frecuencias de 67.2 y 29 % respectivamente, para esta población analizaron los exones 5 y 6 incluyendo el intron del gen calpaina, por otro lado Dehnavi et al., (2012) observó un resultado similar para los alelos A y B con frecuencias de 84.5 y 15.5 % respectivamente, reportando genotipos AA y BB. Sin embargo en contraste con las anteriores investigaciones Azari et al.,(2012) tomo los mismos primers reportados en los anteriores estudios y observo tres patrones diferentes G1, G2 y G3 con frecuencias genotípicas de 8.2, 89.2 y 2.7%, respectivamente, en una población de 110 ovejas Dalagh de irán.

Otros estudios realizados en el gen Calpastatina donde Azari et al., (2012) identificó un polimorfismo utilizando el método PCR-RFLP, en el exón e intron 1 con un peso de 622 Pb, realizo la digestión del producto con la enzima de restricción Mslp y observo frecuencias para los alelos M 55.45 y N 44.45 %, identificando tres genotipos MM, MN Y NN con frecuencias de 36, 38 y 26 % respectivamente. Así mismo Dehnavi et al., (2012) en su estudio hizo una asociación entre los genotipos de PCR- RFLP y el análisis PCR-SSCP, donde encontró alelos A, B y C con frecuencias 83.5, 14.5 y 2 % respectivamente, con la técnica SSCP observando patrones AA, AB, BB y AC con frecuencias genotípicas de 71, 21, 4 y 4 % respectivamente, por otra parte con la técnica RFLP observó alelos M y N con frecuencias genotípicas para MM 75%, MN 21% y NN 4%, los resultados fueron muy similares para las frecuencias alelicas y genotípicas con las dos técnicas. Resultados parecidos fueron observados en una población de ovejas Makoei Ranjbari et al., (2012) encontró alelos A, B y C, el alelo con mayor frecuencia fue el alelo A 63.13 %, también observo cuatro genotipos AA, AB, BB, AC, donde identifico que los animales con genotipo AB presentaron mayor frecuencia con un 63%.

Sin embargo en las investigaciones anteriores no han logrado identificar si existe una interacción clara de los polimorfismos encontrados en estos genes y su asociación con la ternura de la carne. Por lo tanto es importante seguir haciendo estudios que permitan hacer análisis asociativos de diferentes variantes alélicas y así mismo realizar la secuenciación de los fragmentos para identificar cuál es la mutación puntual en las regiones amplificadas.

5. Conclusiones y recomendaciones

El uso de un kit para la extracción de ADN genómico permitió obtener un ADN más puro y de mejor calidad, siendo esta técnica más rápida y menos toxica que el método fenol – cloroformo.

Los resultados obtenidos mostraron que los marcadores (CAPN316) y Calpastatia (CAST1), tomados del genoma del bovino son polimórficos, en la población ovina analizada. Estos SNPs han sido reportados en literatura por su importante influencia sobre la terneza de la carne de bovinos y al ser polimórficos en la población ovina podrían ser considerados para la realización de análisis de asociación genética a esta característica esperando encontrar igual o similar significancia a la reportada en bovinos.

Se calcularon las frecuencias alélicas, genotípicas, y el índice de fijación, encontrando que la población está en equilibrio de Hardy Weinberg.

El método de PCR-SSCP permitió genotipificar la totalidad de la población, se recomienda secuenciar varios fragmentos tanto del genotipo AA, AB y BB para confirmar los resultados obtenidos

Se recomienda implementar en los planes de mejoramiento genético el uso de marcadores moleculares para identificar los animales élite para la conservación de estos individuos.

Para el presente estudio es de vital importancia tomar medidas fenotípicas de los animales y realizar pruebas de Warner Bratzler en los cortes que tiene preferencia el consumidor, estos datos

pueden ser asociados con la genética del animal y determinar si el SPN identificado tiene un efecto o no en la suavidad de la carne.

Se recomienda trabajar con un número más elevado de individuos para realizar estudios más profundos en los genes CAPN y CAST, con la totalidad de los marcadores tipo SNP que se han reportado en literatura, para así realizar futuros programas de selección genética asistida por marcadores en poblaciones de ovinos criollos Colombianos.

Bibliografía

Azari, M. A., Dehnavi, E., Yousefi, S., & Shahmohamadi, L. (2012). Polymorphism of calPastatin, calPain and myostatin genes in native dalagh sheep in iran. *Slovak Journal of Animal Science*, 45(1), 1-6.

