

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

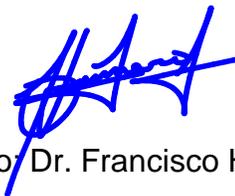
INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**EXPRESIÓN DE mARN DEL GEN DE LA DECORINA DE BOVINOS DE CARNE: SU RELACIÓN  
CON LA DUREZA DE LA CARNE Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA IDENTIFICACIÓN DE  
POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs).**

Presentador del Servicio Social

Suzette Juárez Contreras

Matrícula: 2143059565



Asesor

Interno: Dr. Francisco Héctor Chamorro Ramírez

Núm. Económico: 32000

Externo: Dr. José Alfredo Martínez Quintana



Céd. del Doctorado:

4874029

Lugar de realización

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco- Laboratorio Veterinario de Ciencias de la Carne y Salud Pública.

Medicina Veterinaria y Zootecnia

Fecha de inicio y término del servicio social

06 de diciembre de 2019 a 06 de junio de 2020.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	2
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN .....	3
MARCO TEÓRICO .....	4
Terneza de la carne.....	4
Papel de las proteínas extracelulares en la dureza de la carne.....	4
Variantes genéticas que interfieren en la dureza de la carne: Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) .....	5
Técnicas utilizadas para identificar SNPs.....	6
Ganado Criollo en cruzamientos.....	6
OBJETIVOS.....	7
General.....	7
Específicos.....	7
MÉTODOLOGÍA .....	7
Descripción del Área de Estudio .....	7
Animales.....	8
Diseño de Oligonucleótidos para PCR Punto final PCR Cuantitativa (qPCR) .....	8
Toma de biopsias de músculo.....	8
Extracción y cuantificación de ARN, y síntesis de ADN complementario (cDNA) .....	8
PCR punto final y preparación de muestras para identificación de SNPs .....	9
PCR cuantitativa (qPCR).....	9
Determinación del esfuerzo al corte .....	9
Análisis Estadístico .....	10
ACTIVIDADES REALIZADAS.....	10
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.....	10
RESULTADOS .....	10
Preparación de Muestras para Identificación de SNPs.....	10
Niveles de mARN de DCN .....	12
Terneza de la carne.....	13
DISCUSIÓN .....	14
CONCLUSIONES.....	17
RECOMENDACIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	17

## RESUMEN

La terneza de la carne es un factor importante que determina la satisfacción del consumidor y puede depender de factores tanto genéticos como ambientales, dentro de los factores genéticos destaca la decorina (DCN) un proteoglicano presente en la matriz extracelular. El objetivo de este trabajo fue medir la expresión génica de DCN en músculo de bovinos de dos grupos raciales y analizar su relación con la dureza de la carne, así como preparar muestras para identificar posibles SNPs en el gen de la DCN. Se obtuvieron muestras del músculo *Longissimus dorsi* de 7 hembras de 23 meses, hijas de madres F1 Angus x Criollo de Chihuahua (AxC) y Hereford x Angus (HxA) y de padre Piedmontese. Por PCR punto final se amplificó la secuencia codificante de la DCN; La expresión del mRNA DCN relativa a  $\beta$ -actina se midió por PCR cuantitativa en 7 animales (3 y 4 de cada grupo racial). La medición de esfuerzo al corte se hizo mediante el método de Warner Bratzler. El fragmento obtenido de PCR fue evidente en cinco de las siete muestras y quedarón listas para su posterior secuenciación. No hubo una diferencia significativa en los niveles de expresión de DCN entre grupos raciales, sin embargo, el esfuerzo al corte fue mayor ( $p > 0.05$ ) en PxHxA indicando una mayor terneza en PxAxC. A pesar de que no se encontró relación entre los niveles de expresión de DCN y terneza de la carne entre grupos raciales, es importante buscar posibles SNPs que pudieran estar afectando la funcionalidad de la proteína.

## INTRODUCCIÓN

La terneza es definida como la dificultad o facilidad con la cual la carne se puede cortar o masticar (Tornberg, 1996, citados por Gómez, 2016). Gran parte de la literatura indica que la terneza es el factor más importante para determinar la satisfacción del consumidor (Alfnes, Rickertsen y Ueland, 2008; Huffman et al., 1996; Verbeke, Pérez-Cueto, de Barcellos, Krystallis y Grunert, 2010, citados por Merlino et al., 2018). Y constituye uno de los criterios de selección más importantes a la hora de comprar carne (Brooks et al., 2000, citados por Desgarenes et al., 2017), por lo que es una característica importante a mejorar en el ganado y sus cruza. A diferencia de otros atributos, la terneza no es verificable hasta después del sacrificio (Nishimura, 2015). Es por ello, que la tecnología genómica puede hacer un aporte significativo, ya que en la actualidad existen evidencias sobre el efecto de algunos genes que afectan la terneza de la carne, lo que permitirá el desarrollo de marcadores genéticos con fines de mejoramiento de la calidad de carne bovina (Corva et al., 2007, citados por Pinilla, 2014). Entre los diferentes genes relacionados con la terneza de la carne, se encuentran genes que codifican para componentes de la matriz extracelular (MEC), como los proteoglicanos (PG) entre los que destaca la decorina (DCN), que interviene en la fibrillogénesis y en

la estabilidad del colágeno maduro (Reed *et al.*, 2003, citados por Pinilla, 2014), y debido a su unión con el colágeno, todo apunta a que juega un papel importante en la dureza de la carne.

El gen DCN promueve la regeneración en el músculo esquelético y acelera la cicatrización después de la lesión (Li *et al.*, 2007, citados por Pinilla, 2014).

Un estudio realizado por Pedersen *et al.* (2001) citados por Pinilla (2014), demostró que la expresión de la DCN se relaciona con la expresión de colágeno tipo I, en los músculos Semitendinoso y Psoas mayor de bovinos de 3-5 años, siendo este el mayor tipo de colágeno presente en estos músculos, confirmado mediante la presencia y la expresión del RNAm de DCN; el músculo Semitendinoso presentó una mayor expresión del RNAm de DCN y una mayor dureza (medida por el método de Warner Bratzler) lo que permite sugerir que DCN juega un papel importante en los entrecruzamientos del colágeno. Danielson *et al.* (1997) citados por Nishimura (2015) demostraron que la interrupción dirigida de la DCN en ratones conduce a una morfología anormal de fibrillas de colágeno y fragilidad de la piel, sugiriendo un papel importante en la formación de fibrillas de colágeno y organización de redes de fibrillas. La DCN también participa en el crecimiento celular modulando algunos factores de crecimiento (Li, McFarland y Velleman, 2008; Riquelme *et al.*, 2001; Yamaguchi, Mann y Ruoslahti, 1990, citados por Nishimura, 2015) y mediante señalización directa a las células (Schönherr, Sunderkotter, Iozzo y Schaefer, 2005; Suzuki, Kishioka, Wakamatsu y Nishimura, 2013, citados por Nishimura, 2015).

