



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

“Evaluación de la administración de glicerol en ganado de engorda 24 h antes del sacrificio en relación a su efecto con algunos indicadores bioquímicos de estrés fisiológico y de estrés oxidativo”

MARIANA HUERTA JIMÉNEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: "Evaluación de la administración de glicerol en ganado de engorda 24 h antes del sacrificio en relación a su efecto con algunos indicadores bioquímicos de estrés fisiológico y de estrés oxidativo", realizada por el alumno: Mariana Huerta Jiménez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

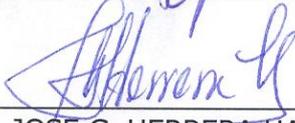
CONSEJERO

  
DRA. MARÍA ESTHER ORTEGA CERRILLA

ASESOR

  
DRA. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR

  
DR. JOSE G. HERRERA HARO

ASESOR

  
DR. JORGE R. KAWAS GARZA

ASESOR

  
DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESOR

  
DR. EUSEBIO ORTEGA JIMÉNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2015

“HOY EN DÍA, SON NUESTROS SENTIDOS QUIENES NOS HACEN VIAJEROS, NO NUESTRA MENTE. Y POR ESO, EL SECRETO DEL ARTE DE VIAJAR ESTÁ EN SABER ABRIRSE A LAS SENSACIONES ANTES QUE A LA REFLEXIÓN. EL VIAJE ES, SOBRE TODO, UNA AVENTURA SENSUAL Y SENTIMENTAL.”

*Javier Martínez Reverte. La aventura de viajar.*

*Girona, Catalunya, Agosto del 2014.*

*“Las cosas pasan porque así nos ayuda a progresar... y ningún evento pasa por casualidad”*

*Vitale M.*

## **DEDICATORIA**

A mi hermoso y viejo roble... **Javier Francisco Huerta Ramírez<sup>†</sup>**, mi Padre.

A mi mamá:

**Elizabeth Jiménez Trejo**

Por todo el amor, apoyo, comprensión y ser mi soporte de vida

A mis hermanos:

**Mónica Aida y José Francisco**

Por todo el amor, apoyo, momentos compartidos y palabras de aliento

A mis sobrinos:

Natalia por todos los momentos de felicidad y para su hermanit@ que

esperamos con tanto amor

**CON TODO MI CARIÑO Y ADMIRACIÓN**

**MAY**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número (103565) para realizar mis estudios de Doctorado en el programa Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

A la Institución y a todo el personal del Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mis estudios de Posgrado.

A la Línea Prioritaria de Investigación LPI-7: Inocuidad y Calidad Agroalimentaria del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por aportar los recursos financieros para realizar la presente investigación.

A la Dra. María Esther Ortega Cerrilla por todas sus enseñanzas, formación en el área de investigación y toda la libertad para tomar mis decisiones en la realización de mis objetivos y metas durante el Doctorado. Agradezco toda la confianza y amistad.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez, por guiarme en la investigación del área de Biología Molecular y ejemplo de disciplina. Gracias por todas las enseñanzas.

Al Dr. José G. Herrera Haro, por todas las sugerencias para la realización de la investigación, revisión del manuscrito y gran ejemplo de entusiasmo por la vida.

Al Dr. Jorge R Kawas Garza, por toda la dinámica de trabajo transmitida y apoyo para la realización de la presente investigación. Muchas gracias por toda la confianza.

Al Dr. David Hernández Sánchez, por todo su apoyo, amistad y sugerencias para mejorar la investigación.

Al Dr. Eusebio Ortega Jiménez por toda su disponibilidad para la revisión del manuscrito y sugerencias para mejorar la investigación.

A la Dra. Magda Crosby, por todo el apoyo, disponibilidad en el laboratorio y por formar parte del Jurado Examinador.

Al Sr. Miguel Gutiérrez, Q.A. Norma Herrera y a todo su equipo de trabajo del Rancho el Hualul, Tamuín SLP por todo el apoyo recibido para realizar la Fase de Campo de la presente tesis Doctoral.

Al MVZ .Raciel Leal por todo su apoyo académico y moral. Muchas gracias por su amistad.

A todo el grupo de MNA Nutrición Animal por su amistad y todo el apoyo recibido durante mi estancia en Monterrey N.L.

A Ely, Betza, Angie, MariJo, Yola, Mirna y Lily, por todo el apoyo, las experiencias compartidas, por cada uno de todos los detalles que han marcado mi vida y por cuidar de los chiquilines. A Chabelita, Silvia y Noris por su amistad y enseñanzas en esta parte de mi vida.

A mis hermanit@s del Programa de Ganadería. Muchas gracias por todos los momentos de risas, trabajo, experiencias compartidas y amistad.

A todos mis amig@s del Programa de Ganadería y del Programa de Fitopatología. Muchas gracias por todos los momentos compartidos.

A toda la comunidad del Programa de Ganadería. Muchas gracias por todo su apoyo.

A todos los compañeros y Doctores que tuve la oportunidad de conocer durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A todo el grupo IRTA Catalunya, España por recibirme para mi estancia doctoral, gracias por formar parte de una de las metas cumplidas en mi formación en la investigación. Y con mucho cariño para mis amigos y jóvenes investigadores extranjeros –Brazil, España, Portugal, Italia y México- con los que tuve la oportunidad de compartir esta gran experiencia.

A Manu gracias por todo el apoyo.

<b>CONTENIDO</b>	<b>pags</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>3 OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>3</b>
<b>4 HIPÓTESIS .....</b>	<b>3</b>
<b>5 REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<i>5.1 GENERALIDADES Y PROPIEDADES FÍSICAS DEL GLICEROL.....</i>	<i>4</i>
<i>5.2 METABOLISMO ENERGÉTICO EN LOS RUMIANTES Y EFECTO DEL GLICEROL.....</i>	<i>6</i>
<i>5.3 SUPLEMENTACIÓN CON GLICEROL EN LA PRODUCCIÓN DE BOVINOS EN CORRAL .....</i>	<i>9</i>
<i>5.4 INDICADORES BIOQUÍMICOS QUE PERMITEN LA EVALUACIÓN DEL ESTRÉS .....</i>	<i>12</i>
<i>5.4.1 ESTRÉS FISIOLÓGICO .....</i>	<i>12</i>
<i>5.4.2 Parámetros para medir estrés fisiológico.....</i>	<i>15</i>
<i>5.4.3 Estrés oxidativo.....</i>	<i>17</i>
<b>5.5 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>20</b>

<b>CAPITULO II .....</b>	<b>24</b>
<b>6. TITULO: “EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE GLICEROL EN ENGORDA DE NOVILLOS 24 H ANTES DEL SACRIFICIO Y SU EFECTO CON ALGUNOS INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS FISIOLÓGICO Y OXIDATIVO” .....</b>	<b>24</b>
<b>6.1 RESUMEN .....</b>	<b>24</b>
<b>6.2 ABSTRACT.....</b>	<b>26</b>
<b>6.3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>6.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
6.4.1 Fase de campo.....	29
6.4.2 Tratamientos .....	30
6.4.3 Toma de muestras.....	30
6.4.4 Fase de laboratorio.....	31
6.4.5 Análisis estadístico.....	34
<b>6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
6.5.1 Parámetros para medir estrés fisiológico.....	35
6.5.2 Parámetros indicadores de estrés oxidativo.....	41
6.5.3 Estrés oxidativo y vida de anaquel .....	43
<b>6.6 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>6.7 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>47</b>

**CAPÍTULO III.....50**

**7 TÍTULO: “GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS EN LAS  
CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA CARNE EN GANADO DE CARNE” ...50**

**7.1 RESUMEN .....50**

**7.2 ABSTRACT .....51**

**7.3 INTRODUCCIÓN .....52**

*7.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE LA CARNE .....53*

*7.5 MARCADORES MOLECULARES .....56*

*7.6 GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS CON CARACTERÍSTICAS DE LA CALIDAD DE LA CARNE*

*BOVINA .....59*

*7.6.1 Calpaína.....59*

*7.6.2 Leptina .....61*

*7.6.3 Tioglobulina (TG5).....62*

*7.6.4 Miostatina .....63*

**7.7 CONCLUSIONES .....64**

**7.8 LITERATURA CITADA .....65**

<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>72</b>
<b>8. TITULO: “DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL GEN CALPASTAÍNA (CAST) Y TIROGLOBULINA (TG5) EN GANADO BOVINO (BOS TAURUS X BOS INDICUS) DE UNA ENGORDA COMERCIAL DEL MUNICIPIO DE TAMUÍN, SLP, MÉXICO” .....</b>	<b>72</b>
<b>8.1 RESUMEN .....</b>	<b>72</b>
<b>8.2 ABSTRACT .....</b>	<b>73</b>
<b>8.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>74</b>
<b>8.4 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>76</b>
<b>8.5 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>76</b>
<b>8.6 HIPÓTESIS .....</b>	<b>76</b>
<b>8.7 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
8.7.1 Lugar de realización de la investigación.....	77
8.7.2 Toma de muestras .....	77
8.7.3 Fase de laboratorio.....	77
<b>8.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>8.10 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del glicerol dependiendo de su pureza. (Adaptada de Schröder y Südekum, 1999).....	6
Cuadro 2. Indicadores de estrés agudo en bovinos, que permiten evaluar el bienestar animal durante el manejo.....	16
Cuadro 3. Biomarcadores de estrés agudo y rango biológico normal para bovinos. ....	17
Cuadro 4. Media y Error Estándar (EEM) de los parámetros indicadores de estrés fisiológico por efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio. ....	40
Cuadro 5. Media y Error Estándar (EEM) de los parámetros indicadores de estrés oxidativo en muestras de sangre por efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio. ...	42
Cuadro 6. Media y Error Estándar (EEM) del efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio de los parámetros FRAP, TBARS, pH y textura para evaluar la vida de anaquel a los 7,14, 21 y 28 d.....	46
Cuadro 7. Componentes del kit Thermo Scientific Fusión Sangre PCR Directa. ....	78
Cuadro 8. Protocolo de reacción para extracción de DNA por PCR Directa. ....	80
Cuadro 9. Iniciadores CAST y TG5 usados en esta investigación.....	81
Cuadro 10. Datos de la programación en el termociclador.....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del glicerol (Blieck <i>et al.</i> , 2005).....	5
Figura 2. Equipo de laboratorio de Biología Molecular: A) Cámaras de electroforesis, B) Termociclador, C) Transiluminador de luz UV.....	79
Figura 3. Ensamble y edición con el programa Vector NT Suite 8.0. ....	83
Figura 4. <b>Secuencias homologas del BLAST.</b> ....	83
Figura 5. Carriles: 1 y 6) Marcador 100-pb (Fermentas <sup>TM</sup> ); Carriles 2, 3, 8-14) Amplificación del gen Tiroglobulina (TG5) en muestras de sangre provenientes de bovinos de engorda (Bos taurus x Bos indicus); Carriles 4, 5 7 y 15) Amplificación del gen calpastatina (CAST) en muestras de sangre provenientes de bovinos de engorda (Bos taurus x Bos indicus).....	84

**“Evaluación de la administración de glicerol en ganado de engorda 24 h antes del sacrificio en relación a su efecto con algunos indicadores bioquímicos de estrés fisiológico y de estrés oxidativo”**

**Mariana Huerta Jiménez, D. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2015**

**RESUMEN**

La administración de fuentes de energía antes del sacrificio puede tener efecto sobre algunos indicadores fisiológicos manteniendo la homeostasis durante la exposición inevitable de estrés por el manejo. El objetivo de esta investigación fue la evaluación de los niveles basales de marcadores bioquímicos indicadores de estrés fisiológico en novillos de engorda próximos al sacrificio. Se eligieron al azar 50 novillos cruza (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Se evaluaron dos tratamientos (T1= 25) administrando 600 ml de glicerol 24 h antes del sacrificio y (T0= 25) sin glicerol. Se colectaron muestras de sangre de la vena yugular para evaluar los niveles basales de indicadores de estrés y 24 h después de aplicar los tratamientos y muestras de carne para observar los cambios de estrés oxidativo en vida de anaquel. El diseño experimental fue DCA, los datos se analizaron por PROC MIXED de SAS, la diferencia entre medias por la prueba de Tukey. En el análisis de los biomarcadores de estrés fisiológicos reportados como indicadores de estrés agudo, se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos y por tiempo para las variables PROT ( $P = 0.0005$ ) y LACT ( $P = 0.0004$ ), por tiempo para UREA ( $P < 0.05$ ) y por tratamiento para LDH ( $P = 0.021$ ). Los biomarcadores de estrés oxidativo indicaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tiempos de muestreo para las variables FRAP ( $P = 0.021$ ) y GSH ( $P = 0.006$ ). Los indicadores FRAP y TBARS en la carne mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) por tiempos de vida de anaquel. Se concluye que la administración de glicerol no modifica la homeostasis del ganado ni causa cambios significativos en la vida de anaquel de la carne.

La terneza y el marmoleo son características poligénicas, indicadoras de calidad en la carne bovina. Algunos de los genes relacionado con la terneza en la carne son la calpastatina (CAST) en el cual se han identificado SNP asociados significativamente con variabilidad en la terneza de la carne bovina y el gen de la tiroglobulina (TG5) en el cual se ha identificado un polimorfismo asociado a la deposición de grasa intramuscular. Se determinó la presencia de estos dos marcadores en ganado bovino procedente de una engorda comercial de producción de carne con exigencias de calidad suprema. Se obtuvieron muestras de sangre de 400 bovinos próximos al sacrificio, las cuales fueron procesadas por PCR Directa utilizando los iniciadores CAST (AF159246) y TG5 (M35823). Los productos de amplificación esperados 495 pb (CAST) y 545 pb (TG5), se corroboraron en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio, purificados por la técnica de PEPSIs-97 y enviados a secuenciar. Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa Vector NT Suite 8.0 para obtener las secuencias consenso, las cuales fueron comparadas con la base de datos del NCBI con las secuencias homologas del BLAST. Los resultados de esta investigación fueron que se corroboraron los fragmentos tanto para el gen CAST y TG5 con los iniciadores utilizados y las secuencias consenso tuvieron una máxima identidad del 85 y 84 % para el gen CAST y para el TG5 una máxima identidad del 99 y 98 %. Se concluye que el uso de las herramientas de la genómica permite identificar la expresión de un gen de carácter productivo.

**PALABARAS CLAVE:** Glicerol, Bienestar animal, Calidad de la canal, Rumiantes, Calpastatina, Tiroglobulina, SNP, Terneza, Marmoleo.

## **"Evaluation of glycerol administration in beef cattle 24 h before slaughter in relation to its effect with some biochemical markers of physiological stress and oxidative stress"**

**Mariana Huerta Jiménez, D. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2015**

### **ABSTRACT**

The administration of energy sources before slaughter can have an effect on some physiological markers maintaining homeostasis during the inevitable stress exposure by handling the animals before and during slaughter. The objective of this research was to assess the basal levels of some biochemical and physiological markers of stress in steers before slaughter. Fifty crossbreed steers were randomly assigned to two treatments (T1 = 25), where animals were given 600 ml of glycerol orally, administered 24 h before slaughter, and (T0 = 25), control animals without glycerol. Blood samples were collected from the jugular vein in all animals before giving glycerol, in order to measure the basal levels of stress indicators, and 24 h after and evaluated meat to observe the changes of oxidative stress. The experimental design was completely random, the data were analyzed by PROC MIXED, and means by the Tukey test. The results of the markers of physiological stress showed differences ( $P < 0.05$ ) between treatments and time for PROT ( $P = 0.0005$ ) and LACT ( $P = 0.0004$ ), variables, time for urea ( $P < 0.05$ ) variable and treatment to LDH ( $P = 0.021$ ). Biomarkers of oxidative stress main effects indicate differences ( $P < 0.05$ ) between sampling times for FRAP ( $P = 0.021$ ) and GSH ( $P = 0.006$ ). The FRAP and meat TBARS indicators showed differences ( $P < 0.05$ ) by time shelf life. It is concluded that the administration of glycerol as an energy supplement 24 h before slaughter did not affect the homeostasis of livestock or cause significant differences in meat shelf life.

Marbling and tenderness are polygenic and quality indicator of beef meat characteristics. Some of the related genes in meat tenderness are the calpastatin gene (CAST) in which have been identified SNP some of which have been associated with significant variability in tenderness, and thyroglobulin gene (TG5) in which it has been identified a polymorphism associated with the deposition of intramuscular fat in cattle. The objective of this research was to identify the presence of these two markers in beef meat from animals of a commercial feedlot dedicated to the production of meat with supreme quality requirements. Four hundred animals were sampled before slaughter, and the blood obtained was processed by the polymerase chain reaction Direct using the primers CAST (AF159246) and TG5 (M35823). The expected products of 495 bp larger preview (CAST) and 545 bp (TG5), were confirmed in gel agarose 1% with ethidium bromide, and the purified technique pepsis-97, and sent to a laboratory for sequencing. Sequences were assembled and edited with the Vector NT Suite 8.0 software for the consensus sequences and compared with the database of the NCBI with homologous sequences BLAST. The results corroborate the fragments expected for both CAST and TG5 gene by primers reported in AF159246 and M35823, respectively. The consensus sequences showed a maximal identity of 85 and 84% for the CAST gene compared to sequences in BLAST. For TG5 the maximal identity was 99 and 98%. It is concluded that the use of genomic tools help to identify the expression of a gene which codifies for a productive characteristic.

**KEYWORDS:** Glycerol, Animal Welfare, Carcass Quality, Markers of Stress, Ruminants, Calpastatin, Thyroglobulin, SNP, Marbling, Tenderness.

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUCCIÓN

El uso del glicerol o glicerina en la alimentación animal, básicamente en los rumiantes, no es algo novedoso. Debido a su alta disponibilidad por la industria del biodiesel y a que puede utilizarse como suplemento o remplazo de otras fuentes energéticas como el maíz y la cebada ha tomado de nuevo gran interés durante esta última década. Las investigaciones realizadas, indican que el potencial del glicerol en la alimentación de los animales depende de varios factores, entre los que se mencionan: el tipo de dieta base en la que se incorpore (dietas altas en granos vs dietas altas en fibra), el nivel de inclusión (< 15 % de la MS total) y el grado de pureza (definida como aquella con altos contenidos de glicerol y bajo concentración de metanol y sales).

Con la expansión de la industria de los biocombustibles, el glicerol o glicerina cruda como subproducto en la producción de biodiesel, se convierte en una alternativa para la alimentación del ganado ya que posee características nutricionales de gran interés (Donkin, 2008). Se ha reportado que tiene propiedades gluconeogénicas incorporándose en el metabolismo de la glucosa por diferentes vías al igual que otros precursores gluconeogénicos, sintetizando glucosa vía porta en hígado o riñones (Wang *et al.*, 2009).

El glicerol también puede sufrir una rápida fermentación en el ambiente ruminal, sugiriendo que el glicerol puede mejorar o mantener los parámetros de degradación, así como también incrementando los ácidos grasos volátiles que contribuyen a la producción de glucosa, siendo el propionato como el de mayor síntesis cuando se alimenta con glicerol (Drackley, 2008, Kijora *et al.*, 1998). Otras investigaciones han enfocado el uso del glicerol con fines terapéuticos como en el tratamiento de problemas de cetosis en vacas y ovejas, obteniendo éxito en el tratamiento. En cerdos se ha reportado que el uso del 5 % de glicerol como fuente de energía de remplazo en la dieta no modifica el consumo de alimento ni los

cambios de la canal, posterior al sacrificio (Della Casa *et al.*, 2009). En otra investigación realizada por (Seneviratne *et al.*, 2011) reportan que la inclusión del 10 % de glicerol en la dieta como fuente de energía administrada por un periodo de 0 - 28 días no mostró ningún cambio en el consumo de alimento diario, ni en la ganancia diaria de peso, así como conversión alimenticia. En aves, el 7.5 % de glicerol empleado en la dieta no afecta el peso corporal, ni se observan cambios en la conversión alimenticia, o en la producción y/o en el peso del huevo (Swiatkiewicz and Koreleski 2009; Yalcin *et al.*, 2010). Otros investigadores reportan que la adición de glicerol en la dieta de aves no causa ningún efecto significativo al evaluar parámetros como el rendimiento de la canal, el contenido magro, el peso y cortes magros. Así como tampoco cambios en la composición intramuscular de los ácidos grasos (Della Casa *et al.*, 2009; Terré *et al.*, 2011). Por su parte (Della Casa *et al.*, 2009) observaron que dosis mayores de 7.5 % de glicerol aumentan la concentración de ácido octadecenoico y una baja tendencia en la concentración de los niveles de ácido palmítico, esteárico y linoléico.

La inclusión de glicerol en la dieta de los animales puede aumentar el aporte energético, sustituyendo a otros alimentos como los granos, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la administración de glicerol vía oral en rumiantes expuestos a estrés por prácticas deficientes de manejo en el transporte, embarque y desembarque de ganado antes del sacrificio, que generalmente son etapas que generan altos niveles de estrés en el bovino que a su vez demandan energía para contrarrestar la pérdida de la homeostasis y características en la canal y calidad de la carne que causan pérdidas económicas relacionadas con decomisos por hematomas, mortalidad animal y alteración de las características organolépticas de la carne (Gallo y Tadich, 2005).

## **2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la suplementación de glicerol a una dosis de 600 mL animal<sup>-1</sup> vía oral 24 h previas al sacrificio en ganado de engorda, como medida preventiva para disminuir los efectos del estrés durante el manejo antes del sacrificio y su relación con la presencia de cortes oscuros y vida de anaquel de la carne.

## **3 OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar los niveles basales de marcadores bioquímicos indicadores de estrés fisiológico y estrés oxidativo en novillos de engorda próximos al sacrificio.

Evaluar el estrés oxidativo y vida de anaquel en la carne de animales a los que se les proporcionaron 600 ml de glicerol antes del sacrificio

## **4 HIPÓTESIS**

El empleo de fuentes de energía, como el glicerol 24 h previas al sacrificio, disminuirá el estrés fisiológico y oxidativo, así como la presencia de cortes oscuros, por lo que mejorará la calidad de la carne.

