



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
ANIMAL

DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE GENES ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LA CARNE EN BOVINOS



Lic. Eileen Armstrong Reborati

**Memoria para optar al grado de
DOCTOR dirigida por los Doctores
Susana Dunner Boxberger y
Javier Cañón Ferreras**

Madrid 2011

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
Calidad de la carne y la canal bovinas	11
Importancia de la carne como alimento. Mercado mundial de la carne bovina	11
Evaluación de la calidad de la carne y la canal bovinas.....	13
Marcadores moleculares en producción animal.....	19
Selección Asistida por Marcadores (MAS).....	19
Aplicación de MAS en planes de mejora genética de bovinos de carne	23
Secuenciación del genoma bovino	25
Búsqueda de polimorfismos genéticos asociados a características de la carne y la canal.	26
Aproximación por genes candidatos.....	26
Análisis estadísticos de asociación genotipo-fenotipo.....	28
El Proyecto GeMQual.....	30
OBJETIVOS.....	33
General	33
Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Muestra de animales	35
Banco de datos fenotípicos	37
Genes y polimorfismos analizados	39
Métodos de genotipado utilizados	42
Genotipado por PCR-SSCP.	42
Genotipado por Multiplex Primer Extension.....	44
Análisis estadístico	47
Análisis de las variables fenotípicas.	47
Análisis de genética poblacional.....	47
Análisis de asociación genotipo-fenotipo.	48
RESULTADOS.....	51
Genotipos obtenidos.....	51
Análisis de los fenotipos	51
Parámetros poblacionales	52

Análisis de asociación genotipo-fenotipo	54
Resultados significativos y cercanos a la significación por gen.....	56
DISCUSIÓN	75
Métodos de genotipado utilizados	76
Muestra de animales y metodología estadística utilizadas.....	76
Análisis de genética poblacional.....	82
Asociaciones detectadas	86
Gen GDF8	86
Gen CYP1A.....	90
Gen CAPN1.....	92
Gen LEP.....	94
Gen CFL1	98
Genes PPARG y PPARGC1A	100
Gen SCD	104
Gen HSPB1	106
Gen PCSK1	108
Otros genes con resultados cercanos al nivel de significación.....	109
Efectos detectados y su aplicabilidad en MAS.....	114
Estudios futuros y perspectivas	119
MAS y Selección Genómica	123
Consideraciones finales	126
CONCLUSIONES	129
CONCLUSIONS.....	131
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXO 1	155
ANEXO 2	157
ANEXO 3	161

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las siguientes personas e instituciones sin las cuales esta tesis no hubiera sido posible:

-a mi tutora, la Dra. Susana Dunner Boxberger, por su gran y valiosa ayuda y por darme la posibilidad de estudiar en el prestigioso equipo de investigación que ella dirige.

-al Dr. Javier Cañón Ferreras, por sus valiosos comentarios y correcciones.

-a la Dra. Pam Wiener y al Dr. Ricardo Pong-Wong, por su gran colaboración y apoyo durante mi estancia en Roslin Institute.

- a la Dra. Natalia Sevane, por su gran ayuda e invaluable amistad durante todos estos años.

-a todos los integrantes del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por su colaboración y amistad.

-a los integrantes del Departamento de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria, así como a otros investigadores de la Universidad de la República (Uruguay), por su colaboración durante mi ausencia y especialmente a los Dres. Raquel Correa, Fernando Macedo, Beatriz Mernies, Elly Navajas y Mariana Carriquiry, por sus invalores consejos durante la confección de esta tesis.

-a la Universidad Complutense de Madrid, la Universidad de la República, la Comisión Sectorial de Investigación Científica del Uruguay y al Programa de Desarrollo Tecnológico de Uruguay, por el importante apoyo económico recibido.

-al proyecto GeMQual y sus integrantes, por permitirme utilizar una base de datos tan preciada, y también a la Dra. Beatriz Gutiérrez-Gil, de la Universidad de León, por aportarme datos valiosos para esta tesis.

-a mi familia y muy especialmente a Andrés, por su apoyo y colaboración durante todos estos años.

Muchas gracias!!!

RESUMEN

La alta demanda de proteína animal seguirá existiendo y crecerá a medida que crece la población mundial. La carne bovina posee varios componentes necesarios para una dieta saludable, y la producción actual apunta a mejorar la calidad del producto. Los marcadores moleculares pueden ser de gran utilidad en la selección de reproductores para características difíciles de medir y de baja heredabilidad, como son los caracteres relacionados con la calidad de la canal y de la carne. Gracias al conocimiento actual de los genomas es posible analizar genes candidatos con efectos medibles para características de interés en animales de renta. El presente estudio comprende 51 genes bovinos, elegidos por codificar proteínas y enzimas involucradas en vías metabólicas y procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo del tejido muscular y adiposo. Utilizando la técnicas *PCR-SSCP* y *Multiplex-Primer Extension* se genotiparon 450 animales para 61 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) presentes en estos genes, pertenecientes a 15 razas europeas de biotipos diversos. Para estos animales se cuenta con registros precisos de crecimiento, características de la canal, terneza y jugosidad de la carne, contenido de colágeno, cantidad de grasa intramuscular, composición de ácidos grasos, pH, etc. (Proyecto GeMQual – Unión Europea). El análisis de asociación se efectuó por regresión lineal múltiple, incluyendo el genotipo, la raza y el establecimiento y año de sacrificio como efectos fijos, estableciéndose el umbral de significación mediante 10.000 permutaciones. Se detectaron asociaciones significativas entre las características de la canal y los genes *GDF8* (porcentaje de músculo, área de la chuleta, rendimiento y compacidad) y *HSPB1* (pH); entre el contenido de colágeno en la carne y los genes *GDF8* y *PCSK1*; entre el gen *CAPN1* y la actividad de de las proteasas responsables de la terneza de la carne madurada; entre la jugosidad de la carne y el gen *CYP1A1*; entre los genes *LEP*, *SCD*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *HSPB1* y *CFL1* y la cantidad neta y porcentual de varios ácidos grasos, algunos de gran importancia para la salud humana. Además se hallaron otras asociaciones cercanas al nivel de significación para varias características de interés. Los efectos detectados son moderados y pequeños, concluyendo que los caracteres fenotípicos estudiados son fruto de la acción de varios genes. Los parámetros poblacionales calculados mostraron que existen diferencias entre las razas debidas a la historia evolutiva de cada una y a presiones selectivas tendientes a mejorar su productividad en diferentes condiciones ambientales y de mercado. El análisis más exhaustivo de estos genes y sus

polimorfismos permitirá su aplicación futura en selección asistida por marcadores para mejorar la calidad sensorial y nutricional de la carne bovina.

ABSTRACT

The high demand for animal protein will continue and grow as long as the world's population increases. Cattle meat has several components necessary for a healthy diet, and the current trends in beef production are headed towards the improvement of its quality. Molecular markers can be very useful in selecting breeding animals for traits of low heritability that are difficult to measure, like the ones related with meat and carcass quality. Thanks to the advances in genomic sciences it is possible to analyze candidate genes with measurable effects on the phenotype for traits of interest in animal production. The present study comprises 51 bovine genes, selected for coding proteins and enzymes involved in metabolic pathways and physiological processes related to muscle and adipose tissue development. By means of PCR-SSCP and Multiplex-Primer Extension techniques, 450 animals were genotyped for 61 single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in these genes. The animals belonged to 15 European breeds of several productive biotypes, with accurate records related to growth and carcass traits, meat tenderness and juiciness, collagen and intramuscular fat content, fatty acid profiles, pH, etc. (GeMQual Project – EEC). The association study was achieved by multiple linear regression analysis, including genotype, breed, farm and slaughter date as fixed effects. Significance thresholds were established through permutation tests (10.000 permutations). Significant associations were detected between carcass traits and genes *GDF8* (muscle percentage, rib area, dressing percentage and blockiness) and *HSPB1* (pH); between collagen content and genes *GDF8* and *PCSK1*; between *CAPN1* gene and the activity of the proteases responsible for meat tenderness; between meat juiciness and gene *CYP1A1*; and between genes *LEP*, *SCD*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *HSPB1* and *CFL1* and several fatty acids' content, some very important in human health. Other associations near to the significance threshold were found for several interesting traits. The detected effects are low to moderate, concluding that the phenotypic traits studied are the result of the interactions of many genes. Population genetic parameters showed differences between breeds due to their history and evolution, and probably to selective pressures towards productive gain. A more exhaustive analysis of these genes and their polymorphisms would allow their potential use in marker assisted selection in order to improve beef sensorial and nutritional quality.

INTRODUCCIÓN

Calidad de la carne y la canal bovinas

Importancia de la carne como alimento. Mercado mundial de la carne bovina

El consumo de proteínas de origen animal es una constante en las sociedades modernas asociada al desarrollo económico de la población. Si bien varía la cantidad, las especies consumidas (bovina, ovina, suina o aviar) y la forma de preparación de una región geográfica a otra, según variables culturales, históricas y económicas, todos los pueblos de la actualidad incluyen algún tipo de carne en su dieta. La alta demanda de proteína animal seguirá existiendo y crecerá a medida que crece la población mundial (Aaslyng, 2009; Caputi y Méndez, 2010).

La carne bovina posee varios componentes necesarios para una buena dieta que permita conservar la salud, especialmente proteínas de alto valor nutricional, hierro y otros minerales, vitaminas del complejo B y ácidos grasos. Si bien presenta un alto contenido de grasas saturadas, las cuales aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares y determinados tipos de cáncer, no difiere demasiado en este sentido de otras carnes consideradas “más saludables”, como el cerdo y el pollo. Con respecto a la grasa, no importa sólo su cantidad sino también su calidad, en cuanto a la composición de ácidos grasos, proporción de ácidos grasos omega 3 vs. omega 6 ($\omega 3/\omega 6$), etc. En relación a esto, la carne bovina presenta niveles mejores que otras carnes (Aaslyng, 2009; Grompone, 2010).

La producción mundial de carne bovina asciende a casi 100 millones de toneladas anuales. El Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) concentra el 25% del stock mundial de vacunos -unas 250 millones de cabezas- y hace que América del Sur como continente participe con casi el 50% de las exportaciones de carne bovina. Junto con Oceanía, son las regiones predominantes en cuanto a la producción y exportación de este producto. Por otro lado, la Unión Europea, América del Norte y Asia, si bien producen carne vacuna en gran cantidad, no es suficiente para atender a su demanda interna y son predominantemente importadores. La productividad está condicionada a la existencia de recursos naturales, a los costos de producción y a las políticas de desarrollo de cada región. Existen dos tipos básicos de sistemas de producción: unos basados en el pastoreo extensivo,

utilizados fundamentalmente en América del Sur y Oceanía, y otros basados en la estabulación o el confinamiento, generalmente presentes en América del Norte y Europa Occidental. El tipo de sistema productivo (pastoril o de engorde intensivo; con o sin promotores del crecimiento; etc.) condiciona el tipo de producto y los mercados a los que se puede acceder (UCO, 2006; Caputi y Méndez, 2010).

La cantidad de bovinos en la UE era de 88.115.891 cabezas en 2004. Es un sector de gran importancia económica, ya que aporta el 11% de la producción agraria y ha sido un sector preferencial de la Política Agrícola Común (PAC). En España la cantidad de vacunos era de 6.700.000 en 2006, con una producción de alrededor de 650.000 toneladas anuales de carne bovina. El 80% de esta producción se destina al consumo en el hogar. Si bien bajó el consumo y la producción debido a la crisis generada por la encefalopatía espongiforme bovina en 2002, sigue siendo la carne de mayor valor (Barreiro, 2005; UCO, 2006; <http://www.aice.es/>).

Por otro lado, Uruguay es un país marcadamente ganadero, con 12 millones de cabezas. El 83% de su producción de carne es de origen vacuno. Presenta una fuerte orientación al mercado externo ya que exporta entre el 70 y el 75% de la carne que produce, a diferencia de Argentina o Brasil, por ejemplo, cuya exportación de carne supone del 10 al 20% de su producción. Al igual que los otros países del Mercosur, su ganadería se basa en sistemas pastoriles, sin confinamiento de los animales y sin utilización de hormonas u otros promotores del crecimiento (Instituto Nacional de Carnes de Uruguay, www.inac.gub.uy).

El consumo promedio de carne bovina en el mundo es de aproximadamente 9,6 kg por persona al año. Esto varía mucho según el nivel de desarrollo, los hábitos de consumo y la facilidad en el acceso al producto de cada país. En la Unión Europea el consumo promedio es de 19,7 kg y en España de 17 kg, mientras que en un país netamente ganadero y exportador como Uruguay el consumo es de casi 60 kg de carne vacuna al año por habitante (UCO, 2006; www.inac.gub.uy).

Los atributos más buscados por los consumidores de carne son la terneza y el sabor. La primera favorece la producción a base de concentrados, ya que al aumentar el nivel de veteado aumenta la terneza. Sin embargo, en los últimos años y especialmente en los países más desarrollados como los de la Unión Europea, se está consolidando la tendencia a la demanda de un producto más sano (con menos grasa), natural, con cuidado del medio ambiente y del bienestar animal, producido con responsabilidad social y altos estándares de seguridad alimentaria. Las demandas de los consumidores actuales apuntan a mejorar la calidad del producto, por lo que los productores y los generadores de material genético deberán incluir la

calidad como objetivo de producción para seguir siendo competitivos (De Felipe y Briz, 2001; Goodson *et al.*, 2002; Hocquette *et al.*, 2007; Caputi y Méndez, 2010).

Evaluación de la calidad de la carne y la canal bovinas

Los parámetros que inciden en mayor medida sobre la calidad de la carne y sus productos son el color, la textura, la composición química de la grasa, la capacidad de retención de agua, la jugosidad y el sabor. Para los consumidores, los atributos más importantes son la terneza, el sabor y la jugosidad, aunque al momento de comprar, la apariencia (básicamente el color y la cantidad de grasa visible) son las que más influyen en las preferencias. Por otro lado, las características de la canal también son determinantes de la calidad del producto final, afectando principalmente los tipos de cortes a obtener (Bernard *et al.*, 2007; Aaslyng, 2009; Feed, 2010). Existen diversas metodologías para evaluar objetivamente estos parámetros, las cuales se detallan a continuación.