Bejarano, G., Pedraza, D., Rocha, A., Martínez, J. F., & Bejarano, R. D. (2012). Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria (Colombia)* V. 13 (1) p. 97-1070122-8706.

Belew, J., Brooks, J., McKenna, D., & Savell, J. (2003). Warner–Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Science*, 64(4), 507-512.

Benbouza, H., Jacquemin, J.-M., Baudoin, J.-P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2), 77-81.

Bird, J., Carter, J., Triemer, R., Brooks, R., & Spanier, A. (1980). Proteinases in cardiac and skeletal muscle. Paper presented at the Federation proceedings.

Bracho, S. U. (2011). pu-calpaína y calpastatina como marcadores genéticos en la predicción de la ternera de la carne de animales Doble Propósito.

Braña, D., Ramírez, E., Sánchez, A., & Torrecano, G. (2011). Manual de análisis de calidad en muestras de carne.

Calderón-Vélez, J. C., & Figueroa-Gordon, L. C. (2009). El acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomédica*, 29(1), 140-160.

Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev inst nal enf resp mex*, 20(3), 213-221.

Casas, E. (2006). Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 14(1), 24-31.

Castro Molina, S. L. (2013). Evaluación de los polimorfismos de nucleótido simple asociados a cambios en el color de la carne en ganados bos indicus y cruces con bos taurus. Universidad Nacional de Colombia.

Chacón-Villalobos, A. (2004). La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, 1(1), 225-243.

Chacón-Villalobos, A. (2005). Efecto de la maduración, cocción y congelamiento sobre la suavidad, rendimiento y carga microbiana del corte de solomo (outside). *Agronomía Mesoamericana*, 2(16), 199-213.

Choi, Y., & Kim, B. (2009). Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, 122(2), 105-118.

Ciappesoni, G., Gimeno, D., & Coronel, F. (2011). Evaluaciones genéticas en ovinos: situación actual y desafíos futuros. Paper presented at the XV Congreso Latinoamericano de Buiatría. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay.

Corva, P., Soria, L., Papaleo, M., Villarreal, E., Melucci, L., Mezzadra, C., Motter, M. (2007). Evaluación de marcadores moleculares asociados a diferencias en terneza de la carne de novillos Brangus. XX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal y XXX Reunión de la Asociación Peruana de Producción Animal. Cusco, Perú, 1-5.

Crouse, J. D., Cundiff, L. V., Koch, R. M., Koohmaraie, M., & Seideman, S. C. (1993). Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* Inheritance for Carcass Beef Characteristics and Meat Palatability.

Cuetia, J., Posso, A. M., Muñoz, J. E., Ariza, M. F., & Álvarez, L. A. (2012). Tipificación de las frecuencias de los genes calpaina, calpastatina y leptina en bovinos criollos colombianos. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, 2, 231-234.

Dagong, M. I., Sumantri, C., Noor, R., Herman, R., & Yamin, M. (2012). Genetic Polymorphisms of the Coding Region (Exon 6) of Calpastatin in Indonesian Sheep. *Media Peternakan-Journal of Animal Science and Technology*, 34(3).

Dayton, W., & Schollmeyer, J. (1981). Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle cells. *Experimental cell research*, 136(2), 423-433.

Dehnavi, E., Azari, M. A., Hasani, S., Nassiry, M. R., Mohajer, M., & Ahmadi, A. R. K. (2012). Genetic variability of calpastatin and calpain genes in Iranian Zel sheep using PCR-RFLP and PCR-SSCP methods. *Iran J Biotech*, 10(2), 136-139.

Díaz, A. Á., Esteban, H. P., Hernández, T. d. l. C. M., Torres, J. Q., & Puzo, A. S. (2009). Fisiología animal aplicada: Universidad de Antioquia.

Ensembl. (2015). Gen:canp. Retrieved from http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Gene/Family?family=ENSMF00720001492093.

Ensembl. (2015). Transcript: CAST. Retrieved from http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Transcript/Summary?db=core.

Espinal, C. F.; Martínez, H.; Amézquita, J. E. La cadena de ovinos y caprinos en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo, 2006, vol. 125.

Estévez, J. J. (2003). La carne de reses de lidia1. Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 16, 1.

Estrada-Cuzcano, A., Sandoval, J., Guevara-Fujita, M. L., & Fujita, R. (2005). Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. Revista Peruana de Biología, 12(3), 349-358.

Franco, J., Bianchi, G., Feed, O., Garibotto, G., Ballesteros, F., Bentancur, O., . Chiruchi, J. (2009). Efecto de la estimulación eléctrica de la canal sobre la calidad de la carne de vacunos de pastoreo. Relación de artículos publicados en ITEA durante 2009, 313.