## 5 REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1 Generalidades y propiedades físicas del glicerol

El glicerol es el más simple de los alcoholes y es conocido como propano 1, 2, 3-triol de acuerdo por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry 1993. [www.iupac.org](http://www.iupac.org)). También se le conoce comercialmente como glicerina 1, 2, 3-propanotriol, trihidroxipropano, glicerol o alcohol glicérico. El glicerol es un líquido viscoso, inodoro, incoloro y de un sabor dulce almíbar. Contiene tres grupos hidroxilo hidrófilos que son responsables de su característica higroscópica y su solubilidad en agua (Silva *et al.*, 2014). Su punto de ebullición es de 294 °C, se puede disolver en agua o en alcohol, pero no en aceite. El glicerol es un componente principal de los acilglicéridos, se encuentra en la grasa animal, aceite vegetal o en el petróleo crudo. También se deriva del jabón o de la producción de biodiesel. Desde 2800 A.C., fue aislado por calentamiento de la grasa mezclada con cenizas para producir jabón (Hunt, 1999), pero se considera que fue descubierto en 1779 por el farmacéutico suizo Scheele, quién aisló el compuesto al calentar una mezcla de Litargirio (PbO) con aceite de oliva. En 1811, el químico francés Chevrel le da el nombre de glicerina, patentando el método industrial para su obtención a partir del jabón por reacción del material graso con cal y material alcalino (Gesslein, 1999). Este producto se emplea como solvente, plastificante, edulcorante, suavizante, en la producción de nitroglicerina, cosméticos, perfumería, lubricantes, licores, tintas, anticongelantes, producción de resinas y más recientemente como alimento energético para los animales. En la Figura 1., se presenta la estructura molecular del glicerol, compuesto con hidroxilos.

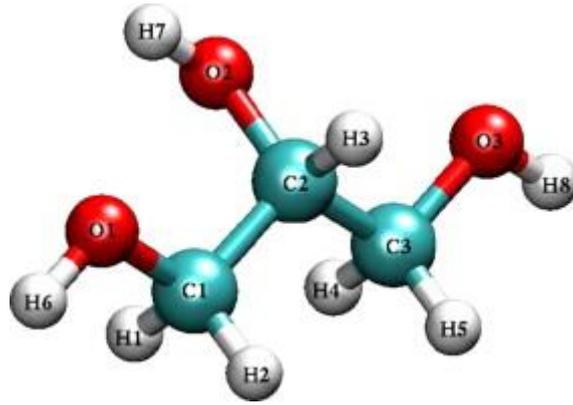


Figura 1. Estructura molecular del glicerol (Blieck *et al.*, 2005).

El glicerol también contiene metanol y sales minerales. El metanol es utilizado en la fabricación de biodiesel y fuentes de baja pureza de glicerol pueden contener grandes cantidades de metanol. Shröder y Südekum (1999), analizaron una fuente de glicerol de baja pureza que contenía 26.7 % de la MS como metanol. El metanol puede ser detoxificado en el rumen pero altas concentraciones pueden ser dañinas para el animal, por lo que concluyeron que el consumo de glicerol procedente de fuentes poco puras puede ser tóxico. El metanol puede ser incluso dañino para los terneros y animales monogástricos como el cerdo. Se reporta que niveles mayores a 150 ppm de metanol, pueden causar efectos negativos en la alimentación de los rumiantes (Drackley, 2008).

Otro compuesto importante del glicerol, son las sales, resultado de la neutralización al momento de ocurrir la transesterificación (Drackley, 2008). En el estudio realizado por (DeFrain *et al.*, 2004) reportaron que la glicerina puede contener hasta un 11.5 % de sales, principalmente de potasio y fosfatos. Sin embargo también se han reportado fuentes con menor contenido de sales de potasio, como la glicerina examinada por (Schröder and Südekum, 1999) oscilando entre un 2.2 % y un 2.3 % de la MS y el fósforo entre 1.05% y 2.36 %. La purificación del glicerol (Cuadro 1) puede ser variable dependiendo de la planta y los procesos utilizados (Hippen *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Composición del glicerol dependiendo de su pureza. (Adaptada de Schröder y Südekum, 1999).

PUREZA DEL GLICEROL			
	Baja	Media	Alta
Humedad %	26.8	1.11	2.5
COMPOSICIÓN DE LA MATERIA SECA <sup>1</sup> %			
Glicerol	63.3	85.3	99.8
Extracto Etéreo	0.71	0.44	NA <sup>2</sup>
Fósforo	1.05	2.36	NA <sup>2</sup>
Potasio	2.20	2.33	NA <sup>2</sup>
Sodio	0.11	0.09	NA <sup>2</sup>
Plomo	0.0003	0.0002	NA <sup>2</sup>
Metanol	26.7	0.04	NA <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Las concentraciones de cadmio, mercurio y arsénico estuvieron por debajo de los límites detectables.

<sup>2</sup>NA= no analizados

## 5.2 Metabolismo energético en los rumiantes y efecto del glicerol

La mayoría de los carbohidratos presentes en la dieta, tanto estructurales como no estructurales, a través de la fermentación ruminal son convertidos en ácidos grasos volátiles, ya sean lipogénicos (acetato y butirato) o gluconeogénicos (propionato) (Quintero *et al.*, 2011). De estos ácidos, el propiónico en su gran mayoría es transformado en glucosa en el hígado a través del proceso de gluconeogénesis. Quintero *et al.*, (2011), reportaron que la tasa de producción de ácido propiónico está relacionada directamente con el consumo de almidón, capaz de sobrepasar la digestión microbiana y ser absorbido directamente como glucosa en el

duodeno. De esta forma la glucosa que se absorbe directamente en el intestino constituye otra fuente de energía para el rumiante, pero la misma no es suficiente para suplir las necesidades energéticas. Razón por la que toma gran importancia la gluconeogénesis hepática principalmente realizada a partir de precursores como el ácido propiónico, aminoácidos, lactato y glicerol proveniente tanto de la movilización del tejido adiposo durante la lipólisis, así como de los triglicéridos presentes en la dieta (Quintero *et al.*, 2011).

En el rumen el metabolismo del glicerol principalmente se realiza por bacterias del grupo *Selenomonas ruminantium* (Daza, 2009). La forma práctica de suministrar glicerol a los animales es mezclándolo con otros ingredientes, como el pasto fresco, heno, ensilado y subproductos agroindustriales como harinas, salvados, bloques multinutricionales, entre otros.

Daza (2009) y Trabue *et al.* (2007) describen tres rutas metabólicas que sigue el glicerol al ser suministrado a los animales y ser asimilado. Distribuyendo el porcentaje como se describe a continuación: 13 % del glicerol atraviesa la pared ruminal, se absorbe en el intestino y es eliminado, 44 % es fermentado en el rumen por acción de las bacterias ruminales principalmente del grupo *Selenomonas ruminantium* y 43 % se absorbe directamente. Indicando con esta distribución que el glicerol tiene una digestibilidad mayor del 80%. Daza (2009), reporta que el glicerol ofrecido de diferentes formas varía en cuanto a su tiempo de asimilación, encontrando que dosis de 200 ml se absorben en máximo dos horas y dosis de 300 ml en un periodo no mayor a cuatro horas.

En otras investigaciones donde se han realizado pruebas *in situ* con animales canulados a nivel de rumen, utilizando del 15 al 20 % de glicerol como parte del volumen total del contenido ruminal, los resultados han mostrado que el glicerol desaparece del rumen dentro de las 6 h posteriores a su administración y que la tasa de desaparición está directamente relacionada con la cantidad de glicerol adicionado y del tiempo de incubación (Bergner *et al.*,

1995). Por su parte Kijora *et al.* (1998) al utilizar novillos y proporcionar 200 g de glicerol divididos en dos tomas diarias vía cánula ruminal, observaron que las concentraciones de glicerol en el plasma sanguíneo fueron mayores que en novillos canulados que no fueron suplementados (0.06 mM vs 0.19 mM), reportando además que el 85 % del glicerol se absorbió dentro de las dos horas posteriores a su administración. Kristensen y Raun (2007) indican que solo el 10 % de glicerol fue recuperado vía porta, cuando se utilizó una dosis de 925 g d<sup>-1</sup> por vaca con cánula ruminal, siendo probablemente utilizado en hígado para producir glucosa.

La fermentación ruminal del glicerol podría contribuir como un producto con capacidad gluconeogénica por ser precursor principalmente del ácido propiónico en el rumen. Resultados obtenidos por Trabue *et al.* (2007) indican que el 80 % del glicerol es metabolizado por los microorganismos del rumen después de 24 h de incubación *in vitro*.

Por su parte Ferraro *et al.* (2009) evaluaron la producción *in vitro* de gases y la fermentación ruminal. Para esto utilizaron fluido ruminal de ovejas Suffolk. El glicerol incubado fue de 320 y 640 µl. Concluyendo que la fermentación del glicerol reduce el acetato y aumenta la proporción molar de butirato.

En relación al metabolismo de los lípidos, el glicerol que es ingerido por los rumiantes como parte de los fosfolípidos contenidos en la pared celular o de los lípidos de semillas que conforman la dieta a nivel ruminal pasa por cuatro transformaciones: hidrólisis, biohidrogenación, síntesis y saponificación de ácidos grasos. La primera transformación de los lípidos en rumen es la hidrólisis, que consiste en romper el enlace entre el glicerol y los ácidos grasos por enzimas lipolíticas microbianas, dando origen a glicerol y tres ácidos grasos; el glicerol es fermentado rápidamente en rumen para producir ácidos grasos volátiles (AGV) (Wattiaux, 1995). Posteriormente el proceso de biohidrogenación, comprende la saturación de dichos ácidos. Diferentes tipos de bacterias y protozoos del rumen poseen la

capacidad de hidrogenar los ácidos grasos insaturados que llegan a éste, siendo la primera fase de este proceso iniciada por *Butyrivibrio fibrisolvens* (Baldwin, 1983). La biohidrogenación conlleva varias fases bioquímicas. Muchas veces la biohidrogenación no es completa quedando productos intermedios, de los cuales algunos tienen funciones metabólicas en los animales; dentro de estos productos se encuentran el ácido linoléico conjugado, 18:3 ácido linolénico, 18:2 ácido linoléico, trans-11 18:1 ácido vacénico, cis 18:1 ácido oleico, 18:0 ácido esteárico. El porcentaje de hidrogenación está en relación con la cantidad de ácidos grasos poli insaturados que lleguen al rumen y del pH ruminal. A mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, menor va a ser la proporción de biohidrogenación. Cuando más bajo es el pH ruminal, mayor es la inhibición del crecimiento de las bacterias encargadas de la biohidrogenación, sobre todo del grupo que realiza el último paso (de 18:1 a 18:0), quedando de esa forma mayor cantidad de metabolitos intermedios (Quintero *et al.*, 2011).

La importancia del metabolismo del glicerol es que podría ser una importante fuente para desencadenar procesos de hidrogenación ruminal, sintetizando ácidos grasos como el ruménico (CLA cis-9, trans-11 C 18:2) a partir del ácido linoléico (cis-9, cis-12 C18:2) y el ácido vaccénico (trans-11 C18:1), principales ácidos grasos componentes del ácido linoléico conjugado (CLA), dada su concentración mayoritaria en la grasa de la leche y carne (Giraldo, 2008).

### 5.3 *Suplementación con glicerol en la producción de bovinos en corral*

El glicerol como subproducto del biodiesel y como ingrediente en inclusión del 10 % y hasta el 15 % de la materia seca total de la dieta, ha mostrado resultados importantes como una potencial fuente de energía para los rumiantes (Drouillard, 2012; Schroder y Südekum,

2009; Versemann, Wiegand, y Kerley, 2008). Los cambios en la canal y calidad de la carne de animales suplementados con glicerol es el resultado del aumento de la disponibilidad de compuestos gluconeogénicos que se utilizan como precursores para la síntesis de ácidos grasos que favorecen el marmoleo de la carne (Evans, Wiegand, y Kerley, 2008; Versemann *et al.*, 2008). También por la capacidad de que el glicerol puede ser convertido a propionato en el rumen o absorbido por el epiteo ruminal y por lo tanto convertido en glucosa (Krehbiel, 2008) que a su vez es la principal fuente de carbono utilizada para la síntesis de ácidos grasos (Schoonmaker, Fluharty, y Loerch, 2004).

Existe pocas investigaciones que nos aporten resultados de la suplementación de glicerol en la ganadería, por lo que su efecto en el comportamiento productivo de los animales no parece muy claro. Por ejemplo, se ha observado que la suplementación diaria del 5 % a 10 % de glicerol en el total de la dieta, que para una vaca representa de 500 a 1000 ml<sup>-1</sup> animal<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, tiene un efecto adecuado en la adaptación microbiana, lo que permite considerar adecuada la administración de dosis de glicerol dentro de los rangos de dosificación mencionados. Por su parte Schroeder *et al.* (2007), reportan que una dieta con el 10 % de glicerol no mostró efecto en el consumo de alimento ni presentó alteraciones en la eficiencia ruminal en vacas lecheras, de igual forma no se han observado diferencias en el consumo de alimento cuando el glicerol es mezclado con alimentos concentrados, ya que se obtiene una mejor conservación del producto, gracias a que puede inhibir la proliferación de hongos (Groesbeck, 2007). También se ha reportado que dosis de 200 a 500 ml de glicerol día<sup>-1</sup> en vacas recién paridas contribuye a evitar la cetosis (Daza 2009). DeFrain *et al* (2004), observaron que la administración de glicerol a vacas en transición disminuye el consumo de materia seca antes del parto, pero no después. En otras investigaciones (Bergner *et al.*, 1995; Kijora *et al*, 1998; Kristensen y Raun, 2007), en las que se suplementó a los animales glicerol por vía oral, se encontraron pocos beneficios de la suplementación alimenticia en los niveles

de glucosa en sangre. Probablemente lo anterior puede deberse al hecho de que la mayoría del glicerol consumido en la dieta es fermentado en el rumen a propionato y butirato. Sin embargo, cuando se administran volúmenes mayores en forma de bolos, una proporción de glicerol puede absorberse directamente a través del epitelio del rumen, por lo que el glicerol absorbido en este compartimento puede convertirse en glucosa en el hígado (Kristensen y Raun, 2007).

En vacas lactantes suplementadas con concentrados, el glicerol reemplaza al maíz en un 15 % de la materia seca, sin efectos negativos en la producción. A medida que se aumenta el glicerol en la dieta de 1 al 15 % de la materia seca total, se disminuye la concentración de urea (amoníaco) en la leche y en el rumen, por incremento de la microflora bacteriana al desdoblarse más rápidamente, produciéndose mayor cantidad de proteína microbiana, resultando mayor producción de leche y carne. Esto indica que el glicerol efectivamente posee una tasa de fermentación ruminal mayor que el grano seco y molido de maíz (Donkin, 2008). En otra investigación realizada por Daza (2009), la cantidad de glicerol ofrecida a novillos estabulados de 280 kg a 480 kg, en un sistema de engorda intensiva, oscilaba entre 200 ml y 600 ml<sup>-1</sup>animal<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, mezclado con los demás ingredientes que hacen parte de la dieta, encontrando una aceptación adecuada por parte del ganado y un reemplazo de la melaza en un 100% por el glicerol.

La energía requerida para la actividad muscular en un animal vivo se obtiene del glucógeno presente en el músculo. En un animal sano y descansado, el nivel de glucógeno de sus músculos es alto, una vez sacrificado el animal, este glucógeno se convierte en ácido láctico y el músculo y la canal se vuelven rígidos (*rigor mortis*). El ácido láctico es necesario para producir carne suave, de buen sabor, calidad y color, pero si el animal está estresado antes y durante el sacrificio, se consume todo el glucógeno y se reduce el nivel de ácido láctico que se desarrolla en la carne luego del sacrificio. Este estado de estrés, puede tener

efectos adversos en la calidad de la carne, en canales de ganado bovino u ovino se presenta una condición conocida como DFD (carne oscura, firme y seca, por sus siglas en inglés) y ocasionalmente en cerdos y aves, al poco tiempo del sacrificio. La carne de la canal es más oscura y más seca de lo normal y tiene una textura más firme. Esta condición se presenta cuando el glucógeno muscular se consume durante el transporte y el manejo en el período antes del sacrificio (*ante mortem*), ocasionando que exista una mínima producción de ácido láctico después del sacrificio, dando como resultado carnes DFD. Esta carne es de una calidad inferior y tiene una menor vida útil por sus niveles de pH altos (6.4 – 6.8). Indicando que una carne con la condición DFD implica que la canal procedió de un animal estresado, lesionado o enfermo antes del sacrificio.

Conocer el efecto de la suplementación de glicerol para mantener los niveles adecuados de glucógeno en sangre de los animales próximos al sacrificio y que posiblemente serán sujetos a estrés ya sea por condiciones de manejo o de transporte, es un área que ha sido poco investigada, en base a la literatura revisada, es importante conocer si por sus características gluconeogénicas, la suplementación de glicerol 24 h antes del sacrificio puede afectar el estrés fisiológico y el estrés oxidativo en el animal y en la carne después del sacrificio.

#### *5.4 Indicadores bioquímicos que permiten la evaluación del estrés*

##### *5.4.1 Estrés fisiológico*

La respuesta al estrés es muy variable y dependiente de la capacidad de cada animal para responder a este efecto. Resulta evidente que si el agente estresante actúa por largo tiempo el efecto encontrado será mayor, sea alta o baja la capacidad individual de respuesta de cada animal. Cuando el ganado es llevado al corral de engorda, surgen una serie de cambios a los cuales los animales se van adaptando, uno de los más importantes es el tipo de alimentación, de una dieta alta en forraje a una alta en concentrado, además de la introducción

a nuevas condiciones de manejo durante el periodo de engorda que en promedio es de 90 a 120 días. Como se había mencionado anteriormente, la capacidad de los animales para responder a situaciones de estrés puede mejorar y con ello minimizar las pérdidas en el rendimiento de las canales, dependiendo de la remoción de glucógeno que requiera para responder a situaciones de estrés, lo cual ya se ha determinado proporcionando niveles adecuados de energía en la dieta y con la adición de electrolitos previo al sacrificio de los animales.

En cuanto a factores relacionados con la producción, se tiene información de este proceso, sin embargo, en lo que se refiere a parámetros relacionados con estrés fisiológico (constante remoción de glucógeno) y estrés oxidativo (lipoperoxidación debido al aumento de radicales libres), existe poca información que nos indique si existe alguna interacción metabólica con la vida de anaquel y la calidad de la carne. Existen al menos dos métodos para cuantificar el estrés en los animales: el análisis de su conducta y las mediciones de diferentes parámetros (Shaw y Tume, 1992). Entre las respuestas fisiológicas de adaptación sobresale el aumento en la secreción de catecolaminas, lo que da lugar a un aumento del gasto cardiaco, consumo de oxígeno y temperatura corporal; disminución del pH, acumulación de ácido láctico y aumento de la gluconeogénesis, con lo que se incrementa el metabolismo basal. Moberg (1996) menciona que estos cambios fisiológicos asociados al estrés se relacionan con cambios en las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, ácidos grasos volátiles ( $\beta$ -hidroxibutirato), volumen globular aglomerado (VGA), y algunos indicadores enzimáticos como la creatinfosfoquinasa (CK). Todo esto conduce a pérdida de peso y a una canal de mala calidad (Cárdenas *et al.*, 1987). Otros factores que alteran el perfil metabólico y ocasionan desajustes ácido-base y repercuten sobre la calidad de la carne, son la genética del animal, el estrés social, la estimulación eléctrica, el estrés calórico, y la privación de agua y alimento (Dantzer, 1982; McGlone *et al.*, 1993; Shaw y Trout, 1995; Bradshaw *et al.*, 1996;

Chevillon, 2000). Estas variables se utilizan como indicadores bioquímicos del estrés, especialmente cuando se están comparando valores previos y posteriores a un determinado manejo que se cree induce el estrés, siempre que las comparaciones se hagan entre animales de características generales semejantes (edad, raza, sistema de crianza). Sin embargo, como lo menciona Warriss (1990) también en las canales de animales destinados a producir carne se pueden observar y medir las consecuencias del estrés.

Inmediatamente después del sacrificio, comienzan en el músculo esquelético una serie de procesos metabólicos anaeróbicos, debido a la interrupción de la circulación sanguínea. En esa condición, se acumula ácido láctico como producto del metabolismo y consecuentemente desciende el pH muscular. Este proceso de acidificación requiere aproximadamente 15 a 36 h. El pH final influye directamente en la conservación y en la transformación de la carne a productos con valor agregado o también conocidos como productos con valor tecnológico de la carne, un valor apropiado de pH oscila en el rango de 5.4 a 5.8 (Warriss, 2000). Por esta razón, es relevante la magnitud de las reservas de glucógeno en el músculo, que a su vez dependerán de la dieta, del trato y el nivel de estrés de los animales antes del sacrificio (Muir *et al.*, 1998; Warriss, 2000). En la investigación realizada por Immonen *et al.* (2000), observaron que en dietas con baja y alta energía la disminución de glucógeno es mejor tolerada por animales que reciben una mayor cantidad de energía para contrarrestar el estrés inducido por altas temperaturas y por el transporte, reportando que la respuesta de los animales sometidos a diferentes tipos de dieta mostró una diferencia en las lecturas de pH de 0.65 unidades, siendo los valores de pH de la carne de  $5.69 \pm 0.03$  para los novillos alimentados con una dieta alta en energía y  $5.93 \pm 0.03$  para los alimentados con una baja (Immonen *et al.*, 2000).

Existen problemas asociados con el manejo de los animales como la mezcla de animales desconocidos, el cambio de alimentación que se da durante el periodo de engorda, el

estrés que genera el transporte previo al desembarque en los corrales de engorda. Cuando los operadores o responsables de movilizar y/o transportar al ganado que ha llegado al peso adecuado de su periodo de engorda para ser llevados al rastro, realizan un mal manejo, todo el trabajo que se realizó en el tiempo que permanecieron los animales en los corrales de engorda podría reflejarse en pérdidas económicas por la presentación de carne con hematomas, pérdida de peso y una carne que no tendrá las características adecuadas para ser transformada en alimentos con un valor agregado. Otro punto importante para disminuir la presentación de canales oscuras (DFD) debido al incremento de pH durante el proceso *postmortem*, es la adecuada inclusión de niveles de energía proporcionados en el corral de engorda para disminuir los efectos del desgaste excesivo de glucógeno muscular generado por mal manejo. Immonen *et. al.*, (2000) sugieren la inclusión de energía dos semanas previas al sacrificio. Siendo esta una medida para prevenir la presentación de canales con pH elevado, especialmente si los animales son transportados por períodos prolongados.