Las características cualitativas de la canal son especialmente importantes desde el punto de vista de la industria, ya que inciden directamente en el rendimiento en carne del animal. Los factores que más inciden en el rendimiento carnicero son la raza, el sexo, la alimentación que ha recibido y la edad al sacrificio. La evaluación de la canal implica medidas morfométricas (longitud total, profundidad de pecho, longitud de la pierna, etc.), pesos (peso vivo, peso de la canal caliente y fría), el grado de engrasamiento (medición del espesor de grasa subcutánea), el rendimiento al desosado y la conformación. Las medidas morfométricas se toman en forma posterior al sacrificio, en la canal izquierda colgada del tendón del calcáneo. El índice de compacidad se calcula a partir del peso de la canal fría y la longitud de la canal (kg/cm). Para la evaluación de la conformación y del grado de engrasamiento usualmente se utilizan escalas visuales subjetivas, aunque últimamente también se han comenzado a aplicar tecnologías más modernas como el ultrasonido y el análisis de imágenes. El ultrasonido permite tomar medidas *in vivo*, como el área de la chuleta, el nivel de veteado y el espesor de grasa subcutánea. Al no depender del sacrificio del animal, estas medidas pueden ser tomadas en cuenta para la estimación de valores genéticos en individuos candidatos a selección. Por otro lado, el análisis de imágenes se utiliza principalmente para la clasificación objetiva de las canales en la planta frigorífica. Permite extraer datos de áreas, perímetros e índices de compacidad que sirven para estimar el rendimiento carnicero de las canales. Esta

información permitiría instaurar pagos diferenciales por calidad, fomentando la mejora genética en calidad del producto y no sólo en cantidad, como ocurre actualmente (Feed, 2010).

Junto con el rendimiento, la composición tisular es uno de los criterios más importantes a la hora de evaluar una canal. Se trata de medir las proporciones relativas en las que se encuentran todos los tejidos que la componen (muscular, óseo, adiposo, conjuntivo, nervioso y epitelial). Si bien lo ideal sería evaluar esto en el despiece total de la canal, es un método demasiado costoso y trabajoso que lo vuelve poco eficiente. Una alternativa es evaluar la composición tisular de una pieza anatómica determinada, para luego extrapolar los resultados a la totalidad de la canal, sirviendo como una muestra del total. La porción más utilizada es la chuleta a nivel de la décima costilla, a la cual se le efectúa una disección muy detallada y se pesan o miden todos los componentes extraídos. Se obtienen así los índices de porcentaje de hueso, porcentaje de músculo, porcentaje de grasa, proporción de músculo versus otros tejidos, etc. Este mismo corte puede ser utilizado para efectuar análisis químicos más complejos, como composición de la grasa y tipos de fibras musculares (Feed, 2010).

Existe gran variación en cuanto a los atributos sensoriales y químicos de la carne según el músculo presente en el corte (Rhee *et al.*, 2004). La evaluación de la calidad instrumental de la carne incluye análisis de laboratorio para evaluar la textura y la terniza, que se efectúan usualmente en el músculo *Longissimus dorsi*, presente en el corte comúnmente llamado “entrecot”. Existen varios factores que influyen en la terniza, como el tiempo y la temperatura de maduración de la carne, el largo del sarcómero, el pH, el grado de proteólisis *post mortem*, etc. (Maltin *et al.*, 2003). La proteólisis se refiere a una serie de procesos metabólicos anaeróbicos que comienzan en el músculo esquelético inmediatamente después del sacrificio del animal. Un sistema de proteasas activadas por el calcio intracelular (calpaínas y calpastatina) degradan las proteínas de las miofibrillas del músculo esquelético en condiciones *post-mortem*. La magnitud de este proceso de proteólisis es el mayor responsable de la variación de la terniza (Page *et al.*, 2002; Casas, 2002; Soria y Corva, 2004). Dada la complejidad de esta característica, para evaluarla se utilizan instrumentos y paneles sensoriales de catadores o de consumidores, de donde se extraerán datos objetivos (por ejemplo, resistencia al corte) y otros más subjetivos pero no menos importantes (aceptabilidad, palatabilidad, jugosidad, sabor, aromas, etc.). La fuerza de corte mecánica, o resistencia al corte, se mide a través de la guillotina o cizalla de Warner-Bratzler y se basa en la medición de la fuerza requerida para efectuar un corte de una muestra de carne en el sentido

perpendicular a las fibras musculares. Esta medida puede hacerse en distintos momentos del proceso de maduración de la carne y se efectúa en muestras cocidas bajo estrictos protocolos. También se utilizan células de compresión para emular la fuerza que deben hacer los molares durante la masticación, que miden la resistencia de la carne a la compresión hasta un nivel de deformación determinado, por ejemplo, al 20 o al 80% (Feed, 2010).

La capacidad de retención de agua se relaciona directamente con la jugosidad de la carne. Depende de la cantidad de agua que el tejido sea capaz de almacenar y retener después de todo el procesamiento (troceado, enfriamiento, congelación, envasado y cocción). Las pérdidas por goteo se producen mayormente después del troceado y pueden ser medidas en laboratorio (Bernard *et al.*, 2007; Feed, 2010).

La carne es básicamente tejido muscular, por lo que las propiedades de la unidad contráctil del músculo (el sarcómero) así como la composición de las diferentes fibras afectarán la calidad de la carne, principalmente su textura y terniza. La longitud del sarcómero puede realizarse mediante métodos histológicos u otras tecnologías (por ejemplo, láser o fluorescencia; Bielli, 2010; Feed, 2010).

El pH es otro factor que altera las propiedades de la carne. En condiciones anaerobias (*post-mortem*) se favorece la transformación de piruvato en ácido láctico. La acumulación de ácido láctico genera una disminución del pH, cuyo valor final va a depender del grado en el cual suceda este proceso durante la maduración de la carne. Usualmente la carne bovina de buena calidad alcanza valores cercanos a 5,5 al final del proceso de maduración. La evolución del pH tras el sacrificio afecta el color, la capacidad de retención de agua, la textura, la terniza y la vida útil del producto. Valores elevados se relacionan con cortes oscuros, firmes y secos, no apetecibles para el consumidor, por lo que se deben evitar. Los factores que alteran el pH son la dieta que recibió el animal, su sexo y edad, la raza, el estrés generado durante el transporte y sacrificio, el tiempo de espera antes del sacrificio y la pérdida de peso. Para medirlo se utiliza un pHmetro con un electrodo capaz de penetrar en la carne (Aaslyng, 2009; Feed, 2010).

Para la evaluación sensorial de la carne se utilizan paneles de catadores entrenados, aunque también es posible hacerlo con consumidores sin entrenamiento. Se trata de una de las evaluaciones más relevantes, ya que en última instancia las características del producto deben ser cuantificadas en relación a la percepción de las personas. Sin embargo, es uno de los métodos más difíciles de estandarizar, debido al problema que supone calibrar las preferencias y sensaciones humanas, y usualmente es de costosa implementación. Por ello, el

procedimiento de preparación de la carne y su posterior degustación debe efectuarse bajo estrictos protocolos que aseguren la mayor objetividad posible a la evaluación (Wheeler *et al.*, 2004; Simm *et al.*, 2009; Feed, 2010).

La composición y las cantidades relativas de los diferentes ácidos grasos presentes en los alimentos son de gran importancia para la salud humana. La prevención de enfermedades cardiovasculares, el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, el desarrollo del sistema nervioso central y visual del feto y del recién nacido, por ejemplo, se relacionan directamente con el balance adecuado de ácidos grasos en la dieta. En general, los lípidos provenientes de productos animales son percibidos como nocivos para la salud en comparación con los derivados de los vegetales. Esto se debe principalmente a su relativamente elevado contenido de colesterol, ácidos grasos saturados y grasas *trans*, que pueden contribuir a generar enfermedades cardiovasculares y cáncer, y a su relativamente bajo contenido en ácidos grasos favorables como los poli-insaturados. Sin embargo, existen ácidos grasos específicos producidos en el rumen que tienen importantes efectos benéficos, siendo de interés seleccionar animales con mayor contenido de estas sustancias (Bauman *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2004; De La Torre *et al.*, 2006).

En la carne, los lípidos constan principalmente de depósitos adiposos y fosfolípidos de las membranas celulares. Los depósitos se localizan en el tejido conectivo laxo entre los haces musculares (grasa intramuscular, que se observa como el veteado de la carne), debajo de la piel (grasa subcutánea) o intermuscular, y en la cavidad corporal (alrededor de los riñones, en la región pélvica y el corazón). Estos depósitos presentan grandes variaciones dependiendo de la edad, sexo, raza y estado nutricional del animal. A su vez, presentan diferencias en cuanto a su composición en ácidos grasos, siendo la grasa subcutánea y la intramuscular más insaturadas (menor punto de fusión) que la grasa visceral (Grompone, 2010).

Los lípidos de la grasa vacuna contienen una mezcla compleja de ácidos grasos en diferentes combinaciones, que varían en la longitud de la cadena de carbonos (de 10 a 26 carbonos), estructura de la cadena (recta o ramificada), grado de saturación (de cero a 6 dobles enlaces), tipo de dobles enlaces (conjugados o no conjugados), configuración (*cis* o *trans*) y ubicación de los dobles enlaces. En general la grasa vacuna contiene altos porcentajes de ácido palmítico y esteárico, lo que aumenta su punto de fusión, e isómeros *trans* de los ácidos grasos oleico y linoleico (incluyendo el linoleico conjugado o CLA), debido a la biohidrogenación en el rumen. La proporción de ácidos grasos poli-insaturados con respecto a los saturados es baja. La composición de la grasa vacuna varía en gran medida según la cantidad de grasa intramuscular, la dieta y factores genéticos (Kraft *et al.*, 2009;

Grompone, 2010). Los fosfolípidos de membrana son una fuente importante de AG poli-insaturados en la carne (Marmer *et al.*, 1984).

En los animales monogástricos, como el cerdo, el tipo de grasa que se les administre en la dieta condicionará la composición en ácidos grasos de los lípidos de su carne. En los rumiantes, como bovinos y ovinos, es más difícil modificar la composición lipídica de sus tejidos mediante la alimentación, debido a las transformaciones y síntesis de ácidos grasos que ocurren en su sistema digestivo por la acción de microorganismos. En el rumen, las lipasas de origen microbiano hidrolizan los triglicéridos, liberando los ácidos grasos. A continuación, los dobles enlaces son hidrogenados por las bacterias ruminales, provocando la isomerización y la saturación de una parte de estos ácidos grasos. Como estos procesos no son completos y además se complementan con otras transformaciones enzimáticas posteriores, en la leche y en el tejido adiposo de los rumiantes se encuentran ácidos grasos insaturados (como linoleico, ruménico o CLA), monoinsaturados (como vaccénico y oleico) y saturados (por ejemplo, esteárico) (Grompone, 2010).

La cantidad y composición de la grasa vacuna también varía según el sistema productivo, presentando los animales alimentados con hierba menor cantidad de grasa y mayores porcentajes de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga de tipo $\omega 3$, CLA y *trans*18:1 que los alimentados con granos (Moloney *et al.*, 2001; UCO, 2006; Kraft *et al.*, 2009). El hecho de que existan variaciones según la raza indica la presencia de un componente genético importante (Laborde *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2004). La composición de la grasa usualmente es determinada mediante cromatografía en fase gaseosa o líquida. El total de lípidos extraídos luego se separa en lípidos polares (fosfolípidos) y lípidos neutros.

El sabor y el aroma de la carne dependen de compuestos volátiles, de la capacidad del método de cocción utilizado para liberarlos y de la cantidad de grasa intramuscular. En relación a esto último, un factor muy importante es la cantidad de fosfolípidos en relación a la cantidad de lípidos totales, ya que son los que más inciden en el sabor. La composición en ácidos grasos incide menos, aunque el exceso de ácidos grasos poli-insaturados del tipo $\omega 3$ puede generar sabores no aceptables (Aaslyng, 2009).

Todas las variables relacionadas con la calidad de la carne y la canal pueden ser modificadas utilizando distintos procedimientos durante la cría de los animales o el procesamiento de sus productos cárnicos. Sin embargo, siempre existirá un gran componente de variación individual (Aaslyng, 2009). La constitución genética tiene una incidencia importante, aunque se ha estudiado en menor grado. Por ejemplo, existen datos acerca de diferencias muy marcadas entre razas y entre individuos de

una misma raza en cuanto a la composición de ácidos grasos. Estas diferencias reflejan variaciones subyacentes en la expresión génica o en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis, desaturación o elongación de estos lípidos. Se han detectado alelos relacionados con variación de determinados ácidos grasos, por lo que la cría selectiva podría ser utilizada para mejorar la composición de la grasa intramuscular (Harper & Pethick, 2004; De Smet *et al.*, 2004; Kraft *et al.*, 2009). Se sabe que la composición genética de un animal incide en la calidad sensorial de la carne (Maltin *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2007), en la cantidad de grasa (Sillence, 2004), en el crecimiento y la calidad de la canal (Sherman *et al.*, 2008), etc., por lo que la mejora genética sin duda afecta en gran medida a la industria de la carne.

Los programas de mejora genética del ganado han resultado en un aumento sustancial en la cantidad de carne generada y en la eficiencia de la producción. Las mayores respuestas a la selección se han obtenido para el crecimiento y las características de la canal. Sin embargo, los intentos por mejorar la calidad de la carne a través de la mejora genética son muy limitados, a pesar de la probada y creciente importancia que tiene para los consumidores. Los mayores problemas a la hora de implementar un plan de cría dirigido a mejorar los atributos de la carne son los mayores costes para registrar de forma sistemática este tipo de información, la dificultad en medir estas características en los candidatos a selección y la falta de criterios u objetivos claros (Simm *et al.*, 2009).