Gabor, M., Trakovická, A., & Miluchová, M. (2009). Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 42(2), 470-476.

Gallo, S. B. (2006). Importância do pH sobre a qualidade da carne.

Gandolfi, G., Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A. H., Costa, L. N., Lametsch, R., .Davoli, R. (2011). Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. Meat science, 88(4), 694-700.

García, B. M. (2006). Higiene e inspección de carnes-I: Ediciones Díaz de Santos.

Garriz, C. (2001). Calidad organoléptica de la carne vacuna, influencia de factores biológicos y tecnológicos. Disertación Jornadas en Ganadería Vacuna. Fac. Agr. y Vet.

UNRC. http://www.Producción_bovina.com/información_técnica/carne_y_ Visto 11-12-2008. composition of Bos Indicus and Bos Indicus x Bos Taurus crossbred steers finished in pasture systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46 (4): 609-616.

Geesink, G. H., & Koohmaraie, M. (1999). Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1490-1501.

Geesink, G., Ilian, M., Morton, J., & Bickerstaffe, R. (2000). Involvement of calpains in postmortem tenderisation: A review of recent research. Paper presented at the Proceedings-New Zealand Society Of Animal Production.

Girard, I., Bruce, H., Basarab, J., Larsen, I., & Aalhus, J. (2012). Contribution of myofibrillar and connective tissue components to the Warner–Bratzler shear force of cooked beef. *Meat science*, 92(4), 775-782.

Goll, D., Dayton, W., Singh, I., & Robson, R. (1991). Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8501-8510.

González, M., Suárez, H., & Martínez, O. (2009). Análisis estructural de la carne de jamón durante el proceso de cocción y temperatura de almacenamiento. *Revista MVZ Córdoba*, 14(3).

Goodship, A. E., Cunningham, J. L., & Kenwright, J. (1998). Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 355, S105-S115.

Hamm, R. (1981). Post-mortem changes in muscle affecting the quality of comminuted meat products. *Developments in meat science*.

Heinze, P., & Bruggemann, D. (1994). Ageing of beef: Influence of two ageing methods on sensory properties and myofibrillar proteins. *Sciences des aliments*, 14(4), 387-399.

Herrera, A. L. e. (2011). *Genética molecular aplicada al mejoramiento animal*: Universidad Nacional de Colombia.

Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A., & Ouali, A. (2006). Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in food science & technology*, 17(8), 394-405.

Hilton, G., Gentry, J., Allen, D., & Miller, M. (2004). Utilization of beef from different cattle phenotypes to produce a guaranteed tender beef product. *Journal of animal science*, 82(4), 1190-1194.

Huff Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle—Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(1), 184-195.

Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.

Jiménez P y Collada C. Tecnicas para la evaluacion de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest Agr: sist Recur* 2000

Jones, S., Jeremiah, L., Tong, A., Robertson, W., & Lutz, S. (1991). The effects of marbling level, electrical stimulation, and postmortem aging on the cooking and palatability properties of beef rib-eye steaks. *Canadian journal of animal science*, 71(4), 1037-1043.

Klein, B. G. (2013). *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology: Elsevier Health Sciences*.

Kumar, N., Jayashankar, M., Ramakrishnappa, N., Nagaraja, C., Fairoze, N., & Satyanarayana, K. (2015). Genetic polymorphism of ovine calpain gene in bandur sheep.

Lawrie, R. (1998). *Ciencia de la carne*. Acribia. Zaragoza, España.

Lawrie, R. A., Barrado, A. M., Buesa, P. L. L., & Esteban, B. M. (1998). *Ciencia de la carne: Acribia Zaragoza*.

Leal Gutiérrez, J. D. (2013). *Marcadores moleculares asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en carne de Bos indicus y sus cruces*. Universidad Nacional de Colombia.

Lefaucheur, L. (2010). A second look into fibre typing—Relation to meat quality. *Meat Science*, 84(2), 257-270.

Lessa, E. (2001). Una excelente introducción a la genética de poblaciones teórica, reducida a su esencia. *Laboratorio de Evolución Facultad de Ciencias monte, Uruguay*.

Locker, R., & Hagyard, C. (1963). A cold shortening effect in beef muscles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(11), 787-793.

Londoño, C., & Andrea, J. (2012). Polimorfismo de los genes calpaína, calpastatina y leptina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de Polimorfismos de nucleótido simple (snps). Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

López De Torre, G., & Carballo, B. (1991). Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Madrid. A. Madrid Vicente, Ediciones.