En México, algunos ganaderos se han interesado en las pruebas de ADN bovino para encontrar variantes favorables en la terneza de la carne, tal es el caso de SNPs que pueden ser potenciales marcadores una vez sometidos a procesos de validación (Smith *et al.*, 2009; Van Enennaam *et al.*, 2007, citados por Muñoz *et al.*, 2012).

## **JUSTIFICACIÓN**

Al ser la dureza de la carne uno de los factores determinantes para realizar la compra de carne, surge la necesidad de contar con bovinos genéticamente capaces de producir carne con una terneza aceptable para los consumidores. Por ello la importancia de identificar posibles marcadores genéticos de importancia económica, como la terneza de la carne. A través de los genes con posibles roles regulatorios y otros con funciones desconocidas, es posible identificar alelos que puedan revelar diferencias en el crecimiento y desarrollo de tejidos en animales, incluso dentro de la misma raza. Tanto en *Bos Taurus* como en *Bos indicus* se han identificado diferentes SNPs en el gen  $\mu$ -CAPN, que se asociaron con la terneza de la carne. Sin embargo, existen otros genes como el de la DCN, que promete ser un PG con un papel importante en la miogénesis y en la terneza de la carne, debido a su

unión con el colágeno. Por lo que es importante generar más información sobre la presencia de SNPs en gen de la DCN que pudieran estar afectando su expresión o funcionalidad en bovinos de carne, impactando en características de importancia económica.

## **MARCO TEÓRICO**

### **Terneza de la carne**

La terneza de la carne depende de diversos factores intrínsecos como la raza, individuo, sexo, peso al sacrificio, edad, estructura y composición del músculo esquelético (Nishimura, 2015; Blanco *et al.*, 2017). Los factores extrínsecos pre-sacrificio por su parte, incluyen el sistema de producción, dieta, manejo, transporte, ayuno y sacrificio; y factores post mortem como el frío, tiempo de maduración, tiempo de conservación y método de cocción (Blanco *et al.*, 2017). La evaluación instrumental de la textura de la carne se realiza con un texturómetro, que permite medir la resistencia del tejido al corte (De Huidobro *et al.*, 2005). El texturómetro es un aparato con controles electrónicos precisos, elevada sensibilidad y gran versatilidad. Para el análisis de resultados se utiliza un programa informático, que recoge los datos y los grafica automáticamente (Onega, 2003, citado por Pinilla, 2014). Otra técnica para medir la textura es el protocolo de Warner-Bratzler, éste es utilizado para estimar la dureza de la carne, midiendo la cantidad de fuerza necesaria para cortar las fibras musculares. El corte se puede realizar en muestras de carne crudas y cocidas (71°C) (Girard *et al.*, 2012, citados por Molano, 2016), con forma de cilindro o prisma, previamente deshuesada, cortada en forma perpendicular a la dirección de las fibras musculares, y con un espesor aproximado de 2.5 cm (Braña *et al.*, 2011, citados por Molano, 2016). En estudios realizados por Belew *et al.* (2003) citados por Molano (2016), los músculos de bovinos fueron clasificados de acuerdo a los valores que presentaron ante la fuerza al corte como: carnes muy suaves (<3.2 kg), suaves (3.2 y 3.9 kg) y duras valores superiores a 4.0 kg.

### **Papel de las proteínas extracelulares en la dureza de la carne**

El tejido conectivo intramuscular (TCIM) está compuesto de macromoléculas de matriz extracelular (MEC) como colágeno, proteoglicanos (PG) y glicoproteínas (Nishimura, 2015). Los tipos de colágeno que se encuentran allí son el I, III, IV, V y VI (Nishimura *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998, citados por Nishimura, 2015). La gran fuerza de tensión que ejerce el colágeno es un mecanismo de estabilidad conferida por la cantidad y tipo de enlaces cruzados que están ligando individualmente las moléculas de colágeno y las fibrillas (McCormick, 1999, citados por Nishimura, 2015). Un elevado contenido de fibras que contienen colágeno tipo I y III, afecta negativamente la terneza, así como el valor biológico de la proteína cárnica (Bosselmann *et al.*, 1995, citados por Blanco *et al.*, 2017).

Los PG están compuestos de una proteína central principal ligada a una cadena de glicosaminoglicanos (GAG), y los típicos que se unen a la proteína principal son los GAG sulfato de coindritina, dermatán sulfato, heparán sulfato y el keratán sulfato (Izzo y Murdoch, 1996, citados por Nishimura, 2015). La DCN es uno de los PG pequeños de bajo peso molecular que mejor se describen en la literatura. En bovinos, la DCN tiene un peso molecular de aproximadamente 37 kDa (Nakano *et al.*, 1997; Hedbom *et al.*, 1993, citados por Pinilla, 2014). La proteína DCN está compuesta por una región N terminal, C terminal con residuos de cisteína y una región central compuesta de 10 repeticiones ricas en leucina (Reed *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2007; Hedbom *et al.*, 1993, citados por Pinilla, 2014). La DCN recibe su nombre por la habilidad de ligarse al colágeno, a través de la modulación del mismo por la fibrillogénesis (Izzo y Murdoch, 1996, citados por Nishimura, 2015; Franczyk *et al.*, 2018). Probablemente puede ligarse a más de dos fibrillas de colágeno, influyendo en la dureza de la carne (Scott, 1992, citado por Nishimura, 2015).

La miostatina (MSTN) es un factor de crecimiento que pertenece a la superfamilia TGF- $\beta$ , y actúa como un regulador negativo de la masa del músculo esquelético. La doble musculatura vista en ciertas razas de ganado como Piedmontese, es causada por mutaciones en la región codificante del gen de la MSTN. La DCN interactúa con la MSTN y evita la acción inhibitoria mediada por MSTN para el crecimiento de las células musculares (Miura *et al.*, 2006, citados por Dubost *et al.*, 2015).

### **Variantes genéticas que interfieren en la dureza de la carne: Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)**

El uso de marcadores genéticos que explican una proporción significativa de la varianza fenotípica es la opción más eficaz para la selección asistida de los animales (Dekkers, 2004, citado por Branda *et al.*, 2014). Existen diversas metodologías para identificar genes asociados a variables de interés productivo como crecimiento muscular y terneza, una de estas metodologías es el escaneo de genes candidatos en busca de variantes genéticas generadas por la presencia de SNPs y su posterior asociación con las características de interés.