#### 5.4.2 Parámetros para medir estrés fisiológico

Estos parámetros evalúan el estado de salud de un individuo y / o su estado nutricional. Se basan principalmente en la determinación e interpretación de la concentración de ciertos elementos sanguíneos que representan las principales vías metabólicas (Kaneko *et. al.*, 1997). Otros autores (Knowles y Warriss, 2006) describen a estos indicadores como marcadores bioquímicos, que al obtener información de sus niveles en sangre, permiten evaluar el bienestar del ganado (Cuadro 2). Entre los que se encuentran el cortisol (COR), la concentración de albúmina plasmática, urea, globulina, proteínas totales, la actividad de la creatinfosfoquinasa (CK),  $\beta$ -Hidroxi butirato (BHT), haptoglobina, fibrinógeno, glucosa (GLU), volumen celular acumulado o hematocrito (VGA), proteínas totales en suero (PTS), conteo de leucocitos y la proporción de ácidos grasos libres (AGL) entre otros (Ammann *et*

al., 2006; Buckham-Sporer *et al.*, 2008). En el Cuadro 3 se presentan los rangos biológicos normales para bovinos, de las variables fisiológicas utilizadas como biomarcadores de estrés agudo (Knowles y Warriss, 2006; Romero *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Indicadores de estrés agudo en bovinos, que permiten evaluar el bienestar animal durante el manejo.

INDICADOR	ÍNDICES
MARCADORES BIOQUÍMICOS	<u>Índices de privación de alimento:</u> incremento de ácidos grasos no esterificados, $\beta$ -hidroxibutirato (BHT), urea, disminución de glucosa.
	<u>Indicadores de deshidratación y/o hemoconcentración:</u> incremento de la osmolalidad, VGA, proteína total, albúmina.
	<u>Índices de esfuerzo físico:</u> incremento de CK, lactato, lactato deshidrogenasa
	<u>Índices de miedo/excitación y la liberación de catecolaminas:</u> aumento VGA, glucosa, urea, BHT.
	<u>Indicadores de ayuno:</u> peso vivo, BHT, Ac. Grasos libres, glucógeno muscular.

Fuente: Adaptado de Knowles y Warriss 2006.

Cuadro 3. Biomarcadores de estrés agudo y rango biológico normal para bovinos.

<b>BIOMARCADOR</b>	<b>RANGO NORMAL</b>	<b>TIPO DE INDICADOR</b>
Cortisol (ngml <sup>-1</sup> )	0-20	Neuroendocrino primario
Glucosa (mmol L <sup>-1</sup> )	3.0-4.4	Miedo o excitación
β-Hidroxiacetato (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.02-0.46	Miedo, excitación y ayuno
Ácidos Grasos Libres (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.06	Ayuno
Creatinfosfoquinasa (U·L <sup>-1</sup> )	35-280	Esfuerzo físico
Proteínas Plasmáticas (g·dl <sup>-1</sup> )	6.8	Deshidratación, Hemoconcentración
Hematocrito (%)	24-46	Miedo o excitación
Temperatura Corporal (°C )	37.7-38.5	Hipertermia o hipotermia

(Knowles y Warriss, 2006; Romero *et al.*, 2011).

#### 5.4.3 Estrés oxidativo

Los radicales libres (RL) cumplen una importante función en diversos procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (REDOX) esenciales para la vida. Las concentraciones bajas de RL son benéficas e incluso indispensables; sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular. Los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante (AO) protector que limita la acción nociva de los RL, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas. La generación de RL y la defensa de AO se encuentran en equilibrio; al romperse este equilibrio se crea una situación llamada estrés oxidativo, que puede producir daño celular, desencadenar trastornos fisiológicos y favorecer la presentación de procesos patológicos. Se ha reportado

también que algunos factores como la edad de los animales afecta los tejidos biológicos debido a los cambios que ocurren en los tejidos a través del tiempo (Bokov *et al.*, 2004). De ahí que se ha definido al envejecimiento como la disminución de las funciones fisiológicas debido al estrés oxidativo en las células o tejidos (Beckman y Ames, 1998). Este proceso de envejecimiento es impulsado por los radicales libres de oxígeno, de aniones superóxido ( $O_2 \bullet^-$ ), radical hidroxilo ( $OH \bullet$ ), peróxidos y aldehídos que se producen durante el metabolismo basal del organismo (Harman, 1956). Debido a esta circunstancia, los músculos esqueléticos pueden ser vulnerables al estrés oxidativo debido a un alto nivel de oxígeno metabólico ( $O_2$ ) (Carmeli *et al.*, 2002). Halliwell (1994) reportó que la edad del animal induce el daño oxidativo a macromoléculas celulares, como los lípidos, proteínas y ADN., en los músculos.

Otro factor, es la oxidación lipídica en la carne almacenada, siendo el principal factor relacionado con la pérdida de la frescura y calidad de la carne, ya que deriva características indeseables tales como el mal sabor, producción de toxinas, y cambios en el color (Gray *et al.*, 1996). También los procesos de carbonilación, fragmentación o polimerización de las proteínas se ha reportado que disminuye la capacidad de retención de agua y la calidad sensorial de la carne, principalmente la jugosidad y ternura (Xiong, 2000).

Como consecuencia de que la presentación del daño oxidativo puede atribuirse a una deficiencia de sustancias protectoras, queda establecida una estrecha relación entre el estrés oxidativo y el estado nutricional. El uso de estrategias nutricionales para mejorar la calidad de la carne juega un papel importante debido a su efecto regulador en los procesos biológicos del músculo que se reflejan en la calidad de la carne (Andersen *et al.*, 2005). Los antioxidantes se pueden incorporar en el músculo a través de la dieta. Por ejemplo la suplementación de dietas con vitamina E ha demostrado ser eficaz en la reducción de la oxidación de lípidos, mejorando el color de la carne y la obtención de productos cárnicos con mayor vida de anaquel, ya que los antioxidantes incorporados dentro de las membranas celulares son más

eficientes que los añadidos después del sacrificio para preservar la carne de daño oxidativo (Kerry *et al.*, 1999). Por otra parte las enzimas antioxidantes constituyen una barrera intracelular contra los radicales libres. Su actividad *in vivo* depende de diversos factores como la lesión celular, el estrés y procesos inflamatorios (Descalzo y Sancho 2008). En los músculos esqueléticos las más importantes son la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Después del sacrificio de los animales, todas las células están en proceso de anoxia y agotamiento de los nutrientes, por lo que las investigaciones sobre la actividad antioxidante de la carne suelen ser inconsistentes en sus resultados (Descalzo y Sancho, 2008).

## 5.5 LITERATURA CITADA

Andersen HJ, Oksbjerg N, Young JF and Therkildsen M (2005). Feeding and meat quality – A future approach. *Meat Science* 70: 543-554.

Beckman KB and Ames BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78: 547-581.

Bergner H, Kijora C, Ceresnakova Z, Szakacs J. (1995). In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde* 48: 245-256.

Blieck J, Affouard F, Bordat P, Lerbret A, Descamps M. (2005). Molecular dynamics simulations of glycerol glass-forming liquid. *Chemical Physics* 317:253-257.

Bokov A, Chaudhuri A and Richardson A (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 125: 811-826.

Buckham-Sporer KR, Xiao L, Tempelman RJ, Burton JL, Earley B and Crowe MA. (2008). Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls. *Veterinary Immunology Immunopathology* 121: 300-320.

Carmeli E, Cleman R and Reznick AZ (2002). The biochemistry of aging muscle. *Experimental Gerontology* 37: 477-489.

Chevillon P. (2000). O bem-estar dos suínos durante o pré-abate e no atordoamento. *Anais 1º Conferencia Virtual Internacional sobre Qualidade de Carne Suína*. 16 de Novembro a 16 de Dezembro. Brasil. Concordia, SC: 17-20.

Daza RA. (2009). Evaluación productiva y económica de una ceba intensiva establecida aprovechando subproductos agroindustriales y establecida con infraestructuras de bajo costo, en la región Caribe colombiana. *Barranquilla, Colombia*: 25-28

DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF and Jardon PW. (2004). Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. *Journal Dairy Science* (7): 4195–4206.

Della Casa G, Bochicchio D, Faeti V, Marchetto G, Poletti E, Rossi A, Garavaldi A, Panciroli A, Brogna N. (2009). Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. *Meat Science* 81: 238-244.

Descalzo AM y Sancho AM (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science* 79: 423-436.

Donkin SS. (2008). Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. *R. Bras. Zootec*: 37.

Drackley K. (2008). Opportunities for Glycerol Use in Dairy Diets. En: *Four-State Dairy Nutrition and Management Conference*. Dubuque, Iowa. pp. 113-118.

Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. (2009). In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology* 154: 112-118.

Gallo, C., Tadich, N. (2005). Land transport of cattle for slaughter: Effects on animal welfare and meat quality. *Agro-Ciencia* 21(2):37-49.

Gesslein BW. (1999). Humectants in personal care formulation: a practical guide. In: Schueller R, Romanowski P, editors. *Conditioning agents for hair and skin*. Marcel Dekker, Inc., p. 95-96.

Gray JI, Gomaa EA and Buckley DJ (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science* 43: S111-S123.

Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants. A personal view. *Nutrition Reviews* 52: 253-265.

Harman D (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11: 298-300.

Hellen, M; Peñuela, R; Uribe-Velásquez F.L; Sánchez V. A. J. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *BioSalud*, Vol. 10 no. 1: 71 – 87.

Hippen, A.R., DeFrain, J.M., and Linke, P.L. 2008. Glycerol and other energy sources for metabolism and production of transition dairy cows. 19th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. January 29 and 30.

Hunt JA. (1999). A short history of soap. *The Pharmaceutical Journal* 263 (7076): 985-989.

Immonen K, Ruusunen M, Hissa K, Puolanne E. 2000. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. *Meat Science* 55: 25-31.

Kaneko JJ. (1997). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. Academic Press, London, 1997.

Kerry JP, Buckle DJ, Morrisey PA, O'Sullivan K and Lynch PB (1999). Endogenous and exogenous and exogenous  $\alpha$ -tocopherol supplementation: effects on lipid stability

(TBARS) and warmed-over flavor (WOF) in porcine. *M. longissimus dorsi* roasts held in aerobic and vacuum packs.

Kijora C, Bergner H, Gotz KP, Bartelt J, Szakács J and Sommer A. (1998). Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. *Arch. Anim. Nutr.* 51: 341-348.

Knowles T, Warriss P. 2006. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock handling and transport*, eds. Temple Grandin. 3 ed.

Moberg GP. (1996). Stress and its measurement in domestic animals. A review of behavioural and physiological studies under field and laboratory situations. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med* 24: 179-210.

Ogborn KL. (2006). Effects of method of delivery of glycerol on performance and metabolism of dairy cows during the transition period. MS Thesis. Cornell University, Ithaca, NY.

Quintero M, Olivera M, Rosero R. (2011). Metabolismo energético en vacas durante la lactancia temprana y el efecto de la suplementación con grasa protegida. (en línea). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24 (1): 74-84. Consultado el 12 de junio 2015. Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_bovina\\_de\\_leche/produccion\\_bovina\\_leche/175-grasa\\_protegida.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/175-grasa_protegida.pdf).

Romero PHM, Uribe-Velásquez FL y Sánchez VJ. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* 10 (1): 71-87.

Schröder A and Südekum KH. (1999). Glycerol as a byproduct of biodiesel production in diets for ruminants. In *New Horizons for an Old Crop. Proceedings. 10th Int. Rapeseed Congr.* Canberra, Australia, September 26–29, Paper No. 241. N. Wratten and P. A. Salisbury.

Seneviratne RW, Beltranena E, Goonewardene LA, Zijlstra RT. (2011). Effect of crude glycerol combined with solvent-extracted or expeller-pressed canola meal on growth performance and diet nutrient digestibility of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* 170: 105-110.

Shaw FD and Tume RK. (1992). The assessment of pre-slaughter and slaughter treatment of livestock by measurement of plasma constituents. A review of recent work. *Meat Science* 32: 311-329.

Silva VO., Lopes E., Andrade EF., Sousa RV., Zangeronimo MG., Pereira, LJ. 2014. Use of biodiesel co-products (Glycerol) as alternative sources of energy in animal nutrition: a systematic review. *Archivos de Medicina Veterinaria* 46: 111-120.

Swiatkiewicz S, Koreleski J. (2009). Effect of crude glycerine level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. *Poultry Science* 88: 615-619.

Terré M, Nudda A, Casado P, Bach A. (2011). The use of glycerine in rations for light lamb during the fattening period. *Animal Feed Science and Technology* 164: 262-267.

Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen M, Reilly P. (2007). Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7043-7051.

Van de Water G, Verjans F, Geers R. 2003. The effect of short distance transport under commercial conditions on the physiology of slaughter calves; pH and colour profiles of veal. *Livestock Production Science*; 82:171-179.

Wang C, Liu Q, Huo WJ, Yang WZ, Dong KH, Huang YX, and Guo G. (2009). Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livestock Science*. 121 (1): 15–20.

Warris PD. (1990). The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. *Applied Animal Behaviour Science* 28: 171-186.

Wattiaux M. (1995). Secreción de leche por la ubre de una vaca lechera (en línea). Madison, Wiscconsin. Universidad de Wiscconsin p. 79-81. Consultado el 23 de febrero 2012. Disponible en: [http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de\\_20.es.pdf](http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_20.es.pdf).

Xiong YL (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In Decker EA, Faustman E and Lopez-Bote CJ (Eds), *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality* (pp. 85-111). New York: John Wiley and Sons. Inc.

Yalcin S, Erol H, Ozsoy B, Onbasilar I, Yalem S, Uner A. (2010). Effects of glycerol on performance, egg traits, some blood parameters and antibody production to SRBC of laying hens. *Livestock Science* 129: 129-134.

## CAPITULO II

### 6. TITULO: “Evaluación de la administración de glicerol en engorda de novillos 24 h antes del sacrificio y su efecto con algunos indicadores bioquímicos de estrés fisiológico y oxidativo”

#### 6.1 RESUMEN

El estrés agudo experimentado por los animales en el área de recepción de ganado en el rastro, puede afectar la conversión del músculo en carne. Manifestándose una respuesta fisiológica del estrés antes del sacrificio que incluye procesos de deshidratación, desequilibrio de electrolitos, balance negativo de energía, agotamiento de glucógeno en el músculo y catabolismo de proteínas y grasa. En consecuencia, los acontecimientos en el lapso de 24 y 48 h *ante mortem* son de gran importancia ya que se ha demostrado que influyen en la pérdida de peso, el rendimiento en canal, la retención de grasa intramuscular y la presentación de carnes secas, firmes y oscuras (DFD), generando pérdidas económicas importantes para el productor. La administración de fuentes de energía antes del sacrificio puede tener efecto sobre algunos indicadores fisiológicos manteniendo la homeostasis durante la exposición inevitable de estrés por el manejo de los animales antes y durante el sacrificio. Siendo el objetivo de esta investigación; la evaluación de los niveles basales de marcadores bioquímicos indicadores de estrés fisiológico en novillos de engorda próximos al sacrificio al proporcionar glicerol vía oral como fuente de energía 24 h antes del sacrificio. Se eligieron al azar 50 novillos cruza Cebú, Pardo Suizo y Simental de una engorda comercial en etapa de finalización y próximos al sacrificio. Se proporcionaron dos tratamientos (T1= 25) administrando 600 ml de glicerol 24 h antes del sacrificio y (T0= 25) sin glicerol. Se colectaron muestras de sangre de la vena yugular de los 50 novillos para evaluar los niveles basales de indicadores de estrés y 24 h después de aplicar los tratamientos. Los indicadores bioquímicos de estrés fisiológico y estrés oxidativo evaluados en suero bovino fueron: hematocrito (VGA), lactato deshidrogenasa (LDH), lactato (LAC), cortisol (COR), glucosa (GLU),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHT), creatinfosfoquinasa (CK), proteínas totales (PT), albumina (ALBU), urea (N), ácidos grasos libres no esterificados (NEFA), actividad antioxidante (FRAP), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y reacción de la Glutación Peroxidasa (GSH-Px). Las variables evaluadas en carne para observar los cambios de estrés oxidativo en vida de anaquel fueron TBARS, FRAP, pH y textura. El diseño experimental fue completamente al azar, los datos se analizaron usando el PROC MIXED de SAS (2002), la diferencia entre medias se realizó por la prueba de Tukey. En el análisis de los biomarcadores de estrés fisiológicos reportados

como indicativos de estrés agudo mostró que no hubo diferencias ( $P>0.05$ ) para las medias de los tratamientos T0 y T1 para las variables CORT, VGA, GLU, NEFA, BHT, ALB y CK; pero sí entre tratamientos y por tiempo para las variables PROT ( $P=0.0005$ ) y LACT ( $P=0.0004$ ), por tiempo para la variable UREA ( $P < 0.05$ ) y por tratamiento para LDH ( $P=0.021$ ). Los biomarcadores de estrés oxidativo por efectos principales indicaron diferencias ( $P<0.05$ ) entre tiempos de muestreo para las variables FRAP ( $P = 0.021$ ) y GSH ( $P = 0.006$ ). Los indicadores FRAP y TBARS en la carne muestreada en esta investigación, no mostraron diferencias ( $P>0.05$ ) entre tratamientos pero si por tiempos de vida de anaquel para ambas variables FRAP y TBARS ( $P<0.05$ ), siendo un comportamiento normal por efecto de la refrigeración. Para los indicadores de calidad pH mostro diferencia por tiempo ( $P=0.0002$ ) y por textura no mostraron efecto ( $P>0.05$ ), los resultados se encontraron dentro de los rangos óptimos para mantener una calidad tecnológica de la carne., es decir algún proceso tecnológico como maduración, picado, congelación y cocción, Se concluye que la administración de glicerol como suplemento energético 24 h antes del sacrificio no modifica la homeostasis del ganado ni causa cambios significativos en la vida de anaquel de la carne.

**PALABRAS CLAVE:** Glicerol, Bienestar animal, Calidad de la canal, Marcadores bioquímicos del estrés, Rumiantes.

**TITLE:** "Evaluation of glycerol administration in beef cattle 24 h before slaughter and their effect on some biochemical markers of physiological stress and oxidative stress."

## **6.2 ABSTRACT**

The acute stress experienced by animals in the reception area of cattle on the trail, can affect the conversion of muscle to meat. The physiological response to stress before slaughter processes including dehydration, electrolyte imbalance, negative energy balance, depletion of muscle glycogen and catabolism of protein and fat. Consequently, the events in the 24 to 48 h before slaughter are of great importance since it has been shown to influence weight loss, carcass yield, retention of intramuscular fat and presentation of dried, firm and dark meat (DFD), generating significant economic losses to the producer. The administration of energy sources before slaughter can have an effect on some physiological markers maintaining homeostasis during the inevitable stress exposure by handling the animals before and during slaughter. The objective of this research was to assess the basal levels of some biochemical and physiological markers of stress in steers before slaughter. Fifty crossbred steers were randomly assigned to two treatments (T1 = 25), where animals were given 600 ml of glycerol orally, administered 24 h before slaughter, and (T0 = 25), control animals without glycerol. Blood samples were collected from the jugular vein in all animals before giving glycerol, in order to measure the basal levels of stress indicators, and 24 h after. Biochemical markers of physiological stress and oxidative stress were evaluated in bovine serum hematocrit (VGA), lactate dehydrogenase (LDH), lactate (LAC), cortisol (COR), glucose (GLU),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHT), creatine (CK), total protein (TP), albumin (ALBU), urea (N), non-esterified free fatty acids (NEFA), antioxidant activity (FRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione peroxidase reaction (GSH-Px). The variables evaluated in meat to observe the changes of oxidative stress were TBARS, FRAP, pH and texture. The experimental design was completely random, the data were analyzed by PROC MIXED, and means by the Tukey test. The results of the markers of physiological stress showed no differences ( $P > 0.05$ ) for any treatment for CORT, VGA, GLU, NEFA, BHT, ALB and CK variables; but there were differences ( $P < 0.05$ ) between treatments and time for PROT ( $P = 0.0005$ ) and LACT ( $P = 0.0004$ ), variables, time for urea ( $P < 0.05$ ) variable and treatment to LDH ( $P = 0.021$ ). Biomarkers of oxidative stress main effects indicate differences ( $P < 0.05$ ) between sampling times for FRAP ( $P = 0.021$ ) and GSH ( $P = 0.006$ ). There were sampling time differences ( $P = 0.0002$ ) for pH, but not for texture ( $P > 0.05$ ). The results showed that

the meat in both treatments had a good quality. It is concluded that the administration of glycerol as an energy supplement 24 h before slaughter did not affect the homeostasis of livestock or cause significant differences in meat shelf life.

**KEYWORDS:** Glycerol, Animal Welfare, Carcass Quality, Markers of Stress, Ruminants.

### 6.3 INTRODUCCIÓN

El glicerol ha tenido una amplia gama de aplicaciones en alimentos para humanos y en la industria farmacéutica, se ha sido utilizado para la producción de polímeros sintéticos, cosméticos y productos de cuidado personal. El glicerol es un líquido viscoso que se ha empleado en bebidas como agente espesante y en la alimentación humana, con propiedades humectantes (SDA, 1990). Contiene en promedio 60 % de sacarosa, atributo que lo hace atractivo para la adición en alimentos para animales y para mejorar el texturizado y control de alimentos en polvo.

Se ha reportado que tiene propiedades gluconeogénicas incorporándose en el metabolismo de la glucosa (Wang *et al.*, 2009). Otras investigaciones han enfocado el uso del glicerol con fines terapéuticos como en el tratamiento de problemas de cetosis en vacas y ovejas y se ha reportado que el uso del 5 al 10 % de glicerol como fuente de energía de reemplazo en la dieta no modifica el consumo de alimento ni las características de la canal (Della Casa *et al.*, 2009).