La medición directa de caracteres relacionados con la calidad de la carne implica una inversión elevada en dinero, tiempo y trabajo. Requiere personal entrenado y laboratorios especializados. Si se desea obtener información acerca del potencial genético para producir carne de mejor calidad de animales candidatos a selección, las medidas deben realizarse en parientes cercanos (por ejemplo, progenie) y no en los propios individuos, debido a que la mayoría de estas medidas requieren el sacrificio del animal, con la excepción de área de la chuleta y espesor de grasa dorsal, que pueden evaluarse *in vivo* mediante ultrasonografía. Esto supone un coste sustancial, debido a que implica el muestreo de gran número de animales en edad de sacrificio para que las estimaciones de los parámetros genéticos tengan una precisión estadística aceptable. Varios de los análisis que se mencionaron anteriormente suponen la destrucción del músculo utilizado, que en general forma parte de los cortes más valiosos del vacuno, por lo cual se produce una pérdida total o parcial del valor del corte. Por último, la evaluación de la calidad del producto difiere entre países, entre culturas, y entre los sucesivos niveles de la cadena de producción y comercialización. No es fácil, por lo tanto, diseñar un plan de cría que contemple todas las exigencias de la cadena cárnica y de los mercados

a los que se pretenda acceder (Simm et al, 2009). Finalmente, en muchas ocasiones, los diferentes eslabones de la cadena no tienen ningún tipo de integración entre ellos, lo que añade dificultades para diseñar un programa de mejora que puede beneficiar a un eslabón y perjudicar a otro.

La revolución ocurrida en la última década a partir de la secuenciación de los genomas ha generado nuevas oportunidades en varios campos de la ciencia y la tecnología, abriendo nuevas puertas para la producción de carne de calidad. Actualmente es posible, por ejemplo, detectar contaminación bacteriana, identificar las especies presentes en un producto elaborado, y efectuar la trazabilidad de la carne a partir de análisis de ADN. La mejora genética ha visto ampliadas en gran medida sus posibilidades, ya que ahora es posible evaluar directamente el genotipo de un animal a la hora de seleccionar reproductores. La genómica funcional ha permitido conocer en mayor detalle los factores que afectan la fisiología del músculo, y en último término la calidad de la carne, mediante un mejor conocimiento de la expresión de los genes involucrados. La biotecnología aplicada a la producción animal es una de las fronteras científicas más prometedoras del futuro e influirá en gran medida en varios aspectos de la sociedad y la economía mundiales (Hocquette et al., 2007).

Marcadores moleculares en producción animal.

Selección Asistida por Marcadores (MAS).

Varios caracteres económicamente importantes en ganadería, como los que determinan la calidad de la carne, son difíciles de registrar, complejos, involucran muchos genes y los efectos no genéticos representan un importante porcentaje de su variabilidad fenotípica lo que, en muchas ocasiones, se refleja en reducidas heredabilidades. Debido a esto, son difíciles de mejorar genéticamente mediante los métodos tradicionales de selección.

En las últimas décadas se ha avanzado de forma sustancial en la aplicación de la genética molecular, concretamente, en la identificación de genes y marcadores ligados a éstos que afectan estas características. Estos genes, o regiones cromosómicas cuando el gen responsable del cambio fenotípico no ha podido ser identificado, se denominan Loci de Caracteres Cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*, o QTL). El progreso genético puede ser aumentado sensiblemente por el uso de

información molecular para la selección de reproductores, ya que permite discriminar entre los portadores y no portadores de las variantes genéticas que son responsables directas del fenotipo de interés y así aumentar la precisión en la predicción del valor genético de los animales (Dekkers, 2004; Ron y Weller, 2007; Simm *et al.*, 2009).

Es claro que el desarrollo de esta nueva tecnología depende en forma clave de la identificación de los genes y polimorfismos que afectan las producciones de los animales (Casas, 2002; Dekkers, 2004; Ron y Weller, 2007). Si la característica de interés fuese controlada principalmente por un solo locus, sería relativamente simple aumentar la frecuencia del alelo favorable en las poblaciones mediante el cruce de individuos con el genotipo deseado. Sin embargo, si el carácter es poligénico y depende de una acción compleja de varios loci, como lo son las características de calidad de la carne, la selección basada en un número pequeño de marcadores sólo permitiría explotar una parte de la variación genética existente. Por ese motivo la información molecular debe ser integrada a un programa de mejora que incluya métodos tradicionales de selección de reproductores, como forma de potenciar esta información (Simm *et al.*, 2009).

Las estrategias para la utilización de información molecular en programas de mejora genética se agrupan en lo que se ha dado en llamar Selección Asistida por Marcadores (*Marker Assisted Selection*, o MAS). El objetivo es, entonces, integrar la información proveniente de los marcadores en el programa de cría y mejora del núcleo, posibilitando una selección directa sobre los mecanismos genéticos subyacentes a las características productivas (Dekkers, 2004; Neuner *et al.*, 2009).

Una vez identificados los alelos favorables para cierto QTL, mediante MAS es posible aumentar su frecuencia en la población o introducirlos mediante introgresión genética en las poblaciones en las que no existan. Dado que un gen puede actuar sobre diversos procesos fisiológicos y vías metabólicas, el valor económico del QTL dependerá de su efecto no sólo en la característica a la que ha probado estar asociado, sino también en todas las características incluidas en el índice de selección, lo que constituye el efecto pleiotrópico. Además, el resultado dependerá de la relación entre sus alelos (dominancia, codominancia, etc.), de las frecuencias relativas de los mismos en la población, de los fenómenos de impronta genética asociados al sexo del progenitor que lo transmite, y de las interacciones con otros genes (Ron y Weller, 2007).

Si bien MAS requiere de metodologías más sofisticadas de muestreo y de toma de decisiones, la información que agrega a los métodos convencionales de selección permite la explotación de efectos genéticos específicos. Como se dijo

anteriormente, MAS no reemplazará las metodologías actuales basadas en la utilización de información fenotípica para estimar las Diferencias Esperadas en la Progenie (DEP), sino que contribuirá a predecir en forma más precisa el valor genético de un animal, aumentando así la respuesta a la selección. Los datos de DEP podrán ser combinados con información proveniente de marcadores moleculares en un mismo índice de selección para el carácter fenotípico de interés, el cual será superior a los índices basados únicamente en DEP o en marcadores. Para la implementación de MAS, el efecto del QTL es incorporado a las evaluaciones genéticas mediante modelos estadísticos como el MA-BLUP (*Marker Assisted - Best Linear Unbiased Prediction*; mejor predicción no sesgada asistida por marcadores), en el cual el QTL es considerado en el modelo mixto como un efecto aleatorio más. Varios factores deben ser tomados en cuenta al aplicar este sistema, como son la información fenotípica disponible, la profundidad del pedigrí, los genotipos faltantes, el nivel de endogamia y la pérdida de variación genética a medida que avanzan las generaciones (Hocquette *et al.*, 2007; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Neuner *et al.*, 2009; Simm *et al.*, 2009).

El uso de marcadores moleculares es especialmente útil para mejorar características de baja heredabilidad, en las cuales el fenotipo observable no predice correctamente el valor genético del animal. También es útil para características difíciles de medir o que usualmente no se registran, como las relacionadas con la calidad de la carne, el consumo de alimento, la fertilidad o la resistencia a enfermedades; características limitadas o expresadas en un único sexo, como la producción de leche; y características que se determinan tarde en la vida del animal o incluso *post-mortem*, como el rendimiento de la canal. Al poder evaluar a los candidatos a selección a una edad muy temprana (incluso en etapas embrionarias), MAS contribuye en gran medida a disminuir el intervalo generacional. Como se basa en la selección de futuros reproductores teniendo en cuenta su dotación alélica para ciertos genes con mayor influencia en un fenotipo dado, aumenta la precisión de la selección. Por todo ello, el uso de MAS incrementa el progreso genético y tiene el potencial de aumentar significativamente la eficiencia de la producción y la calidad del producto final (MacNeil & Grosz, 2002; Dekkers, 2004; Simm *et al.*, 2009).

La aplicación de MAS requiere del genotipado de los individuos para los marcadores elegidos. Existen básicamente dos tipos de loci que pueden ser utilizados con este fin:

- a. genes que contienen la mutación causante de la variación a nivel fenotípico (marcadores causales o directos).

b. loci que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el gen o mutación causal (marcadores indirectos).

En los marcadores directos usualmente se analizan cambios nucleotídicos, como polimorfismos de nucleótido simple (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*), deleciones o inserciones. Los SNPs son especialmente útiles, dado que son la forma más abundante de variación a nivel del ADN en mamíferos. Además suelen ser dialélicos y fáciles de detectar mediante técnicas automatizadas. Esta estrategia es también conocida como Selección Asistida por Genes (GAS, *Gene Assisted Selection*) (Hocquette *et al.*, 2007; Ron y Weller, 2007; Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008; Sevane *et al.*, 2011).

Como marcadores indirectos tradicionalmente se han utilizado microsatélites, aunque también pueden ser SNPs u otros polimorfismos nucleotídicos. Necesariamente deben estar muy cercanos a la mutación causal para que exista suficiente desequilibrio de ligamiento a nivel poblacional entre el marcador y el QTL. Se calcula que la distancia no debe ser mayor a cinco centiMorgans (cM), aunque el grado de ligamiento también depende de la estructura e historia de la población (Dekkers, 2004). El mayor problema con los marcadores indirectos es que sólo son útiles mientras permanezcan completamente ligados al gen responsable del fenotipo. Esta relación de ligamiento puede cambiar por la acción de la recombinación y si el marcador ya no es heredado junto con la mutación causal, éste proporciona una información menos precisa para ser utilizada en MAS (García *et al.*, 2002; Simm *et al.*, 2009).

Obviamente, el uso de marcadores directos es el medio más eficaz para aprovechar las ventajas de MAS. Sin embargo, descubrir el gen -y la mutación funcional dentro del gen- que genera el cambio fenotípico no es sencillo e implica la aproximación desde diferentes ángulos (genético, fisiológico, bioquímico, etc.). Debido a esta limitante, aún hoy existen pocos marcadores directos de uso en MAS, por lo que el uso de marcadores indirectos estrechamente ligados con la mutación funcional, no se han abandonado (García *et al.*, 2002; Ron y Weller, 2007).

En la actualidad se comercializan pruebas genéticas que sirven para genotipar a los animales para varios marcadores, con el fin de detectar los mejores candidatos para selección. Se comenzaron a utilizar en producción de leche, que es donde MAS más se ha extendido, para determinar los alelos que portan los toros candidatos para genes asociados a la cantidad de proteína y grasa de la leche (Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008), para genes relacionados con enfermedades hereditarias como el BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*, deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina; Nagahata, 2004) y CMV (*Complex Vertebral*

Malformation, malformación vertebral compleja, Schutz *et al.*, 2008), y para otros marcadores asociados a la producción lechera. Mediante el uso sistemático de pruebas de ADN, en Alemania se ha logrado disminuir la frecuencia del alelo causante de BLAD en las poblaciones de toros reproductores Holstein de 9,4% en 1997 a 0,3% en 2007, y del alelo causante de CMV de 8,3% en 2002 a 2,3% en 2007 (Schutz *et al.*, 2008). En poblaciones de Holstein de Holanda, el progreso genético gracias al uso de MAS ha aumentado entre 4,5 y 21,2%, dependiendo de la proporción de la varianza aditiva explicada por el QTL utilizado, en esquemas de selección basados en pruebas de progenie. Un QTL que explica sólo el 5% de la varianza aditiva permitió una disminución del 35% en la cantidad de toros candidatos usados en pruebas de progenie, disminuyendo así los costes de estas pruebas. Por último, el progreso genético aumentó 31,3% en sistemas que involucran la producción y selección de embriones basadas en información de QTLs (Schrooten *et al.*, 2005). En producción de carne la aplicación de MAS todavía es incipiente.

Aplicación de MAS en planes de mejora genética de bovinos de carne

Uno de los mayores desafíos de la industria cárnica en la actualidad es mejorar la uniformidad y calidad del producto. La cría selectiva en ganado de carne ha tenido mucho éxito en el aumento del rendimiento carnicero de los animales, pero no ha prestado suficiente atención a la calidad. El incremento en calidad puede lograrse en gran parte gracias a la mejora genética y la utilización de MAS, la cual es una herramienta de enorme valor potencial para mejorar características cuyo progreso genético es muy lento o inexistente con la selección fenotípica tradicional. La inclusión de genes que controlan los aspectos relacionados con la calidad de la carne en los programas de selección podría mejorarla sustancialmente y contribuir a generar carnes diferenciadas, según las preferencias de los consumidores. Gracias al rápido avance de la genómica, cada vez existe más información y más herramientas disponibles que pueden utilizarse con este fin (Albertí *et al.*, 2006; Hocquette *et al.*, 2007; Simm *et al.*, 2009).

Por ejemplo, el veteado y la terneza son dos características de indudable valor comercial que podrían beneficiarse significativamente con el uso de MAS. Actualmente se está a la búsqueda de genes que sirvan para identificar a los animales con una alta propensión a la acumulación de grasa intramuscular, con el objetivo de producir carne más sabrosa y tierna (Hocquette *et al.*, 2007).

Hasta ahora, se han hallado varios polimorfismos en genes asociados a la terneza y el veteado de la carne, así como al desarrollo muscular y la calidad de la canal. Por ejemplo, en los genes que codifican las enzimas microcalpaína (μ -calpaína), milicalpaína (m-calpaína) y calpastatina (Page *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006), relacionadas con el proceso de degradación miofibrilar *post mortem* y por ende a la terneza; en los genes de la leptina (Buchanan *et al.*, 2002), de la enzima diacil-glicerol acetil-transferasa 1 (Thaller *et al.*, 2003) y de la tiroglobulina (Barendse *et al.*, 2004), asociados a la cantidad de grasa intramuscular; en el gen de la miostatina (Grobet *et al.*, 1997) y en el de la hormona del crecimiento (Schlee *et al.*, 1994), asociados al desarrollo muscular; etc.

