



Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 POBLACIONES Y MUESTRAS

En los diferentes estudios se utilizaron seis grupos de muestras:

- 1) Banco de ADN disponible en el IGEVET.
- 2) Muestras de carne obtenidas en una carnicería comercial.
- 3) Muestras de carne obtenidas en frigorífico.
- 4) Rodeo comercial Hereford “Cabaña Los Ángeles”.
- 5) Rodeo experimental Hereford Reserva 7 INTA Balcarce.
- 6) Pruebas de comportamiento (XIV, XV y XVI) del INTA Balcarce.

1) Se dispuso de las muestras del panel de ADN genómico del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, CCT La Plata – CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP), este incluía 15 razas bovinas tanto taurinas como cebuinas. Los muestreos de sangre o pelo de individuos (machos y hembras) con un mínimo grado de parentesco posible fueron realizados entre 1993 y 2008. En la Tabla 2.1 se detallan los animales utilizados, raza, tipo de muestra, año de colecta y método de extracción.

2) En una carnicería del mercado local, se obtuvieron diferentes muestras de carne con el objeto de optimizar el método de medición en el equipo disponible para realizar esta medida. Se utilizaron dos cortes para evaluar si existía una gran variabilidad del color. Se solicitaron los cortes “Colita de Cuadril” y “Tortuguita” en forma de bife. Los cortes fueron realizados a cuchillo en forma longitudinal y transversal al músculo. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y analizadas 2 horas después de realizado el corte.

Tabla 2.1: Se detallan los ADN tomados del panel de ADN genómico del IGEVET y utilizados en los diferentes estudios realizados. Se indica el tipo de muestra tomada originalmente, fechas de toma de la muestra y método de extracción.

Raza	N	Muestra	Metodo
Angus	12	Sangre	Orgánica
	3	Semen	pK/cloroformo
Criollo Argentino	12	Sangre	Orgánica
Criollo Boliviano	15	Sangre	Orgánica
Brahman	8	Sangre	Orgánica
Charolais	6	Sangre	DNAzol
Criollo Uruguayo	5	Sangre	DNAzol
Galloway	2	Sangre	DNAzol
Hereford	23	Sangre	DNAzol
Holando	5	Sangre	Orgánica
Jersey	4	Sangre	DNAzol
Nelore	25	Sangre	DNAzol y Chelex
Normando	2	Sangre	DNAzol
Retinta	4	Sangre	Orgánica
Wagyu	16	Pelo	NaOH
	8	Sangre	DNAzol
Shorthorn	1	Sangre	DNAzol

3) En un frigorífico comercial de la provincia de Buenos Aires se faenaron 50 animales en condiciones controladas. Los animales pertenecían a las razas Aberdeen Angus (6), Hereford (3) y sus cruza en diferentes proporciones (23 media sangre, 7 Angus $\frac{3}{4}$ y 6 Hereford $\frac{3}{4}$), más 5 muestras de animales triple cruza (padre Limusin y madre Angus x Hereford). Los animales nacieron en la primavera 2006 y fueron criados en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 45' latitud S, 58° 18' longitud W, 130 m sobre el mar). Su alimentación se realizó sobre pasturas, principalmente de las especies *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Bromus catarthicus*, *Trifolium repens* y *T. pretense*. Al desposte (24 h después del sacrificio) se extrajeron muestras de tres bifos entre las costillas 12° y 13° de la media res izquierda. Las muestras se remitieron deshuesadas, envasadas al vacío y congeladas (-18 °C) al Laboratorio de Carnes de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, para la realización posterior de las mediciones de color y pH.

4) Las muestras del Rodeo Comercial (RodC) fueron obtenidas de una cabaña - ubicada en el Partido de Azul (centro de la Provincia de Buenos Aires). La Cabaña Los Ángeles cuenta con un volumen aproximado de 400 vacas de cría y una producción anual de 160 toros. El muestreo, realizado entre 2006 y 2008, incluyó sangre de 68 terneros (machos y hembras) y 17 vacas, y semen congelado de 18 toros. Todos los animales muestreados presentaban una conexión genética con un toro fundador (HHH ENF 972) nacido en 1980, a excepción de 6 toros utilizados para introducir un nuevo pool genético en el rodeo. Con el objetivo de maximizar la inferencia de genotipos a partir de las relaciones de parentesco, las hembras seleccionadas para muestrear tenían varias crías en el rodeo, y los toros habían sido utilizados desde 1986. Finalmente el árbol de relaciones de parentesco (pedigrí) registrado desde 1980 incluía 1754 animales.

5) El Rodeo experimental (RodE) constituye uno de los rodeos del INTA Balcarce, fundado en 1960 con el objetivo de experimentar condiciones de manejo en la cría. Desde 1986 hasta 2006 el rodeo estuvo cerrado, estabilizado en 100 vacas de cría y 4 toros en servicio. Los toros entraban en servicio a los dos años de edad y servían al rodeo dos años consecutivos, luego eran reemplazados por dos toros jóvenes; así los toros en servicio siempre tenían dos y tres años de edad (para una visión más detallada del rodeo ver Melucci *et al.* (2009)). El muestreo se realizó entre 2005 y 2007 de

animales ubicados entre las generaciones 2.19 y 8.16, presentando un coeficiente de consanguinidad promedio de 0,047. Las muestras de sangre tomadas pertenecían a 66 terneros (machos y hembras), 83 vacas y 9 toros. Adicionalmente el rodeo contaba con un árbol de relaciones de parentesco (pedigrí) que incluyó 2474 animales.