Al transportar el ganado se conjugan numerosos factores de perturbación, como son: la exposición a un nuevo ambiente, la agrupación con animales desconocidos, el hacinamiento, el ruido, los movimientos del vehículo, el hambre y la sed (Dantzer y Morméde, 1984). La distancia en el transporte varía de pocos a varios cientos de kilómetros. Durante la carga, transporte y descarga de los animales, es común que se presenten problemas de traumatismos, pérdida de peso, hematomas e inclusive la muerte (Amtmann *et al.*, 2006); sin embargo, un buen manejo en estas etapas puede contribuir considerablemente a aminorar la incidencia de estos problemas. El manejo de los bovinos previo al sacrificio provoca estrés, presentándose cambios de tipo metabólico y hormonal en el animal vivo, induciendo efectos adversos en la calidad de la carne, específicamente en el pH, color, textura y la capacidad de retención de

agua (Van de Water *et al*, 2003). Dentro de los cambios de tipo metabólico y las respuestas fisiológicas de adaptación sobresale el aumento en la secreción de catecolaminas, lo que da lugar a un aumento del gasto cardíaco, consumo de oxígeno, temperatura corporal, disminución del pH, acumulación de ácido láctico y aumento de la gluconeogénesis, con lo que se incrementa el metabolismo basal (Moberg, 1996; Warriss, 1990). Otros agentes que pueden alterar el perfil metabólico y ocasionar desajustes ácido-base y repercutir sobre la calidad de la carne son la genética del animal, el estrés social, la estimulación eléctrica, el estrés calórico y la privación de agua y alimento (Chevillon, 2000). Todos estos factores causan disminución de peso, que se traduce en menor cantidad de carne producida, lesiones como hematomas de diverso grado que implican recortes y disminución del precio o categoría de las canales. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar si la administración de glicerol 24 h *ante mortem* puede aumentar el aporte energético para contrarrestar el estrés por prácticas de manejo como el transporte, embarque y desembarque de ganado previo al sacrificio, manteniendo los indicadores de estrés fisiológico y estrés oxidativo dentro de los rangos normales para mantener la homeostasis en el animal y a su vez evaluar algunos cambios en la carne como pH, textura y estrés oxidativo, hasta los 28 días de vida de anaquel.

## **6.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *6.4.1 Fase de campo*

La investigación se realizó en las instalaciones de una engorda comercial, localizada en el Rancho el Hualul en Tamuin, San Luis Potosí, México, a una altitud de 20 msnm ubicado a 22° 00' 25''N 98°47'19''O, con una temperatura media de 16 ° y 53 % de humedad relativa. Se eligieron al azar 50 novillos en etapa de finalización de las razas cruzas Cebú, Pardo Suizo, Simmental con un peso promedio de 450 kg, los cuales se encontraban en corral de engorda intensivo con 90 y 102 días en promedio y 24 horas próximos al sacrificio.

#### 6.4.2 *Tratamientos*

Con el propósito de evaluar el efecto de la administración de glicerol con una pureza del 85 %, 24 h antes de sacrificio se midió el comportamiento de los parámetros indicadores de estrés fisiológico y estrés oxidativo. Se proporcionaron dos tratamientos al grupo de los 50 bovinos de corral de engorda: T0= Sin glicerol (25 animales) y T1= Con glicerol (25 animales). La aplicación del tratamiento T1 se administró vía oral con una jeringa dosificadora Syrman, administrando 600 mL animal<sup>-1</sup> asignados a este tratamiento. El manejo se realizó en una prensa de sujeción para ganado con ayuda del MVZ encargado del manejo del corral de engorda.

#### 6.4.3 *Toma de muestras*

Para realizar las determinaciones en sangre de los parámetros indicadoras de estrés fisiológico y estrés oxidativo, se tomaron muestras de los animales asignados a los dos tratamientos antes (parámetros basales) de la administración del T1 y al momento del degollé en el rastro (24 h después de la administración de glicerol).

Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular empleando tubos vacutainer de 5 mL con anticoagulante EDTA para las determinaciones de: hematocrito (VGA), lactato deshidrogenasa (LDH), lactato (LAC), cortisol (COR), glucosa (GLU),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHT), proteínas totales (PT), albumina (ALBU), urea (N), ácidos libres no esterificados (NEFA) y tubos de 10 mL con EDTA para colectar muestras de sangre para evaluar la actividad antioxidante (FRAP), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y reacción de la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Para determinar creatinfosfoquinasa (CK) la muestra de sangre se colectó en tubos vacutainer de 5 mL sin anticoagulante.

Cuando los animales se transportaron al rastro para el sacrificio, se cargaron a las 5:30 am a una temperatura ambiente de 15°C y 90 % de humedad, en condiciones de manejo adecuado evitando el uso del bastón eléctrico. El tipo de transporte fue en jaulas de transporte de dos ejes, con una capacidad de 20 novillos en un contenedor de doble piso, los cuales fueron transportados durante 30 minutos y colocados en el corral de recepción en donde permanecieron un tiempo promedio de 4 y 5 horas antes de que iniciara el proceso de sacrificio.

#### *6.4.4 Fase de laboratorio*

Después de colectadas las muestras de sangre, se refrigeraron a 4 °C y se llevaron al laboratorio de nutrición animal de la engorda comercial para centrifugarse a 3,500 rpm por 10 min para obtener el suero (Power Spin <sup>TM</sup> Mx Centrifuge), posteriormente se distribuyeron las muestras en tubos eppendorf de 2 mL para obtener submuestras para cada una de las determinaciones. Las muestras se almacenaron -40°C hasta su procesamiento. Excepto las muestras para la determinación del VGA ya que fueron procesadas en el laboratorio de la granja comercial utilizando la técnica de microcentrifugación (Micro-Hematocrit Centrifuge Modelo KHT-400) empleando tubos capilares (Fisher brand/ Micro-Hematocrit cat. No: 22-362-574).

Los sueros obtenidos fueron transportados en condiciones de refrigeración al laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) para realizar las determinaciones de los elementos bajo el esquema del perfil nutricional hepático: GLU, LDH, LAC, BHT, PT, ALBU, N, NEFA y CK, usando un espectrofotómetro de absorción atómica (marca Perkin Elmer). Las determinaciones de COR se realizaron en el laboratorio de Reproducción de la misma Facultad, utilizando la técnica de ELISA (Enzimo Inmuno Análisis) a partir de

anticuerpos de conejo y como antígeno peroxidasa de rábano picante, las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 410 nm.

Los sueros para evaluar FRAP, TBARS y GSH-Px, se procesaron en el laboratorio de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ-UNAM. Todas las muestras se procesaron por duplicado.

La determinación de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) se refiere a la capacidad antioxidante global de los agentes exógenos solubles en agua como la vitamina C, la cual se realizó conforme al protocolo (Benzie y Strain 1999, 1996) utilizando el cromógeno TPTZ y el estándar antioxidante TROLOX, la lectura se realizó con un espectrofotómetro a 593 nm.

La prueba de reacción del ácido tiobarbiturico conocida como TBARS tiene como fundamento la producción de malonaldehído (MDA), producto secundario de la oxidación de ácidos grasos de tres o más dobles ligaduras. El MDA reacciona con el ácido tiobarbiturico (TBA) en un medio ácido y a 90 °C, el producto genera un color rosa que absorbe luz a 532-535 nm. Por esta razón la reacción a prueba de TBA mide realmente el total de TBARS presentes en una muestra. El valor de TBARS se compara con un estándar de MDA producido a partir de 1, 1, 3, 3, tetraethoxypropane (TEP) (Botsoglov *et al.*, 1994; Gutteridge 1975).

La actividad de glutatión peroxidasa, presente en una muestra biológica, se determina mediante el acoplamiento de reacciones en el que se monitoriza por unidad de tiempo y en condiciones definidas, la concentración de NADPH a 340 nm (Lawrence y Burk, 1976):



En la primera reacción la glutatión peroxidasa (GPx) presente en la muestra cataliza la transformación de GSH (estado reducido) a GSSG (estado oxidado) utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como segundo sustrato. En la segunda reacción el GSSG es restaurado a GSH por acción de la glutatión reductasa (GRe) con el consumo de NADPH. De este modo la desaparición de NADPH es proporcional a la concentración de GSSG formado, dependiente de GPx de la muestra.

Se debe tener en cuenta que la actividad enzimática se mide en función de la cantidad de sustrato consumido o producto generado por unidad de tiempo en condiciones específicas (Hohmadel, 2002). Una forma de expresar la actividad es la unidad (U) el cual es definido como  $\mu\text{mol min}^{-1}$ , sin embargo esta medida no es aceptada por el Sistema Internacional que establece el Katal (Kat) y que se define como  $\text{mol seg}^{-1}$ .

Finalizado el sacrificio de los animales, las canales fueron almacenadas en cámaras frigoríficas a una temperatura de 0°C, después de 24 h fueron transportadas éstas en camiones con termo refrigeración y llevadas a la sala de deshuese de la planta en donde se realizó la segunda parte del muestreo que consistió en coleccionar 500 g del músculo *Longissimus dorsi* sin hueso a nivel de la 10<sup>a</sup> costilla y 13<sup>a</sup> costilla de 20 novillos (T0= 10 sin glicerol y 10 canales correspondientes al T1= con glicerol). Debido a que se coleccionaron las muestras durante la línea de proceso de producción, solo pudieron tomarse el número de muestras antes mencionado.

Una vez coleccionadas las muestras de músculo éstas fueron envasadas al alto vacío asignando los días de evaluación de vida de anaquel (7, 14, 21 y 28 d) y conservadas en cámara de refrigeración a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ de la UNAM, para realizar las determinaciones de FRAP y TBARS, de acuerdo a los diferentes tiempos de maduración. De las piezas

completas se colectaron submuestras de 5 cm, que fueron conservadas en papel aluminio a una temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas.

A estas muestras también se les realizó análisis de pH y textura, las que fueron realizadas en el laboratorio de Nutrición Animal, del Posgrado de Ganadería en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. La determinación de pH se realizó con el método de homogenizado de la carne y la lectura se hizo con un potenciómetro Pelican 1400 Case, Orion Research Model SA 210 (AOAC, 2000).

Para el análisis de textura (TPA) se tomaron de cada muestra de carne tres segmentos con un sacabocados. Estas muestras fueron extraídas sin fascia y sin tejido graso. La extracción con el sacabocado fue en dirección perpendicular a las fibras musculares. El proceso se realizó usando la cuchilla de Warner-Bratzler y con el analizador de textura TA-XT2 (Texture Technologies Corp, Scardale, NY), empleando una velocidad de  $5\text{ mm s}^{-1}$  en el avance y retroceso de la cuchilla, reportándose la fuerza máxima en  $\text{kg cm}^{-2}$ . Siguiendo con el protocolo del texturómetro TA.TX plus (Stable Micro Systems), la compresión fue sobre un eje paralelo a las fibras musculares (Guerrero *et al.*, 2002).

#### 6.4.5 Análisis estadístico

Las variables evaluadas en suero sanguíneo fueron analizadas bajo un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas usando el PROC MIXED de SAS (2002. System for Windows 9.0). El modelo para los análisis incluyó los efectos principales de tratamiento (T0= sin glicerol y T1= con glicerol), tiempo (1=antes del tratamiento y 2= 24 h después de administrar el glicerol) y la interacción tratamiento\*tiempo. Para las variables evaluadas en carne (FRAP, TBARS, pH y Textura), el procedimiento fue similar. El modelo incluyó los efectos principales de tratamiento, tiempo (vida de anaquel 7, 14, 21 y 28 d) e interacción tratamiento\*tiempo.

La diferencia entre medias se realizó por la prueba de Tukey. La estructura de covarianza apropiada para cada variable fue componente de simetría (CS).

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + \delta_{j(i)} + P_l + (TP)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable de respuesta en observación k, repetición j, tratamiento i.,

$\mu$  = Media general

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento (i= 1,2)

$\delta_{j(i)}$  = Error aleatorio asociado con el j-ésimo animal (sujeto) dentro del i-ésimo tratamiento

$P_l$  = Efecto del l-ésimo periodo (l=1,2...4)

$(TP)_{ik}$  = Interacción tratamiento por periodo

$\varepsilon_{ijkl}$  = Error aleatorio asociado con k-ésima medida repetida dentro de j-ésimo animal.

## 6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.5.1 *Parámetros para medir estrés fisiológico*

En el análisis de los biomarcadores de estrés fisiológicos reportados como indicativos de estrés agudo no se encontraron diferencia ( $P > 0.05$ ) para las medias de los tratamientos T0 y T1 en CORT, VGA, GLU, NEFA, BHT, ALB y CK; pero si para UREA, PROT, LDH, y LACT.

La diferencia de los efectos principales fueron diferentes ( $P < 0.05$ ) por tratamiento en LDH ( $P = 0.021$ ), en PROT por tratamiento ( $P = 0.0005$ ) y tiempo ( $P < 0.05$ ) y de igual forma en LACT por tratamiento y tiempos ( $P = 0.001$ ) y ( $P = 0.0004$ ) respectivamente, en donde se

consideraron los niveles basales de las concentraciones sanguíneas de los indicadores de estrés fisiológico como (Tiempo 1= niveles basales) y (Tiempo 2 = 24 h) después de la administración de glicerol), se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) en VGA, UREA, NEFA BHT, PROT, CK Y LACT y para GLU ( $P < 0.05$ ). La interacción tratamiento\* tiempo fue significativo para GLU ( $P = 0.011$ ) (Cuadro 4).

Los resultados obtenidos en la concentración de los biomarcadores determinados en esta investigación se encuentran dentro de los rangos normales para bovinos, de acuerdo a lo reportado por (Knowles y Warriss 2006; Romero *et al.*, 2011), para CORT ( $T_0 = 2.416$  y  $T_1 = 2.944$  ng ml<sup>-1</sup>), VGA ( $T_0 = 37.810$  y  $T_1 = 38.020$  %), NEFA ( $T_0 = 0.339$  y  $T_1 = 0.318$  mmol L<sup>-1</sup>), BHT ( $T_0$  y  $T_1 = 0.334$  mmol L<sup>-1</sup>). Pero no para GLU ( $T_0 = 1.588$  y  $T_1 = 1.663$  mmol L<sup>-1</sup>) encontrándose por debajo de (3.0 – 4.4 mmol L<sup>-1</sup>) considerados normales. De acuerdo con Shaw y Tume (1992) y Cunningham (1999) períodos cortos de ayuno producen hipoglucemia que actúa como factor liberador de catecolaminas, promoviendo la glucólisis y gluconeogénesis. Lo cual estaría explicando los niveles bajos de glucosa encontrados bajo las condiciones de esta investigación. Comparando estos resultados con lo reportado por Tadich *et al.*, (2005) en animales transportados por un periodo de 16 h, los cuales presentaron diferencias de acuerdo al tiempo de ayuno posterior, encontrándose una disminución significativa de glucosa en aquellos animales con ayunos de 24 h en relación a otros tiempos de ayuno, se puede explicar que los niveles bajos de glucosa también pueden verse afectados por el transporte previo de los animales y las condiciones ambientales y físicas en las que estos se mantienen en los corrales de espera antes del sacrificio. De igual forma Cockram y Corley (1991) también reportaron que los bovinos que permanecen mayor tiempo en los corrales de recepción antes del sacrificio presentaron mayores alteraciones en las variables sanguíneas. Así mismo Parker *et al.* (2007), evaluaron un grupo de novillos *Bos indicus* suplementados con glicerol, reportando que la concentración de glucosa en plasma fue 30%

mayor ( $P < 0.001$ ) que en el grupo control (confinado sin alimento y agua), y 14% mayor ( $P = 0.05$ ) que el ganado transportado durante 48 horas. Lo cual resulto contradictorio a esta investigación ya que en ambos tratamientos los niveles de glucosa se reportaron menores a las concentraciones normales de glucosa sanguínea en bovinos.

Para los indicadores PROT y CK las concentraciones observadas fueron elevadas ( $T_0 = 71.11$  y  $T_1 = 75.90$  g dl<sup>-1</sup>) ya que los niveles normales de PROT se encuentran dentro del rango de (6.8 g dl<sup>-1</sup>), debido posiblemente a deshidratación lo cual se corrobora con los resultados de las concentraciones de ALB mayores a los valores normales de referencia (2.7 – 3.7 g dl<sup>-1</sup>) ya que la albumina es un componente principal de las proteínas totales del suero y su concentración muestra el mismo tipo de cambio, lo que permite interpretar dependiendo de los niveles reportados si el efecto del cambio es debido a una deshidratación y no a un efecto de la dieta (Romero *et al.*, 2011). Sin embargo los porcentajes de VGA se encontraron dentro de los parámetros normales y no se encontraron diferencias entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Las concentraciones de CK ( $T_0 = 662.19$  y  $T_1 = 603.20$  U L<sup>-1</sup>) se mostraron elevadas ya que el rango normal es de (35 – 280 U L<sup>-1</sup>). La CK es una enzima muscular que cataliza la reacción para obtener adenosin trifosfato (ATP) a partir del adenosin difosfato (ADP) más el fosfato de creatina en la mitocondria (Averós *et al.*, 2008). El transporte es un factor extenuante; los bovinos tienen que mantener el balance y el contacto entre bovinos produce fatiga y contusiones, que afectan la permeabilidad de la membrana celular y la liberación de CK hacia el torrente sanguíneo. De igual forma, los niveles basales de CK se pueden aumentar debido al ayuno y al ejercicio, siendo mayor el incremento durante la insensibilización y sangría (Romero *et al.*, 2011). Fue evidente la diferencia de los niveles de CK entre los tiempos de evaluación ( $P < 0.05$ ) siendo mayor el incremento previo al sacrificio, debido a que esta enzima es utilizada exclusivamente por las células musculares para permitir el funcionamiento del músculo (Cornell University, 2013).

Los niveles de UREA (T0= 5.33<sup>b</sup> vs T1=5.75<sup>a</sup> mmol L<sup>-1</sup>) se encontraron por debajo de los rangos normales (7.8-24.6 mmol L<sup>-1</sup>), fueron diferentes (P<0.05) entre tratamientos y por tiempo de muestreo siendo mayores para el tratamiento con glicerol. Las concentraciones de urea plasmática son indicadores de privación de alimento o en casos crónicos asociados a problemas renales y malnutrición proteica (Romero *et al.*, 2011), cuando se encuentran por debajo de los rangos biológicos normales, sin embargo los resultados obtenidos en esta investigación, únicamente reflejan los estados de ayuno durante el embarque y transporte de los animales, pero sin ser indicadores de poner en riesgo la homeostasis de los individuos. Existen investigaciones realizadas con vacas lecheras Holstein (Donkin *et al.*, 2009) que fueron suplementadas con glicerol al 5, 10 y 15% del total de la MS de la dieta reportando diferencias significativas entre tratamientos y producción de leche y en la composición de leche se encontró que la concentración de N como urea en la leche disminuyó al aumentar la dosis de glicerol. Por su parte, De Frain *et al.* (2004) utilizando glicerol para alimentar vacas lecheras en transición como un suplemento energético más que como un ingrediente importante de la dieta base, al administrar 46 g de glicerol durante 21 d del total de la MS, reportó diferencias en el consumo de MS de las vacas que recibieron el glicerol, siendo este 17% inferior que en los animales que consumieron la dieta control, sin que la producción de leche mostrara diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto a la composición de leche, la proporción de grasa de leche y la concentración de N como urea en la leche, éstas disminuyeron a medida que se incrementó la dosis de glicerol. A su vez Ogborn (2006) utilizando también glicerol como suplemento energético y no como un ingrediente importante en la dieta para evaluar el comportamiento en vacas Holstein multíparas durante el período de transición, suplementando 504 g animal d<sup>-1</sup>, observó que el glicerol disminuyó el consumo de la MS, sin que se encontraran diferencias significativas en la producción ni composición de la leche. Estos resultados indican la importancia de la evaluación del estado energético o de la

disponibilidad de energía cuando se suplementa a los animales con sustratos glucogénicos, ya que permitirá entender el efecto benéfico que se presenta, aunque no siempre sea traducido en rendimiento de la producción. Lo que no fue evidente en la presente investigación, probablemente a los tiempos de suplementación y al rápido metabolismo del glicerol, ya que la mayoría del glicerol consumido en la dieta es fermentado en el rumen a propionato y butirato (Kristensen y Raun, 2007).

Los resultados de las concentraciones de LDH (T1= 3436.52<sup>a</sup>, T0= 2742.38<sup>b</sup>) y LAC (T1= 10.541<sup>a</sup>, T0= 7.745<sup>b</sup>) se mostraron estadísticamente diferentes entre tratamientos, permaneciendo en ambos casos concentraciones mayores para los animales que recibieron el tratamiento con glicerol. Así mismo por efecto de los efectos principales, los tratamientos fueron significativos para LDH (P=0.021) y para LAC entre tratamientos (P=0.001) y tiempos (P=0.0004). Las concentraciones de LAC y LDH están relacionados con el daño muscular, sin embargo es común que las concentraciones de estas enzimas se reporten elevadas debido a la rápida degradación de las mismas en la muestras. Por su parte Mitchell *et al.* (1988) reportaron en novillos y vaquillas de cruce *Bos indicus* y *Bos taurus* una diferencia para valores de lactato en sangre entre ganado manejado ( $3.1 \pm 1.8$  mmol L<sup>-1</sup>), transportado durante 2 h ( $4.0 \pm 2.2$  mmol L<sup>-1</sup>), y animales que no habían sido manejando o transportados ( $0.3 \pm 0.2$  mmol L<sup>-1</sup>), concluyendo que las diferentes situaciones de estrés producen respuestas fisiológicas mezcladas.

Cuadro 4. Media y Error Estándar (EEM) de los parámetros indicadores de estrés fisiológico por efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio.