Actualmente existen varias pruebas comerciales de ADN disponibles para ganaderos que deseen evaluar a sus animales para algunos de estos genes, como *GeneSTAR Quality Grade (Genetic Solutions)*, que utiliza un polimorfismo presente en la región promotora 5' del gen de la tiroglobulina, más otro SNP anónimo; *Igenity-L (Merial)* que se basa en un SNP presente en un exón del gen de la leptina, asociado al veteado y al aumento del apetito; *Igenity TenderGENE (Merial)* que incluye dos marcadores ubicados en regiones codificantes diferentes del gen de la μ -calpaína; *GeneSTAR Tenderness (Genetic Solutions)* basado en un SNP del gen de la calpastatina; *GeneSTAR Tenderness 2* que incluye un polimorfismo de calpaína además del ya mencionado de calpastatina; etc.

Para que un marcador pueda ser utilizado en MAS, primero debe pasar por un proceso de validación, en el cual se prueba la asociación del SNP con la característica fenotípica de interés en poblaciones diferentes a las cuales fue detectado. Dado que los efectos directos e indirectos de los genes pueden diferir dependiendo de la constitución genética de la población donde se expresan, así como del sistema productivo, es necesario probar los efectos de estos marcadores previo a su implementación en MAS (Simm *et al.*, 2009; Johnston & Graser, 2010). En estos estudios se evalúa el efecto del marcador y la relación costo-beneficio de aplicarlos en rebaños comerciales, teniendo en cuenta el retorno económico y la mejora genética potencial de la población.

Varios de los marcadores mencionados han sido validados en estudios independientes, y en algunos casos se han obtenido resultados negativos o controvertidos. *GeneSTAR Quality Grade* fue validado por el *National Beef Cattle Evaluation Consortium (NBCEC)* de Estados Unidos, en cruces Simmenthal x Angus. No hallaron un aumento significativo del grado de veteado pero sí un incremento del 18% en el número de novillos homocigotos para el alelo favorable que pasan a la categoría "Choice", la mejor según los estándares norteamericanos (Quaas *et al.*,

2006). Van Eenennaam y colaboradores (2007) encontraron una situación similar para los marcadores incluidos en *GeneSTAR*, aunque la asociación detectada fue débil y cercana al nivel de significación. Rincker y colaboradores (2006) no detectan asociación entre el polimorfismo de tiroglobulina y la cantidad de grasa intramuscular en novillos Simmenthal, mientras que Casas y colaboradores (2007) sólo hallan una asociación significativa de este polimorfismo con el veteado en ganado Wagyu. Nkrumah y colaboradores (2004) no hallaron diferencias significativas en cuanto al veteado ni otros depósitos de grasa para los animales con distintos genotipos de la prueba *Igenity L*. Johnston y Graser (2010) tampoco detectaron asociaciones significativas entre los cuatro marcadores de veteado de *GeneSTAR* en cinco poblaciones de bovinos de varias razas, incluyendo cebuínas.

En el caso de los polimorfismos de calpaína y calpastatina la situación es diferente, ya que en varios estudios se confirmó la asociación significativa entre los SNPs mencionados y la terneza de la carne en poblaciones comerciales. Los alelos favorables serían siempre los mismos, aunque la magnitud de sus efectos varían de una raza a otra y de un tipo muscular a otro (Page *et al.*, 2002; Casas *et al.*, 2006; Schenkel *et al.*, 2006; Van Eneennaam *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009; Johnston y Graser, 2010).

Son muchos más los marcadores asociados a características productivas en la bibliografía que los que están disponibles en las pruebas comerciales para los productores, los cuales se encuentran aún en etapas de validación. Una de las dificultades radica en que no existen criterios estandarizados para probar la validez de un marcador, por lo que se utilizan diferentes aproximaciones. Sin embargo, los estudios coinciden en que el tamaño muestral debería ser suficientemente grande y los umbrales de significación suficientemente rigurosos (p-valores reducidos) para evitar errores estadísticos, que el diseño experimental es un factor clave, y que se debería de probar la asociación tanto a nivel poblacional como utilizando datos provenientes de estructuras familiares (Hocquette *et al.*, 2007). La secuenciación completa del genoma bovino ha abierto nuevas posibilidades para la investigación en esta temática.

Secuenciación del genoma bovino

Gracias al enorme avance logrado en la tecnología de la secuenciación automática del ADN, ha sido posible obtener la secuencia completa del genoma de varias especies eucariotas, entre ellas *Bos taurus* y otras especies domésticas. Para

la especie bovina el proceso comenzó en diciembre de 2003, gracias al trabajo conjunto de un consorcio multinacional. Varios “borradores” fueron construidos en forma sucesiva y en abril de 2009 fue presentado el “ensamblaje” *Btau4.0*, de mayor calidad y con una cobertura del 92% del genoma. La construcción de esta versión se realizó mediante métodos similares a los usados en otras especies y el 90% del total de secuencias pudo ser validado y ubicado en los 29 autosomas y el cromosoma X bovinos. Debido a su alta resolución, se estima que menos del 0,8% de los SNPs puedan estar incorrectamente ubicados. El tamaño total estimado es de 2,87 Gpb, conteniendo al menos 22.000 genes (*The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, et al.* 2009).

El genoma es de acceso público y se puede ingresar a su base de datos a través del *GenBank* (del *NIH's National Centre for Biotechnology Information, NCBI*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>), o del *EMBL Bank* (*European Molecular Biology Laboratory's Nucleotide Sequence Database*, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>), o de su homólogo japonés *DNA Data Bank* (www.ddbj.nig.ac.jp). Varios buscadores han sido desarrollados para utilizar la información disponible, que contienen herramientas de diversa índole para el análisis de secuencias, como el *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org>) del *Wellcome Trust Sanger Institute* de Cambridge (Inglaterra), el *Map Viewer* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>), el *UCSC Genome Browser* de la Universidad de California en Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>), y el *Ruminant-Human Genome Browser* del CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*, <http://www.livestockgenomics.csiro.au/cow/>, Australia).

Búsqueda de polimorfismos genéticos asociados a características de la carne y la canal.

Aproximación por genes candidatos

Para implementar MAS utilizando marcadores directos, en primer lugar es necesario identificar el polimorfismo específico responsable de los efectos observados en el fenotipo. Dado que la mayoría de los genes que influyen en las características productivas no ejercen un efecto elevado sobre las mismas, sino que su efecto -usualmente pequeño- se suma al de otros genes, es necesario sumar las

evidencias provenientes de diversos estudios, ninguna de las cuales probablemente sea suficiente para probar por sí sola la validez del marcador, pero que en conjunto apuntan hacia un determinado gen candidato (Ron y Weller, 2007).

Un gen candidato es aquel que reúne ciertas condiciones que hacen probable que contenga una mutación funcional causante de variaciones en un fenotipo dado. La función fisiológica que cumple el gen en el organismo, su relación con determinadas vías metabólicas, sus efectos sobre el fenotipo de interés en otras especies o en otras razas dentro de una misma especie, así como su ubicación dentro de una región cromosómica previamente asociada a un QTL, son criterios para valorar al gen como posible candidato. También es importante evaluar si el gen se expresa en determinados órganos relacionados con el fenotipo de interés, o en ciertos momentos clave del desarrollo embrionario, o si existen animales transgénicos o *knock-out* para ese gen en los cuales su función quede en evidencia (Dekkers, 2004; Ron y Weller, 2007).

Una vez elegido el gen, se procede a buscar polimorfismos en su secuencia, tales como SNPs, duplicaciones, deleciones o inserciones, mediante secuenciación y análisis bioinformáticos. Muchos polimorfismos no tendrán ningún efecto sobre el fenotipo (neutros), algunos podrán afectar la expresión génica tanto a nivel de la traducción como de la transcripción, mientras que otros podrán potenciar, interrumpir o impedir la función de la proteína codificada (Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008). La mayoría de los polimorfismos suelen ubicarse en regiones intrónicas, dado que al no traducirse a proteína su secuencia está menos condicionada por restricciones evolutivas y mantiene más variabilidad. Sin embargo, ciertos polimorfismos ubicados en intrones sí pueden tener efectos sobre el fenotipo; esto sucede cuando se encuentran en regiones que intervienen en la regulación de la expresión génica, como por ejemplo, islas CpG y secuencias de unión de promotores de la transcripción. Por último, algunos polimorfismos se ubican en los exones, y según su posición en el codón pueden o no generar cambios en la secuencia aminoacídica resultante, cambio que a su vez puede o no verse reflejado en el fenotipo. Un polimorfismo que genera una sustitución de aminoácidos es más probable que afecte la función del péptido codificado por ese gen, y en último término, las características del individuo portador. Este tipo de mutaciones son las que se suelen buscar en los genes candidatos, aunque las otras no deben dejarse de lado, ya sea por su posible intervención en la regulación génica, o en último término, porque se encuentran en las cercanías de una mutación funcional desconocida y sirven para captar su efecto gracias al ligamiento.

La búsqueda y selección de los genes candidatos para trabajar puede efectuarse utilizando los buscadores genómicos de Internet mencionados previamente. En dichas bases de datos se detallan todos los polimorfismos (generalmente SNPs) que se han detectado a nivel mundial para cada gen. También ofrecen la posibilidad de efectuar comparaciones mediante alineamiento de secuencias de especies distintas para detectar las regiones más conservadas y así valorar la importancia potencial de un SNP en particular.

Ya se han mencionado anteriormente varios ejemplos de genes caracterizados en cuanto a sus polimorfismos y los efectos que generan y que se utilizan en MAS como marcadores directos en producción de leche y carne. Otros ejemplos son el gen *RYR1* en cerdos (Fuji *et al.*, 1991; O'Brien and MacLennan, 1992), asociado a calidad de la carne pero también al síndrome de estrés porcino; los genes *GHR* e *IGF2* (receptor de la hormona de crecimiento y factor de crecimiento tipo insulina 2; Sherman *et al.*, 2008) en ganado, asociados al peso corporal y la ganancia diaria de peso; etc.

En el caso particular de la búsqueda de genes candidatos relacionados con la calidad de la carne, merecen especial atención aquellos que están involucrados en los distintos aspectos de la biología del músculo y sus componentes celulares, como los que codifican proteínas contráctiles, colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, enzimas mitocondriales relacionadas con el metabolismo energético y moléculas relacionadas con la adipogénesis, como las enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. El tejido muscular es una combinación compleja de diversos tipos celulares, incluyendo fibras musculares, tejido conectivo y depósitos de grasa (Hocquette *et al.*, 2007).

Una vez detectada una influencia significativa de un polimorfismo en un gen candidato, su posible asociación con una característica de interés debe ser probada mediante un ensayo que permita evaluar si existe correlación entre las variantes genéticas y los registros fenotípicos.

Análisis estadísticos de asociación genotipo-fenotipo.

El objetivo de los análisis poblacionales de asociación es detectar patrones de variación genética (por ejemplo, polimorfismos de tipo SNP) que difieran entre individuos de fenotipos divergentes. Dado el gran tamaño de los genomas y la gran cantidad de polimorfismos que contienen, la probabilidad de hallar simplemente por azar un patrón que *a priori* parece sugerir una asociación real es elevada, por lo que

el análisis está dirigido a poder distinguir entre las asociaciones causales de las espurias. Elegir cuidadosamente los individuos a muestrear, calcular umbrales de significación más realistas, controlar posibles falsos positivos y procurar explicar la base biológica de la asociación detectada son prácticas que se pueden aplicar con este fin (Balding, 2006).

El estudio para encontrar marcadores asociados a caracteres complejos suele comenzar con el análisis de una población experimental. Se trata de un grupo de animales de filiación conocida y de los cuales se han obtenido las medidas y registros fenotípicos de interés. Después de obtener los genotipos de los marcadores a analizar, se realizan análisis estadísticos para detectar posibles asociaciones entre los alelos de estos marcadores y los fenotipos. Los datos fenotípicos deben ser lo más precisos posible, es decir, colectados de la misma manera y con instrumentos de medida similares, de forma que los datos de cada animal sean comparables con los de los otros animales. Dado que posteriormente se utilizarán en análisis de varianza y de regresión lineal, deben presentar una distribución Normal y homogeneidad de varianzas (Balding, 2006). Los datos genotípicos deben ser también precisos y fiables, por lo que la elección del método de genotipado es importante.

Previo al estudio de asociación, es necesario analizar la información genotípica desde el punto de vista poblacional, para detectar posibles desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg y alelos por debajo de la frecuencia mínima. Las desviaciones al equilibrio pueden ser provocadas por errores de genotipado, por el efecto de la endogamia, de la estratificación poblacional o de la selección actuando sobre el gen en estudio. Errores en la asignación de los genotipos, por ejemplo cuando se confunde a los heterocigotos con uno de los dos homocigotos, pueden generar exceso o deficiencia de individuos de algún genotipo, provocando un desequilibrio artificial. Para evitar los efectos de la endogamia se aconseja muestrear animales no emparentados. Las desviaciones causadas por la selección pueden ser interesantes desde el punto de vista de la explicación biológica de las posibles asociaciones detectadas, ya que un polimorfismo directamente implicado en la variación fenotípica de un carácter es muy probable que se vea afectado por la selección sobre ese carácter (García *et al.*, 2002; Balding, 2006; Lachance, 2009).