6) Con el objetivo de evaluar la diversidad y la frecuencia alélica en poblaciones no homogéneas, se tomaron muestras de sangre de los toros de las Pruebas de comportamiento XIV, XV y XVI del INTA Balcarce, realizadas de 2006 a 2008 (<http://www.inta.gov.ar/balcarce/index.htm>). Estas pruebas incluyeron 133 toros: 37 Hereford, 58 Angus, 25 Criollos y 13 cruza Angus x Hereford, pertenecientes a 7, 16, 3 y 1 establecimientos diferentes, respectivamente. La importancia de este estudio en estas razas radica en que Angus y Hereford son las razas mayoritarias en el país, y la raza Criolla es la única población autóctona, que constituye un germoplasma valioso de ser caracterizado por ser un potencial “reservorio de variabilidad genética” (Giovambattista *et al.*, 2001). Además, el conjunto de los animales Hereford sirvió como referencia de la variabilidad de esta raza en Argentina.

2.2 DATOS FENOTÍPICOS

2.2.1 Crecimiento

Los dos rodeos muestreados (RodE y RodC) utilizaban métodos de selección basados en el Modelo Animal (genética cuantitativa), con el uso de BLUPs (*Best Linear Unbiased Predictors*). Aunque los objetivos de selección de ambos rodeos no coincidían totalmente, algunas de las mediciones fueron equiparables.

El RodC ha sido seleccionado por más de 15 años utilizando los EBVs (*Estimated Breeding Values*) resultantes del modelo de evaluación genética implementado por BreedPlan® (<http://breedplan.une.edu.au/>). Este rodeo es constantemente evaluado para las variables relacionadas con el crecimiento: Peso al Nacer directo (PNd), Peso a los 200 días (equivalente al Peso al Destete directo, PDd), Habilidad Materna o Leche (equivalente al Peso al Destete materno, PDM), Peso a los 400 días (P400), Peso a los 600 días (P600) y Área de Ojo de Bife (AOB). El objetivo de selección aplicado en este rodeo, respecto del crecimiento corporal, es obtener un bajo peso al nacer y un peso adulto moderado (comunicación personal del propietario de la cabaña). De esta manera los valores de PNd y P600 son los más significativos al momento de elegir los toros que

serán padres de la cabaña. Los EBVs obtenidos por BreedPlan en 2008 fueron suministrados por el propietario de la Cabaña. La base contenía los valores de cría pertenecientes a 1754 animales relacionados, incluyendo los animales genotipados.

El RodE fue seleccionado desde 1986 hasta 1993 aplicando un índice de selección sobre los toros con el objetivo de aumentar la tasa de ganancia diaria pre-destete, sin aumentar el peso al nacer. El índice (I), obtenido por Melucci *et al.* (1983), se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I_i = PN_i + 9374,76 RDG_i$$

siendo PN_i = el Peso al Nacer del toro i y RDG_i la tasa de ganancia diaria relativa desde el nacimiento al destete, calculada como el logaritmo del peso al momento de la medida (cada animal tuvo entre 5 y 8 medidas). A partir de 1994 y hasta 2006, el criterio de selección varió, utilizando el índice (X) propuesto por Melucci (1995):

$$X_i = BLUP_i(PDd) - 2,33 BLUP_i(PNd)$$

los BLUPs corresponden al peso al nacer directo y al peso al destete directo respectivamente, y fueron calculados a partir de un modelo animal de dos caracteres considerando el PNd, PDd y PDm. Al momento de realizar esta tesis, el modelo incluyó 2474 animales que contaban con datos fenotípicos o permitían establecer relaciones de parentesco entre ellos (para una visión más detallada del modelo de selección ver Melucci *et al.* (2009)). Por lo tanto, este rodeo contaba con información de campo y BLUPs, disponibles para los análisis de asociación.

2.2.2 Determinación del Color de la Carne

Muestras de Carnicería

Las muestras fueron procesadas en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET. La medición del brillo (L^*) y de los parámetros de cromaticidad (a^* y b^*) fue realizada mediante espectrofotometría de reflectancia difusa, utilizando un colorímetro triestímulo Chromameter Minolta CR-300 (Minolta Co. Ltd., Japan). Este

método, como la mayoría de los métodos objetivos de medición de color, utiliza el sistema CIE (1986) que se basa en tres coordenadas: L*, luminosidad, mide la luz reflejada (0 a 100 de luz completamente absorbida a completamente reflejada), a* mide gradaciones del rojo (positivo) al verde (negativo), y b* mide gradaciones del amarillo (positivo) al azul (negativo) (Priolo *et al.*, 2001). Las pruebas realizadas incluyeron zonas que contenían o no fibras musculares, con diferentes grados de grasa intramuscular y diferentes espesores de corte. Luego de estas pruebas se decidió realizar las medidas por triplicado, evitando zonas con grasa y/o fibras.