VARIABLE	TRAT		EEM		TIEMPO		EEM		P > 0.05		
	0	1	0	1	1	2	1	2	TRAT	TIEMPO	TRAT * TIEMPO
CORT (ng ml <sup>-1</sup> )	2.416 <sup>a</sup>	2.944 <sup>a</sup>	0.347	0.296	2.303	3.057	0.319	0.367	0.252	0.150	0.071
VGA (%)	37.810 <sup>a</sup>	38.020 <sup>a</sup>	0.679	0.602	36.540	39.290	0.552	0.635	0.820	0.0008	0.830
GLU (mmol L <sup>-1</sup> )	1.588 <sup>a</sup>	1.663 <sup>a</sup>	0.148	0.127	1.370	1.881	0.131	0.152	0.702	0.017	0.011
UREA (mmol L <sup>-1</sup> )	5.331 <sup>b</sup>	5.754 <sup>a</sup>	0.182	0.153	4.760	6.325	0.180	0.206	0.083	<.0001	0.140
NEFA(mmol L <sup>-1</sup> )	0.339 <sup>a</sup>	0.318 <sup>a</sup>	0.023	0.212	0.238	0.419	0.018	0.020	0.515	<.0001	0.058
BHT (mmol L <sup>-1</sup> )	0.334 <sup>a</sup>	0.334 <sup>a</sup>	0.016	0.013	0.278	0.390	0.015	0.017	0.990	0.0001	0.525
PROT (g L <sup>-1</sup> )	71.117 <sup>b</sup>	75.900 <sup>a</sup>	0.953	0.839	76.240	70.777	0.789	0.909	0.0005	<.0001	0.822
ALB (g L <sup>-1</sup> )	35.636 <sup>a</sup>	35.960 <sup>a</sup>	0.293	0.252	35.500	36.096	0.259	0.299	0.410	0.150	0.617
LDH (U L <sup>-1</sup> )	2742.38 <sup>b</sup>	3436.52 <sup>a</sup>	222.60	188.10	2931.00	3247.90	210.500	241.830	0.021	0.366	0.797
CK (U L <sup>-1</sup> )	662.19 <sup>a</sup>	603.20 <sup>a</sup>	60.770	51.028	440.22	825.17	59.115	67.703	0.460	0.0003	0.113
LACT (mmol L <sup>-1</sup> )	7.745 <sup>b</sup>	10.541 <sup>a</sup>	0.602	0.526	7.709	10.577	0.507	0.585	0.001	0.0004	0.789

TRAT= Tratamiento; T0= Tratamiento sin glicerol; T1= Tratamiento con glicerol.

EEM= Error Estándar de la Media.

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma fila, señalan diferencia significativa (P< 0.05).

### 6.5.2 Parámetros indicadores de estrés oxidativo

En la presente investigación se observó que los resultados del análisis estadístico de los biomarcadores de estrés oxidativo por efectos principales indicaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tiempos de muestreo para las variables FRAP ( $P = 0.0209$ ) y GSH ( $P = 0.006$ ) (Cuadro 5). Muchas variables pueden proporcionar información sobre la condiciones de estrés del ganado. Se han realizado investigaciones en donde la evaluación relacionada con la función inmune ha permitido conocer los cambios en las poblaciones del tipo de glóbulos blancos (linfocitos y neutrófilos) en respuesta a factores de estrés, en particular la disminución relativa en los linfocitos en comparación con los neutrófilos en la salud y la susceptibilidad a las infecciones en la especie bovina (Burton *et al.*, 2005). Aunque los neutrófilos son cruciales para el control y eliminación de muchos patógenos durante la respuesta inflamatoria, se conoce que también pueden dañar los tejidos del huésped por degranulación y producir enzimas proteolíticas y especies reactivas al oxígeno (ERO). Estas ERO son importantes debido a su papel en la oxidación y su relación a los procesos patológicos. El estado antioxidante es el resultado de la interacción de elementos enzimáticos y no enzimáticos con las interacciones metabólicas sistémicas (Ghiselli *et al.*, 2000). Por otra parte, en los rumiantes la actividad de compuestos antioxidantes puede ser influenciada por la nutrición y las estaciones del año (Bernabucci *et al.*, 2002; Descalzo *et al.*, 2005; Gatellier *et al.*, 2004). Por lo tanto, en la presente investigación la medición de las tres variables indicadoras de estrés oxidativo permitió tener información que indicó que los cambios en las concentraciones de los marcadores FRAP y GSH se presentaron debido al el estrés generado por el manejo que se realizó a los animales y no por efecto de la suplementación con glicerol.

Cuadro 5. Media y Error Estándar (EEM) de los parámetros indicadores de estrés oxidativo en muestras de sangre por efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio.

VARIABLE	TRATAMIENTOS		EEM		TIEMPO		EEM		P > 0.05		
	0	1	0	1	1	2	1	2	TRAT	TIEMPO	TRAT * TIEMPO
<b>FRAP</b>	0.329 <sup>a</sup>	0.354 <sup>a</sup>	0.135	0.115	0.318	0.366	0.0123	0.0142	0.163	0.021	0.571
<b>TBARS</b>	6.599 <sup>a</sup>	9.327 <sup>a</sup>	1.1265	0.9801	9.224	6.703	0.962	1.111	0.073	0.087	0.213
<b>GSH (μmol de NADPH min<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>)</b>	3.353 <sup>a</sup>	3.1410 <sup>a</sup>	0.192	0.162	3.675	2.818	0.181	0.208	0.404	0.006	0.843

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma fila, señalan diferencia significativa (P < 0.05).

Media con literal distinta es igual a diferencia significativa entre tratamientos alfa 0.05.

### 6.5.3 Estrés oxidativo y vida de anaquel

No se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos en FRAP pero sí por tiempos ( $P < 0.05$ ) de vida de anaquel, siendo un comportamiento normal por efecto de la refrigeración. Los FRAP proporcionan información respecto a la capacidad antioxidante exógena, es decir que está influenciada por la dieta y entendiendo el concepto de vida de anaquel como el periodo donde un alimento mantiene características sensoriales y de seguridad aceptables para el consumidor, almacenado bajo condiciones óptimas establecidas (Anzueto, 2012), el incremento de FRAP de acuerdo a los tiempos evaluados mostró un comportamiento normal.

Los resultados obtenidos de la determinación de TBARS, medidos como un índice de oxidación de los lípidos mostró diferencias debido al tratamiento ( $P = 0.005$ ), por tiempo ( $P < 0.05$ ) y en la interacción tratamiento tiempo ( $P = 0.024$ ). Teniendo concentraciones mayores en el tratamiento con glicerol en los tiempos evaluados de vida anaquel (Cuadro 6). Resultados similares han reportado (Soohyun *et al.*, 2015) en ganado Coreano Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) en donde evaluaron concentraciones de TBARS en carne de animales con diferentes edades al sacrificio, reportando efectos significativos por edad ( $P < 0.001$ ) y tiempo de almacenamiento ( $P < 0.001$ ) y su interacción ( $P < 0.001$ ). De igual forma Xiong *et al.*, (2007) observaron diferencias significativas por edad de los animales en cuanto al desarrollo de TBARS en carne almacenado al vacío con una refrigeración menor a  $3^{\circ} \text{C}$ . Este fenómeno se puede entender debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados y la presencia de la mioglobina, lo cual contribuye a favorecer la oxidación de lípidos en la carne cruda durante el almacenamiento y refrigeración (Monahan, 2000). Lo que también se corrobora con los resultados observados por (Chan, Faustman y Decker, 1997) en donde evaluaron la oxidación de lípidos en carne concluyendo que el aumento de TBARS puede ser debido a concentraciones altas de mioglobina. Otro aspecto para entender el aumento de la oxidación de lípidos, es que el envejecimiento celular está relacionado a la disfunción mitocondrial y el

exceso de auto producción de especies reactivas al oxígeno (ERO) dando como resultado el deterioro oxidativo de los componentes celulares tales como lípidos, proteínas y ADN (Wickens, 2001). También el proceso de maduración, aumenta la concentración de hierro específicamente el contenido de grupo HEMO, favoreciendo la aceleración de la oxidación de los lípidos (Marzetti *et al*, 2010; Tichivavangana y Morrissey, 1985). En el presente estudio, el deterioro oxidativo de lípidos fue significativo a pesar del aumento de los FRAP como indicador de la capacidad antioxidante exógena, siendo este indicador significativo por tiempo ( $P < 0.05$ ), lo cual se explica debido al almacenamiento de la carne y al aumento gradual en los tiempos evaluados de 7 a 28 d en condiciones de refrigeración de 5 °C y a los procesos de maduración favoreciendo la lipoperoxidación.

El descenso del pH durante la vida de anaquel fue significativo por tiempo ( $P = 0.0002$ ) sin embargo no se observó diferencia entre tratamientos ni tampoco interacción tratamiento\*tiempo (Cuadro 6). Los valores de pH para los tiempos 7 fueron para el T0= 5.58 y T1=5.54 y para el día 28 de vida de anaquel los valores de pH fueron T0= 5.50 y T1=5.46. Este descenso del pH se presenta en un desarrollo normal debido a los cambios de la utilización de la energía de glucógeno a ácido láctico, en el caso de un medio anaerobio como el empaquetado al alto vacío, causando que los niveles de pH se modifiquen como un proceso normal de la degradación constante de la materia orgánica (Solis, 2005). Por su parte Gregory (1998) menciona que el aumento del estrés fisiológico o la actividad física en animales de granja durante el transporte y el manejo ante mortem conduce al agotamiento de la reserva de glucógeno muscular antes del sacrificio, lo que puede resultar en un pH final elevado en la carne y carne más dura. Lo cual en esta investigación no se vio afectado ni por el manejo de la suplementación del glicerol ni por el manejo del ganado antes del sacrificio.

Finalmente los resultados de la evaluación de la textura durante los tiempos de vida de anaquel no fueron significativos. Reportando valores de textura muy favorables dentro del

rango de muy tierna. Siendo los resultados de fuerza de corte para el 7 d (T0= 2.068, T1= 1.878 kg cm<sup>-2</sup>) y para los 28 d (T0=1.76, T1= 2.07 kg cm<sup>-2</sup>). De acuerdo a Miranda *et al.* (2009) la relación bifásica de ternura con el pH final se presenta debido a la menor actividad proteolítica, con valores de pH de 6.3-5.8. En esta investigación el pH final de vida de anaquel estuvo por debajo de 5.8, lo que indica que los cambios físico-químicos de la carne se vieron favorecidos por la degradación proteolítica, cambios de pH y aumento de ácido láctico durante los tiempos de maduración (Young *et al.*, 2004).

## **6.6 CONCLUSIÓN**

Bajo las condiciones experimentales de esta investigación, se concluye que el efecto del estrés de los novillos por el manejo al rastro evaluado por indicadores bioquímicos de estrés fisiológico, se mostraron muy inconsistentes dentro de los límites normales y la administración oral de 600 mL de glicerol como fuente de energía en ganado de engorda 24 h previo al sacrificio no mostró diferencias significativas entre los tratamientos debido a la rápida absorción que tiene el glicerol y a la dosis única administrada para evaluar su efecto antes del sacrificio. Al no modificar la homeostasis de los animales, ni mostrar efectos en el proceso de vida de anaquel evaluado hasta los 28 d, es indispensable considerar evaluaciones del glicerol como suplemento energético tomando en cuenta un periodo más amplio de administración y como un porcentaje de inclusión en la dieta.

Cuadro 6. Media y Error Estándar (EEM) del efecto de la administración de glicerol 24 h antes del sacrificio de los parámetros FRAP, TBARS, pH y textura para evaluar la vida de anaquel a los 7,14, 21 y 28 d.

VARIABLE	TIEMPO DE VIDA DE ANAQUEL										P>0.05		
	7		14		21		28		EEM		TRAT	TIEMPO	TRAT*TIEMPO
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1			
<b>FRAP</b>	0.273 <sup>a</sup>	0.233 <sup>a</sup>	0.456 <sup>a</sup>	0.468 <sup>a</sup>	0.784 <sup>a</sup>	0.747 <sup>a</sup>	0.760 <sup>a</sup>	0.758 <sup>a</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.027	0.671	<.0001	0.940
<b>TBARS</b>	0.019 <sup>b</sup>	0.022 <sup>a</sup>	0.052 <sup>b</sup>	0.054 <sup>a</sup>	0.066 <sup>b</sup>	0.083 <sup>a</sup>	0.057 <sup>b</sup>	0.092 <sup>a</sup>	0.003	0.003	0.005	<.0001	0.024
<b>pH</b>	5.58 <sup>a</sup>	5.54 <sup>a</sup>	5.59 <sup>a</sup>	5.60 <sup>a</sup>	5.57 <sup>a</sup>	5.53 <sup>a</sup>	5.50 <sup>a</sup>	5.46 <sup>a</sup>	0.018	0.018	0.303	0.0002	0.815
<b>Textura (g cm<sup>-2</sup>)</b>	2068.7 <sup>a</sup>	1878.84 <sup>a</sup>	1723.43 <sup>a</sup>	1846.50 <sup>a</sup>	1883.93 <sup>a</sup>	2023.47 <sup>a</sup>	1759.30 <sup>a</sup>	2068.71 <sup>a</sup>	67.25	67.25	0.300	0.400	0.200

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma fila, señalan diferencia significativa (P< 0.05).

## 6.7 LITERATURA CITADA

Amtmann VA, Gallo C, Van Schaik G, Tadich N. (2006). Relaciones entre el manejo *antemortem*, variables sanguíneas indicadoras de estrés y pH de la canal en novillos. Archivos de Medicina Veterinaria 38 (3): 259-264.

Anzuetto R. (2012). Estimación de vida útil de alimentos. Food and Beverage Technology. Summit 2012. Osmosis. San Salvador.

A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 17<sup>th</sup> Edition Published by the Association of Official Agricultural Chemist. M.D. USA. 1,500.

Averós X, Martín S, Riu M, Serratosa J, Gosálvez LF. (2008). Stress response of extensively young being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. Livestock Science 119: 174-182.

Benzie I and Strain J. (1999) *Methodos Enzymology* 299: 15-27.

Benzie I and Strain J. (1996). *J. Anal. Biochem.* 239: 70-76.

Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science* 85: 2173–2179.

Botsoglov NA, Fletouris DJ, Papageorgiou JE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatelliss AG. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff. *Agric. Food. Chem* 42: 1931-1937.

Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PSD, Buckham KR, Hickey MC, *et al* (2005). Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 105: 197–219.

Chan WKM, Faustman C, and Decker E. (1997). Lipid oxidation induced by oxymyoglobin with involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Meat Science* 46: 181–190.

Chevillon P. (2000). O bem-estar dos suínos durante o pré-abate e no atordoamento. Anais 1<sup>o</sup> Conferencia Virtual Internacional sobre Qualidade de Carne Suína. 16 de Novembro a 16 de Dezembro. Brasil. Concordia, SC: 17-20.

Cunningham JG. (1999). *Fisiología Veterinaria*. Editorial Interamericana McGraw-Hill 2<sup>a</sup> edición. México.

Cockram MS y Corley KTT. (1991). Effect of pre-slaughter handling on the behaviour and blood composition of beef cattle. *British Veterinary Journal* 147: 444-454.

Dantzer, R. y Morméde, P. 1984. *El Estrés en la Cría Intensiva del Ganado*. España: Acribia. 130 pp.

Descalzo AM, Insani EM, Biolatto A, Sancho AM, Garcia PT, Pensel NA, *et al.*, (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* 70: 35–44.

Gatellier P, Mercier Y, Renerre M. (2004). Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science* 67: 385–394.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine* 29: 1106–1114.

Gregory NG. (1998). *Animal Welfare and Meta Science*. UK: CABI Publishing (Chapter 2 and 4).

Guerrero LI, Ponce AE, y Pérez ML. (2002). *Curso práctico de tecnología de carnes y pescado*. Universidad Metropolitana Unidad Iztapalapa, DF, México. 171 p.

Gutteridge JM. (1975). The use of standards for Malonyldialdehyde. *Anal Biochem* 69: 518-526.

Hohmadel DC. (2002). *Clinical Enzimology*. In: Kaplan LA, Pesce AJ y Kazmierczak SC. *Clinical Chemistry: Theory, analysis, correlation*. USA: Mosby: 1043-1063.

Knowles, T. G. y P. D. Warriss. 2000. Stress physiology of animals during transport *In* *Livestock Handling Transport* 2<sup>nd</sup> edition. Grandin T. (Ed). CABI International. New York. pp: 385-407.

Lawrence RA, Burk RF. (1976). Gluthatione peroxidasa activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.

Marzetti E, Hwang JCY, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, *et al.* (2010). Mitochondrial death effectors: Relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800: 235–244.

Miranda- de la Lama, Villarroel GC, Olleta JL, Alierta S, Sañudo C y Maria GA. (2009). Effect of the pre-slaughter logistic chain on meat quality of lambs. *Meat Science* 83:604-609.

Monahan FJ. (2000). Oxidation of lipids in muscle foods: Fundamental and applied concerns. In E.A. Decker, C. Faustman, & C.J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality* (pp. 3–23). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Moberg GP. (1996). Stress and its measurement in domestic animals. A review of behavioural and physiological studies under field and laboratory situations. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med* 24: 179-210.

Parker AJ, Dobson GP and Fitzpatrick LA. (2007). Physiological and metabolic effects of prophylactic treatment with the osmolytes glycerol and betaine on *Bos indicus* steers during long duration transportation. *Journal Animal Science* 85:2916– 2923.

Romero PHM, Uribe-Velásquez FL y Sánchez VJ. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* 10 (1): 71-87.

SAS. (2002). SAS. 2014. Statistical Analysis System for Windows 9. Institute Cary, NC, USA.

SDA (Soap and Detergent Association). (1990). Glycerine: An Overview. The Soap and Detergent Association, Glycerine and Olechemical Division. New York, USA. Disponible en [http://www.aciscience.org/docs/Glycerine\\_-\\_an\\_overview.pdf](http://www.aciscience.org/docs/Glycerine_-_an_overview.pdf). Acceso 30 Junio 2011.

Shaw FD and Tume RK. (1992). The assessment of pre-slaughter and slaughter treatment of livestock by measurement of plasma constituents. A review of recent work. *Meat Science* 32: 311-329.

Solís R. (2005). Manual de prácticas de tecnología de carnes. Departamento académico de ciencia y tecnología de alimentos. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú.

Soohyun Cho, Geunho K, Pil-Nam S, Beomyoung P and Sun Moon K. (2015). Effect of slaughter age on the antioxidant enzyme activity, color, and oxidative stability of Korean Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) cow beef. *Meat Science* 108:44-49.

Tichivavangana JZ, and Morrissey PA. (1985). Metamyoglobin and inorganic metals as prooxidants in raw and cooked muscle systems. *Meat Science*, 15: 107–116.

Warris PD. (1990). The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. *Appl Anim Beh Sci* 28: 171-186.

Wickens AP. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128: 379-391.

Xiong YL, Mullins OE, Stika JF, Chen J, Blanchard SP and Moody WG. (2007). Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscle from mature cows of various ages. *Meat Science* 77: 105-113.

Young J, Karlsson A, Henckel P. (2004). Water-holding capacity in chicken breast muscle is enhanced by pyruvate and reduced by creatine supplements. *Poultry Science* 83: 400-405.

## **CAPÍTULO III**

### **7 TÍTULO: “Genes candidatos involucrados en las características de calidad de la carne en ganado de carne”**

#### **7.1 RESUMEN**

La calidad de la carne es una apreciación que realiza el consumidor, resultado de la interacción de los sentidos con sus propiedades físicas y químicas, como suavidad y marmoleo. Estas dos características son de naturaleza poligénica, es decir ciertos genes en particular explican una proporción importante de la variabilidad fenotípica de la composición y calidad de la carne. La contribución de los genes que están involucrados en la expresión de un carácter se puede evaluar seleccionando genes candidatos. Los genes “candidatos” son genes de los cuales se conoce su función fisiológica y bioquímica en la determinación de un fenotipo, por lo que es importante identificar en ellos polimorfismos asociados con las variables en estudio. Ejemplos de genes candidatos asociados con la calidad de la carne (terneza y marmoleo), son la leptina, calpastatina, tiroglobulina, calpaína, miostatina y el IGF-I. En esta revisión se señala la importancia de la biología molecular como una herramienta para entender los efectos de los genes en la expresión de características productivas, que permitan mejorar aspectos de calidad de la carne.

**Palabras clave:** Calidad, Terneza, QTL, SNP, TG5, CAPN1, Polimorfismos.

**TITLE** "Candidate genes involved in quality traits of meat in beef cattle"

## **7.2 ABSTRACT**

The meat quality is an attribute of direct assessment made by the consumer, mainly perceived by a set of feelings resulting from the interaction of the senses with the physical and chemical properties of meat, as tenderness and marbling. These two characteristics are polygenic. There is evidence that particular genes explain a significant proportion of the phenotypic variability of composition and meat quality. Currently the contribution of genes that are involved in the expression of a character can be evaluated by selecting candidate genes. "Candidate" genes are genes which physiological and biochemical activity is known in the determination of a phenotype and could be involved in the differences detected in productive variables, so it is important to identify these polymorphisms associated with the study variables . In the case of cattle, there have been studies of candidate genes associated with meat quality (tenderness and marbling), such as leptin, calpastatin, calpain, thyroglobulin, myostatin and IGF-I. In this context we mention the importance of molecular biology as a tool to understand the effect of a gene on the expression of a productive nature, can improve the selection and handling marker assisted towards a more comprehensive approach involving aspects of quality.

**Keywords:** Quality, Tenderness, QTL, SNP, TG5, CAPN1, Polymorphisms.

### 7.3 INTRODUCCIÓN

La variabilidad de la calidad de la carne está determinada por diversos factores como la genética del animal, las condiciones de crianza y engorda, el tipo de alimentación y el manejo antes y después del sacrificio. Así mismo, la valoración de la calidad de la carne, está dada por el consumidor, principalmente por medio de los órganos de los sentidos, siendo en la mayoría de los casos una evaluación un tanto subjetiva. La textura de la carne se percibe como un conjunto de sensaciones táctiles resultado de la interacción de los sentidos con las propiedades físicas y químicas entre las que se incluyen la densidad, la dureza, la plasticidad, la elasticidad, la consistencia, la cantidad de grasa y la humedad. Por lo que el consumidor confiere una mayor importancia a la terneza, como principal atributo de la textura, siendo uno de los criterios determinantes de la calidad de la carne, así como también, el contenido de grasa intramuscular y de tejido conectivo que se sabe que pueden explicar hasta el 20% de la variación en terneza entre animales (Shackelford *et al.*, 1994a).