Los SNPs indican cambios en el ADN, estos son originados por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN y por factores ambientales. Son una sustitución de un sólo nucleótido por otro, deleciones o inserciones que se identifican al ser comparados con genomas de individuos de la misma especie (Caratachea, 2007, citados por Molano, 2016). 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. Los sinónimos no alteran la estructura de la proteína, pero algunas mutaciones pueden generar consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo desconocido

(Nebert, 1997, citado por Molano, 2016). Existen variaciones funcionales que regulan la tasa de expresión de un gen, estas se pueden encontrar en regiones promotoras de los genes, influyendo en la actividad transcripcional del gen, en los intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de corte y empalme o en regiones intergénicas (Caratachea, 2007, citados por Molano, 2016).

Las secuencias y SNPs reportados para una gran cantidad de genes se encuentran disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). La mayoría de SNPs aún no han sido validados a nivel poblacional, por lo que no se conoce su distribución y frecuencia en las diferentes razas bovinas (Van Eenennaam *et al.*, 2012, citados por Estanislao, 2014). Algunos SNPs identificados en DCN, son reportados por Chen *et al.* (2011), quienes identificaron dos nuevos SNPs y trabajaron rangos de crecimiento (en altura y longitud del cuerpo) y circunferencia del pecho en cabras.

### **Técnicas utilizadas para identificar SNPs**

Existe una gran variedad de métodos analíticos que permiten identificar o descubrir nuevos SNPs. Entre los más destacados, se encuentran:

- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)
- Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)
- Secuenciación del ADN

En este último, se determina el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN y es actualmente es una de las técnicas más recurridas e informativas para detectar nuevas variantes genéticas, ya sea por secuenciación Sanger o por secuenciación de nueva generación (Rojas, 2018).

### **Ganado Criollo en cruzamientos**

El cruzamiento es una práctica frecuente para producir terneros de engorde y finalización, con la ventaja adicional de obtener vigor híbrido (Gregory y Cundiff, 1980, citados por Muñoz *et al.*, 2016). El valor potencial de un biotipo (puro o cruzado) para la producción rentable de carne de res en diferentes sistemas productivos podría estimarse mediante la evaluación de las características de la canal y la calidad de la carne (Muñoz *et al.*, 2016).

Recientemente, se han desarrollado razas compuestas para combinar los rasgos adaptativos de las razas cebú y la eficiencia de producción y la calidad de la carne de las razas taurinas (Piccoli *et al.*, 2020). De acuerdo a Quintana-Gallegos *et al.* (2018) citados por Sotelo (2019), hay interés creciente de involucrar al ganado Criollo en los sistemas de cruzamiento con ganado especializado en la producción de carne, debido a diversas características importantes, entre ellas el bajo requerimiento

nutricional debido a su talla pequeña. Este ganado ha demostrado poseer buena adaptabilidad a temperaturas extremas, resistencia a enfermedades, alta tasa de reproducción y una ventajosa capacidad de búsqueda de alimento y agua (Anderson *et al.*, 2015). Nardone *et al.* (2010) citados por Anderson *et al.* (2015) comentan que este ganado presenta una mayor adaptabilidad al estrés calórico y a deficiencias alimentarias comparado con razas europeas especializadas en producción de carne. El ganado de razas europeas como Hereford y Angus poseen hábitos diferentes al del ganado Criollo en lo que se refiere a la búsqueda de alimento, las distancias de desplazamiento en búsqueda del mismo, inclusive, el tipo de terreno por el cual se desplazan (Koppa, 2007, citado por Sotelo, 2019).

## **OBJETIVOS**

### **General**

Medir la expresión génica de DCN en músculo de bovinos de dos grupos raciales y analizar su relación con la dureza de la carne, así como preparar muestras para identificar posibles SNPs en el gen de la DCN.

### **Específicos**

1. Realizar toma de biopsias de músculo *Longissimus dorsi* de dos grupos raciales de bovinos para medir la expresión génica de la DCN.
2. Asociar la expresión de DCN con la terneza de la carne de ambos grupos raciales.
3. Amplificar la región codificante del gen DCN expresado en músculo de bovinos, para una posterior identificación de SNPs.

## **MÉTODOLOGÍA**

### **Descripción del Área de Estudio**

El presente estudio se realizó en el rancho experimental Teséachic, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicado al este de la Sierra Madre Occidental, a 16 km de la Colonia Oscar Soto Máynez, Municipio de Namiquipa, Chihuahua, México. Los estudios de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la misma universidad y en el Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública de la Universidad Autónoma Metropolitana.

## **Animales**

Para la realización de este estudio se utilizaron 7 hembras de 23 meses de edad aproximadamente, 3 hijas de madres F1 Angus x Criollo de Chihuahua (AxC) y 4 Hereford x Angus (HxA) y de padre Piedmontese.

## **Diseño de Oligonucleótidos para PCR Punto final PCR Cuantitativa (qPCR)**

Los cebadores para PCR específicos de DCN, se diseñaron de acuerdo con la secuencia Bos taurus decorin (DCN): Gen Bank No. NM\_173906.4, situada en <https://www.ncbi.nlm.nih>.

Los oligonucleótidos fueron: BoDCN-fw (5' ATGAAGGCAACTATCATCTTTC 3') y BoDCN-rv (5' GTTCAGCTTGGAAACTACAAG3'), para amplificar secuencia codificante completa de DCN (1080 pares de bases (pb)).

Para la qPCR se diseñaron oligonucleótidos para DCN (BoDCNRT- fw y BoDCNRT- rv) y Beta actina ( $\beta$ -Act) como gen de referencia en la expresión génica. Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). El diseño de cebadores de  $\beta$ -Act se realizó con base en las secuencias de referencia del banco de genes: NM\_001009784.3. El amplicón es de un tamaño de 85 pb.

## **Toma de biopsias de músculo**

Se sedó a los animales con xilacina al 1% en una dosis de 0.06 mg/kg PV, y una vez sedados, se prosiguió a la anestesia local, con una inyección intradérmica con lidocaína al 2% a la altura del músculo *Longissimus dorsi*. Se rasuró el pelo del área, se lavó con agua y jabón, y se desinfectó con yodo. Posteriormente, utilizando un bisturí se realizó una incisión de 1 cm hasta llegar al músculo. Para la toma de biopsias se utilizó un punzón para biopsia (Integra Miltex Biopsy Punch de 3 mm), obteniendo ~50 mg de músculo y fueron colocados en viales de 2 mL, conteniendo 1 mL de TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) y se transfirieron a nitrógeno líquido. Finalmente, se almacenaron a -80°C para su posterior utilización en la extracción de ARN.