Muestras de carne obtenidas en Frigorífico

Estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Carnes de la Facultad de Agronomía (UBA). Luego de ser conservadas a -18 °C durante aproximadamente 12 meses, fueron descongeladas y llevadas a 4 °C durante 60 minutos para su oxigenación. De los trozos derivados se seccionó un bife de 2,5 cm de ancho cortado del músculo *Longissimus* entre la doceava y treceava costilla. Las mediciones de color se realizaron en el espacio L* a* b* por medio de un colorímetro triestímulo Chromameter Minolta CR-300 (Minolta Co. Ltd.), evitando las medidas sobre tejido conectivo o grasa intramuscular. El área de medición circular fue de 8 mm de diámetro, usando el iluminante C y con iluminación difusa de una lámpara de Xenón. Previo a las mediciones, el colorímetro fue calibrado contra un estándar blanco (CR – A43) provisto por el fabricante. Se tomaron tres mediciones de cada muestra que luego se promediaron, para tener una única medida por bife. El pH fue medido con un peachímetro digital portátil Testo 230, con electrodo de penetración y sonda compensadora de temperatura (Testo GMBH. Ltd., Japan). Se tomaron tres lecturas de pH por muestra y se calculó el promedio.

2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

2.3.1 Extracción de ADN de carne

Se cortaron 0,07 g. de carne y se colocaron en 500 µl de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 30 µl de Ditiotretol (DTT) 1 M. Luego se llevó el tubo a 55 °C durante toda la noche para la digestión del tejido. Al día siguiente se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezclaron

las fases y se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 5 min 12000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió 2 o 3 veces hasta que la fase intermedia fuera casi nula. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio (concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 750 μ l de etanol 100%, el mismo fue separado por centrifugación (15 min a 14000 g y temperatura ambiente). El pellet se lavó con 250 μ l de etanol 70%, se centrifugó a temperatura ambiente 5 min a 12000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 μ l de NaOH 8mM a 37 °C toda la noche.

2.3.2 Extracción de ADN de semen congelado

Se tomaron 50 μ l de semen para digestión total, para ello se agregaron 500 μ l de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 0,4 mg/ml de proteinasa K y 25 mM de DTT. Se permitió actuar a la enzima durante toda la noche a 55 °C en horno de hibridación. Luego de la digestión, se siguieron los mismos pasos de purificación, precipitación y lavado, que en la “Extracción de ADN de carne”.

2.3.3 Extracción de ADN de sangre por el método DNAzol

A partir de 500 μ l de sangre se obtuvieron Glóbulos Blancos por sucesivos lavados (hasta tres) con 500 μ l de agua y posterior centrifugación a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado obtenido fue blanco, se le agregaron 500 μ l de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y se disgregó con pipeta o vortex. La dispersión obtenida se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 14.000 g y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo. El ADN, presente en el sobrenadante, se precipitó con 750 μ l de etanol 100% y se separó por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 min a 14000 g. El pellet se lavó con 250 μ l de etanol 70% y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 12000 g. El ADN obtenido se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 200 μ l de NaOH 8mM a 37 °C durante toda la noche.

2.3.4 Extracción de ADN de sangre por el método Chelex

A 500 µl de sangre se le agregaron 500 µl de agua y se incubó a temperatura ambiente 30 min. La dispersión luego se centrifugó a temperatura ambiente, a 14000 g, durante 3 min y el sobrenadante se descartó. Al precipitado así obtenido se le agregaron 200 µl de Chelex 5% y se incubó durante 30 min a 56° C. Se mezcló enérgicamente (vortex) 5 min y se incubó durante 8 min a 95 °C.

2.3.5 Extracción de ADN de sangre por el método Orgánico

A partir de 500 µl de sangre se obtuvieron glóbulos blancos por sucesivos lavados (hasta tres) con 500 µl de agua y posterior centrifugación a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado obtenido fue de color blanco, se le agregaron 500 µl de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Luego se llevó el tubo a 55 °C durante toda la noche para la digestión de las células. Al día siguiente se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezclaron las fases y se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 5 min 12000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió 2 o 3 veces hasta que la fase intermedia fuera casi nula. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio (concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 750 µl de etanol 100%, el mismo fue separado por centrifugación (15 min a 14000 g y temperatura ambiente). El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70%, se centrifugó a temperatura ambiente 5 min a 12000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 µl de NaOH 8 mM a 37 °C toda la noche.

2.3.6 Extracción de ADN de pelo

Se cortaron y colocaron cinco a diez bulbos pilosos en un tubo de microcentrífuga, luego se agregó 50 µl de NaOH 0,2 M y se calentó a 95 °C durante 15 min. Inmediatamente después, la solución sobrenadante se trasvasó en un nuevo tubo y se neutralizó con 50 µl de una solución HCl 0,2 M - TRIS 1 M.

2.3.7 Cuantificación de ADN

Las soluciones de ADN resultantes, conservadas en un freezer de -20 °C, se midieron en un espectrofotómetro NanoView (GE healthcare, USA). A partir de los datos de absorbancia obtenidos, se prepararon soluciones de trabajo con una concentración final entre 12,5 y 18 ng/μl, que se conservaron en un freezer de -20 °C hasta su utilización.

2.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO

Para el estudio de polimorfismo de genes candidatos para el color de la carne (Mb y GSTP1) se plantearon diferentes estrategias.

2.4.1 Gen de la Mioglobina (Mb)

Con el objetivo de identificar qué secciones de la estructura primaria de la proteína poseían mayor contacto con el grupo Hemo, se utilizaron simulaciones de la estructura 3D de la mioglobina. Al no disponer en ese momento del diagrama bovino, se utilizó el de la mioglobina equina (GeneBank MMDB: 42426 PDB: 2IN4), se observó con el programa Cn3D (Chen *et al.*, 2003), y se identificó la zona de mayor contacto. Para ver la correspondencia de las zonas identificadas en la mioglobina bovina en el gen, se utilizaron las secuencias NC 007303, NM 173881, NP 776303.1 reportadas en GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que codifican para el gen de la mioglobina bovina (*Bos taurus*), el ARNm del mismo y la proteína respectivamente (Anexo 1). Por alineación de las secuencias se seleccionó el exón 2 del gen, como la zona codificante para la porción proteica en mayor contacto con el grupo Hemo (principal responsable del color), siendo esta la zona elegida para realizar la amplificación.