Majidi, A., Panandam, J. M., Sazili, A. Q., & Siraj, S. S. (2009). Characterization of bovine calpastatin gene in Nelore cattle using polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphisms. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4(4), 92-94.

Marín, P. A. Á., Cadavid, H. C., & Muñoz, M. F. C. (2013). Genómica en la producción animal. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(2), 497-518.

Márquez, H. L. (2014). Reproducción ovina en Colombia. *Revista Ciencia Animal* (8), 67-83.

Montaldo, H., & Barría, N. (1998). Mejoramiento genético de animales. *Ciencia al día*, 1(2).

Moore D and Dowhan D. (2003) Preparation and analysis of DNA supplement. *current protocols in molecular biology*.

Mooseker, M. S., & Foth, B. J. (2008). The structural and functional diversity of the myosin family of actin-based molecular motors Myosins (pp. 1-34): Springer.

Motter, M., Corva, P., Krause, M., Pérez Cenci, M., & Soria, L. (2009). Rol de la calpastatina en la variabilidad de la terneza de la carne bovina. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 20(1), 0-0.

Muir, P., Deaker, J., & Bown, M. (1998). Effects of forage-and grain-based feeding systems on beef quality: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 41(4), 623-635.

Muscatello, U. (2008). A period of convergence in the studies on muscle contraction and relaxation: The Ebashi's contribution. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(1), 52-56.

Muto, Y., Morton, J., & Palmer, D. (2015). Investigation of biochemical changes of the ovine calpain 3 exon-10 polymorphism. *Molecular and cellular probes*, 29(6), 382-388.

Nebert, D. W. (1997). Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *American journal of human genetics*, 60(2), 265.

O'Sullivan, A., Galvin, K., Moloney, A., Troy, D., O'Sullivan, K., & Kerry, J. (2003). Effect of pre-slaughter rations of forage and/or concentrates on the composition and quality of retail packaged beef. *Meat Science*, 63(3), 279-286.

Ocampo Gallego, R. J. (2014). Caracterización genética de ovinos en Colombia por medio de marcadores microsatélites. *Maestría en Ciencias Animales*.

Onega, E., & Ruiz, H. (2003). Evaluación de la calidad de carnes frescas: aplicación de técnicas analíticas, instrumentales y sensoriales. Departamento de Nutrición y Bromatología III, Universidad Complutense de Madrid.

Ono, Y., Sorimachi, H., & Suzuki, K. (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochemical and biophysical research communications*, 245(2), 289-294.

Ortiz, Y. A., M., Castro, S., Ríos, M., & Sierra, L. (2015). Identificación genómica de snps asociados a ternezade la carne de ovino de pelo criollo colombiano.

Ossa, G. A., & Suárez, M. A. (2008). Valores genéticos de caracteres productivos y reproductivos en bovinos Romosinuano. Retrieved from

Otero, O. (2013). Utilización de ciencia y tecnología e innovación en carneros para mitigar efectos del TLC.

Page, B., Casas, E., Heaton, M., Cullen, N., Hyndman, D., Morris, C. Keele, J. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in for association with meat tenderness in cattle. *Journal of animal science*, 80(12), 3077-3085.

Page, B., Casas, E., Quaas, R., Thallman, R., Wheeler, T., Shackelford, S., Keele, J. (2004). Association of markers in the bovine gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of animal science*, 82(12), 3474-3481.

Parra, M., & Sifuentes, A. M. (2007). Polimorfismo en el gen de la μ -calpaína en ganado Brahman de registro de México.

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.

Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., & Hopkins, D. L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes—A review. *Meat science*, 89(2), 111-124.

Pereira J.A.C., Falomir-Lockhart A.H, Loza A., Villegas-Castagnasso E.E., Rojas P., Carino M., Ripoli M., Giovambattista G. comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos capn1-316- y capn1-4751 del gen de la calpaina en tres poblaciones de ganado criollo boliviano.(2015)AICA 6 156-164

Ranjbari, M., Hashemi, A., Mardani, K., & Darvishzadeh, R. (2012). Allelic polymorphism of Makoei sheep Calpastatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(3), 533-538.

Raynaud, P., Gillard, M., Parr, T., Bardsley, R., Amarger, V., & Levéziel, H. (2005). Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Archives of biochemistry and biophysics*, 440(1), 46-53.

Reardon, W., Mullen, A., Sweeney, T., & Hamill, R. (2010). Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat science*, 86(2), 270-275.