## **Extracción y cuantificación de ARN, y síntesis de ADN complementario (cDNA)**

El ARN fue extraído mediante el método de trizol siguiendo las instrucciones del fabricante; y fue cuantificado con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Termo Fisher Scientific) y la integridad fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó con el kit PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara), a partir de 1  $\mu$ g de ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **PCR punto final y preparación de muestras para identificación de SNPs**

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 5  $\mu\text{L}$  de Green or colorless Gotaq Flexi Buffer 5X, 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's a 10 mM, 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a 25 mM, 1.0  $\mu\text{L}$  de cada primer (forward y reverse) a 10  $\mu\text{M}$ , 0.2  $\mu\text{L}$  de GoTaq® DNA polymerase (Promega), 1.5  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado y 13.3  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Para la reacción se utilizó un termociclador (Mastercycler® Nexus, Eppendorf), programado con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95° C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 53° C, 80 s a 72° C; con una extensión final de 7 min a 72° C, y enfriamiento a 4°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% conteniendo bromuro de etidio, en amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) en una cámara de electroforesis (BIO-RAD PowerPac™ Basic Electrophoresis Power Supply) durante 40 min a 40 mA. Los geles fueron revelados bajo luz UV en un transiluminador BioDoc-Itm Imaging System benchtop 2UV Transluminator (UVP Transluminator, model M-20, CA 91786 U.S.A.).

Posteriormente, el producto restante de PCR fue colocado en viales previamente etiquetados para su posterior secuenciación en el Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

## **PCR cuantitativa (qPCR)**

La reacción de qPCR fue realizada en un termociclador (Applied Biosystems™) en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo 10  $\mu\text{L}$  de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2X, 0.35  $\mu\text{L}$  de los primers a 10 mM ( $\beta$ -act y BoDCN RT rv/fw para cada caso), 8.3  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (proveniente de 12.5 ng de ARN total). Cada corrida de qPCR se acompañó de una curva estándar compuesta de cinco puntos, generada a partir de diluciones seriadas 1:3 del punto más concentrado de cDNA. Los valores de  $R^2$  en cada corrida del experimento fue de 0.99, con una eficiencia de 62%. Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 50°C por 2 min (1 ciclo), 95°C por 2 min (1 ciclo) y 40 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 15 s y 72°C por 40 s; y se utilizó un programa de curva de disociación que parte de 60°C hasta 95°C, aumentando 0.5°C en cada ciclo de 5 s.

La expresión de DCN se reporta en relación a la expresión de  $\beta$ -act de 7 muestras de cDNA, un control negativo y los 5 puntos de la curva, con dos réplicas técnicas cada una. Para esto se utilizó el método  $2^{-\Delta\text{Cq}}$  de Livak y Schmittgen (2001).

## **Determinación del esfuerzo al corte**

Después de los 15 días de maduración de las muestras de carne, fueron cocinadas hasta alcanzar una temperatura interna de 71°C y se enfriaron por 24 h. Se obtuvieron muestras pequeñas y se

cortaron para determinar su esfuerzo al corte, mediante el equipo de Warner Bratzler a una velocidad de 20 cm/min.

### **Análisis Estadístico**

La expresión de DCN y fuerza al corte se analizaron agrupando las muestras de acuerdo a los dos grupos raciales mencionados (PxAxC y PxHxA). La comparación se realizó con una prueba *T de Student* (con un  $\alpha \leq 05$ ), utilizando el software estadístico SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999).

### **ACTIVIDADES REALIZADAS**

1. Recopilación bibliográfica y actividades en el LVCCySP.
2. Biopsias de músculo de bovinos.
3. Diseño de oligonucleótidos.
4. Realización de PCR punto final y PCR en tiempo real (cuantitativa).
5. Preparación de muestras para identificación de SNPs.
6. Elaboración de geles de agarosa y electroforesis.
7. Medición de esfuerzo al corte de muestras de carne.
8. Análisis estadístico.
9. Reporte final.

### **OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS**

- ✓ Toma de biopsias de músculo de dos grupos raciales de bovinos de carne.
- ✓ Medición de la expresión génica de DCN en muestras de músculo de bovinos de carne.
- ✓ Preparación de muestras para la posterior identificación de SNPs en el gen de DCN en bovinos de carne.
- ✓ Análisis de datos y correlación con la dureza de la carne.

### **RESULTADOS**

#### **Preparación de Muestras para Identificación de SNPs**

En las Figuras 1 y 2 se observan las fotos de geles de electroforesis, donde se muestran los productos de PCR con una banda única del tamaño esperado de 1080 pb para cinco de las 7 muestra analizadas. El producto de PCR para las muestras 4B, 9B (PxAxC), 7B, 8B (PxHxA) (Figura 1) y 15B (PxAxC) (Figura 2). Las muestras 16B (PxHxA), 17B y 18B (PxAxC) no amplificaron, esto puede deberse a que el cDNA utilizado haya estado ya degradado. Entonces, los productos listos para secuenciar fueron 4B, 7B, 8B, 9B y 15B.

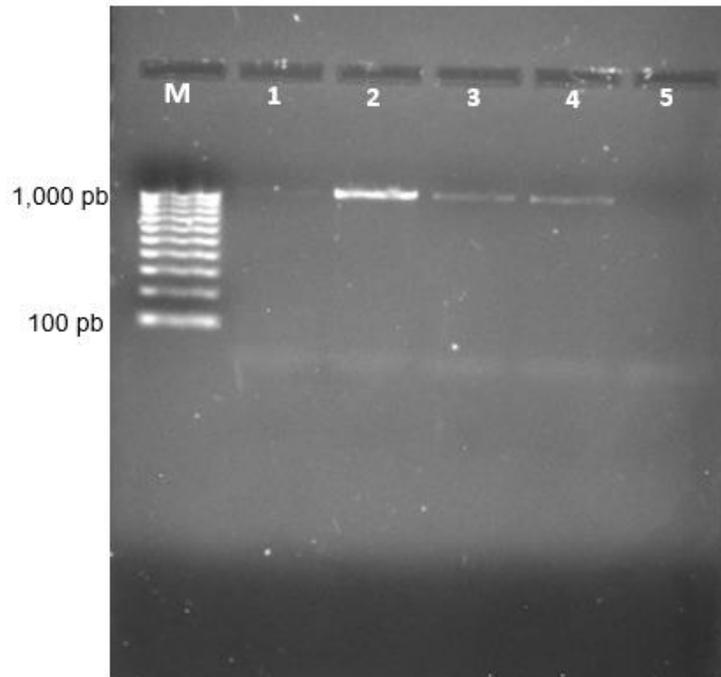


Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa en el que se indica el producto de PCR. M: Marcador Molecular de ADN (EZ Load™ 100 bp, de BIO-RAD), carril 1: muestra 4B (PxAxC); carril 2: muestra 7B (PxHxA); carril 3: muestra 8B (PxHxA); carril 4: muestra 9B (PxAxC); y carril 5: N (control negativo), todos correspondientes a 1080 pb excepto el negativo.