Se diseñaron primers en los extremos del exón 2 para buscar polimorfismos en la secuencia del mismo (Tabla 2.2) y estudiar la variabilidad genética en varias razas. Para esto se incluyeron muestras del panel de ADN genómico bovino del IGEVET. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl con las siguientes concentraciones de reactivos: ADN 100 μg totales, 10X PCR Buffer (Invitrogen) 5 μl, MgCl₂ 2,5mM, dNTPs 0,8 mM, Primers 1mM, Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) 0,06 U/μl. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: 1 min a 94°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 63°C y 45 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. Luego, para

verificar el producto obtenido por PCR, se mezclaron 3 µl del tubo con el amplificado con 1 µl de colorante no desnaturante (4 g % sacarosa, 0,025 g % de Azul de Bromofenol). Estos fueron luego corridos en un gel de poliacrilamida (19:1) al 6 %, a 170 voltios durante 40 min, junto con marcadores de peso molecular. Las bandas de ADN se revelaron con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 5 min y se observaron en un transiluminador UV. Se comprobó la presencia de una única banda de peso molecular coincidente con el teórico del gen amplificado.

El screening de polimorfismos se realizó por el método PCR-SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), y se confirmó cada variante conformacional encontrada por secuenciación directa. Para realizar el SSCP, los productos de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida (38:1) al 10% (Orita *et al*, 1989a,b), bajo las siguientes condiciones

de corrida: 16 h, 200 volts y 4° C. Luego, los geles se tiñeron con Nitrato de Plata según la técnica de Bassam *et al*. (1991) y

Tabla 2.2: Primers utilizados para el estudio del polimorfismo de los genes candidatos para color.

Gen	Nombre	Primer
GSTP1	GSTP1 V2 F	5'-CCgCTAACTggCTTCTTTgTgCAT-3'
	GSTP1 E1-2 R	5'-ACTgCTCggAAgACCTCACAgC-3'
Mioglobina	MBe2int-F	5'-ggCTCTTCACAggTCACCCgAg-3'
	MBe2int-R	5'-CTCCAggTACTTgACAgggATC-3'

se observaron con un transiluminador de luz visible. Una vez seleccionadas las posibles variantes, por diferencias en los patrones de bandas, una nueva alícuota de los productos de amplificación se purificaron con polietilenglicol 8000 y se corrieron en un secuenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare, USA) utilizando el DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Sequence Analyzer (GE Healthcare). Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL-W 1.8 (Baylor College of Medicine - <http://searchlauncher.bmc.tmc.edu>), y las variaciones se determinaron por comparación directa con la secuencia existente en el GenBank para el gen de la mioglobina (NM 173881).

2.4.2 Gen GSTP1

La secuencia NC 007330 (Anexo 2), incluida en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que codifica para el gen de la proteína GSTP1, se

utilizó para el diseño de primers específicos. Se diseñaron los primers GSTP1 V2 F y E1-2 R (Tabla 2.2) que amplifican 273 pb que incluyen el exón 2 y parte del segundo intrón del gen.

Las muestras utilizadas para la búsqueda de polimorfismos se seleccionaron del panel de ADN genómico bovino del IGEVET. Para las reacciones de PCR se incluyeron 100 ng de ADN en un volumen total de 50 μ l, que incluyó: 10X PCR Buffer (Invitrogen) 5 μ l, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,8 mM, Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) 0,06 U/ μ l, primers 1mM. El programa de ciclado fue 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 63°C y 75 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C.

Se comprobó la presencia de productos de PCR como se describió anteriormente (para el gen Mb) y los amplificados con una buena señal (que poseían una buena concentración del gen amplificado) se seleccionaron para secuenciar. El proceso de purificación, corrida y análisis realizado fue el mismo que el descrito anteriormente para el gen Mb. Los polimorfismos se determinaron por comparación directa con la secuencia informada en el GenBank para el gen de la GSTP1 bovina (NC 007330).

2.5 GENOTIPIFICACIÓN

Para el estudio de asociación con los caracteres de crecimiento y color de carne se eligieron 6 genes como candidatos. Por un lado, para los caracteres de crecimiento se seleccionaron 4 genes, cuyos productos pertenecen a diferentes etapas de la vía de señalización de la Hormona de Crecimiento (GH). En tanto que, se utilizaron 3 técnicas de detección de polimorfismo: GH por corte con enzimas de restricción (PCR-RFLP), Receptor de GH (GHR) y GH por Pirosecuenciación, e IGF1 y Myf5 por microsatélites cercanos a los genes. Por otro lado, la posible asociación de los dos genes elegidos en relación al color de la carne se realizó: GSTP1 por secuenciación directa y Mb por microsatélites cercanos al gen.