Restrepo, H., Ambrosio, J., Barrios, C., Barbosa, L., Navarro, R., Nieto, A., & Lopera, Y. (2010). Plan estratégico de la ovinocultura colombiana 2010 – 2018. Asociación de ovinocultores de Colombia, 27p.

Rincón, F. G. R., & Sánchez, D. C. A. (2008). Sacrificio humanitario de ganado bovino e inocuidad de la carne. *Nacameh*, 2(2), 106-123.

Romero Peñuela, M. H., Uribe-Velásquez, L. F., & Sánchez Valencia, J. A. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne: stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *biosalud*, 10(1), 71-87.

Ruiz Darbonnens, M. (2012). Efecto de la alimentación en el perfil aromático de la carne cocinada de corderos de raza navarra.

Safari, E., Channon, H., Hopkins, D., Hall, D., & Van De Ven, R. (2002). A national audit of retail lamb loin quality in Australia. *Meat science*, 61(3), 267-273.

Schenkel, F. S., Miller, S., Jiang, Z., Mandell, I., Ye, X., Li, H., & Wilton, J. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84(2), 291-299.

Schenkel, F., Miller, S., Jiang, Z., Mandell, I., Ye, X., Li, H., & Wilton, J. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84(2), 291-299.

Segura, Ó. (2013). La ganadería ovina vive su mejor momento en Colombia.

Sheffield, V. C., Beck, J. S., Kwitek, A. E., Sandstrom, D. W., & Stone, E. M. (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16(2), 325-332.

Sierra Sánchez, V. (2010). Evolución post-mortem de parámetros indicativos de calidad en carne de vacuno: efecto de la raza y el gen de la hipertrofia muscular.

Silva, D. R., Torres Filho, R. A., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. L., & Ramos, E. M. (2015). Comparison of Warner–Bratzler shear force values between round and square cross-section cores from cooked beef and pork Longissimus muscle. *Meat science*, 103, 1-6.

Soria, L., & Corva, P. (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la ternera de la carne bovina genetic and environmental factors influencing beef tenderness. *Archivos Latinoamericanos De Producción Anim*, 12(12), 73-88.

Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J*, 328, 721-732.

Sparrow, J. C. (2009). Roberto Marco y el sarcómero del músculo de vuelo. *Encuentros multidisciplinares*, 11(33), 50-57.

Sutikno, S., Yamin, M., & Sumantri, C. (2011). Association of polymorphisms Calpastatin gene with body weight of local sheep in Jonggol, Indonesia. *Media Peternakan-Journal of Animal Science and Technology*, 34(1).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Taylor, G. R. (1997). *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*: CRC Press.

Uribe, H. (2001). *Apuntes de Clase Genética Pecuaria*. Universidad Austral de Chile.[En línea]. Recuperado en < <http://es.scribd.com/mobile/doc/140481308>.

Utrera, M., Morcuende, D., & Estévez, M. (2014). Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat science*, 96(3), 1250-1257.

Uzcátegui-Bracho, S., & Jerez-Timaure, N. (2008). Factores que afectan la actividad de las proteasas dependientes del calcio y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 16(3), 166-174.

Valenzuela, C. Y. (2003). Ética científica de la terapia génica de individuos: Urgencia de la Cirugía Génica del ADN. *Revista médica de Chile*, 131(10), 1208-1214.

Van Eenennaam, A., Li, J., Thallman, R., Quaas, R., Dikeman, M., Gill, C., Thomas, M. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of animal science*, 85(4), 891-900.

Vasconcellos, L. P. d. M. K., Tambasco-Talhari, D., Pereira, A. P., Coutinho, L. L., & Regitano, L. C. d. A. (2003). Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26(2), 133-137.

Vivas Ascue, N. J. (2012). Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. Universidad Nacional de Colombia.

White, S., Casas, E., Wheeler, T., Shackelford, S., Koohmaraie, M., Riley, D., Smith, T. (2005). A new single nucleotide polymorphism in extends the current tenderness marker test to include cattle of and crossbred descent. *Journal of animal science*, 83(9), 2001-2008.

Zhou, H., Hickford, J., & Fang, Q. (2007). Single nucleotide polymorphisms of the ovine calpain 3 (CAPN3) gene. *Molecular and cellular probes*, 21(1), 78-79.

Zimmerman, M., Sañudo Astiz, C., & González, C. (2008). pH de la carne y factores que lo afectan. Aspectos estratégicos para obtener carne de ovino de calidad en el cono sur americano