Para detectar asociaciones entre genotipos y variables cuantitativas se utilizan análisis de regresión lineal y de varianza (ANOVA), asumiendo una relación lineal entre el valor medio del carácter fenotípico y el genotipo. Usualmente se realiza un análisis de regresión lineal múltiple, en el cual se toma la medida fenotípica como variable dependiente y el genotipo como variable independiente. Se

incluyen también como variables independientes en la ecuación todos aquellos factores que puedan estar incidiendo en el valor del registro fenotípico. Como el interés es medir el efecto del genotipo sobre el fenotipo, es importante poder discriminar entre éste y el efecto de otros factores, tales como el sexo, la raza, la edad, el parentesco (si hubiere), la procedencia, el manejo nutricional recibido, etc. Éstos se consideran como variables independientes, como efectos fijos o aleatorios. Al final, se aceptará o rechazará la hipótesis de la existencia de asociación entre la variable fenotípica medida y el genotipo para cierto SNP, así como se obtendrá una estimación de la magnitud del efecto de sustitución de los alelos de dicho SNP (García *et al.*, 2002; Balding, 2006; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009; Johnston & Graser, 2010).

Para controlar el error de tipo I, la ocurrencia de falsos positivos en los análisis múltiples, pueden utilizarse varias estrategias, dentro de las cuales el análisis de permutaciones es un método de elección por su, a pesar de su demanda en cálculo, simplicidad en su implementación (Balding, 2006).

Como se mencionó anteriormente, una vez identificada una asociación debe efectuarse el análisis de validación en poblaciones independientes, para asegurar que la asociación es verdadera, tiene sentido biológico y se mantiene en poblaciones con características diferentes, antes de poder ser aplicada en MAS (Van Eenennaam *et al.*, 2007; Johnston & Graser, 2010).

El Proyecto GeMQual

En el año 2001 comenzó un proyecto denominado GeMQual (*Assessment of Genetic Variation in Meat Quality and Evaluation of the Role of Candidate Genes in Beef Characteristics with a View to Breeding for Improved Product Quality*, <http://www.gemqual.org/>), dedicado a la identificación de polimorfismos en una gran cantidad de genes candidatos asociados a diversas características susceptibles de influir en la calidad de la carne. Se trata de un proyecto financiado por la Unión Europea que incluye 436 toros jóvenes de 15 razas bovinas, mayormente de carne pero también lecheras y razas locales menos especializadas.

Se trata de una población experimental con características compatibles con las necesidades de los análisis de asociación genotipo-fenotipo. Los animales fueron criados en condiciones similares, tanto desde el punto de vista nutricional como de manejo *pre* y *post* faena, para evitar posibles sesgos en las mediciones debidos a factores ambientales. Se tomó una gran variedad de registros fenotípicos

individuales, tales como medidas morfológicas y peso a distintas edades, medidas de la canal, propiedades físicas, químicas y sensoriales de la carne, etc. Junto con el banco de ADN de estos animales, constituye una base de datos de inestimable valor que permite el análisis de cualquier marcador que se desee.

El estudio comparativo de las características de la canal y la carne en estos animales es uno de los más exhaustivos que se han llevado a cabo en cuanto a la caracterización de la variación entre razas europeas (Albertí *et al.*, 2006). En cuanto al estudio molecular, mediante resecuenciación de genes candidatos fueron identificados 672 marcadores (principalmente SNPs) en 206 genes, los cuales están siendo analizados para la localización de posibles asociaciones con diferentes aspectos de la calidad de la carne (Hocquette *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009).

El propósito de esta tesis es la utilización de la información fenotípica de los animales criados en el marco del proyecto GeMQual y de la disponibilidad de sus ADNs, para identificar asociaciones entre marcadores de tipo SNP descritos en la bibliografía en los últimos años y gran parte de los fenotipos medidos.

OBJETIVOS

General

Detectar y analizar asociaciones entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes candidatos y características relacionadas con la calidad de la canal y de la carne bovina.

Específicos

1. seleccionar y genotipar polimorfismos de nucleótido simple ubicados en genes que participan en vías metabólicas y procesos relacionados con el tejido muscular, el crecimiento y el metabolismo energético.
2. efectuar análisis poblacionales de los polimorfismos seleccionados en la muestra de animales a utilizar para calcular frecuencias alélicas y otros parámetros que puedan incidir en los resultados del análisis de asociación.
3. detectar posibles asociaciones entre los genotipos de los SNPs seleccionados y las características fenotípicas medidas en los animales de la muestra.
4. calcular el efecto y la significación estadística de las asociaciones genotipo-fenotipo detectadas.
5. discutir su posible aplicación en selección asistida por marcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de animales

La muestra utilizada comprende 436 bovinos machos pertenecientes a 15 razas europeas. Se trata de razas altamente especializadas en la producción de carne (Limousin, Charolais, Simmenthal, Aberdeen Angus, Piamontesa), razas lecheras (Jersey y Holstein), razas de carne de uso más bien local (Asturiana de Valles, Pirenaica, South Devon, Danish Red) y razas de carne de aptitud materna (Casina, Avileña, Highland, Marchigiana). Se incluyeron razas altamente especializadas en la producción de carne, razas lecheras y razas locales poco mejoradas genéticamente. Los animales eran todos de raza pura y sin castrar. Se seleccionaron individuos sin parentesco, como forma de maximizar el grado de diversidad genética presente en cada raza.

Estos animales fueron criados desde el destete (seis meses de edad) en seis establecimientos diferentes de cinco países (uno en España, Reino Unido, Italia, Francia y dos en Dinamarca; Tabla 1), en condiciones controladas de manejo y alimentación. Se utilizaron procedimientos comunes a la práctica comercial ganadera de los países de la Unión Europea, iguales en todas las razas, dado que el manejo incide posteriormente en la calidad de la carne y la canal. Al destete fueron ingresados a los establecimientos experimentales donde se les suministró una dieta estandarizada a base de pienso de cebada y soja, con la adición de los minerales y vitaminas necesarias, *ad libitum*. El contenido proteico fue de 160g CP/kg de materia seca hasta los 10 meses de edad y luego 150g CP/kg de materia seca hasta el momento del sacrificio. Si bien era deseable que las condiciones nutricionales fueran lo más homogéneas posibles, hubo algunas diferencias de manejo que determinaron que la densidad energética del alimento fuera de 12.9 kJ/kg de materia seca para todas las razas excepto para las británicas, que recibieron 13.5 kJ/kg de materia seca (Albertí *et al.*, 2006).

La mayor parte de los individuos fueron sacrificados durante los años 2002 y 2003, aunque debido a un brote de fiebre aftosa los animales de origen británico fueron faenados durante un período mayor (desde 1998 hasta 2005). La edad del sacrificio fue determinada por el momento en el cual los animales alcanzaron el 75% del peso adulto, alrededor de los 15 meses, con una variación debida a la raza a la

cual pertenecían. Se faenaron en mataderos comerciales o experimentales, dependiendo de cada país.

Tabla 1. Razas incluidas en la muestra, número de animales por raza (N), biotipo productivo de la raza, país en el cual se encontraba el establecimiento donde fueron criados los animales y el período o año en que fueron faenados (Faena).

Raza	N	Biotipo	País	Faena
Asturiana de los Valles	30	cárnico de uso local	España	2002-2003
Casina	31	cárnico de aptitud materna	España	2002-2003
Pirenaica	31	cárnico de uso local	España	2002-2003
Avileña	30	cárnico de aptitud materna	España	2002-2003
Aberdeen Angus	30	cárnico altamente especializado	Reino Unido	1998-2000 y 2004
Jersey	31	lechero	Reino Unido	2003-2004
South Devon	27	cárnico de uso local	Reino Unido	1999-2000
Highland	29	cárnico de aptitud materna	Reino Unido	1999 y 2004
Simmenthal	20	cárnico altamente especializado	Dinamarca	2004
Holstein	29	lechero	Dinamarca	2003-2004
Danish Red	29	cárnico de uso local	Dinamarca	2004
Marchigiana	28	cárnico de aptitud materna	Italia	2002-2003
Piamontesa	30	cárnico altamente especializado	Italia	2002-2003
Limousin	31	cárnico altamente especializado	Francia	2002
Charolais	30	cárnico altamente especializado	Francia	2002

Banco de datos fenotípicos

Durante el Proyecto GeMQual se tomaron numerosos datos relacionados con la calidad de la canal y la carne a todos los animales de la muestra. Los registros fenotípicos utilizados para el análisis se detallan en la Tabla 2.

Los animales fueron pesados al inicio del período experimental y a los 9, 12 y 15 meses de edad, así como en el momento previo al sacrificio. La ganancia de peso diaria promedio fue calculada en función al peso inicial, peso final y el peso durante 365 días mediante regresión lineal. Después del sacrificio, las canales fueron refrigeradas a $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. La disección de la canal se llevó a cabo mediante protocolos estandarizados y las mediciones fueron tomadas de la media canal izquierda. La sexta costilla torácica fue recogida a las 24 horas *post-mortem* y se separó el músculo *Longissimus thoracis* para el análisis químico e instrumental (índice de fragmentación miofibrilar, pH, contenido de colágeno, actividad de las calpaínas y calpastatina, compresión, pérdida de agua por goteo, análisis de resistencia al corte con cuchilla de Warner-Bratzler, perfil de ácidos grasos, etc.). El porcentaje de músculo, grasa, hueso y otros componentes (tendones y vasos sanguíneos) se estimó a partir del corte mencionado. Para el análisis sensorial de la carne (sabor, textura y jugosidad) se utilizaron cortes del mismo músculo y dos paneles simultáneos de degustadores entrenados, en España y en el Reino Unido.

Tabla 2. Registros fenotípicos tomados en todos los animales de la muestra.

Evaluación del crecimiento	Unidades
<i>Peso al inicio del experimento, a los 9 meses, 12 meses y 15 meses</i>	kg
<i>Peso al sacrificio</i>	kg
<i>Ganancia de peso diario promedio</i>	kg/día
Evaluación de la canal	
<i>Peso de la canal</i>	kg
<i>Longitud de la canal</i>	cm
<i>Compacidad de la canal^{*1}</i>	kg/cm
<i>Compacidad de los miembros</i>	kg/cm
<i>Rendimiento de la canal^{*2}</i>	%
<i>Conformación^{*3}</i>	Puntaje
<i>Grado de engrasamiento^{*4}</i>	Puntaje
<i>Profundidad de pecho</i>	cm
<i>Longitud y ancho de los miembros posteriores</i>	cm
<i>Área de la chuleta</i>	cm ²
<i>Diámetro mínimo y máximo de la chuleta^{*5}</i>	cm
<i>Porcentaje de músculo</i>	%
<i>Porcentaje de grasa</i>	%
<i>Porcentaje de hueso & otros</i>	%
<i>Peso de grasa suprarrenal</i>	kg
Evaluación química e instrumental de la carne	
<i>Índice de fragmentación miofibrilar</i>	
<i>Contenido total de colágeno</i>	mg/g tejido
<i>Porcentaje de colágeno soluble</i>	%
<i>Actividad de la u-calpaína</i>	U/g tejido
<i>Actividad de la m-calpaína</i>	U/g tejido
<i>Actividad de la calpastatina</i>	U/g tejido
<i>pH a las 3 hs, a las 24 hs y luego de descongelada</i>	
<i>Compresión mediante cuchilla de Warner-Bratzler a las 48hs y 10 días de la carne cocida y a los 10 días de la carne cruda</i>	libras
<i>Pérdida de agua por descongelamiento y cocción, a las 48 horas y 10 días</i>	%

Tabla 2. (continuación).

<p>Perfil de ácidos grasos (para lípidos totales, lípidos neutros y fosfolípidos):</p> <p>Saturados: 12:0 +14:0 +16:0 +18:0</p> <p>Monoinsaturados: 16:1 + trans 18:1+ 9cis18:1 n-9 +11cis18:1 + 20:1 n-9</p> <p>Poliinsaturados: 18:2 + 18:3 + 20:3n-6 +20:4n-6 + 20:5n-3 + 22:4n-6 + 22:5n-3 +22:6n-3</p> <p>ω3: 18:3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3</p> <p>ω6: 18:2 + 20:3n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6</p> <p>Relación poliinsaturados:saturados (18:2 + 18:3) / (12:0 + 14:0 + 16:0 + 18:0)</p> <p>Relación ω6/ω3</p> <p>(18:2 + 20:3n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6) / 18:3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3)</p> <p>Relación linoleico: linolénico (18:2/18:3)</p> <p>ATT (C20:3 + C20:5)/C20:4</p>	<p>mg/100g</p>
<p>Evaluación sensorial de la carne</p> <p>textura</p> <p>jugosidad</p> <p>sabor</p>	<p>Puntaje</p> <p>Puntaje</p> <p>Puntaje</p>

*1: Índice de compacidad (*blockiness*) = peso de la canal caliente (kg) x 100 / longitud de la canal.

*2: Rendimiento de la canal (*dressing percentage*) = (peso de la canal caliente/peso vivo al sacrificio)×100.

*3: El grado de conformación corresponde a la clasificación SEUROP (EEC, 1991) con una escala que va desde 1 (muy pobre) a 18 (muy buena).

*4: El grado de engrasamiento fue medido según la clasificación de la Unión Europea con una escala que va desde 1 (muy bajo contenido de grasa) a 15 (muy alto contenido de grasa).

*5: Diámetros máximo (medio-lateral) y mínimo (dorso-ventral) del área de la chuleta.

Genes y polimorfismos analizados

Los SNPs analizados corresponden a polimorfismos descritos en publicaciones, en particular las relacionadas con el proyecto GeMQual, y/o en las bases de datos públicas (Williams *et al.*, 2009; http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El genoma bovino disponible en la actualidad es la versión *Btau_4.0*, publicada en

2007, que corresponde a un “ensamblaje” preliminar con una profundidad de 7x de un ejemplar hembra de la raza Hereford.