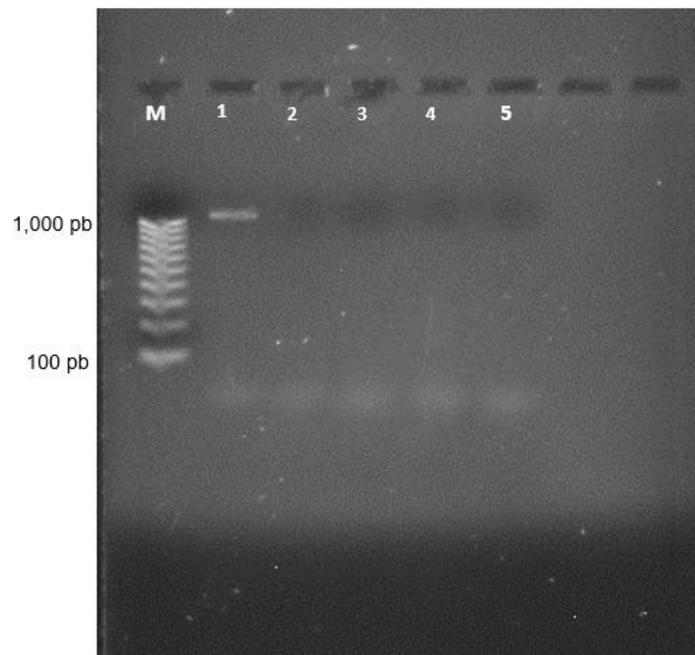
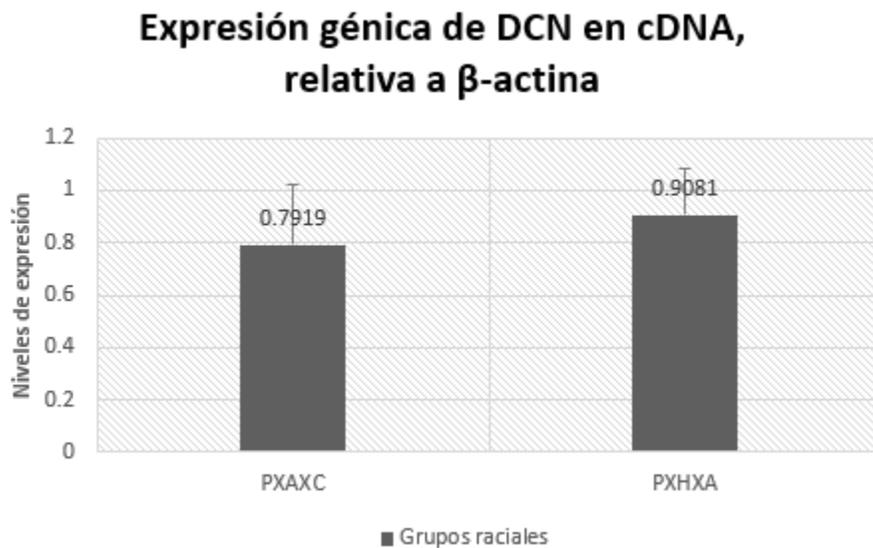


Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa en el que se indica el producto de PCR. M: Marcador Molecular de ADN (EZ Load™ 100 bp, de BIO-RAD), carril 1: muestra 15B (PxAxC); carril 2: muestra 16B (PxHxA); carril 3: muestra 18B (PxAxC); carril 4: muestra 17B (PxAxC); y carril 5: N (control negativo). El 15B corresponde a un producto de PCR de 1080 pb y el resto sin amplificación.

## Niveles de mRNA de DCN

El análisis por qPCR de los niveles de expresión génica, mostró que DCN se expresó en la mayoría de las muestras de músculo. Es importante mencionar que la muestra 17B se omitió del análisis de la expresión génica debido a que no amplificó en ninguna de sus réplicas en la PCR tiempo real.

Como se puede observar en la Gráfica 1, la prueba t de student arrojó que no hubo una diferencia significativa en los niveles de expresión ( $p > 0.05$ ), ya que la DCN se está expresando en cantidades muy similares en ambos grupos raciales (PxAxC y PxHxA), con una media de expresión relativa a  $\beta$ -actina de 0.7919 y 0.9081, respectivamente; sin embargo, estas son medias globales por esta razón es importante analizar los porcentajes de expresión por individuo tal y como se muestra en el cuadro 1.



Gráfica 1: Medias  $\pm$  D.E. de Expresión génica de DCN, relativa a  $\beta$ -actina en dos grupos raciales (PxAxC y PxHxA).

En el Cuadro 1 se muestran los valores de expresión génica de DCN relativa a  $\beta$ -actina, se puede observar que para los distintos grupos raciales existe gran variabilidad por lo que los resultados de búsqueda de SNPs podrán revelar diferencias importantes.