Las características relacionadas con la calidad de carne, terneza y marmoleo, son de herencia cuantitativa, es decir están bajo el control de muchos genes, por lo que se conocen como características complejas o poligénicas (Dekkers, 2004). Actualmente, los avances en la biología molecular y la genómica han permitido la identificación de variaciones específicas en el ADN, constituyendo las nuevas disciplinas que han diseñado metodologías para los estudios de genética animal asociadas a características de interés productivo y de calidad. Es decir, no solo a partir del fenotipo y su parentesco, si no a partir de la evaluación directa de los genes, identificando los polimorfismos o variantes alélicas. Entre los genes asociados a estas características de calidad de la carne, se encuentra el  $\mu$  calpaína (CAPN1) asociado al

efecto sobre la terneza de la carne y la tiroglobulina (TG5), relacionado con el marmoleo y porcentaje de grasa intramuscular (Casas, 2006; Barendse *et al.*, 2004).

#### 7.4 Factores que influyen en las características de calidad de la carne

La mayoría de las características de importancia económica tales como ganancia de peso, peso vivo, rendimiento en cortes, espesor de grasa, marmoleo y terneza de la carne, se encuentran como características poligénicas. Estas características son generalmente de naturaleza cuantitativa y su expresión sigue una distribución normal. Esta variabilidad, determinada por diversos factores ha demostrado la existencia de diferencias en la terneza en las razas bovinas (Marshall, 1999). Las razas de origen índico producen carne con menor terneza que las razas europeas (Shackelford *et al.* 1995). En Latinoamérica es de gran relevancia este aspecto, ya que la utilización de las razas cebuinas en sistemas de producción de carne es una necesidad por su agroecología, factor que la pone en desventaja, en comparación con las razas europeas, y por ende tienen un valor comercial menor.

Los índices de herencia o heredabilidad se muestran relativamente altos para caracteres relacionados con crecimiento y rendimiento (Estrada-León *et al.*, 2008) y moderados para caracteres de calidad de la canal y de la carne (Wheeler *et al.* 2001; Shackelford *et al.* 1994b), por lo que estas variables de rendimiento y calidad son susceptibles de ser mejoradas a través de selección. Un programa de selección persigue el mérito genético de los animales que serán usados como reproductores. Un aspecto importante a considerar en cualquier programa de mejoramiento genético, son las correlaciones genéticas. Por ejemplo, una correlación genética antagonista entre marmoleo y rendimiento, podría dificultar los esfuerzos en selección que busquen mejorar el rendimiento y marmoleo simultáneamente. Por lo que los programas de selección persiguen la obtención del mérito genético de los animales que van a ser usados como reproductores, el cual se evalúa a través de las diferencias esperadas entre progenie

(DEP), que permiten estimar genéticamente la superioridad e inferioridad productiva que un animal transmite en promedio a su descendencia (Mendoza, 1997). Dikeman *et al.* (2005) reportaron por primera vez DEP para la variable resistencia al corte (o blandura mecánica de la carne), demostrando que existen diferencias genéticas considerables entre toros de un mismo grupo racial y que la terneza puede mejorarse con la selección de los reproductores.

La relación entre las prácticas de alimentación, manejo y sacrificio de los animales y la elección de las razas de acuerdo a las limitaciones climáticas y nutricionales, son factores que definen los valores de terneza. Estos factores son importantes al momento de diseñar experimentos, obtener resultados y dar conclusiones. Incluso la forma en que se cuelga la res después del sacrificio influye en la tensión que se ejerce sobre diferentes músculos y en el grado final de terneza que tendrán los mismos (Ferguson *et al.*, 2001). Las características intrínsecas del músculo como tipo de fibras, proporción de tejido conectivo, muscular y adiposo, no se ven muy afectados por los procesos después del sacrificio o por la cocción de la carne. La terneza final de la carne está determinada por características como la estructura de las miofibrillas, la cantidad de glucógeno y la actividad proteolítica, además de otros factores como el manejo antes del sacrificio y durante el sacrificio, tiempo y temperatura de almacenamiento (Oddy *et al.*, 2001). Por ejemplo, el uso de la estimulación eléctrica en el proceso de sacrificio, produce intensa contracción muscular lo que promueve la glucólisis y el descenso rápido del pH, favoreciendo el desarrollo del *rigor mortis*. Otras prácticas de manejo como la aplicación de vitaminas, son útiles para identificar vías metabólicas específicas que permiten detectar genes involucrados o genes candidatos. Como lo observado por Montgomery *et al.*, (2002), en que la administración de vitamina D a los animales durante el periodo de engorda mejoró la terneza de la carne, manifestando la importancia de generar conocimiento en el metabolismo del calcio.

La edad del animal es otro factor que influye en la ternura de la carne, generalmente en los sistemas de producción de carne el consumidor asocia a un animal joven con una mayor probabilidad de obtener carne más tierna, y esto lleva a que esas categorías ligeras logren precios por kilogramo mucho más altos que los animales más pesados. Esto tiene una importante relación con el potencial genético para crecimiento de las distintas razas y cruces. Los individuos con mayor potencial de crecimiento y eficiencia en la conversión de alimento difícilmente pueden alcanzar la composición corporal adecuada para ser sacrificados a pesos ligeros. De manera que a la maximización de la eficiencia biológica de la producción de carne se contraponen la rentabilidad comercial y el interés por producir un tipo de carne con más éxito en el mercado.

Los factores de alimentación y estrés antes del sacrificio afectan el nivel de reservas de glucógeno a nivel muscular y esto se relaciona con la tasa de descenso de pH y el valor final en la carne, lo cual determina el color y la ternura. La actividad del sistema proteolítico responsable de la suavidad es dependiente del pH, la temperatura y la concentración de calcio (Muir *et al.*, 1998). Inmediatamente después del sacrificio, comienzan en el músculo esquelético una serie de procesos metabólicos anaeróbicos, debido a la interrupción de la circulación sanguínea. En esa condición, se acumula ácido láctico como producto del metabolismo y consecuentemente desciende el pH muscular. Este proceso de acidificación requiere aproximadamente 15 a 36 h. El pH final influye directamente en la conservación y el valor tecnológico de la carne, que se define como las características técnicas que se encuentran dentro de los rangos óptimos y que favorecen el mejor procesamiento de la carne como pH, color, conductividad, capacidad de retención de agua y grasa intramuscular. Warriss (2000) menciona que un valor apropiado de pH oscila en el rango de 5.4 a 5.8. Cuando el pH final es  $\geq 6.2$  a nivel del músculo *Longissimus dorsi*, la carne es más oscura,

firme y seca (DFD). Un valor de pH final alto resulta en una escasa proteólisis y además la carne presenta una elevada capacidad de retención de agua, lo que determina una estructura proteica más compacta (Tornberg, 1996; Warriss, 2000). Se ha demostrado que gran parte de la variación en la degradación proteica medida *in vivo* es debida a la actividad de las calpaínas y una alta tasa de recambio de proteínas *in vivo* está asociada con un alto nivel de proteólisis después del sacrificio (Oddy *et al.*, 2001). Shackelford *et al.* (1994b) reportaron una correlación genética negativa ( $r = -0.52 \pm 0.37$ ) entre la actividad de la calpastatina y la ganancia diaria de peso, ya que una mayor actividad proteolítica afecta la eficiencia de conversión del alimento (Mc Donagh *et al.*, 2001).

### 7.5 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares, son regiones específicas del ADN donde se ha encontrado variación que se asocia positiva o negativamente con un rasgo de interés. Existe evidencia que ciertos genes en particular explican una proporción importante de la variabilidad fenotípica de composición y calidad de la carne (Burrow *et al.*, 2001). En los primeros estudios para detectar marcadores genéticos asociados con caracteres productivos, se utilizaron como marcadores los polimorfismos de proteínas séricas y antígenos eritrocitarios (McClure, 1952). Posteriormente, se utilizó el polimorfismo encontrado en los grupos sanguíneos (Larsen *et al.*, 1985) y en el sistema mayor de histocompatibilidad (Batra *et al.*, 1989; Stear *et al.*, 1989). Sin embargo, el poder de detección de estos estudios se limitaba a las regiones del genoma donde se encuentran estos marcadores. Fue hasta que se desarrollaron los mapas de ligamiento que se pudo hacer una búsqueda a través de todo el genoma para encontrar los QTL (*loci* de carácter cuantitativo, por sus siglas en inglés, Quantitative Trait Loci). La contribución de los genes que están involucrados en la expresión

de un carácter se puede evaluar seleccionando genes candidatos. Los genes “candidatos” son genes de los cuales se conoce su función fisiológica y bioquímica en la determinación de un fenotipo y podrían estar involucrados en las diferencias detectadas en variables productivas, por lo que es importante identificar en ellos polimorfismos asociados con las variables en estudio (Rothschild y Soller, 1997). La versión actual de QTL reportados en el ganado hasta el 11 de junio de 2015 son 17,908 en 589 publicaciones insertas en la base de datos (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>). Estos QTL representan: 514 características diferentes, de las cuales 1,856 están relacionadas con características del crecimiento, 375 para características sensoriales, 97 para variables del color en carne y grasa, y 80 referentes a la calidad de la carne. Los microsatélites constituyen la segunda generación de marcadores moleculares, en grado de importancia en el área de genética animal. Estos son pequeños segmentos de secuencias de ADN, abundantes, polimórficos, fácilmente amplificables y bien distribuidos en el genoma, que se constituyeron en la base para el desarrollo de mapas genéticos por asociación o ligamiento (Arango y Salomón, 2002). Sin embargo, con los resultados de la secuenciación del genoma bovino, otro grupo de marcadores llamados SNP (Polimorfismos de Nucleótido Simple, en inglés, Single Nucleotide Polimorphism) han tenido mayor auge recientemente. La iniciativa para secuenciar el genoma de animales domésticos comenzó en la década de los 90s, pero no fue hasta octubre de 2004 (Zhi-Liang *et al.*, 2013) cuando se liberó el primer borrador del mapa de secuenciación bovino y en agosto de 2006 se publicó la última versión del proyecto de secuenciación del genoma bovino, el cual se encuentra disponible en la base de datos pública ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?)). Este mapa físico se realizó utilizando cromosomas artificiales de bacterias (BAC, por sus siglas en inglés), en los que se insertan secuencias de ADN bovino para ser reproducidos (clonados), que posteriormente serán secuenciados, alineados y normalizados.

La Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) es el proceso de usar los marcadores genéticos para asistir la selección de los progenitores de las siguientes generaciones en un programa de mejoramiento genético. Este procedimiento tiene mayor potencial para características con baja heredabilidad, difíciles o caras de medir (p.e. resistencia a enfermedades), que se pueden evaluar hasta que el animal ha contribuido con la siguiente generación, que no son seleccionados debido a que de manera rutinaria no son evaluadas (características de la canal como terneza) y que son características correlacionadas con otras que no se quieren mejorar (los marcadores asociados con aumento en el marmoleo, usualmente no se asocian con grosor de grasa dorsal) (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). Esta selección tiene como finalidad complementar los programas de mejoramiento genético basados en la estimación de valores genéticos, DEPs (Diferencias Esperadas en la Progenie) de tal forma que la información molecular está incluida en el proceso de estimación de valores genéticos (Allan y Smith, 2008). Otra de las estrategias es el Manejo Asistido por Marcadores (MAM), la cual tiene un mayor potencial en auxiliar el uso de las DEPs, sin incluir el modelo estadístico de evaluación, empleando la presencia de alelos favorablemente asociados a caracteres de interés que ayuden a la selección de reproductores (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). El MAM comercialmente consiste en combinar la información de animales vivos con su información genética (ADN) para realizar decisiones de manejo (Kolath, 2009). En este sentido la importancia de utilizar el MAM es que está relacionada con características de calidad de la carne, como el marmoleo o contenido de grasa intramuscular, la suavidad de la carne o la resistencia al corte, características que comercialmente no son evaluadas mediante la estimación de DEPs y que poseen el potencial de ser seleccionadas sin la necesidad de sacrificar al animal. Aunque ambos sistemas tienen sus ventajas, en los próximos años el conocimiento que se genere con los estudios de asociación de genoma completo mediante la genotipificación masiva por medio de arreglos de miles de SNPs

demostrará el verdadero potencial de la SAM y el MAM, una vez que el genoma sea caracterizado y sean identificadas más variaciones que significativamente afecten el fenotipo (Allan y Smith, 2008).

#### 7.6 *Genes candidatos involucrados con características de la calidad de la carne bovina*

Algunas de las herramientas para mejorar la calidad de la carne desde el punto de vista genético es a través de la identificación de marcadores relevantes de ADN directamente en poblaciones seleccionadas (Ahmed *et al.*, 2005). El gen candidato se identifica porque se tiene un conocimiento previo de la proteína respectiva. Otra forma de identificarlos es comparar genes homólogos en especies cuyos genomas ya han sido secuenciados en su totalidad, como el del humano (Venter *et al.*, 2001) y el del ratón (Waterston *et al.*, 2002). En todos los casos, es fundamental tener conocimiento de las bases fisiológicas y bioquímicas del fenotipo estudiado.

Existen estudios de genes candidatos asociados con la calidad de la carne (terneza y marmoleo), entre los se pueden mencionar: la calpaína, leptina, tiroglobulina y miostatina (Avilés *et al.*, 2015; Hocquette *et al.*, 2012).

##### 7.6.1 *Calpaína*

La suavidad de la carne es una característica de aceptación muy importante, la cual es modificada por la proteólisis por tres sistemas de enzimas y sus cofactores como son las catepsinas lisosomales, el sistema ubiquitina proteosomal y las proteasas calcio dependientes (Oddy *et al.*, 2001). Las enzimas  $\mu$ calpaina, m-calpaina y p94, o calpaina 1, 2 y 3, están involucradas en la degradación de las proteínas musculares *pre mortem* y *post mortem* (Ilian *et al.*, 2001, Ilian *et al.*, 2004). Por otro lado, el inhibidor de las calpainas (con la excepción

de la p94) es la calpastatina, la cual se ha comprobado que inhibe la diferenciación de mioblastos, así como la tenderización *post mortem* (Kent *et al.*, 2004). Otro sistema enzimático involucrado en la degradación proteica en los músculos son las caspasas, especialmente la 3, que actúa en la muerte celular o apoptosis. También, se han identificado genes como i-calpaína, que se ha asociado a la suavidad o terneza de la carne. Este gen se localiza en el cromosoma 29 (Smith *et al.*, 2000). La proteasa activada con niveles micromolares de calcio (m-calpaína) y la proteasa activada con niveles micromolares de calcio (i-calpaína), son las dos enzimas responsables del ablandamiento *post mortem*, aunque se ha indicado que la i-calpaína es la principal enzima responsable de este proceso. Esta reportado que la calpastatina es el inhibidor natural de las calpaínas en el sistema de proteólisis de la carne (Koochmaraie, 1996). El SNP conocido como CAPN1-316 fue el primero que se vinculó a la terneza de la carne (Page *et al.*, 2004) y se encuentra en el gen que codifica para la proteína  $\mu$ -calpaína. El segundo SNP denominado UoG-CAST también fue descrito para predecir la terneza (Schenkel *et al.*, 2006). Ambos polimorfismos constituidos por una transversión de una guanina (G) a citocina (C) siendo en ambos marcadores el alelo C el que está asociado a la carne con mayor terneza.

En otros estudios con animales de la raza Brahman (Parra-Bracamonte *et al.*, 2007) caracterizaron la frecuencia de variantes alélicas favorables en el gen de la calpaína, específicamente, las frecuencias de los SNPs 316, 530 y 4751 asociados a la suavidad de la carne de ganado *Bos taurus* y ganado *Bos indicus*. Esta información demuestra la importancia de caracterizar la base genética del ganado en regiones tropicales para aprovechar los cruzamientos en los sistemas de producción de carne o doble propósito (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). En otro estudio enfocado a la asociación de genes candidatos y la relación con las características organolépticas de la carne (Avilés *et al.*, 2015) reportaron que en razas

comerciales de engordas intensivas como Charolais, Limousin y Retinta, genes como CAST (calpastatina), LEP (leptina) y SCD1 (enzima esteroil-CoA desaturasa) tienen un efecto potencial sobre las diferentes mediciones de la calidad de la carne evaluado a nivel sensorial.

### 7.6.2 *Leptina*

La leptina es una hormona sintetizada en los adipocitos, involucrada en la regulación del apetito y energía. Los niveles de leptina en la sangre se han asociado con variaciones en las características de la canal. Se han descrito alelos de este gen que identifican individuos con diferente capacidad de retención de grasa y marmoleo. Si bien se han identificado diferentes polimorfismos en su secuencia, el que parece tener efectos fisiológicos, es la sustitución de citocina (C) por timina (T) en el exón 2, que a su vez conduciría a la sustitución de arginina por cisteína en la proteína correspondiente, en tanto que el alelo T sería el que se correspondería con un mayor nivel de grasa en la canal (Buchanan *et al.*, 2002). Se han reportado polimorfismos ligados al gen de la leptina que pueden influir en la regulación de genes y afectar la ganancia de peso, como lo reportan Liefers *et al.* (2005) en vacas lecheras Holstein-Friesian, quienes observaron algunas mutaciones asociadas con la producción de leche, el consumo de alimento y las concentraciones de leptina en plasma durante la gestación pero no presentes durante la lactancia. En otro estudio de asociación entre seis marcadores moleculares ligados al gen LEP con la ganancia promedio diaria de peso y el rendimiento reproductivo en vacas posparto de las razas Angus (AA) y Charolais (C). Matos *et al.* (2007) reportaron asociaciones positivas, sugiriendo que los animales de AA que llevan el alelo BMS1074\*151 tuvieron un mal desempeño en relación con otros animales, y que los animales portadores del alelo BM1500 \*136 en ambas razas (AA y C) mostraron una probabilidad tres veces más alta para mayor ganancia promedio diaria de peso.

### 7.6.3 Tiroglobulina (TG5)

El gen de la TG5 codifica a una glicoproteína precursora de la hormona tiroidea y se ha asociado con diferencias en marmoleo en bovinos (Harper y Pethick, 2004). El marmoleo es una característica que confiere sabor, jugosidad a la carne y tiene un efecto lubricante durante la masticación, lo que aumenta la satisfacción del consumidor (Thompson, 2004).

Como la mayoría de las características productivas, el marmoleo es el resultado de la interacción entre varios genes y el medio ambiente por lo que se espera que muchos genes se encuentren asociados con esta característica, sin embargo el marcador TG5 del gen de tiroglobulina, se ha estudiado debido al bajo efecto pleiotrópico (gen que produce un conjunto de efectos fenotípicos no relacionados) con otras características y a su asociación con el marmoleo (Casas *et al.*, 2005). En respuesta a la actividad tiroidea, el gen TG5 se expresa dentro del tejido de esta glándula, la proteína (tiroglobulina) es secretada y activada para posteriormente formar T3 (Triyodotironina) y T4 (Tiroxina). La tiroglobulina tiene una función indirecta en la regulación metabólica, sin embargo, la velocidad de expresión del gen, tiene efectos directos sobre la producción de las principales hormonas tiroideas y estas a su vez sobre la deposición de grasa (Harper y Pethrick, 2004). El gen de la TG se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 del bovino (14q). Uno de los polimorfismos reportados dentro del gen se localiza en la región 5' no traducible en la posición TG-537, el cual está involucrado en la regulación del gen y se le ha relacionado con el grado de marmoleo en la carne (Barendse *et al.*, 2001, 2004). En un estudio realizado con ganado bovino *Bos indicus*, *Bos taurus* y cruza comerciales (Bonilla *et al.*, 2010) reportaron que la frecuencia del SNP favorable para el marmoleo se encontró en un 10 % con 26 % de animales portadores, encontrando la presencia de dos genotipos CC y CT.

#### 7.6.4 *Miostatina*

El gen de la miostatina, ha sido estudiado como gen candidato encontrado en el cromosoma 2 a 4 centimorgan (cM ) del centrómero para las variables rendimiento en cortes, espesor de grasa, grado de rendimiento y marmoleo reportados por Casas *et al.* (2000). Este gen codifica un inhibidor del crecimiento muscular y la forma mutada del gen es responsable de la condición de doble musculatura mayormente presente en razas bovinas como la Belgian Blue, Charolais y Piedmontes. En Latinoamérica existe una percepción negativa sobre los animales con características de doble musculatura, relacionado a la alta tasa de presentación de partos distócicos (Casas *et al.*, 1999). Estudios recientes en animales Charolais, indican la importancia de esta mutación en animales heterocigotos, reportando un efecto significativo en el aumento del rendimiento y masa muscular, disminución de colágeno en la carne y un aumento de la suavidad de la carne, independientemente de la disminución de grasa intramuscular y el sabor de la carne (Allais *et al.*, 2010).

Otros posibles genes candidatos los constituyen el gen que codifica el factor de crecimiento para la insulina (IGF-I), la hormona del crecimiento y el DGAT1 (Mullen, 2006), fosfodiesterasa 1 B (Ortiz-Colón *et al.*, 2007), el gen PPARGC1\_ (Soria *et al.*, 2007). Estas pruebas comerciales de marcadores genéticos para características de la calidad de la carne han sido validadas por el Nacional Beef Cattle Evaluation Consorsium (<http://www.nbcec.org/nbcec/index.html>). Esta validación es necesaria porque pueden ocurrir falsas asociaciones entre el marcador y la variable de interés si se ignora la información sobre el pedigrí o la composición racial. En Latinoamérica ya se conocen los primeros resultados de las experiencias en el uso de marcadores moleculares de los genes PPARGC1\_, PDE1B, calpaínas y su relación con los atributos de calidad (Corva *et al.*, 2007; Ortiz-Colón *et al.*,

2007; Soria *et al.*, 2007; Villareal *et al.*, 2007), pero no existen evidencias del uso de pruebas de este tipo a nivel comercial.