Se seleccionaron polimorfismos ubicados en genes considerados “buenos candidatos” para estar asociados a características que influyen en la calidad de la carne y la canal o en genes incluidos en rutas metabólicas potencialmente implicadas en caracteres productivos. Estos genes codifican enzimas o proteínas involucradas en vías metabólicas y/o procesos fisiológicos que inciden en el metabolismo lipídico y energético, el desarrollo y composición del tejido muscular y el crecimiento. En varios casos se trata de genes ubicados en regiones cromosómicas donde se han detectado QTLs asociados a los fenotipos de interés (por ejemplo, *PPARGC1A* y un QTL de síntesis de grasa en BTA6; Weikard *et al.*, 2006). También se incluyeron SNPs localizados en genes que cuentan con datos fiables acerca de su efecto en otras razas de ganado bovino, otras especies domésticas (ovino, porcino, etc.) u otras especies más estudiadas (por ejemplo, humano y ratón).

En los casos en que había más de un SNP detectado por gen se priorizaron los que se ubicaban en regiones altamente conservadas, las cuales fueron determinadas mediante el alineamiento de secuencias de varias especies, utilizando las herramientas disponibles para tal fin en las bases de datos de internet anteriormente mencionadas. Un polimorfismo en una región conservada es más probable que tenga una mayor incidencia en la expresión génica. Dichas regiones suelen ser exones o regiones de regulación de la transcripción (por ejemplo, islas CpG, ciertas regiones de los intrones, regiones promotoras en 5´ y terminales en 3´ de los genes). Aunque muchos de los SNPs seleccionados localizados en regiones codificantes no generan cambio de aminoácido en el péptido resultante, fueron tomados en cuenta dada la posibilidad de que dicho SNP pudiera estar en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal, desconocida, del cambio fenotípico. Lo mismo se aplica para varios SNPs que se ubican en intrones.

En total fueron seleccionados 61 polimorfismos, ubicados en 51 genes (Tabla 3).

Tabla 3. Marcadores utilizados, en orden alfabético. Denominación del polimorfismo (Locus), número de acceso en *Genbank* (de la secuencia donde se encuentra el SNP o de dbSNP), variantes alélicas que presenta, cromosoma bovino en el cual se encuentra el gen (BTA), nombre del gen que contiene al polimorfismo y función conocida del gen en el organismo.

Locus	SNP Genbank	alelos	BTA	gen	función
ABCA1	ss28451692	C/A	8	ATP-binding cassette, subfamilia A, miembro 1	transporte de lípidos
ACACA	ss64381883	G/A	19	acetil-CoA carboxilasa alfa	metabolismo lipídico
ACAT2	ss65658764	T/C	9	acetil-coenzima A acetiltransferasa 2	metabolismo lipídico
ALDH2	ss77831990	C/T	17	aldehído deshidrogenasa 2 (mitocondrial)	metabolismo energético
CAPN1 g.6545	AF248054	A/G	29	μ-calpaína	proteólisis de fibras musculares
CAPN1 g.5709	AF252504	G/C	29	μ-calpaína	proteólisis de fibras musculares
CAPN1 g.4558	AF248054	C/T	29	μ-calpaína	proteólisis de fibras musculares
CAPN1 g.4751	rs110877698	C/T	29	μ-calpaína	proteólisis de fibras musculares
CAST	ss77832278	G/C	7	calpastatina	proteólisis de fibras musculares
CAST g.2959	AF159246	G/A	7	calpastatina	proteólisis de fibras musculares
CAV3	ss62797050	T/C	22	caveolina 3	desarrollo muscular
CFL1	ss77831721	C/T	29	cofilina 1	depilimerización de la actina
CHRENE g.1145del20	NC_007317	C/T(del)	19	receptor colinérgico, nicotínico, epsilon	desarrollo muscular
CTP1	ss65363345	G/C	5	carnitin palmitoiltransferasa 1B	metabolismo de ácidos grasos
CRH g.22 CbG	AF340152	C/G	14	hormona liberadora de corticotropina	regulación del peso corporal
CR1	ss77832128	G/T	10	factor inhibidor de la diferenciación 1	adipogénesis
CRYAB	ss62086225	T/C	15	crystallin alfa B	desarrollo del tejido muscular
CTSF	ss77831844	A/G	29	cathepsina F	crecimiento y conformación
CYP1A1	ss77832034	G/A	21	citocromo P450, subfamilia 1, polipéptido 1 (mitocondrial)	metabolismo energético
DGAT1 g.6829 AbG	AY065621	A/G	14	diacil glicerol acetil transferasa 1	producción de triglicéridos
DNAJA1	ss65351307	T/C	8	DnaJ (Hsp40) homóloga, subfamilia A, miembro 1	desarrollo del tejido muscular
FABP4	ss77831857	C/G	14	proteína de unión a ácidos grasos 4	metabolismo de ácidos grasos
FADS1	ss63322537	C/T	29	ácido graso desaturasa 1	metabolismo de ácidos grasos
FIT2	ss61961642	A/C	13	transcripto inductor de grasas 2	metabolismo lipídico
GDF8	ss77831865	G/C(del)	8	miostatina	desarrollo muscular
GDF8_F94L	ss77831863	A/C	8	miostatina	desarrollo muscular
GDF8_Q204X	ss77831864	C/T	8	miostatina	desarrollo muscular
GHR g.4962 TbA	AM161140	T/A	20	receptor de la hormona del crecimiento	crecimiento y desarrollo
GLUT4	ss62538460	G/A	19	transportador de glucosa dependiente de insulina	metabolismo energético
HSPB1	ss63015930	T/C	25	proteína de choque térmico de 27kDa 1	metabolismo lipídico
IGF2R	ss77831877	G/A	9	receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina 2	crecimiento y desarrollo
INSIG2	ss62463931	A/T	2	gen inducido por insulina 2	metabolismo energético
LEP	ss77832159	A/T	4	leptina	metabolismo lipídico y peso corporal
LEP g.198 CbT	AF120500	T/C	4	leptina	metabolismo lipídico y peso corporal
LOX g.7548 CbT	NW_001495344	T/C	7	lisil oxidasa	desarrollo del tejido muscular
LPL	ss65478732	T/C	8	lipoproteína lipasa	metabolismo lipídico
ME3	ss77831909	G/A	29	ME3 malic enzyme 3, dependiente de NADP(+), mitocondrial	metabolismo energético
MGAT1	ss65425229	T/C	2	monoacilglicerol O-aciltransferasa 1	metabolismo lipídico
MMP1	ss77831916	A/G	15	metaloproteína de matriz 1 (colagenasa intersticial)	metabolismo del colágeno
OPN g.3492	rs110503508	A/G	6	osteopontina (también llamada SPP1)	desarrollo óseo y metabolismo lipídico
OPN g.10043	rs110254070	C/T	6	osteopontina (también llamada SPP1)	desarrollo óseo y metabolismo lipídico
OPN g.1406	rs108997065	C/T	6	osteopontina (también llamada SPP1)	desarrollo óseo y metabolismo lipídico
PCSK1	ss77831755	C/T	7	proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 1	metabolismo lipídico
PLOD3	ss77831757	G/A	25	procólágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxygenasa 3	metabolismo del colágeno
PLTP	ss77832104	G/A	13	proteína de transferencia de fosfolípidos	metabolismo lipídico
POMC g.437del1	J00021	T/C	11	pro-opiomelanocortina	crecimiento y metabolismo lipídico
PPARG	ss62850198	A/G	22	receptor gamma activado proliferador de peroxisomas	adipogénesis y metabolismo lipídico
PPARGC1A ex8_1209	-	C/T	6	PPAR-gamma coactivador 1-alfa	adipogénesis y metabolismo lipídico
PPARGC1A	rs41651313	C/T	6	PPAR-gamma coactivador 1-alfa	adipogénesis y metabolismo lipídico
PPM2C	ss77831758	C/T	14	proteína fosfatasa 2C dependiente de magnesio, subunidad catalítica	metabolismo lipídico
PRKAG2	ss77832378	A/G	4	proteína quinasa activada por AMP, gamma 2, subunidad no catalítica	metabolismo energético
RORA	ss65549854	G/A	10	receptor A relacionado a RAR	adipogénesis y metabolismo lipídico
RORC g.3290	DQ667048	C/A	3	receptor de ácido retinoico gen C	adipogénesis y metabolismo lipídico
SCAP	ss62839002	G/A	22	chaperona de SREBF	metabolismo de ácidos grasos
SCD g.10329 TbC	AY241932	T/C	26	estearoil-CoA desaturasa (delta-9-desaturasa)	metabolismo de ácidos grasos
SOCS2B	ss77832234	C/T	5	supresor de la señal de la citoquina 2	metabolismo lipídico
SREBP1C	ss62543518	T/C	17	proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1	metabolismo de ácidos grasos
SUSP1	ss77831761	G/A	9	supresor de producción de superóxido	modificación de proteínas
TG g.1696 CbT	M35823	C/T	14	tiroglobulina	metabolismo lipídico
UCP2 g.812 GbA	XM_614452	C/T	15	proteína desacopladora 2	metabolismo energético
VIM	ss77831736	C/T	13	vimentina	desarrollo muscular

Métodos de genotipado utilizados

A todos los animales muestreados se les tomaron muestras de sangre en *Magic Buffer*® (Biogen Diagnostica, España), de la cual se extrajo ADN genómico mediante un protocolo estándar basado en fenol:cloroformo y precipitación con etanol. Estas muestras de sangre conforman el banco de muestras del Proyecto GeMQual.

Los SNPs *SCD* y *FADS1* fueron genotipados mediante la técnica de *PCR-SSCP* (*Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism*), la cual además permite detectar nuevos polimorfismos. La mayoría de los marcadores fueron genotipados por el personal del Laboratorio de Genética utilizando la metodología de *Multiplex Primer Extension*. Ambas técnicas se detallan a continuación.

Genotipado por PCR-SSCP.

La técnica de *PCR-SSCP* se basa en la amplificación del segmento de ADN que contiene al SNP y su posterior electroforesis en geles de acrilamida:bisacrilamida no desnaturalizantes, después de desnaturalizar la muestra previamente, con el fin de separar las hebras de la doble cadena de ADN y determinar las variantes alélicas según la conformación tridimensional que adopten dichas hebras. Al desnaturalizarse el ADN, cada hebra se renaturaliza sobre sí misma adoptando una conformación específica que depende de la secuencia de bases nucleotídicas que contiene. Diferentes secuencias se plegarán de manera distinta y migrarán a velocidades distintas a través del gel, posibilitando la detección de alelos diferentes según el patrón de bandas que se visualice. De esta manera, se determinan los tres genotipos posibles para cada SNP dialélico, además de posibilitar la detección de mutaciones no descriptas. Se trata de una técnica de genotipado relativamente sencilla y de bajo costo dado que requiere una sola amplificación (Barroso *et al.*, 1999).

El diseño de los cebadores de PCR se basó en la secuencia genómica que circunda el SNP de interés. Las secuencias de los genes fueron obtenidas de las bases de datos de internet (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para cada SNP se tomó una secuencia de aproximadamente 500 pares de bases, incluyendo al polimorfismo, la cual se sometió al programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para diseñar ambos cebadores, directo e inverso. Se tomaron en cuenta diversos factores a la hora de lograr un diseño óptimo de los cebadores, tales como la temperatura de disociación del ADN (T_m , entre 52 y 58°C), el contenido en GC (40-60%), la longitud del cebador (18 a 22 pares de bases, aproximadamente) y la probabilidad de formación de estructuras secundarias entre y dentro de los cebadores que puedan interferir con la amplificación. También se tomó en cuenta el tamaño de la secuencia amplificada (entre 300 y 400 pares de bases, aproximadamente) y la posición del polimorfismo dentro de dicha secuencia, siendo preferible una ubicación cercana al centro del amplicón. Por último, se realizó un análisis de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para detectar posibles hibridaciones inespecíficas con otras secuencias genómicas bovinas.

El protocolo de amplificación se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de amplificación por PCR de los marcadores analizados.

Mix de PCR por muestra:

1,0 µl tampón 10x

0,75 mM MgCl₂

0,3 mM dNTPs

0,5 µM de cada cebador

0,25 U de Taq Polimerasa (Biotools)

10 ng de ADN

Cantidad suficiente de H₂O destilada y estéril para un volumen final de 10 µl.

Programa de amplificación (termociclador PTC100 MJResearch):

Desnaturalización inicial: 94°C, 4 minutos.

34 ciclos:

Desnaturalización: 94°C, 50 segundos.

Hibridación: 58°C, 50 segundos*.

Extensión: 72°C, 50 segundos.

Extensión final: 72°C, 10 minutos.

*La temperatura de hibridación depende de cada pareja de cebadores. Un programa de amplificación con un gradiente de temperatura (desde 53°C hasta 63°C) fue utilizado previamente para seleccionar la temperatura de hibridación óptima.

El producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 1,5% para confirmar la correcta amplificación del fragmento de interés, utilizando tampón TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH=8), bromuro de etidio y transiluminador de luz UV para la visualización de los fragmentos.

Se añadieron 10 µl de tampón de carga desnaturizante (EDTA 5,5 Mm, xilen-cyanol 0,05%, azul de bromofenol 0,005%, pH = 8, en formamida desionizada) a cada producto de PCR. Posteriormente fueron desnaturizados a 96° C durante 5 minutos e inmediatamente colocados en hielo por otros 5 minutos. A continuación fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida:bisacrilamida. Se ensayaron diversas condiciones de electroforesis con el objetivo de determinar la metodología más conveniente. Las concentraciones relativas de acrilamida:bisacrilamida ensayadas fueron 19:1, 29:1 y 100:1, al 10, 12 y 19%. Los geles contenían TBE 0,5X, persulfato amónico 0,5% y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) 0,05%. Se experimentó con geles con y sin glicerol (5%). La electroforesis se llevó a cabo en un tampón TBE1x por tiempos y temperaturas variables (de 1 hora y media a 6 horas; a temperatura ambiente, 5°C y 10° C), a 300V. Finalmente, se procedió a la tinción de los genes con nitrato de plata siguiendo el procedimiento descrito por Barroso y colaboradores (1999). Los patrones de bandas de ADN obtenidos se analizaron visualmente. La asignación de los diferentes patrones a cada alelo fue confirmada mediante secuenciación automática.