2.5.1 PCR-RFLP

Para la determinación del polimorfismo L217V del exón 5 (alelos A y B) del gen GH se utilizó la técnica descrita por Yao *et al.* (1996). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15 μ M de cada primer (GH6P11 y GH6P12, Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2

mM MgCl₂ y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones utilizadas fueron 92°C 4 min, 30 ciclos de 92°C 30 s, 59°C 1 min y 72°C 1 min, con una extensión final de 5 min a 72°C. Luego 3 µl de cada amplificado se utilizaron para verificar el grado de amplificación como se describió anteriormente para el gen Mb. Las muestras

Tabla 2.3: Primers utilizados para la genotipificación de marcadores de los genes candidatos, con el tamaño del amplificado. Los prefijos **FAM** y **HEX** corresponden a fluorocromos, y **BIOT** a biotina.

Marcador/ Gen	Nombre	Primer	Amplificado (Rango)	Referencia
BM1824	BM1824 F	FAM 5' - gAgCAAggTgTTTTTCCAATC - 3'	180-192	www.isag.org.uk
	BM1824 R	5' - CATTCTCCAACgCTTCCTTg - 3'		
BP1	BP1 F	FAM 5' - AAAATCCCTTCATAACAgTgCC - 3'	302-322	UnISTS:250709 (www.ncbi.nlm.nih.gov)
	BP1 R	5' - CATCgTgAATTCCAaggTTC - 3'		
ETH10	ETH10 F	FAM 5' - gTTCAggACTggCCCTgCTAACA - 3'	214-226	www.isag.org.uk
	ETH10 R	5' - CCTCCAgCCCACCTTCTCTCTC - 3'		
IGF1	IGF1 F	HEX 5' - gCTTggATggACCATgTg - 3'	225-231	Bishop <i>et al.</i> 1994
	IGF1 R	5' - CACTTgAggggCAAATgATT - 3'		
RM029	RM029 F	FAM 5' - ATATgTCTCTgCATATCTgTTTAT - 3'	80-86	Kossarek <i>et al.</i> 1994
	RM029 R	5' - CTAATCCCATAgTgAgCagACC - 3'		
GH	GH6P11	5' - TAggggAgggTggAAAATggA - 3'	404	Yao <i>et al.</i> 1996
	GH6P12	5' - gACACCTACTCagACAATgCg - 3'		
	GH5 V2 R	BIOT - 5' - ggCACTTCATgACCCTCAggT - 3'	253	Estatesis
	GH5 V2-Int-1	5' - CCCTTggCaggAg - 3'	---	
GHRc	GHR F	BIOT - 5' - TgCTCTAATCTTTCTggTACCagg - 3'	344	Blott <i>et al.</i> 2003
	GHR R	5' - CCTCCCCAAATCAATTACATTTTCTC - 3'		
	GHR seq	5' - TAgAAAATATgAgTAAA - 3'		

que presentaban una buena señal (en las que se logró una buena eficiencia de amplificación), se digirieron con la enzima de restricción. Para esto, 12 µl del amplificado se mezclaron con 3,1 µl de agua, 2,5 U de la enzima Alu I (Promega, Madison, WI) y 1,7 µl de Buffer (provisto por el fabricante de la enzima). La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche. Luego, todo el volumen de reacción se corrió en gel de poliacrilamida al 8% 1X TBE, a 120 volts, durante 1 hora. El gel se reveló con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 5 minutos, y se observó con un transiluminador UV. Los genotipos se determinaron por observación directa e interpretación del patrón de bandas.

2.5.2 PCR-Pirosecuenciación

Para el estudio de los SNPs de los genes GH y GHRc se utilizó la técnica de pirosecuenciación. Esta técnica aprovecha la detección de la luminiscencia emitida por la luciferasa al romper una molécula adenosinatrifosfato (ATP). La incorporación de una base nitrogenada trifosfato (dNTP) en la síntesis de ADN por la polimerasa libera