Otros investigadores (Gill *et al.*, 2010) han reportado la asociación de 28 SNP de 10 genes relacionados con la calidad de la carne de ganado y cerdo comercial. Dentro de los asociados a características de calidad de la carne en ganado podemos mencionar algunas hormonas como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) asociada con el grosor de la grasa subcutánea y el grado de marmoleo (Wibowo *et al.*, 2007), la hormona del crecimiento (GH) asociada al veteadado de la carne y la grasa de la cadera (Barendse *et al.*, 2006). El factor de crecimiento tipo insulina II (IGF-II) asociado con el área del músculo *longuissimus*, porcentaje de grasa (Sherman *et al.*, 2008) y la zona del rib eye (Goodall y Schmutz, 2007).

## **7.7 CONCLUSIONES**

La identificación de los diferentes genes candidatos asociados a atribuciones de las características de calidad de la carne, como la ternera o suavidad de la carne que es considerada por los consumidores como el factor más importante que determina la calidad de la carne, permitirá tener un mayor conocimiento de los procesos genéticos por los cuales se expresa un carácter productivo, así como también hacer mejores evaluaciones genéticas de las características que el productor está interesado en incluir en su ganado para satisfacer las demandas del mercado local o de exportación. La incorporación de la información molecular en los programas de cría y engorda del ganado se recomienda para aumentar la eficiencia y predecir las características como la suavidad, la ternera, el marmoleo de la carne, siendo importante mencionar que el aprovechamiento de este potencial se enfoca en favorecer los caracteres productivos, que puedan promover la producción de animales en cantidad y calidad y que reduzca la dependencia de productos y subproductos cárnicos de importación, además

de incentivar el consumo de carne con valor agregado con características inocuas y de calidad.

## **7.8 LITERATURA CITADA**

Ahmed F, Ifeanyi A and Kenneth DE (2005). Farm animal genomics and informatics: an update. *Nucleic Acids Research* 33 (19): 6308–6318.

Allais S, Levéziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C, Journaux L, Bonnot A, Renand G (2010). The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *Journal of Animal Science* 88:446-454.

Allan MF, Smith TPL (2008). Present and future applications of DNA technologies to improve beef production. *Meat Science* 80: 79-85.

Arango J, Salomón J (2002). Aplicaciones de Biotecnología para el mejoramiento Genético de Bovinos de Carne. En: XVIII Cursillo sobre Bovinos de Carne. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay, Venezuela. p. 237-285.

Avilés C, Peña F, Polvillo O, Barahona M, Campo MM, Sañudo C, Juárez M, Horcada A, Alcalde MJ, Molina A. (2015). Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively-fed beef. *Meat Science* 107: 33-38.

Barendse WJ, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S and Donaldson N. (2001). The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle. Disponible en: [http://www.geneticsolutions.com.au/pdf/genestar/Marbling\\_Bill\\_Barendse.pdf](http://www.geneticsolutions.com.au/pdf/genestar/Marbling_Bill_Barendse.pdf).

Barendse WJ, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S and Donaldson N. (2004). The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 669-674.

Barendse W, Bunch RJ, Harrison BE, and Thomas MB. (2006). The growth hormone 1 GH1:c.457CNG mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sample of Australian feedlot cattle. *Animal Genetics*. 37: 211–214.

Batra TR, Lee AJ, Gavora JS and Stear MJ (1989). Class I alleles of the major histocompatibility system and their association with economic traits. *Journal of Dairy Science* 72: 2115-2124.

Bishop MD, Kappes SM, Keele W, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J y Beattie CW. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.

Bonilla CA, Rubio MS, Sifuentes AM, Parra-Bracamonte GM, Arellano VW, Méndez MRD, Berruecos JM, Ortiz R (2010). Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with Mexican bovine meat quality traits. *Genetics and Molecular Research Evolution and Technology* 9 (4): 2395-2405.

Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, and Schmutz SM. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptine gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution* 34(1):105-116.

Burrow HM, Moore SS, Johnston DJ, Barendse W and Bindon BM (2001). Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: A Review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 893.

Casas E, Keele JW, Smith TPL, Cundiff LV, Stone RT (1999). Quantitative analysis of birth, weaning and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreeds segregating an inactive myostatin allele. *Journal of Animal Science* 77 (7): 1686–1692.

Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM and Koohmaraie M. (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *Journal of Animal Science*. 78: 560.

Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brenneman RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase CC Jr. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in gene residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 83: 13-19.

Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase Jr CC, Johnson DD y Smith TPL. (2006). Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal Animal Science* 84:520-525.

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

Corva P, Soria L, Papaleo Mazzuco J, Villareal E, Melucci L, Mezzadra C, Schor A, Motter M. (2007). Evaluación de marcadores moleculares asociados a diferencias en terneza de la carne de novillos Brangus. En: XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Peru. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15 (Supl. 1): 436.

Curi RA, Chardulo AL, Mason MC, Arrigoni MDB, Silveira AC, De Oliveira HN. (2009). Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nelore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics*.

Dekkers JCM. (2004). Commercial application of marker and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science* 82 (Supplement 13): E313-E328.

Dikeman ME, Pollak EJ, Zhang Z, Moser DW, Gill CA, Dressler EA. (2005). Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 83:2461-2467.

Estrada-León RJ, Magaña Monforte JG, Segura Correa JC (2008). Comparación de modelos en la evaluación genética de caracteres de crecimiento del ganado Brahman en el sureste de México. de variación. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 16 (4): 224-233.

Ferguson D, Bruce H, Thompson J, Egan A, Perry D and Shorthose W (2001). Factors affecting beef palatability; from farmgate to chilled carcass. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 879.

Gill LJ, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P. (2010). Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Science* 86: 985-993.

Goodall JJ and Schmutz SM. (2007). IGF2 gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. *Animal Genetics*. 38: 154-161.

Harper GS, Pethick DW (2004). How might marbling begin?. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 77: 653–662.

Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW and Scollan ND. (2012). Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Science* 92 (3): 197-209.

Ilian MA, Morton JD, Bekhit AE, Roberts N, Palmer B, Sorimachi H. (2001). Effect of pre-slaughter feed withdrawal period on longissimus tenderness and the expression of calpains in the ovine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(4), 1990-1998.

Ilian MA, Bekhit AEDA, Stevenson B, Morton JD, Isherwood P, Bickerstaffe R. (2004). Up and down regulation of longissimus tenderness parallels changes in the myofibril-bound calpain 3 protein. *Meat Science*. 67(3): 433-445.

Kolath B. 2009. Feedlot marker assisted management. In Proceedings of the Beef Improvement Federation 41st Annual Research Symposium April 30 May 3, Sacramento, California p: 103-106.

Koohmaraie M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science* 43:S193.

Larsen B, Jensen NE, Madsen P, Nielsen SM, Kalstrup O and Madsen PS (1985). Association of the M blood group system with bovine mastitis. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 16:165-173.

Liefers SC, Veerkamp RF, Te Pas MFW, Chilliard Y, Van der Lende T. (2005). Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 227-238.

Marshall DM. (1999). Genetics of meat quality. In: The genetics of cattle Fries RF and Ruvinsky A (Ed.). CABI Publishing. New York p: 605.

Matos ASE, Amazonas AE, Terral G, Pereira NJ, Dias GPB, Weimer TA. (2007). Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. *Ciencia Rural* 37 (1) Santa Maria Jan/Feb. On-line version ISSN1678-4596. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000100033>.

Mc Donagh MB, Herd RM, Richardson EC, Oddy VH, Archer JA. and Arthur PF. (2001). Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. *Australian Journal Experimental Agriculture* 41: 1013.

McClure TJ (1952). Correlation study of bovine erythrocyte antigen A and butter-fat test. *Nature* 170:327.

Mendoza Hidalgo MA. (1997). Papel actual y potencial de la Conamegra en el mejoramiento genético de Bovinos. En: *Memorias: Primer Foro de Análisis de los Recursos Genéticos de la Ganadería Bovina* 17 a 19 de Noviembre, Cd. de México: 18-20p.

Montgomery J, Carr M, Kerth C, Hilton G, Price B, Galyean M, Horst R. and Miller M. (2002). Effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. *Journal of Animal Science* 80: 971.

Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Dobbie PM, Veenvliet BA, Manley TR, Pitchford WS, Kruk ZA, Bottema CDK, Wilson T. (2006). Genotypic effects of calpain 1 and

calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey\*Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics* 37: 411-414.

Muir PD, Deaker JM and Brown MD (1998). Effects of forage and grain based feeding system on beef quality: A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 41: 623.

Mullen A.M., Stapleton P.C., Corcoran D., Hamill R.M., White A. (2006). Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. *Meat Science*. 74: 3-16.

Oddy VH, Harper GS, Greenwood PL. and Mc Donagh MB. (2001). Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 921.

Ortiz-Colon G, Bosques J, Marrero D, Martinez E, Rivera M, Casas A, Cianzio D, Pagán M. (2007). Asociación de polimorfismos de nucleótidos simples en el locus del gen de la fosfodiesterasa 1 B (PDE1B) con la grasa corporal en toretes criados a pastoreo. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* Vol. 15 (Supl. 1): 447.

Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, White SN, Bennett GL, Keele JW, Dikeman ME, Smith TPL. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82: 3474-3481.

Parra-Bracamonte GM, Sifuentes-Rincón AM, Martínez-González JC, Cienfuegos-Rivas E, Tewolde A (2007). Polimorfismo en el gen de la  $\mu$ -Calpaína en ganado Brahman de registro de México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15 (1):33-38.

Parra-Bracamonte GM, Sifuentes Rincón AM, De la Rosa Reyna XF, Arellano Vera W (2011). Avances y Perspectivas de la Biotecnología Genómica Aplicada a la Ganadería en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 1025-1037.

Rothschild MF and Soller M (1997). Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* 8:13.

Shackelford SD, Koohmaraie M. and Wheeler TL. (1994a). The efficacy of adding a minimum adjusted fat thickness requirement to the USDA beef quality grading standards for select grade beef. *Journal Animal Science* 72:1502.

Shackelford SD, Koohmaraie M, Cundiff LV, Gregory KE, Rohrer GA, Savell JW. (1994b). Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *Journal of Animal Science* 72:857-863.

Shackelford SD, Wheeler TL, and Koohmaraie M (1995). Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal Animal Science* 73: 3333.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, et al. (2008). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 86: 1–16.

Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H et al (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal Animal Science* 84 (2): 291-299.

Smith TPL, Casas E, Rexroad CE III, Kappes M, and Keele JW. (2000). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a QTL for meat tenderness. *Journal of Animal Science* 78: 2589-2594.

Soria L, Corva P, Papaleo Mazzuco J, Melucci L, Villareal E, Mezzadra C, Sivestro C, Schor A. (2007). Polimorfismos en el gen PPARGC1\_ en bovinos de carne. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15 (Supl. 1): 335.

Stear MJ, Pokorny TS, Muggli NE, and Stone RT (1989). The relationship of birth weight, preweaning gain with the bovine major histocompatibility system. *Journal of Animal Science* 67:641-649.

Thompson JM (2004). The effects of marbling on flavor and juiciness scores of cooked beef, after adjusting to a constant tenderness. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44 (7): 645-652.

Tornberg E (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science* 43 (Supplement) S175.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* 291:1304.

Villareal M, Mezzadra E, Melucci L, Soria L, Corva P, Schor A. (2007). Caracteres de crecimiento y de la canal de novillos en engorde en pastoreo que discriminan genotipos del marcador CAPN1 316. En: XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 15 (Supl. 1): 446.

Warriss PD (2000). *Meat Science: An Introductory Text*. CABI Publishing. New York. Chapter 3 and 5: 37 and 93p.

Waterston R, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril J, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis S (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520.

Wheeler, T.L., Cundiff L.V., Shackelford S.D., Koohmaraie M. 2001. Characterization of biological types of cattle (Cycle V): Carcass traits and longissimus palatability. *Journal Animal Science* 79: 1209-1222.

Wibowo TA, Michal JJ, Jiang Z. (2007). Corticotropin releasing hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat depth in beef cattle. *Genome* 50: 939–945.

Zhi-Liang H, Carissa AP, Xiao-Lin W, and James MR. (2013). Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Research* 41: 871-879.

## CAPITULO IV

### **8. TITULO: “Determinación de la presencia del gen Calpastatina (CAST) y Tiroglobulina (TG5) en ganado bovino (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de una engorda comercial del Municipio de Tamuín, SLP, México”**

#### **8.1 RESUMEN**

La terneza y el marmoleo son características poligénicas e indicadoras de calidad en la carne bovina. Algunos de los genes relacionado con la terneza en la carne son el gen calpastatina (CAST) en el cual se han identificado polimorfismos de nucleótidos simples (SNP del inglés Single Nucleotide Polymorphism) algunos de los cuales han sido asociados significativamente con variabilidad en la terneza de la carne bovina y el gen de la tiroglobulina (TG5) en el cual se ha identificado un polimorfismo del gen asociado a la deposición de grasa intramuscular en bovinos. En la presente investigación se determinó la presencia de estos dos marcadores en ganado bovino procedente de una engorda comercial dedicada a la producción de carne con exigencias de calidad suprema. Se obtuvieron muestras de sangre de 400 bovinos próximos al sacrificio, las cuales fueron procesadas por reacción en cadena de la polimerasa directa (PCR Directa) utilizando los iniciadores CAST (AF159246) y TG5 (M35823). Los productos de amplificación esperados 495 pb (CAST) y 545 pb (TG5), se corroboraron en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio, purificados por la técnica de PEPSIs-97 y enviados a secuenciar. Posteriormente las secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa Vector NT Suite 8.0 para obtener las secuencias consenso, las cuales fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con las secuencias homologas del algoritmo Basic Local Aligment Search Tool (BLAST). Los resultados de esta investigación fueron que se corroboraron los fragmentos tanto para el gen CAST y TG5 con los iniciadores utilizados y reportados en la literatura. Las secuencias consenso tuvieron una máxima identidad del 85 y 84 % para el gen CAST comparadas con secuencias reportadas en el BLAST y para el TG5 una máxima identidad del 99 y 98 %. Las secuencias consenso se registraron en la base de datos del NCBI otorgando los números de acceso KP866922 (CAST) y KP866923 (TG5) para su análisis y validación por el staff del GenBank. Se concluye que el uso de las herramientas de la genómica permite identificar la expresión de un gen de carácter productivo.

**PALABARAS CLAVE:** Calpastatina, Tiroglobulina, Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP), Terneza, Marmoleo.

**TITLE: "Determination the presence of Calpastatin (CAST) and thyroglobulin (TG 5) genes in cattle (Bos taurus x Bos indicus) in a commercial feedlot in Tamuín, SLP, Mexico"**

## **8.2 ABSTRACT**

Marbling and tenderness are polygenic and quality indicator of beef meat characteristics. Some of the related genes in meat tenderness are the calpastatin gene (CAST) in which have been identified single nucleotide polymorphisms (SNP)) some of which have been associated with significant variability in tenderness, and thyroglobulin gene (TG5) in which it has been identified a polymorphism associated with the deposition of intramuscular fat in cattle. The objective of this research was to identify the presence of these two markers in beef meat from animals of a commercial feedlot dedicated to the production of meat with supreme quality requirements. Four hundred animals were sampled before slaughter, and the blood obtained was processed by the polymerase chain reaction (Direct PCR) using the primers CAST (AF159246) and TG5 (M35823). The expected products of 495 bp larger preview (CAST) and 545 bp (TG5), were confirmed in gel agarose 1% with ethidium bromide, and the purified technique pepsis-97, and sent to a laboratory for sequencing. Sequences were assembled and edited with the Vector NT Suite 8.0 software for the consensus sequences and compared with the database of the NCBI with homologous sequences BLAST. The results corroborate the fragments expected for both CAST and TG5 gene by primers reported in AF159246 and M35823, respectively. The consensus sequences showed a maximal identity of 85 and 84% for the CAST gene compared to sequences in BLAST. For TG5 the maximal identity was 99 and 98%. The consensus sequences were registered in the NCBI database with number KP866922 (CAST) and KP866923 (TG5) for analysis and validation by the staff of GenBank. It is concluded that the use of genomic tools help to identify the expression of a gene which codifies for a productive characteristic.

**KEYWORDS:** Calpastatin, Thyroglobulin, SNP, Marbling, Tenderness.

### 8.3 INTRODUCCIÓN

Para el hombre moderno, la carne sigue siendo la base de la dieta, recordando su papel en la evolución de nuestra especie, pero su producción se ha desarrollado como una industria enfocada no solo al abastecimiento del producto y a suplir un requerimiento nutricional (Ortigues *et al.*, 2006), sino con una concepción de satisfacer sensorialmente al consumidor, mediante el ofrecimiento de carne con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y de calidad textural (Straadt *et al.*, 2007). Varios parámetros son establecidos como propiedades de la carne, entre los que se destacan la apariencia, el color, el sabor, el contenido de grasa, la textura, la ternura y la capacidad de retención de agua (Ciobanu *et al.*, 2004). Sin embargo las prácticas de selección y disponibilidad de la compra o el abasto de ganado que cumpla con las características fenotípicas- genotípicas que exprese los atributos de calidad que demandan los mercados nacionales e internacionales, en la mayoría de los casos suelen ser limitadas. Sumando a esta situación factores que aumentan la variabilidad de acuerdo a la edad, la dieta, el tipo de producción, incluso la misma respuesta del propio individuo. En la actualidad la genómica ha sido fundamental en el descubrimiento de la arquitectura genética de características productivas identificando variantes alélicas que predicen la habilidad para desarrollar dichos rasgos (Alla y Smith 2008). Los cuales han sido asociados a los parámetros de calidad, entre ellos destacan el gen calpastatina (CAST),  $\mu$ -calpaína (CAPN1), tiroglobulina (TG5), leptina (LEP), Miostatina (MSTN). La calpastatina (CAST) es una enzima inhibidora de las calpaínas, principales enzimas proteolíticas del músculo esquelético. Esta codificada por el gen CAST, a partir del cual se pueden expresar cuatro isoformas proteicas diferentes debido a la existencia de cuatro promotores distintos. Este gen ha sido estudiado como candidato para explicar diferencias de origen genético en la ternura de la carne. En bovinos se han descrito varios polimorfismos del tipo SNP en distintas regiones del gen. El gen que codifica a la CAST se localiza en el cromosoma 7 del bovino (Bishop *et al.*,

1994) y está organizado en 35 exones y sus respectivos intrones, abarcando aproximadamente 130 kb. Barendse (2002) identificó una sustitución de Guanina por Adenina (G/A) en el extremo 3' no traducido del ARN mensajero de CAST (posición 2959 de la secuencia AF159246 del GenBank), estableciendo que el alelo A se asociaba a carne más tierna. Este resultado posteriormente fue confirmado por Casas *et al.*, (2006) utilizando razas puras *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas. Por su parte Morris *et al* (2006) analizó este mismo polimorfismo en novillos de distintas razas *Bos taurus* hallando diferencia entre los valores de resistencia al corte del genotipo favorable (AA). Recientemente se ha evaluado el efecto de este SNP en la raza Nelore y en cruzas índicas, reportando que el genotipo AA presentó una resistencia al corte menor que el heterocigoto, hallándose una diferencia de 0.42 kg entre ambos genotipos (Curi *et al.*, 2009).

Otra característica como el marmoleo cuyo gen codificante es la tiroglobulina (TG5) en el cual se encuentra un SNP en la posición -537 de la región promotora 5' (Barendse 1999, Barendse *et al.*, 2004) es uno de los principales parámetros utilizados para la valoración de la calidad de la carne ya que influye directamente en sus características organolépticas.

El conocimiento y aplicación de estas estrategias de la Biología Molecular, permiten establecer el efecto de un gen en la expresión de un carácter productivo. Aun cuando el uso de los genes candidatos parece un proceso lógico, se han caracterizado pocos genes, ya que los genes involucrados en la expresión de un carácter son por lo general desconocidos. En muchos casos la secuencia del gen indica su potencial función (hidrolasa, isomerasa, ligasa, oxidoreductasa, etc.) pero se desconoce el proceso biológico en el que participan o bien su interacción con otros genes. Por lo tanto, seleccionar un gen candidato sin entender su relación con otros genes podría conducir a malas elecciones en estudios de esta naturaleza.

#### **8.4 JUSTIFICACIÓN**

Existen genes candidatos que influyen en caracteres productivos que se han identificado en las diferentes especies domésticas. Aquellos identificados, están siendo utilizados para incrementar la cantidad y calidad de la carne. Esta información permitirá tener un mayor conocimiento de los procesos genéticos por los cuales se expresa un carácter productivo.

#### **8.5 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia del gen Calpastatina (CAST) ligado a la ternera y del gen Tiroglobulina (TG5) al marmoleo de la carne en ganado bovino de una engorda en etapa de finalización.

#### **8.6 HIPÓTESIS**

El gen calpastatina y tiroglobulina están presentes en los novillos de engorda empleados para esta investigación, relacionados con características de ternera y marmoleo de la carne.

## **8.7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *8.7.1 Lugar de realización de la investigación*

Las muestras de sangre para realizar esta investigación se colectaron de ganado bovino proveniente de una engorda comercial del Rancho Hualul (cruza *Bos taurus x Bos indicus*), destinado para el sacrificio en las instalaciones del Frigorífico de Tamuin localizada en el Municipio de Tamuin, San Luis Potosí, México, a una altitud de 20 msnm ubicado a 22° 00' 25''N 98°47'19''O, con una temperatura media de 16 ° y 53 % de humedad relativa.

La extracción de DNA de las muestras de sangre se procesaron en las instalaciones del laboratorio 209 de Fisiología de la Interacción Planta Patógeno, Programa de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Edo de México.

### *8.7.2 Toma de muestras*

Se tomaron muestras de sangre de 400 novillos de las razas cruza Cebú, Pardo Suizo, Simmental con un peso promedio de 450 kg, los cuales se encontraban en corral de recepción para ser sacrificados, todos los animales tuvieron en mismo origen de engorda y fueron transportados bajo las mismas condiciones y sacrificados el mismo día.

Las muestras de sangre se colectaron de vena yugular empleando tubos vacutainer de 5 mL con anticoagulante EDTA y se conservaron en refrigeración hasta llegar al laboratorio en donde se conservaron en congelación a -40°C hasta realizar la extracción de DNA.