Genotipado por Multiplex Primer Extension.

La técnica de *Primer Extension* es un proceso en dos pasos que involucra la hibridación de un cebador a la secuencia inmediatamente anterior al SNP, seguida de una reacción de secuenciación muy corta, en la cual una ADN polimerasa extiende el cebador hibridado mediante la adición de una base complementaria al nucleótido presente en el SNP. Al detectarse cuál base ha sido incorporada, se determina el alelo presente en el SNP. La correcta asignación de alelos se basa en la alta precisión de la polimerasa, por lo que es un método confiable, robusto y flexible, ya que permite genotipar muchos SNPs a la vez bajo las mismas condiciones de reacción. Estas características lo hacen ventajoso para aplicaciones de alto rendimiento, en las cuales es necesario obtener un número importante de

genotipos, debido a que se minimiza el diseño y optimización del ensayo. Por estas razones, además de su relativo bajo costo, el *Primer Extension* se ha convertido en el método con más aceptación para el genotipado de SNPs de medio a alto rendimiento, adaptado a varios formatos y plataformas, como por ejemplo en los *microarrays* y en la espectrometría de masa por MALDI-TOF, actualmente muy en uso (Kaminski *et al.*, 2006; Sevane *et al.*, 2010).

Entre las plataformas apropiadas para llevar a cabo *Primer Extension* se encuentran también los secuenciadores de ADN. Se utilizan cebadores modificados a los cuales se agregan nucleótidos u oligonucleótidos neutrales para aumentar su tamaño (también denominado *SNaPshot*). Incorporando dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorocromos, la separación por tamaños que permite la electroforesis en gel y capilar facilita el genotipado simultáneo (*Multiplex*) de muchos SNPs por reacción, aumentando la rapidez y eficacia de la técnica. Cuando el cebador hibrida con la secuencia diana inmediatamente anterior al SNP, un ddNTP complementario al nucleótido del SNP se agrega al extremo 3' del cebador. El hidroxilo 3' faltante en el ddNTP impide que se unan otros nucleótidos a continuación. Como cada uno de los cuatro tipos de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) está marcado con un fluorocromo diferente, es posible detectar cualquiera de los cuatro alelos (A, C, G, T) en una misma reacción.

En el presente trabajo, los SNPs de interés fueron genotipados en varias reacciones múltiples (*Multiplex*). Las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de amplificación para cada reacción. Composición del *mix* de PCR y condiciones de ciclado.

Mix de PCR por muestra:

Cebadores (concentraciones variables, de entre 0,5mM y 1,5mM)

1,25 ml de la solución QIAGEN® Multiplex PCR (Izasa, España)

10 ng de ADN

Volumen final: 3 ml.

Programa de amplificación (termociclador PTC100 MJResearch):

Desnaturalización inicial 95 °C por 15 minutos.

31 ciclos:

Desnaturalización a 94 °C por 30 segundos.

Hibridación a 57 °C por 1 minuto y 30 segundos.

Extensión a 72 °C por 1 minuto.

Extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Después de la amplificación, los cebadores y dNTPs sobrantes fueron eliminados mediante la incubación de 2,5 µl de producto de PCR a 37°C durante 15 minutos con 5 U de Exonucleasa I (Exol) y 1 U de fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*; USB Corporation, Alemania), seguida de una inactivación enzimática calentando la solución a 80°C por 30 minutos.

Para el diseño de los cebadores de *Primer Extension* se consideraron longitudes variables de entre 22 a 70 pares de bases. Por encima de las 44 pares de bases, un número variable de nucleótidos y/o un oligonucleótido neutral (TAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA) fue añadido en forma total o parcial al extremo 5' para generar productos más largos. Los cebadores se analizaron en BLAST para detectar posibles hibridaciones inespecíficas con cualquier otra secuencia bovina presente en la *multiplex*. Todos los cebadores fueron adquiridos a INVITROGEN TM (Groningen, Holanda).

La reacción final fue llevada a cabo en un volumen de 5 µl conteniendo 0,75 mM de MgCl₂, diferentes concentraciones de los cebadores, 0,2 U de *Thermo Sequenase* (Amersham Biosciences Inc., Sunnyvale, CA, EEUU), 225 µM de ddNTPs (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) y 2 µl de producto de PCR de la *multiplex*. Las condiciones de ciclado consistieron en 1 minuto a 96°C, seguido de 34 ciclos de 96°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos y 60°C por 15 segundos. Los dinucleótidos no incorporados fueron eliminados añadiendo 0,33 U de SAP a 5 µl de los productos diluidos 1:2 con tampón de dilución.

A una cantidad de 2 ml del producto de la reacción final se le agregó 10 ml de Hi-DiTM Formamida (Applied Biosystems) y 0,17 ml del marcador de peso molecular interno GeneScanTM-120 LIZTM (Applied Biosystems), previo a la inyección en un secuenciador ABI 3130 utilizando POP-7® (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados por medio del programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Análisis de las variables fenotípicas.

Los datos de las características fenotípicas detalladas en la Tabla 2 fueron analizados para detectar valores atípicos y desviaciones a la distribución Normal que pudieran sesgar artificialmente los resultados. Para ello se utilizaron los programas STATGRAPHICS Plus 5.1 (http://www.statgraphics.com/statgraphics_plus.htm) y GenStat 10.2 (<http://www.vsnl.co.uk/es/software/genstat/>). Para cada característica estudiada se analizó la distribución general, media, varianza, valores mínimos y máximos, desviación típica, asimetría y curtosis tipificadas. Para analizar la homogeneidad de las varianzas entre las diferentes razas se utilizó la prueba de homocedasticidad de Levene.

Para normalizar aquellas variables que no tuviesen una distribución Normal se siguió la siguiente estrategia: eliminación de los valores atípicos y/o transformación de la variable. Se aplicó una transformación de Box-Cox (Box y Cox, 1964), en la cual el valor de la variable se eleva a $1-b/2$, siendo b la pendiente de la recta de la varianza sobre la media de dicha variable. Para probar la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk.

Análisis de genética poblacional.

Para cada SNP se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, por raza y globales. Dado que los SNPs son dialélicos, la presencia de un alelo en una frecuencia menor a 0,05 puede sesgar artificialmente los resultados, por lo que los SNPs cuyo alelo minoritario no superaba este umbral no fueron utilizados en el análisis de asociación.

Se calcularon índices de diversidad genética (heterocigosis esperada, H_e , y observada, H_o) y estadístico F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg se calculó mediante el test exacto de Fisher (Fisher, 1935).

Para todos estos cálculos se utilizó el programa Genepop v4.0 (Rousset, 2008).

Análisis de asociación genotipo-fenotipo.

Para el análisis de asociación se utilizó un modelo de regresión lineal múltiple, en el cual se asumió que los efectos de los SNP sobre cualquiera de las variables fenotípicas son completamente aditivos y que no hay interacciones entre el genotipo del SNP y la raza¹.

El efecto de cada SNP sobre cada variable fue estimado mediante su inclusión como covariable en el modelo lineal. Debido al elevado número de SNPs en relación al número de registros fenotípicos, cada SNP fue analizado en forma individual, al igual que como se procede en los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (*Genome-Wide Association Studies*).

El modelo utilizado en este estudio fue:

$$y = raza + establecimiento / fecha_de_faena + g\alpha + e$$

donde **y** es la variable fenotípica en cuestión, *raza* es el efecto de la raza (efecto fijo), *establecimiento/fecha_de_faena* es el efecto combinado del establecimiento de cría y la fecha de sacrificio (efecto fijo), **g** es el genotipo del SNP (codificado como 1, 2 y 3 para los genotipos aa, Aa y AA, respectivamente) y **α** es el efecto aditivo del SNP. Recuérdese que en cada país participante del proyecto había un establecimiento de cría, a excepción de Dinamarca, donde había dos. Los animales fueron agrupados en lotes combinando el establecimiento de origen y la fecha de faena (el número mínimo de animales por lote fue de 17 animales tomando en cuenta todas las razas, y de 29 si se utilizan sólo las continentales). Sólo fueron utilizados los SNPs que presentaron una frecuencia del alelo minoritario mayor a 0,05. Al tratarse de animales no emparentados (Albertí *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009), no se incluyeron efectos paternos.

Es importante destacar que las medidas fenotípicas de cada raza fueron tomadas en un solo país (el país de origen de cada raza), por lo que los efectos del país de origen y de la raza están combinados. Esto significa que el *efecto raza* estimado y obtenido del análisis no puede utilizarse para comparar dos razas a menos que ambas provengan del mismo país (excepto Dinamarca, en donde para ser comparables las razas deben provenir del mismo establecimiento).

¹ Se llevaron a cabo análisis preliminares para determinar las interacciones entre la raza y los SNP, aunque no fueron significativos, posiblemente debido al bajo número de registros por raza. Por este motivo no se tomaron en cuenta este tipo de interacciones.

Dado que existieron inconvenientes con el manejo de las razas de origen británico que pueden afectar los resultados, los análisis se efectuaron dos veces, con y sin estas razas. En un primer análisis se incluyeron todos los animales de las 15 razas muestreadas ($N = 426$). Para un segundo análisis se tomaron todos los animales de razas continentales y se excluyeron los de las razas Aberdeen Angus, Jersey, South Devon y Highland ($N = 314$).

Para corregir el efecto de pruebas múltiples, se llevó a cabo un análisis de permutaciones que permitió obtener un umbral de significación estadística de cada experimento (uno por cada variable fenotípica). En cada permutación los genotipos de los SNPs se mezclan al azar entre todos los animales. Se calculó el efecto de cada SNP y el máximo valor obtenido del estadístico F de la regresión se utilizó para calcular la distribución de la hipótesis nula. Se efectuaron 10.000 permutaciones con este fin, de las cuales se obtuvo el umbral de 5% de significación estadística.

El análisis de asociación se llevó a cabo mediante programación en lenguaje R, utilizando el paquete estadístico *nlme* (<http://www.r-project.org/>).

RESULTADOS

Genotipos obtenidos

En total se obtuvieron 24.661 genotipos para 61 SNPs diferentes. No hubo dificultad en genotipar los SNPs mediante las técnicas utilizadas, a excepción de *POMC g.437del1* (nro. acceso *Genbank* J00021, con 213 animales genotipados de un total de 436) y *TG g.1696 CbT* (M35823, 175 animales genotipados).

Las condiciones óptimas de electroforesis para la metodología *PCR-SSCP* se obtuvieron utilizando geles de acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 10%, durante un tiempo de 2 horas y media a 4 horas según el SNP, a 300V y una temperatura constante de 10° C. Se obtuvieron claros patrones de bandas en los geles que permitieron discriminar con facilidad entre los distintos genotipos. El análisis de secuenciación de individuos con patrones de bandas diferentes confirmó la correcta asignación de cada patrón a su genotipo correspondiente.

La metodología *Multiplex-Primer Extension* demostró ser altamente eficaz, permitiendo el genotipado simultáneo de un número elevado de individuos para decenas de SNPs diferentes. El genotipado de algunos individuos de los cuales ya se conocía previamente su genotipo por *PCR-SSCP* y/o secuenciación automática permitió confirmar la elevada precisión de esta metodología.

Análisis de los fenotipos

En muchas variables fenotípicas se detectaron valores atípicos que afectaban la distribución de los datos, aumentando la asimetría. Fue el caso, por ejemplo, del porcentaje de colágeno soluble (asimetría tipificada = 5,05), el pH de la carne después de su descongelación (asimetría tipificada = 13,93), la terneza medida a los 10 días de maduración (asimetría tipificada = 6,43), la compacidad de la canal (asimetría tipificada = -6,09) y la cantidad neta y porcentual de varios ácidos grasos, como ω 12:0, ω 18:0, ω 18:3n3, % ω 18:3n3, ω 20:5n3 y % ω 20:5n3 (asimetría tipificada = 11,84; 12,22, 12,79; 12,45; 11,04 y 18,42 respectivamente). Elevados valores de curtosis se observaron en el diámetro máximo de la chuleta (curtosis tipificada = 6,20), en la actividad de la calpaína B (curtosis tipificada = 7,25), en el porcentaje de colágeno soluble (curtosis tipificada = 5,41), en el pH de la carne después de su descongelación (curtosis tipificada = 23,19), en la cantidad de ω 18:0,

en el porcentaje de $\omega_{18:3n3}$ y en el porcentaje de $\omega_{20:5n3}$ (curtosis tipificada = 15,44; 11,57 y 28,38, respectivamente), por ejemplo.

Dada la gran variación existente entre y dentro de las razas, éstas presentaron una elevada heterogeneidad de sus varianzas en muchos casos, observándose valores de p muy por debajo de 0,05 en la prueba de homocedasticidad de Levene en los datos sin tratar. Tal fue el caso, por ejemplo, de pH de la carne descongelada (p valor = $7,4 \times 10^{-8}$), peso de la canal (p valor = $2,8 \times 10^{-10}$), % de músculo (p valor = $1,1 \times 10^{-8}$), % de grasa (p valor = $1,8 \times 10^{-7}$) y una gran cantidad de ácidos grasos, entre ellos $\omega_{11c18:1}$ (p valor = $9,2 \times 10^{-9}$), $\omega_{22:6n3}$ (p valor = $1,8 \times 10^{-12}$), etc.

En un número elevado de variables se observaron diferencias entre las razas británicas y el resto de las razas. Por ejemplo, en la mayoría de los ácidos grasos totales, las razas británicas tendían a presentar valores más elevados y mayores varianzas, mientras que las razas continentales tendían a presentar valores más bajos. Las razas danesas fueron una excepción dado que usualmente se ubicaban junto con las británicas. Por causa de esto, se observó una tendencia hacia el aumento de la asimetría de la distribución, con un sesgo hacia los valores más bajos, y un aumento también en el contraste entre las varianzas. Por ejemplo, en el porcentaje de $\omega_{18:3n3}$, en los cocientes $\omega_{18:2}/\omega_{18:3}$ y ω_6/ω_3 , las razas británicas presentaron diferencias altamente significativas en las varianzas con respecto a las otras razas (p valor de Levene $\ll 0,05$). Al aumentar el número de razas aumenta la heterogeneidad de los datos, por lo que la inclusión de las razas británicas en muchos casos contribuyó a aumentar las desviaciones observadas con respecto a la distribución Normal.