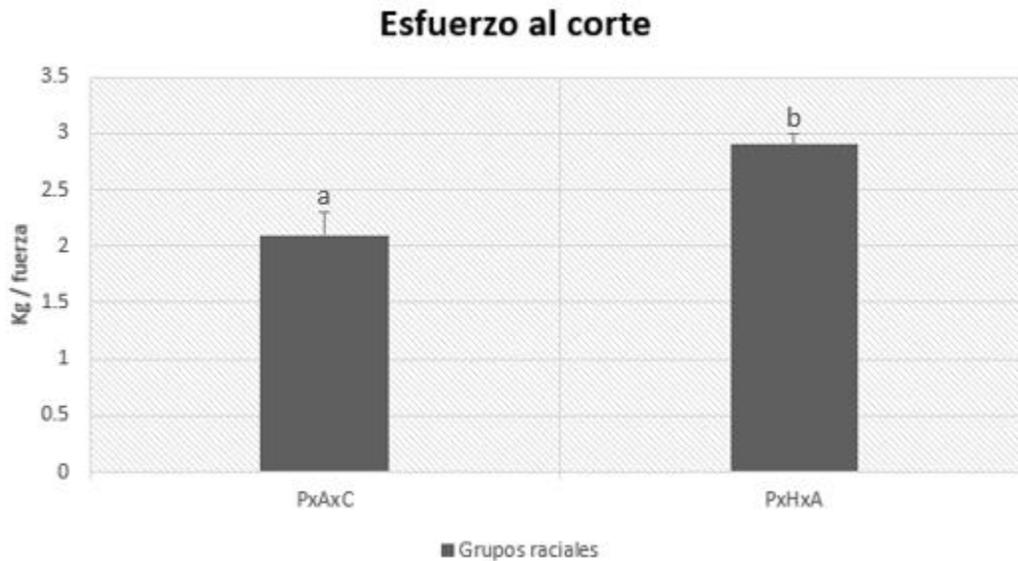
### Expresión génica de DCN

Muestra	Raza	Expresión de DCN (Método $2^{-\Delta Cq}$ )
4B	PXAXC	1.021012126
7B	PXHXA	0.962594443
8B	PXHXA	0.712025098
9B	PXAXC	0.820741609
15B	PXAXC	0.852634892
16B	PXHXA	1.049716684
18B	PXAXC	0.473028823

Cuadro 1: Medias de Expresión génica de DCN, relativa a  $\beta$ -actina en los distintos individuos muestra del experimento.

### Terneza de la carne

De acuerdo a la gráfica 2, hay una diferencia de 0.8 kg/fuerza entre ambos grupos raciales, siendo PxAxC (2.1 kg/f) el que posee mayor terneza ( $p > 0.05$ ), a diferencia de PxHxA (2.9 kg/f).



Gráfica 2: Esfuerzo al corte por medio de cizallamiento de muestras de carne de ambos grupos raciales. Las literales a y b indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La expresión de DCN puede variar debido a muchos factores, según Dubost (2015) su expresión es músculo dependiente ya que encontró que la proporción de DCN con respecto al colágeno era mayor en *Bíceps femoris* que en *Longissimus thoracis*. También menciona que varía en el área del TIC, siendo mayor en el Endomisio que en Perimisio (0.57 y 0.52, respectivamente). Además, Sasaki et al. (2013) mencionan que en su estudio el esfuerzo al corte fue mayor en el *Longissimus thoracis* que en el Semitendinoso. Albrecht y col. (2011) citados por Nishimura et al. (2015) mostraron que el nivel de DCN es más bajo en el músculo Semitendinoso que en el *Longissimus*; si asociamos lo obtenido por Sasaki et al. (2013) y Nishimura et al. (2015), podemos interpretar que la expresión de DCN sí afecta la terneza de la carne. En nuestra investigación no se analizaron diferentes músculos, pero sí el mismo en ambos grupos raciales.

Los valores de esfuerzo al corte fueron de 2.1 kg/f en PxAxC y 2.9 kg/f en PxHxA, sugiriendo una mayor terneza en el grupo racial con componente de Criollo. De acuerdo a la clasificación utilizada por Belew et al. (2003) citados por Molano (2016), ambos grupos raciales presentan carnes muy suaves (<3.2 kg/f). La diferencia entre grupos raciales, concuerda con Garriz *et al.* (1996) citados por Anderson *et al.* (2015), quienes examinaron carne de bovinos criollos de argentina (*Bos Taurus*) y mestizos (incluían Hereford) criados en pastizales semiáridos, muy similares a los de esta investigación y concluyeron que la carne criolla era más tierna que la de mestizos.

Anderson et al. (2015) cita a Vranic et al. (2008) quienes no encontraron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en terneza entre las razas AC, Angus, Hereford, y cruces. Difiere un poco con otro estudio de 2013, donde se analizó el esfuerzo al corte mediante Warner-Bratzler de carne de ocho novillos Raramuri Criollo (de Chihuahua) y de cuatro novillos cruzados (representando nueve razas diferentes, entre ellas Angus) (media 2,70 kg / cm<sup>2</sup> y 2,53 kg / cm<sup>2</sup> para los dos grupos de ganado, respectivamente) lo que se refleja en una carne muy tierna (Anderson *et al.*, 2015). Esta pequeña diferencia entre terneza de la carne, puede deberse a que los novillos Raramuri Criollo pesaban entre 800 libras y 1,000 libras, mientras que los novillos mestizos pesaban entre 1.000 y 1.200 libras, y a que la alimentación difirió un poco ya que el ganado criollo caminó más distancia pudiendo adquirir diversos nutrientes. En nuestra investigación no se analizaron diferentes músculos, pero sí el mismo en ambos grupos raciales bajo las mismas condiciones nutrimentales, por lo que este no se considera como un factor determinante en la terneza de su carne; las medias obtenidas para terneza, son muy similares a las del estudio mencionado.

Dentro de una misma raza, la genética controla cerca del 30% de la variación de la terneza y el 70% es explicado por el medio ambiente (Koch *et al.*, 1982, citados por Desdémona, 2017). O'Connor et al.

(1996) citados por Desdémona (2017) mostraron que el porcentaje de la raza *Bos indicus* incrementa significativamente la dureza de la carne. Esto no concuerda con los valores de ternera obtenidos, ya que como se mencionó anteriormente, entre ambos grupos raciales la única diferencia es  $\frac{1}{4}$  y se trata de las razas Hereford y Criollo para cada grupo. En realidad, no hay alguno donde predomine la raza *Bos Indicus*.

Desdémona (2017) cita a O'Connor *et al.* (1996) y a Dikeman (1995) quienes sugieren que el ganado de origen *Bos indicus* no debe incluirse más del 37.5% y 25% en los cruzamientos, respectivamente, para evitar la dureza de la carne. En el caso de las muestras estudio, la raza Piedmontese de origen *Bos Indicus*, está en un 50% en ambos grupos raciales y presentan una ternera aceptable, por lo que es posible que existan variantes genéticas en genes involucrados con la ternera en estos animales.

Shackelford *et al.*, (1991) citados por Desdémona (2017), reportaron valores de 7.4 kg/f en el músculo *Longissimus* de animales Hereford. Otros estudios de The National Beef Tenderness Survey (2011) citados por el anterior autor, reportan valores de esfuerzo al corte de 4.15 kg/f en músculos de filetes obtenidos del lomo, indicando valores al doble de los obtenidos aquí. Esto puede atribuirse que las muestras utilizadas en esta investigación, pasaron por un proceso de maduración confiriéndoles mayor blandura.