### *8.7.3 Fase de laboratorio*

Para los análisis moleculares se realizó extracción de DNA a partir de las muestras de sangre de los 400 novillos por la reacción en cadena de la polimerasa directa (PCR Directa) usando el kit Thermo Scientific Fusión Sangre PCR Directa (kit Thermo Scientific #F-547L-500 rxns) (Cuadro 7), siguiendo el protocolo para realizar la mezcla de reacción que se

describe en el (Cuadro 8). La amplificación por PCR se realizó utilizando los iniciadores específicos CAST No. Acceso GenBank: AF159246 (Casas *et al.*, 2006) y TG5 No. Acceso GenBank M35823 (Barendse, 1999; Barendse *et al.*, 2004), solicitados al IBT-UNAM. Las secuencias de los iniciadores específicos se muestran en el (Cuadro 9).

Cuadro 7. Componentes del kit Thermo Scientific Fusión Sangre PCR Directa.

<b>COMPONENTE</b>	<b>500 rxns</b>
Fusión Sangre II DNA polimerasa	200 $\mu$ L
2 X Fusión Sangre PCR buffer (incluye dNTPs y MgCl <sub>2</sub> )	5 x 1.25 mL
Primer Control Universal	40 $\mu$ L
50 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 mL
50 mM solución de MgCl <sub>2</sub>	1.5 mL
100 % DMSO	05 mL

Siguiendo el protocolo del Kit PCR directa se mezclaron los componentes en tubos PCR y se colocaron en el termociclador (Techne ® Incorporated Modelo TC-512) (Figura 2B) usando el protocolo que se describe en el (Cuadro 10). Las concentraciones de los productos de PCR se leyeron en un Nanodrop (ND-1000, Nanodrop Technologies) y se verificaron en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X (Tris Base-EDTA) usando la técnica de electroforesis con una cámara modelo 75.1214-20D (Continental Lab Products División Apollo®) (Figura 2A). Los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> el cual fue depositado antes de depositarlo en la cámara de electroforesis. En cada pozo se depositó un volumen final de 7  $\mu$ l (2  $\mu$ l de colorante azul de bromofenol y 5  $\mu$ l de producto de PCR), usando como buffer de corrida TAE 1 X. Las condiciones de electroforesis fueron 1 hora 30 minutos a 80 voltios. El marcador empleado

fue de 100 bp (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder #SM0241). Las bandas amplificadas fueron visualizadas con Transiluminador UV (Bio Rad® Modelo Gel Doc 2000) con el programa Quantity One 4.0.3 (Figura 2C).

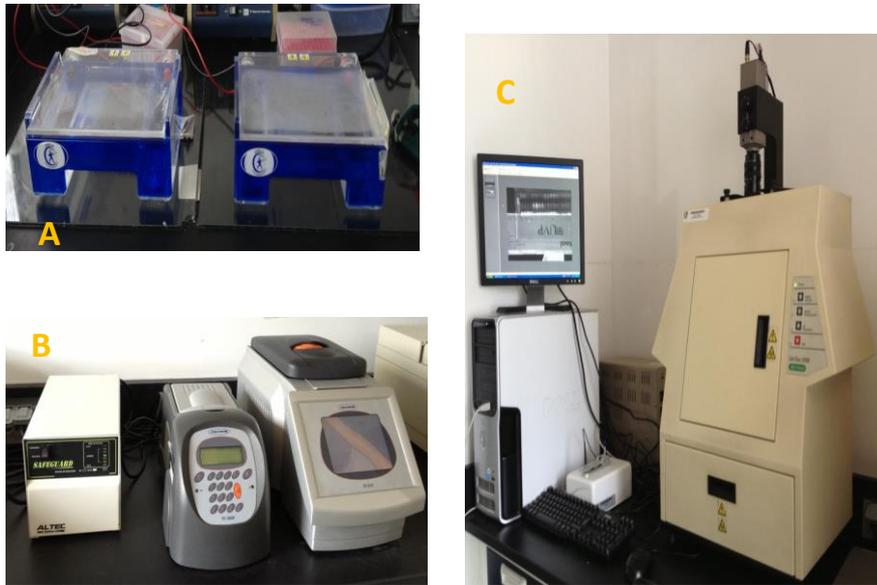


Figura 2. Equipo de laboratorio de Biología Molecular: A) Cámaras de electroforesis, B) Termociclador, C) Transiluminador de luz UV.

Fuente: Equipo del laboratorio 209 Fisiología de la Interacción Planta Patógeno, Programa de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Edo de México.

De las 400 muestras realizadas se seleccionaron 100 productos de PCR directa y se purificaron siguiendo el protocolo de PEPSIs-97 (Marziliano *et al.*, 1997) (Anexo 1) para ser enviadas a secuenciar al IBT por secuenciación automatizada de DNA. Las condiciones de envío de las muestras fueron las siguientes: los productos de PCR se purificaron por gel (PEPSIs-97) y se entregaron 100 ng, mezclados con 10 pmolas de oligo, en un volumen final de 16  $\mu$ l.

Cuadro 8. Protocolo de reacción para extracción de DNA por PCR Directa.

COMPONENTE	1 X ( $\mu$ L)
PCR Buffer	10
Primer F	1.25
Primer R	1.25
DNA Polimerasa	0.4
Muestra de Sangre	1
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6
50 mM EDTA	1.0
DMSO	1.0
Agua	3.5
Volumen Total	20

Cuadro 9. Iniciadores CAST y TG5 usados en esta investigación.

<b>GEN</b>	<b>No. Acceso</b>	<b>Iniciador (Sentido)</b>	<b>Iniciador (Antisentido)</b>	<b>SNP</b>
CAST	AF159246	5'-AAG TAA AGC CAA AGG AACACA CA-3'	5'-AGG CTT TTT GGC TGA AAA CA-3'	A/G
TG5	M35823	5'-GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA-3'	5'-GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG-3'	C/T

La secuenciación de los productos de PCR de los patrones de bandeado se ensamblaron y editaron con el programa Vector NT Suite 8.0 (Figura 3), para obtener las secuencias consenso, las cuales fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con las secuencias homologas del algoritmo Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) Figura 4.

Cuadro 10. Datos de la programación en el termociclador.

<b>FASE</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
Desnaturalización inicial	98 °C	5 min
35 ciclos	98 °C	1 s
Alineamiento	55 °C	35 s
	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	1 min



Figura 3. Ensamble y edición con el programa Vector NT Suite 8.0.

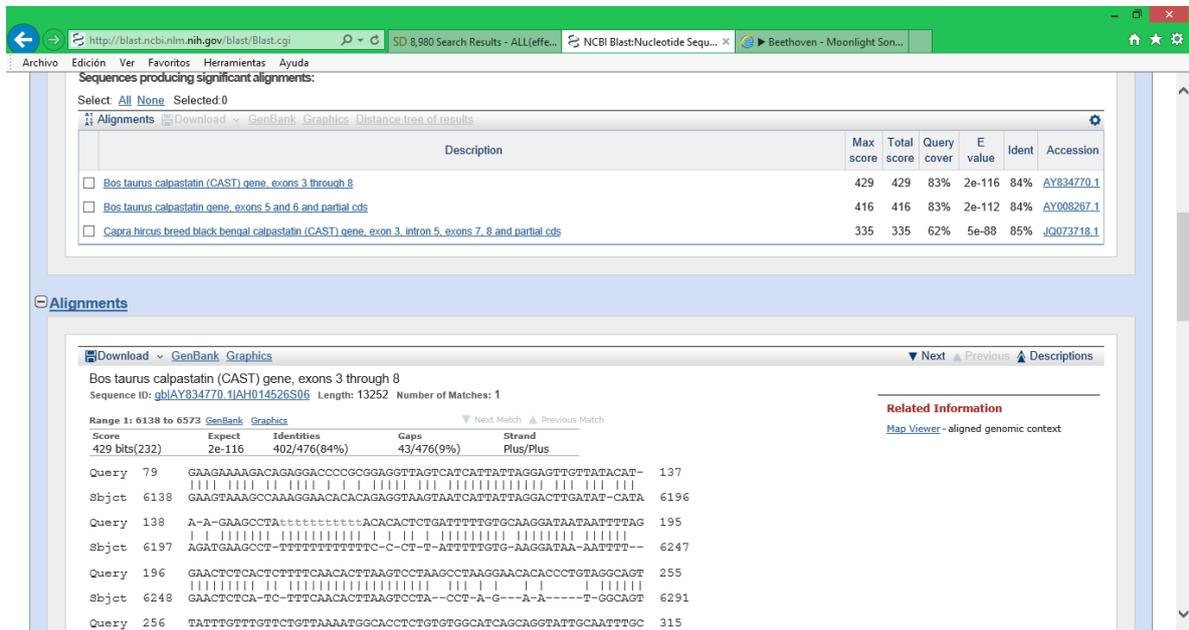


Figura 4. Secuencias homologas del BLAST.

## 8.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los iniciadores utilizados permitieron la amplificación del fragmento 495 pb del gen CAST y el fragmento 545 pb del gen TG5, usando PCR directa en muestras de sangre empleando el protocolo del Kit de ThermoScientific (Figura 5). Los cuales corroboran lo reportado con la información del GenBank y los números de acceso reportados para estos genes.

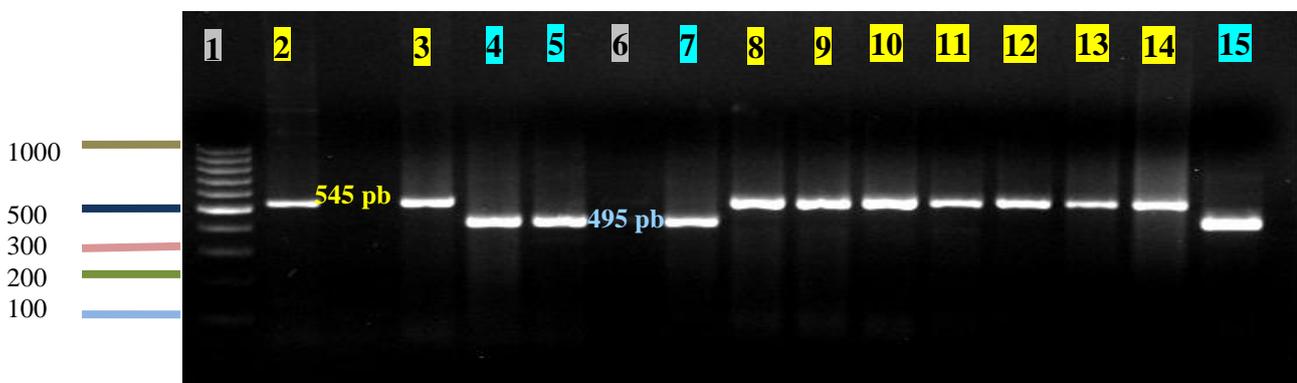


Figura 5. Carriles: 1 y 6) Marcador 100-pb (Fermentas™); Carriles 2, 3, 8-14) Amplificación del gen Tiroglobulina (TG5) en muestras de sangre provenientes de bovinos de engorda (*Bos taurus* x *Bos indicus*); Carriles 4, 5 7 y 15) Amplificación del gen calpastatina (CAST) en muestras de sangre provenientes de bovinos de engorda (*Bos taurus* x *Bos indicus*).

Las secuencias consenso ensambladas y editadas de esta investigación tuvieron una máxima identidad del 84 % con las secuencias de nucleótidos depositadas en la base de datos del GENBANK con el gen CAST (No. de Acceso: AY834770.1 y AY008267.1) y un 85 % para la secuencia del gen CAST (No. de Acceso JQ073718.1). Para este gen de la Calpastatina (CAST), inhibidor natural de las calpaínas, se han presentado resultados experimentales confirmando (Green *et al.*, 1996 a y b) y refutando (Lonergan *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2001) su asociación con la variabilidad en terneza. Esta inconsistencia en los

resultados se presenta debido a que las calpaínas son enzimas que se producen naturalmente en los músculos y tiene la función de ablandar las fibras musculares, después del sacrificio de los animales. Sin embargo las calpaínas son inhibidas por las calpastatina y con esto se detiene la función sobre la maduración después del sacrificio (Soria y Corva, 2004).

Por otro lado las calpaínas, como lo menciona (Fernández, 2005), algunos investigadores han sugerido que controlando la genética de los animales se puede resolver el problema de la terneza, la que varía entre razas y dentro de una raza. Sin embargo, la información reportada indica que los factores ambientales también tienen una contribución igual a la variación de la terneza. Los mejores indicadores sugieren que, dentro de una raza, la genética controla el 30 % de la variación de la terneza. Este 30 % representa la heredabilidad (efecto de genes aditivos) de estas características. En consecuencia, dentro de una raza, el 70 % de la variación se explica por factores ambientales y efectos de genes no aditivos. Entre razas, la variación es igual o menor que dentro de una raza. Sin embargo, entre los bovinos de todas las razas, aproximadamente el 46 % de la variación de la terneza es de origen genético y el 54 % ambiental. Esto explica que, entre razas o dentro de una raza, puede ser controlada por factores ambientales, como días de engorda, la energía de la dieta, el estrés, la edad del animal y el método de cocción.

Para el gen TG5 se encontró una homología de un 99 % de identidad con las secuencias con numero de Accesoión KF202096.1 y X05380.1, y con un 98 % de identidad con las secuencias del número de accesoión AM490264.1, AM490270.1, AM490268.1, AM490265.1 y AY615525.1.

Siendo el marmoleo una característica cuantitativa afectada por muchos genes y existiendo una gran variación entre individuos y razas, como lo ha reportado (Casas *et al.*, 2007), en los resultados obtenidos en la presente investigación se encontró una homología del 99 % de identidad con el SNP propuesto por tener un efecto sobre el marmoleo de la carne y

que se ha localizado en la posición 422 del número de accesoión X05380. Este marcador se ha asociado con el marmoleo de la carne y se ha validado en corrales de engorda (Van Eenennaam *et al.*, 2007) y también en corrales de engorda de Australia (Barendse *et al.*, 2004).

Como se puede observar la información a partir del empleo de las herramientas de la bioinformática permiten corroborar información existente de las secuencias reportadas en el GenBank, sin embargo para explicar la asociación de características relacionadas con características de producción es indispensable realizar estudios que validen la asociación de los genes candidatos seleccionados con variables como resistencia al corte, ultrasonografía para predecir el grosor de la grasa en la canal.

## **8.9 CONCLUSIÓN**

Los resultados de esta investigación sugieren que tanto el gen CAST como el TG5 son marcadores útiles para la calidad de la carne.

## 8.10 LITERATURA CITADA

Allan MF, Smith TPL. (2008). Present and future applications of DNA technologies to improve beef production. *Meat Science* 80: 79-85.

Barendse W. (1999). Assessing lipid metabolism. International patent application PCT/AU98/00882, international patent publication WO 99/23248.

Barton-Gade PA. (1988). The effect of breed on meat quality characteristics in pigs. In: *Proceedings 34<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*. Brisbane, Australia.

Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase Jr CC, Johnson DD and Smith TPL. (2006). Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84: 520-525.

Casas E, White SN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M, Bennett GL, Smith TP. (2007). Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass trait in beef cattle. *Journal Animal Science* 85: 2807-2814.

Ciobanu D, Bastiaansen J, Lonergan S, Thomsen H, Dekkers J, Plastow G y Rothschild M. (2004). New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science* 82: 2829-2839.

Chung HY, Davis ME and Hines HC (2001). Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. *Animal Genetics* 32:53

Fernández AM (2005). Marcadores moleculares, su relación con la carne. *Rev. Angus, Bs.As.*, 229:20-26.

Green RD, Cockett NE, Tatum FD, O'Connor SF, Hancock DL and Smith GC. 1996a. Association of a Taq1 calpastatin polymorphism with postmortem measures of beef tenderness in Bos Taurus and Bos indicus- Bos Taurus steers and heifers. *Journal Animal Science* 74 (Supplement 1) 111 (Abstract).

Green RD, Cockett NE, Tatum FD, O'Connor SF, Hancock DL and Smith GC. 1996b. Association of a Taq1 calpastatin polymorphism with postmortem measures of beef tenderness in Charolais and Limousin-sired steers and heifers. *Journal Animal Science* 74 (Supplement 1) 113 (Abstract).

Lonergan SM, Ernst CW, Bishop MD, Calkins CR and Koohmaraie M. 1995. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *Journal Animal Science* 73:3608-3612.

Marziliano N, Zuccotti M, Redi CA and Garagna S. (1997). PEPSIs-97: a nested device for high recovery of DNA from agarose gels. *Technical Tips Online* 2: 169-170.

Ortigue I, Thomas E, Prévéraud D, Girard C, Bauchart D, Durand D y Peyron A. (2006). Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats, pp. Water losses and vitamin B12. *Meat Science* 73: 451-458.

Soria LA y Corva PM (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la ternura de la carne bovina. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal* 12 (2):73-88.

Straadt I, Rasmussen M, Andersen H y Bertram H. (2007). Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss- A combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxation study. *Meat Science* 75: 687-695.

Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE and Thomas MG (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal Animal Science* 85: 891-900.

## ANEXO 1

### PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN POR GEL EMPLEANDO EL PROCEDIMIENTO PEPSIs-97

Existen varios métodos de purificación de ADN de geles de agarosa (Sambrook, 1989; Weichnan, 1991; Glenn, 1994) el procedimiento desarrollado fue el de Glenn *et. al.*, (1994) modificado por Marziliano *et. al.*, (1997) quienes describen al proceso como un método fácil, económico y eficiente y el cual se describe a continuación.

#### PROCEDIMIENTO:

1.-Una vez obtenidos los productos de PCR, se corroboran las bandas en gel de agarosa con bromuro de etidio y TAE 1x, una vez revelado el gel se procede a cortar las bandas de interés y serán depositadas en un sistema (Fig. A1). Todo el material debe estar previamente esterilizado.

2.- El sistema conocido con el término de PEPSIs, consiste en colocar dentro de un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL otro tubo de microcentrifugación de 0.6 mL al cual se le debe de agregar sílice (arena que se obtuvo de la trituración de pipetas Pasteur de vidrio, hasta obtener una arena muy fina, la cual cumple la función de columna).



Figura A1. Sistema de procedimiento PEPSIs-97.

3.-Cortar el gel de agarosa con las bandas que se requieren purificar y colocar en el tubo, se debe de tener cuidado de cortar la banda lo más delineada que se pueda para obtener el fragmento que se requiere filtrar, es suficiente con una banda por tubo. El corte se debe de realizar en una lámpara de UV de preferencia en un cuarto oscuro y el uso de lentes protectores (Fig. A2).

4.- Preparados cuantos tubos se requiera, se colocan en una microcentrifuga a 13,000 rpm durante 25 minutos, Glenn *et. al.* (1994) sugieren velocidades de 12,000 – 14,000 rpm y un tiempo de 30 a 50 minutos, sin embargo Marziliano *et. al.*, (1997) obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de 25 minutos. El número de veces a centrifugar son las que se requieren tantas veces hasta no observar fracciones de gel en el filtro.

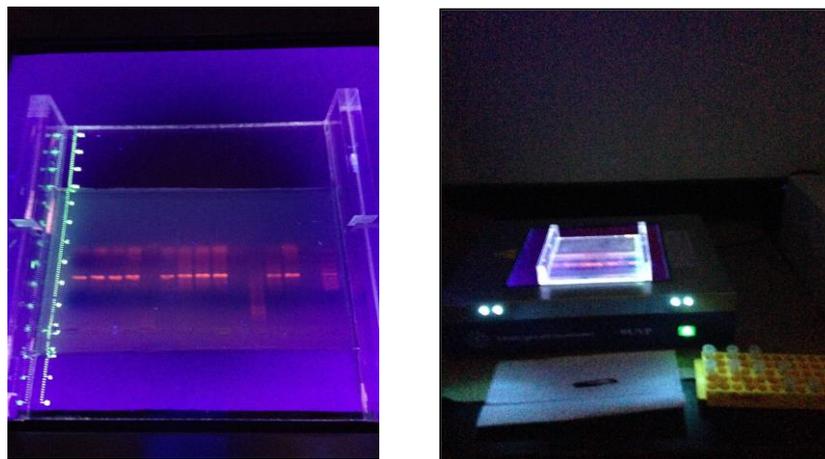


Figura A2. Corte de gel para purificación por la técnica PEPSIs

5.- Posteriormente se retira el tubo de microcentrifugación que contiene el filtro y se adiciona al sobrenadante obtenido para su precipitación, 1 volumen por volumen de acetato de sodio y 2.5 volumen por volumen de etanol absoluto. Mezclar varias veces y congelar a -20 °C durante 12 horas.

6.- Después de las 12 horas a -20 °C, se vuelve a centrifuga a 13,000 rpm durante 10 minutos.

7.- Una vez que se centrifuga y se observa el pellet, se retira el sobrenadante se deseca en la cámara de flujo laminar durante 15 minutos y se resuspende el pellet en 100  $\mu$ L de agua inyectable.

8.- Se analiza el producto de la purificación en gel de agarosa al 1 % y se cuantifica su concentración en el nanodrop.

**Resultados:** Usando este protocolo descrito, se obtuvo una concentración de 40 ng/μl y el revelado en el fotodocumentador se muestra en la (Fig. A3).

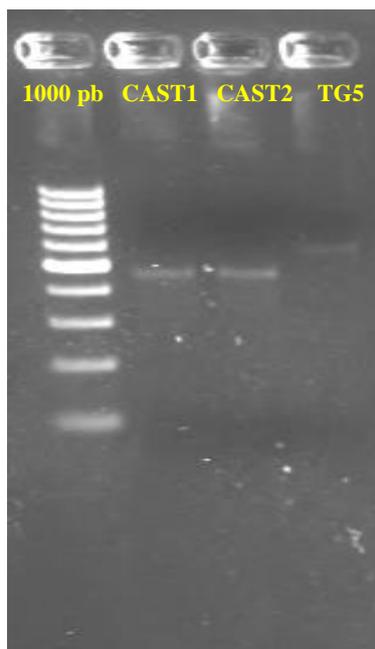


Figura A3. Revelado del producto de purificación.

#### **LITERATURA CITADA**

Glenn, T.C. and Glenn, S.J. 1994. Trends Genet. 10, 334.

Marziliano N., Zuccotti M., Redi CA and Garagna A. 1997. PEPSIs-97: a nested device for high recovery of DNA from agarose gels. Technica Tips Online vol. 2: 169.

Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Weichnan, D. 1991. Trends Genet. 7, 109.