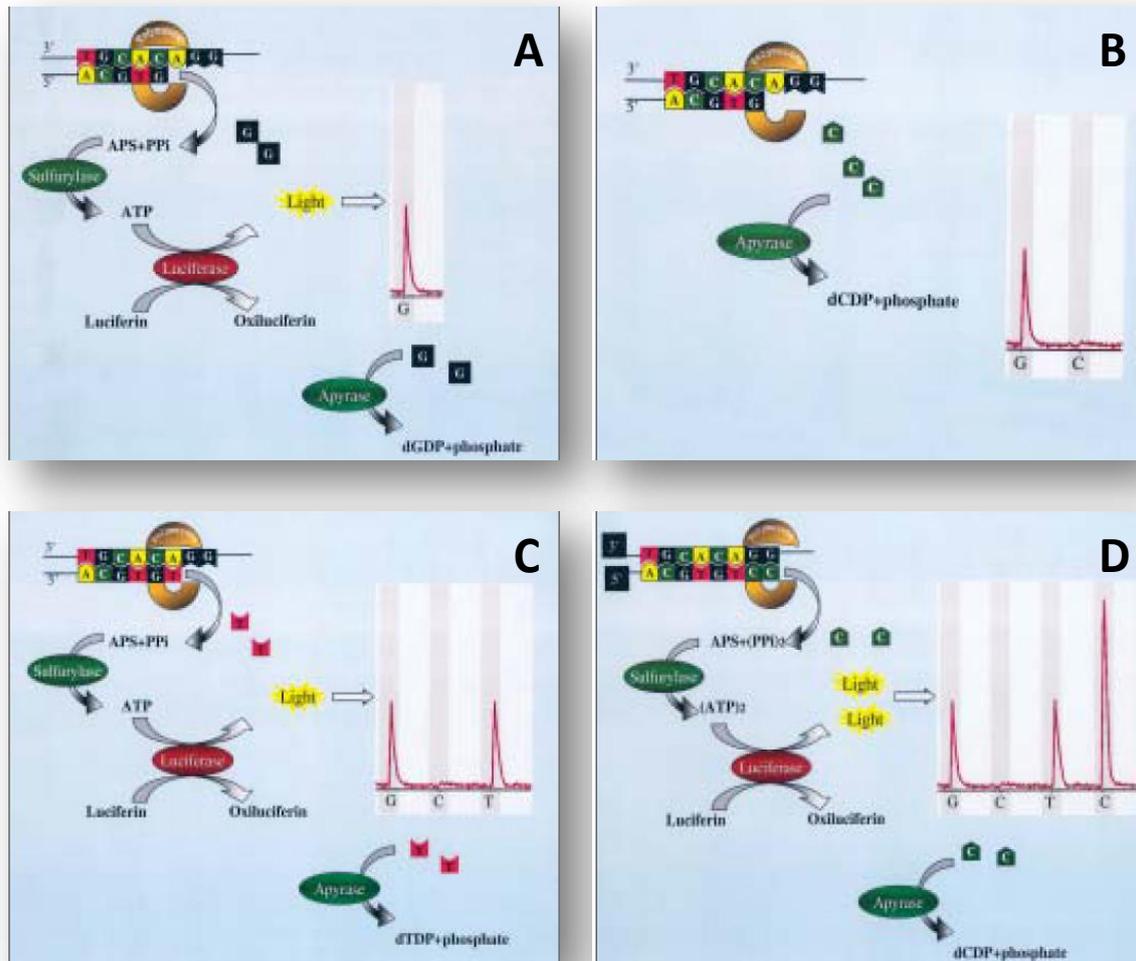


Figura 2.1: Esquema de la técnica de pirosecuenciación (adaptada de Wang y Marincola 2003). Paso A: se dispensa el primer dNTP establecido en el orden (dGTP) y la Polimerasa cataliza su incorporación a la cadena. Este proceso se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad que es equimolar con la cantidad de dNTP incorporado. Subsecuentemente, la ATP sulfurylase convierte el PPi + APS en ATP y este produce la conversión de luciferina en oxiluciferina en presencia de la enzima luciferasa. Este proceso emite luz en cantidades proporcionales al dNTP incorporado, que es captado por el equipo y presentado en forma de un pico. El dGTP no incorporado y el exceso de ATP, es degradado por una apirasa, y el equipo queda preparado para el próximo paso. Paso B: Se dispensa el segundo dNTP del orden (dCTP), como no es incorporado todo es degradado por la apirasa y no genera luz. Paso C: Se dispensa el tercer dNTP del orden (dTTP), se genera el pico por la incorporación de un dTTP y el exceso es degradado. Paso D: Se dispensa el cuarto dNTP del orden (dCTP), se genera un pico del doble de intensidad por la incorporación de dos dCTP y el exceso es degradado. Esto se repite para el resto de la secuencia.

una molécula de Pirofosfato (PPi), a partir de este y adenosilfosfosulfato (APS), en presencia de la enzima sulfirilasa se genera una molécula de ATP por cada base incorporada. Así la luminiscencia emitida por una reacción de la luciferasa acoplada, será proporcional al número de bases incorporadas. En la Figura 2.1 se esquematiza el método de pirosecuenciación. En el paso A: se dispensa el primer dNTP establecido en el orden (dGTP) y la Polimerasa cataliza su incorporación a la cadena. Este proceso se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad que es equimolar con la cantidad de dNTP incorporado. Subsiguientemente, la ATP sulfurilasa convierte el PPi + APS en ATP y este produce la conversión de luciferina en oxiluciferina en presencia de la enzima luciferasa. Este proceso emite luz en cantidades proporcionales al dNTP incorporado, que es captado por el equipo y presentado en forma de un pico. El dGTP no incorporado y el exceso de ATP, es degradado por una apirasa, y el equipo queda preparado para el próximo paso.

GHRc (F279Y)

Para la determinación del genotipo del SNP ubicado en el exón VIII del gen *GHRc*, responsable de la sustitución F279Y, se utilizó la técnica de pirosecuenciación. Se amplificó un fragmento de 344pb por el método informado por Blott *et al.* (2003), en este caso el primer *forward* se biotiniló para adaptarlo a la técnica. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15 μ M de cada primer (*GHR F* y *GHR R*, Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2 mM $MgCl_2$ y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones empleadas fueron 45 ciclos de 94°C 45 s, 63°C 45 s y 72°C 45 s, con una extensión final de 10 min a 72°C. Las muestras se verificaron como se describió anteriormente para el gen *Mb*. Las cadenas biotiniladas se purificaron a partir 20 μ l de los amplificados; para ello se mezclaron con 40 μ l de Buffer de "binding" (Biotage AB, Uppsala, Sweden), 3 μ l de perlas de sefarosa cubiertas con estreptoavidina (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare, USA) y 17 μ l de agua. La purificación se efectuó utilizando la plataforma de purificación PyroMark Prep Workstation (Biotage AB), mediante sucesivos lavados de 5 s con etanol 70%, NaOH 8mM y Washing Buffer Workstation (Biotage AB). Un primer interno de secuenciación (*GHR-seq*, Tabla 2.3), complementario a la cadena forward, se diseñó con el programa Pyrosequencing Primer

SNP Design 1.01 software (<http://www.pyrosequencing.com>). Las cadenas biotiniladas purificadas y lavadas se utilizaron como molde de la reacción de pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1998, 2001), en una mezcla de reacción que contenía 0,135 μM del primer interno de secuenciación diluido en 45 μl de Annealing Buffer (Biotage AB). La reacción se realizó en un PSQTM96 utilizando el Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB). Los resultados se interpretaron con el software PSQ (Biotage AB).