Los niveles de expresión de DCN de ambos grupos raciales son relativos, es decir, no podemos saber si son altos o bajos, simplemente que no son diferentes, pero la ternera sí. Podría decirse que la expresión de DCN no influyó favorablemente sobre la ternera, ya que en el caso de PxAxC tuvo un esfuerzo al corte de 2.1 kg/f y una media de expresión de 0.7919, mientras que PxHxA un esfuerzo de corte de 2.9 kg/f y una media de expresión de 0.9081 kg/f. Sin embargo, es importante buscar posibles SNPs en DCN que puedan relacionarse con la función de la proteína y medir la interacción con otros genes candidato como la calpaína proteasa y su inhibidor endógeno calpastatina; proteínas que se han caracterizado como principales factores en la ternera de la carne (Huff Lonergan, Zhang y Lonergan, 2010, citados por Naves *et al.*, 2017; y Dzhulamanov *et al.*, 2019).

Page *et al.* (2004) citados por Desgarennes *et al.* (2017) describieron dos SNPs responsables de variación del gen de  $\mu$ -calpaína. Ambos SNP's han sido intensamente estudiados en varias poblaciones y subespecies bovinas (White *et al.*, 2005, citados por Desgarennes *et al.*, 2017). El resultado de estas investigaciones demuestra que en todos los genotipos de CAPN1-316 se relacionan con variaciones en ternera de la carne de todas las subespecies bovinas, mientras que CAPN1-530 ejerce un efecto similar solamente en el ganado *Bos taurus*. El tener conocimiento sobre estos SNPs, nos hace considerar la presencia de SNPs en el gen de la DCN y una asociación con la ternera.

Otra posible interacción genética de la DCN que se debería estudiar es con el colágeno, ya que a terneza de la carne depende, entre otros factores, de la cantidad de tejido conectivo que se encuentra presente en el músculo, siendo la concentración de colágeno una de las causas que incrementa la dureza de la carne (Sañudo *et al.*, 2004, citados por Gómez, 2016).

Wheeler, Koohmaraie, Cundiff y Dikeman (1994) citados por Papaleo *et al.* (2016) informaron que en su investigación el efecto del grupo genético no fue significativo. En general, la terneza informó menores diferencias entre cruces de *Bos Taurus* (Koch, Dikeman, Lipsey, Allen y Crouse, 1979) que las diferencias entre cruces de *Bos indicus* × *Bos Taurus* (Crouse, Cundiff, Koch, Koohmaraie y Seideman, 1989, citados por Papaleo *et al.*, 2016), posiblemente porque las razas *Bos indicus* tienen menor contenido de FMI que las de *Bos Taurus* (Marshall, 1994). Esto es consistente con Schor *et al.* (2008) citados por Papaleo *et al.* (2016) quienes concluyeron que la raza tenía un efecto menor en términos de los parámetros físicos y nutricionales de la carne. También concluyeron que cuando se compararon novillos de raza pura británica y continental con novillos cruzados *Bos indicus*, los valores de esfuerzo al corte de *Bos indicus* fueron mayores, dependiendo de su proporción en el cruzamiento. Nuestros resultados confirman que la inclusión de vientres Criollo en los sistemas de producción de carne, es importantes para la disminución del impacto a los ecosistemas, sin mermar en la calidad del producto obtenido.

Etherington (1987) y Wu *et al.* (1981) citados por Nishimura *et al.* (2015) mostraron que el tipo y la cantidad de PG son importantes para determinar el nivel de susceptibilidad del colágeno a la digestión enzimática; y que la solubilidad del colágeno aumenta debido a la acción combinada de colagenasa con  $\beta$ -glucuronidasa o hialuronidasa, respectivamente. Con ambos descubrimientos, puede existir la posibilidad de que las glucosidasas lisosómicas expongan las fibrillas de colágeno de los PG circundantes y faciliten su degradación por la colagenasa, lo que resulta en la desintegración del IMCT durante el envejecimiento postmortem de la carne (Nishimura *et al.*, 2015). Debido a esto, el nivel de expresión de DCN puede ser mayor en el músculo in vivo que en la muestra de carne como tal, ya que in vivo no estaría sufriendo la digestión enzimática. Esto da pauta a realizar la medición de la expresión de DCN tanto en el músculo in vivo, como en músculo ya transformado en carne. La expresión del RNAm de DCN; el músculo Semitendinoso fue mayor que en Psoas mayor, a la vez que presentó mayor dureza (medida por el método de Warner Bratzler) lo que permite sugerir que DCN juega un papel importante en los entrecruzamientos del colágeno (Pedersern *et al.* (2001) citados por Pinilla (2014)

De acuerdo a Zuñiga (2014), actualmente las técnicas de secuenciación masiva usando plataformas de secuenciación de nueva generación, es una herramienta muy potente para la

identificación de SNPs, por lo que representa uno de los métodos de elección. En esta investigación se amplificó la secuencia codificante de gen de la DCN en animales de ambos grupos raciales y quedaron listas para su posterior secuenciación y búsqueda de SNPs, ya que diversos autores concuerdan con la presencia de mutaciones a través del gen de DCN, como Chen et al. (2011), que identificaron SNPs en DCN de cabras, y lo asociaron con rasgos de crecimiento como altura y longitud del cuerpo, así como circunferencia del pecho. La presencia de SNPs en el gen DCN pueden asociarse de igual forma a la función a nivel muscular, ya que Nishimura et al. (2002) citados por Chen et al. (2011) mencionan que hay evidencia acumulada de que la DCN contribuye en la formación y estabilización de las fibras de colágeno en el perimio que soportan fibras musculares ensambladas en la miogénesis; por lo que investigaciones adicionales de estructura y función de DCN son esenciales y significativas.

## **CONCLUSIONES**

Ambos grupos raciales presentaron valores muy similares en cuanto a la expresión de DCN, sin embargo la terneza de la carne fue diferente, aun cuando los demás factores ambientales fueron iguales. Sugiriendo la posible presencia de SNPs en DCN o en otros genes involucrados que puedan estar afectando la funcionalidad de la proteína. La secuenciación de los productos de PCR preparados en esta investigación podrían generar marcadores genéticos de importancia en la terneza de la carne.

## **RECOMENDACIONES**

Es importante realizar la secuenciación para identificar SNPs en el gen de DCN que afecten favorable o desfavorablemente la terneza de la carne. También sería muy útil medir los niveles de expresión de DCN in vivo y compararlos con los niveles en las muestras de carne para conocer qué tanta DCN se puede degradar a través del proceso de la transformación de músculo a carne.