GH (L217V)

En el momento que se dispuso de la tecnología, se desarrolló una técnica de pirosecuenciación para el polimorfismo L217V del exón 5 del gen GH. Este método presentaba la ventaja de ser más exacto y permitía ser automatizado. Para la determinación del genotipo de cada individuo, se amplificó un fragmento de 253pb utilizando los primers GH6P11 y GH5 V2 R, que se biotiniló para ser utilizado en esta técnica. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μl conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15 μM de cada primer (Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl_2 y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones empleadas fueron 45 ciclos de 94°C 45 s, 63°C 45 s y 72°C 45 s, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los pasos siguientes se realizaron del mismo modo que para GHRc pero con el primer interno de secuenciación GH5 V2-Int-1 (Tabla 2.3), complementario a la cadena reversa.

2.5.3 PCR-Microsatélites

Tres de los genes elegidos se localizan en el BTA5: IGF1, Myf5 y Mb. Se tipificaron cuatro microsatélites cercanos a ellos, y con un posible grado de ligamiento: BP1 (posición: 14.382.552 pb) en las inmediaciones del gen Myf5, ETH10 (posición: 60.836.475 pb) e IGF1 (posición: 71.198.741 pb) cercanos al gen IGF1, y RM029 (posición: 80.417.234 pb) alrededor del gen Mb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>). Para evaluar posibles efectos debidos al azar se seleccionó un quinto microsatélite, BM1824 (BTA1, 122cM), multi-alélico, en otro cromosoma y sin ligamiento conocido a algún gen estructural. La reacción de PCR se realizó en multiplex, en un volumen total de 12,5 μl conteniendo 25 a 30 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 200 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl_2 , 0,04 U/ μl

Taq Platinum (InvitrogeneTM) y las siguientes cantidades de los primers marcados con fluorescencia: 1,5 pmol ETH10, 2,5 pmol BM1824, 3 pmol FRM029, 6 pmol BP1y 10 pmol IGF1 (Tabla 2.3). Las condiciones empleadas fueron 2 min 94°C, 10 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 60°C, 30 s a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 58°C, 30 s a 72°C, y una extensión de 7 min a 72°C. Luego 3 µl de amplificado se utilizaron para verificar la amplificación como se describió anteriormente para el gen Mb. Los productos se corrieron en un secuenciador MegaBACE 1000 sequencer (GE healthcare) utilizando el DYE ET-ROX 550 (GE healthcare) como marcador de peso molecular. Los archivos crudos se analizaron con el programa Fragment Profiler (GE healthcare).

2.6 VARIABILIDAD GENÉTICA

Para el estudio de la variabilidad genética se utilizó el software GenePop 4.0 (Rousset 2008), con los algoritmos incluidos en el paquete se calculó: número de alelos, frecuencias génicas, heterocigocidad esperada para cada locus (h_e), y todos los locus (H_e). Adicionalmente, se utilizó el método de cadenas de Markov, incluido en el mismo paquete estadístico, para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) estimado por el estadístico F_{IS} , y el desequilibrio de ligamiento.

En el caso de los genes de crecimiento, se realizó un estudio de variación de las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo en el RodE, con el objetivo de evaluar el efecto de la selección sobre las frecuencias génicas de dichos genes. Para esto se dividieron los animales en tres grupos de contemporáneos: i) nacidos entre 1996 y 1999, ii) nacidos entre 2000 y 2003, y iii) nacidos entre 2004 y 2007. El intervalo de cuatro años corresponde al tiempo mínimo generacional, así un toro y su hijo no están sirviendo al rodeo al mismo tiempo, por lo tanto nos aseguramos que hijos y nietos de un mismo toro estén en grupos de contemporáneos diferentes. Las diferencias entre las frecuencias génicas de los tres grupos se contrastaron a través del Test Exacto incluido en el programa GenePop 4.0.

Dado que se cuenta con varios marcadores (microsatélites) en un mismo cromosoma (BTA5), se realizó un estudio de reconstrucción de fases en desequilibrio de ligamiento, en otras palabras se analizó la combinación de alelos presentes en cada uno de los dos cromosomas de un individuo dado. Para esto se utilizó el programa Phase v2.1.1 (Li y Stephens, 2003), que reconstruye esta información a partir de las posiciones

de los marcadores en el cromosoma y los genotipos para cada animal. La corrida se realizó con las opciones por defecto, y una vez obtenidas las posibles fases se aceptaron sólo aquellas en las que la probabilidad era mayor al 95%.