Y como se mencionó anteriormente, la terneza es verificable hasta después del sacrificio, por lo que sería muy interesante y funcional, conocer la textura sensorial y a su vez, la medición de esfuerzo al corte de las muestras, para una evaluación más completa de la calidad de la carne.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Anderson, DM., Estell, R.E., Gonzalez, A.L., Cibils, A.F. y Torell, L.A. 2015. *Pastizales*. Vol. 37 (2). Pp.62–67. doi: 10.1016 / j.rala.2015.01.006
- Blanco, M. R., Abbiati, N. N., Rovegno, M. S. y Marotta, P. 2017.. Argentina: Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental Facultad de Ciencias Agrarias. Vol. 4 (1). p.14-

21. Consultado el 10 de diciembre de 2019, disponible en: [http://produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/carne\\_y\\_subproductos/194-Blanco.pdf](http://produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/194-Blanco.pdf)
- Branda, S.A.; Ravagnolo, O.; Brito, G., Baldi, F.; LaManna, A., Banchemo, G., Navajas, E.A., Cho, SH, Kang, G., Seong, P., Kang, S., Sun, C., Jang, S., Hwang, I. 2016. *Animal Science Journal*. Vol. 88 (5). p.781–789. doi: 10.1111 / asj.12635
- Chen, Z., Sun, J., Li, Z., Lan, X., Zhang, C., Qu, Y., Liu, Y., Fang, X., Lei, C. y Chen, H. 2011. *Mol Biol Rep*. Vol. 38. Pp. 3121–3127. DOI 10.1007/s11033-010-9982-8
- De Huidobro, FR, Miguel, E., Blázquez, B., y Onega, E. 2005. *Meat Science*. Vol.69 (3). p.527–536. doi: 10.1016 / j.meatsci.2004.09.008
- Desdémona, E. 2017. *Revista veterinaria*. Vol.52 (5) pp. 90-100.
- Desgarnes, C.M., Del Moral, S., Meza, V.M., Peña, J.M., Zárate, J.P. y Abad, J. 2017. *Revista Nova scientia*. Vol. 9. No.19. Consultado el 11 de diciembre de 2019, disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-07052017000200211](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052017000200211)
- Dubost, A., Micol, D., Lethias, C., & Listrat, A. 2015. *Animal*, 10(05), 821–828. doi:10.1017/s1751731115002396
- Dzhulamanov, K., Gerasimov, N., Dubovskova, M. y Baktygalieva, A. 2019. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. Vol. 25 (2). Pp. 375–379.
- Estanislao, D. 2014. Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias. Tesis para obtener el título de doctor en Ciencias Veterinarias. p.147. Consultado en: <https://core.ac.uk/download/pdf/76485104.pdf>
- Franczyk, M., Wawrzykowski, J. y Kankofer, M. (2018). *Glycoconjugate Journal*. p.5. doi: 10.1007 / s10719-018-9834-7
- Gómez, J.A. 2016. Argentina: Universidad Nacional de Tucumán. Tesis doctoral. Pp.72. doi: 10.13140/RG.2.1.1540.7767
- Merlino, V.M., Borra, D., Girgenti, V., Dal, A. y Massaglia, S. 2018. USA: ELSEVIER. *Ciencia de la carne*. Vol. 143. Pp. 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.023>
- Molano, J.E. 2016. Colombia: Universidad de Cundinamarca. Proyecto de grado opción investigación, como requisito parcial para obtener el título de Zootecnista. p.60. Consultado el 13 de diciembre de 2019, disponible en: <http://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/422/IDENTIFICACION%20DE%20POLIMORFISMOS%20DE%20NUCLEOTIDO%20SIMPLE%20EN%20LOS%20GENES%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Muñoz, C.Y., Parra, G.M., Sifuentes, A.M., Martínez, J.C., López, L.A., Vera, A., De la Rosa, R. 2012. Colombia: *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. Vol.25 (2). pp.210-219.

- Naves, C., Torres, R., Rogério, P., Souza, A., De Miranda, L.A., Machado, M. y Mendes, E. 2017. Brasil: ELSEVIER. Ciencia de la Carne. Vol. 125. pp.16-21. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.010>
- Nishimura, T. 2015. Meat Science. Vol. 109. pp. 48–55. doi:10.1016/j.meatsci.
- Papaleo, J., Goszczynski, D.E., Ripoli, M.V., Melucci, L.M., Pardo, A.M., Colatto, E., Rogberg, A., Mezzadra, C.A., Depetris, G.J., Giovambattista, G. y Villareal, E.L. 2016. ELSEVIER. Vol. 114. Pp. 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.018>
- Piccoli, M.L., Brito, L.F., Braccini, J., Oliveira, H.R., Cardoso, F.F., Roso, V.M., Sargolzaei, M. y Schenkel, F.S. 2020. ELSEVIER. Livestock Science. Vol.231. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103864>
- Pinilla, Y.S. 2014. Colombia: Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Tesis como requisito parcial para optar al título de: Magister en Producción Animal. p.163. Consultado el 11 de diciembre de 2019, disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/46434/1/780260.%202014.pdf>
- Rojas, P. 2018. Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina. p.16. Consultado el 14 de diciembre de 2019, disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/326557298\\_Metodos\\_de\\_Secuenciacion\\_de\\_ADN](https://www.researchgate.net/publication/326557298_Metodos_de_Secuenciacion_de_ADN)
- Sasaki, K., Motoyama, M., Narita, T. y Chikuni, K. 2013. J. Anim. Sci. Vol. 26 (10). pp. 1490-1495. [https://www.researchgate.net/publication/264165372\\_Effects\\_of\\_Cooking\\_End-point\\_Temperature\\_and\\_Muscle\\_Part\\_on\\_Sensory\\_'Hardness'\\_and\\_'Chewiness'\\_Assessed\\_Using\\_Scales\\_Presented\\_in\\_ISO110361994](https://www.researchgate.net/publication/264165372_Effects_of_Cooking_End-point_Temperature_and_Muscle_Part_on_Sensory_'Hardness'_and_'Chewiness'_Assessed_Using_Scales_Presented_in_ISO110361994)
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. USA: Elsevier Science. pp. 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Sotelo, H.S. 2019. Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua- Facultad de Zootecnia y Ecología. Tesis para obtener el título de Ingeniero Zootecnista en Sistemas de Producción. p.31.
- Zúñiga, S. 2014. España: Universidad de Valencia. Tesis doctoral. p.161. Consultado el 16 de diciembre de 2019.