2.7 PEDIGRÍ E INFERENCIA DE GENOTIPOS

Los dos rodeos estudiados (RodC y RodE) contaban con varias generaciones de registros genealógicos (pedigrí). En el caso del RodC la base contenía 1754 animales nacidos entre 1980 y 2007, mientras que la del RodE contenía 2474 animales nacidos entre 1960 y 2008. Utilizando la información de relaciones de parentesco, se han desarrollado programas que infieren genotipos en un árbol genealógico a partir de un núcleo de animales tipificados. Uno de ellos es el Genoprob 2.0 (Thallman *et al.*, 2001a, b), que se utilizó para inferir los genotipos de los microsatélites y de los genes GH y GHR, en los dos rodeos estudiados. Los animales muestreados y a los que se le determinó el genotipo se utilizaron como núcleo para inferir los genotipos de todos los animales incluidos en el pedigrí. Como parámetros de corrida (valores de probabilidad de cada meiosis y error) se utilizaron los establecidos por defecto en el programa, considerándose además penetrancia completa y ausencia de alelos nulos. Finalmente, se definieron 10 iteraciones para la corrida. Los resultados fueron procesados y se aceptó un genotipo para ser incluido en el análisis de asociación si su pGmax (probabilidad posterior de que el genotipo sea correcto) era superior a 0,95.

2.8 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Para este estudio se incluyeron todos los animales que poseían datos genotípicos (por tipificación o por inferencia) y fenotípicos. Para todos los genes y todos los caracteres, el modelo de asociación fue similar y se utilizó el procedimiento GLM (General Lineal Model) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1999).

2.8.1 Crecimiento

En estos casos se realizaron análisis de asociación, independientes para cada locus, entre genotipos y BLUPs. Muchos estudios de asociación entre marcadores y variables cuantitativas se llevan a cabo utilizando los datos de campo, sin embargo en

algunos otros se utiliza BLUPs (Pereira *et al.*, 2005, Schulman *et al.*, 2008). En este sentido Miquel *et al.* (2009) plantea la ventaja de la utilización de BLUPs debido a que estos consideran las correlaciones existentes entre los diferentes caracteres.

Los dos rodeos utilizados en el análisis de asociación poseían información diferente, por un lado en el RodE se contaba con datos de PNd, PNm, PDD y PDM, mientras que en el RodC se contaba con valores de PNd, PDD, PDM, P400, P600 y AOB. Para los caracteres exclusivos de un solo rodeo se planteó un modelo lineal:

$$y_{ij} = \mu + GM_i + e_{ij}$$

donde y_{ij} es el BLUP del carácter i para el animal j , GM_i es el efecto fijo del marcador y e_{ij} es el error. Para el caso de PNd, PDD y PDM se incluyeron en el análisis los dos rodeos aunque estos no presentaban puntos de contacto en su pedigrí, por lo cual hubo que incluir un efecto del rodeo en el modelo. Dependiendo del número de alelos que presentaba cada marcador se definieron dos modelos diferentes:

- i) Modelo para marcadores multialélicos (BM1824, ETH10 y BP1), la interacción entre rodeo (H) y el marcador (GM) no pudo ser estimada, por lo que se incluyó el efecto del marcador anidado en rodeo.

$$y_{ijk} = \mu + H_i + GM_{ij}(H_i) + e_{ijk}$$

- ii) Modelo para marcadores bialélicos (RM029, IGF1, GH y GHR), incluyó efectos fijos para H, GM y para la interacción H*GM. En el caso del microsatélite BP1 se realizó un análisis con este modelo excluyendo los animales que presentaban el alelo 310 (presente solo en el RodC).

$$y_{ijk} = \mu + H_i + GM_{ij} + H_i * GM_{ij} + e_{ijk}$$

En un segundo paso, estos mismos modelos se utilizaron para el análisis de marcadores ubicados en el BTA5 en posiciones cercanas. Se realizó un análisis con los genotipos tomados de a pares para los marcadores ETH10-IGF1 e IGF1-RM029, y un

análisis con las fases obtenidas anteriormente para los marcadores IGF1-RM029. En todos los casos, para determinar la diferencia de las medias entre genotipos, pares de genotipos o fases, se utilizó el test de separación de medias de Bonferroni ($P < 0,05$).

Finalmente, el efecto aditivo de cada alelo se estimó como la diferencia entre dos genotipos homocigota, mientras que el efecto de dominancia se obtuvo como un promedio de las diferencias entre los genotipos homocigota y el genotipo heterocigota.

2.8.2 Color de la carne

El análisis de asociación de marcadores con caracteres de color, se realizó a partir de los genotipos de las muestras obtenidas en el frigorífico con los parámetros de color L^* , a^* , b^* . Adicionalmente, a partir de los datos de a^* y b^* , se calcularon el ángulo Hunter (Hue) y la cromaticidad (Croma) que también fueron incluidos en el análisis:

$$Hue = \text{arcotangente} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad Croma = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Hue es una medida de la divergencia del eje rojo puro sobre espacio de color (Hunter y Harold, 1987), mientras Croma ha sido considerado como un buen parámetro para caracterizar los cambios de color, ya que este valor disminuye en la presencia de tonalidades marrones (Renerre y Mazuel, 1985).

El modelo utilizado incluyó en todos los casos al pH como covariable, y la diferencia de las medias entre genotipos se determinó por el test de separación de medias de Bonferroni ($P < 0,05$):

$$y_{ik} = \mu + GM_i + cov pH_i + e_{ik}$$

donde y_{ik} es el parámetro de color medidos o calculados i para el animal k , GM_i el efecto del genotipo, $cov pH_i$ es la covariable pH y e_{ik} el error.

Si bien el pH fue incluido como covariable en los modelos, podría llegar a estar influido de algún modo por estos genes. Por lo tanto, se evaluó esta posible asociación utilizando un modelo similar a los utilizados en los caracteres de crecimiento, con separación de medias de Bonferroni ($P < 0,05$):

$$pH_{ik} = \mu + GM_i + e_{ik}$$

donde GM_i es el efecto del genotipo y e_{ik} el error.