Parámetros poblacionales

Las frecuencias alélicas calculadas, por raza y en forma global, se presentan en las tablas del Anexo 1 (todas las razas) y Anexo 2 (sin las razas británicas). Algunos marcadores presentan una frecuencia global del alelo minoritario (*Minimum Allele Frequency*, o MAF) menor de 0,05 cuando consideramos todas las razas. Éstos son *ACACA* (ss64381883), *CPT1* (ss65363345), *CHRNE g.1145del20* (NC_007317), *GDF8_Q204X* (ss77831864), *GLUT4* (ss62538460), *INSIG2* (ss62463931), *LPL* (ss65478732) y *MGAT1* (ss65425229), y no serán utilizados en los análisis de asociación. Si se excluyen las razas británicas, los SNPs que presentan una MAF menor de 0,05 son *CPT1*, *CHRNE g.1145del20*, *GDF8_Q204X*,

INSIG2 y *MGAT1*. Por lo tanto, los marcadores *ACACA*, *GLUT4* y *LPL* sólo serán utilizados en el análisis de asociación cuando no se incluya a las razas británicas.

INSIG2 es el único marcador que no presenta variación, estando su alelo A fijado en todas las razas. Por otro lado, varios marcadores presentan frecuencias globales cercanas a 0,50 para sus dos alelos, como por ejemplo *ACAT2* (ss65658764), *CAPN1 g.6545* (AF248054), *CAPN1 g.4751* (rs110877698), *FABP4* (ss77831857), *FADS1* (ss63322537) y *PCSK1* (ss77831755).

Varios SNPs presentan un solo alelo en algunas razas, presentando variación en otras. Por ejemplo, el alelo G de *ACACA* está fijado en todas las razas británicas y francesas; en Aberdeen Angus y Danish Red el SNP *CRI1* (ss77832128) sólo presenta el alelo G; en la raza Pirenaica sólo está presente el alelo G de *CAPN1 g.5709* (AF252504); *POMC g.437del1* está fijado en todas las razas británicas y danesas, aunque esto puede deberse a los problemas de genotipado mencionados; etc.

La gran heterogeneidad mostrada por las distintas razas en cuanto a las frecuencias relativas de cada alelo se refleja también en sus valores de diversidad genética (Anexo 3). Sin tomar en cuenta aquellas razas en las cuales sólo un alelo se encuentra presente, cuando existe variación la heterocigosis puede ser tan baja como 0,032 (H_o y H_e de la raza Pirenaica para el marcador *ACACA*), 0,033 (H_o y H_e de la raza Piamontesa para el SNP *DGAT1 g.6829 AbG*, AY065621) o 0,062 y 0,063 (H_o y H_e , respectivamente, de la raza Jersey para el marcador *CAST*, ss77832278). Valores muy elevados de heterocigosis se observan por ejemplo en Aberdeen Angus para el marcador *OPN g.3492* (rs110503508, H_o = 0,815; H_e = 0,503), en Danish Red para *ACAT2* (H_o = 0,690; H_e = 0,490), en Limousin para *POMC g.437del1* (H_o = 0,727; H_e = 0,473), en Marchigiana para *CAST g.2959* (AF159246, H_o = 0,714; H_e = 0,463), etc. En estos casos se observa un exceso de individuos heterocigotos con respecto a lo esperado, es decir, valores de F_{IS} significativamente negativos ($p < 0,05$).

También se encontraron desviaciones respecto al equilibrio Hardy-Weinberg por situaciones opuestas -una fuerte deficiencia de heterocigotos- con valores de F_{IS} elevados ($p < 0,05$). Esta situación se presenta, por ejemplo, en la raza Avileña para el marcador *CAPN1 g.6545* (H_o = 0,267; H_e = 0,503), en Marchigiana para *CYP1A1* (ss77832034, H_o = 0,107; H_e = 0,225), en Limousin para *SOCS2B* (ss77832234, H_o = 0,065; H_e = 0,124), etc.

Considerando en conjunto todos los marcadores analizados, los índices de diversidad genética por raza son de moderados a bajos (Anexo 3). Las razas con heterocigosis más elevada son Asturiana de los Valles (H_o = 0,323; H_e = 0,318),

Avileña ($H_o = 0,299$; $H_e = 0,307$) y Danish Red ($H_o = 0,298$; $H_e = 0,281$), mientras que las que presentan los índices más bajos son Highland ($H_o = 0,239$; $H_e = 0,229$), Limousin ($H_o = 0,266$; $H_e = 0,273$) y South Devon ($H_o = 0,270$; $H_e = 0,256$). Dado que los índices de heterocigosis observados no difieren en gran medida de los esperados, el estadístico F_{IS} presenta valores cercanos a cero en todas las razas.

Análisis de asociación genotipo-fenotipo

En total, teniendo en cuenta los resultados con y sin las razas británicas, se encontraron 31 asociaciones significativas entre genes y características de la carne y la canal (Tabla 6 y Tablas 7 a la 17). Estas asociaciones incluyen once SNPs presentes en diez genes (*GDF8*, *LEP*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *SCD*, *HSPB1*, *CFL1*, *CYP1A*, *CAPN1* y *PCSK1*). Otras 61 asociaciones se destacan por su proximidad al umbral de significación estadística, en cuyos posibles efectos en la calidad de la carne sería de interés profundizar (Tablas 7 a la 17).

Algunas de estas asociaciones eran esperables, como la relación entre el gen de la miostatina y parámetros relacionados con el desarrollo muscular, mientras que otras resultaron novedosas, como por ejemplo la relación entre *CYP1A1* y la jugosidad de la carne, o la relación entre la leptina y el contenido de ácido linoleico conjugado.

Tabla 6. Resultados significativos para el total de la muestra (todas las razas) y para la muestra de razas continentales (sin razas británicas). Carácter fenotípico analizado, SNP asociado, estadístico F de la regresión (Freg.), umbral de significación (Fumb.) y p valor de la regresión.

TODAS LAS RAZAS				
carácter	SNP	F reg	F umb.	p-valor
rendimiento de la canal	GDF8	12,75	11,36	0,0004
porcentaje de músculo	GDF8	14,02	11,59	0,0002
área de la chuleta	GDF8	14,36	11,34	0,0002
compacidad de la canal	GDF8	17,90	11,30	0,00003
cantidad de colágeno A	GDF8	21,14	11,42	0,000006
cantidad de colágeno B	GDF8	27,07	11,66	0,0000003
colágeno total (promedio)	GDF8	26,70	11,24	0,0000004
jugosidad de la carne	CYP1A	12,09	11,81	0,0006
actividad mu-calpainina B	CAPN1 g.5709	16,24	11,46	0,00007
% 9c11tCLA	LEP	14,41	11,23	0,0002
w9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	18,13	11,18	0,00003
% 9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	16,35	11,74	0,00006
w9c11tCLA	CFL1	13,04	11,12	0,0003
w9c11tCLA (lípidos neutros)	CFL1	12,60	11,51	0,0004
w9c11tCLA	PPARG	11,31	11,12	0,0009
w9c11tCLA (lípidos neutros)	PPARGC1A	12,86	11,51	0,0004
w20:1 (fosfolípidos)	PPARGC1A ex8_1209	12,04	11,51	0,0006
% 18:2n6 (fosfolípidos)	HSPB1	11,78	11,18	0,0007
SIN RAZAS BRITANICAS				
carácter	SNP	F reg	F umb.	p-valor
rendimiento de la canal	GDF8	12,96	11,52	0,0004
área de la chuleta	GDF8	19,73	11,28	0,00001
cantidad de colágeno B	GDF8	19,48	11,51	0,00001
colágeno total (promedio)	GDF8	17,64	11,56	0,00004
colágeno total (promedio)	PCSK1	13,57	11,56	0,0003
jugosidad de la carne	CYP1A	11,90	11,48	0,0006
pH (carne descongelada)	HSPB1	12,48	11,51	0,0004
% 9c11tCLA	LEP	17,14	11,94	0,00005
w9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	16,50	11,46	0,00006
% 9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	18,50	11,43	0,00002
% 9c11tCLA (lípidos neutros)	LEP	16,59	11,73	0,00006
% 18:2n6 (fosfolípidos)	SCD	12,39	11,34	0,0005
% 18:2n6 (fosfolípidos)	HSPB1	12,94	11,34	0,0004

Resultados significativos y cercanos a la significación por gen

A continuación se presentan las asociaciones que resultaron significativas por SNP y gen analizado. Se incluyen también otras asociaciones no significativas pero “sugerentes”, es decir, cercanas al umbral para los genes en cuestión.

GDF8

El gen de la miostatina, y en particular la delección de 11 pares de bases (SNP *GDF8*, ss77831865), se halló significativamente asociado a varios parámetros relacionados con el desarrollo muscular, como son el rendimiento y la compacidad de la canal, el área de la chuleta y el porcentaje de músculo. Excluyendo a las razas británicas, la asociación se mantiene para rendimiento de la canal y área de la chuleta (Tabla 7).

Tomando en cuenta todas las razas, el alelo mutado (alelo C, marcador de la delección de 11 pares de bases) genera en los animales homocigotos casi un 3% más de rendimiento de la canal, 8,8 cm² más de área de la chuleta, un incremento de 4,38% en el porcentaje de músculo y de 0,3 en el índice de compacidad de la canal, con respecto a los homocigotos para el alelo normal. Excluyendo a las razas británicas, el aumento en rendimiento es de 3,58% y de casi 13,5 cm² en el área de la chuleta. El diámetro mínimo dorso-ventral de la chuleta se halló muy cercano al nivel de significación, especialmente cuando se excluyen las razas británicas. El incremento generado por la mutación es de aproximadamente un centímetro más en los animales homocigotos. Este resultado está obviamente en concordancia con el aumento en el área de la chuleta, ya que son dos características muy relacionadas.

Se detectó una fuerte asociación entre este polimorfismo y el contenido de colágeno en la carne, tanto en la cantidad de colágeno total como en la fracción de colágeno tipo B. Si se incluyen las razas británicas, se detecta asociación significativa también con la fracción de colágeno tipo A (Tabla 7). Los animales homocigotos para el alelo normal (genotipo GG) presentan un incremento de la cantidad de colágeno con respecto a los animales homocigotos o heterocigotos para la mutación que genera la hipertrofia muscular. Cuando se incluyen todas las razas, el aumento es de 0,88 mg/g de tejido de colágeno tipo A, 1,0 mg/g de colágeno tipo B, dando como resultado un aumento neto de 0,92 mg/g de colágeno total. Teniendo en cuenta sólo las razas continentales, se observa un incremento en el colágeno tipo

B de 1,18 mg/g y de 1,4 mg/g de colágeno total, estando muy cerca del límite de significación para el colágeno tipo A.

Se detectó también una relación, aunque débil, entre esta mutación y el porcentaje de los ácidos grasos ω 11c18:1, ω 9c18:1 y ω 18:2 n6 (los dos últimos de la fracción fosfolipídica). Los efectos son relativamente pequeños (0,30% y 3,76% de aumento generado por el genotipo CC para ω 11c18:1 y ω 18:2 n6, respectivamente, y 3,38% de aumento provocado por el genotipo GG) y se encuentran cerca del umbral de significación. Esto no se observa cuando se excluyen las razas británicas.

No se detectó ninguna asociación significativa ni cercana al nivel de significación para el otro marcador del gen de la miostatina, *GDF8_F94L* (ss77831863).

Tabla 7. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *GDF8*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP GDF8								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
rendimiento de la canal (%)	CC	2,98	0,67	4,43	12,75	11,36	0,0004	0,42
porcentaje de músculo (%)	CC	4,38	0,68	6,41	14,02	11,59	0,0002	0,59
área de la chuleta (cm ²)	CC	8,80	0,91	9,69	14,36	11,34	0,0002	1,16
compacidad de la canal	CC	0,30	0,94	0,32	17,90	11,30	0,00003	0,04
cantidad de colágeno A (mg)	GG	0,88	1,33	0,66	21,14	11,42	0,000006	0,10
cantidad de colágeno B (mg)	GG	1,00	1,54	0,65	27,07	11,66	0,0000003	0,10
colágeno total (promedio; mg)	GG	0,92	1,46	0,63	26,70	11,24	0,0000004	0,09
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
rendimiento de la canal (%)	CC	3,58	0,90	3,98	12,96	11,52	0,0004	0,50
área de la chuleta (cm ²)	CC	13,48	1,60	8,41	19,73	11,28	0,00001	1,16
cantidad de colágeno B (mg)	GG	1,18	1,79	0,66	19,48	11,51	0,00001	0,13
colágeno total (promedio; mg)	GG	1,04	1,65	0,63	17,64	11,56	0,00004	0,12
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
diámetro min. chuleta (cm)	CC	0,74	0,73	1,01	8,37	11,49	0,004	0,13
w9c18:1 fosfolípidos (%)	GG	3,38	0,88	3,86	9,74	11,36	0,002	0,54
w18:2 n6 fosfolípidos (%)	CC	3,76	0,82	4,60	9,22	11,18	0,003	0,10
w11c18:1 lípidos totales (%)	CC	0,30	0,79	0,38	9,09	11,47	0,003	0,05
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
diámetro min. chuleta (cm)	CC	1,20	1,24	0,97	11,01	11,59	0,001	0,13
cantidad de colágeno A (mg)	GG	0,90	1,34	0,67	11,20	11,51	0,0009	0,13

CYP1A1

Se detectó una asociación significativa entre la jugosidad de la carne y un SNP del gen del citocromo P450 mitocondrial, *CYP1A1* (Tabla 8). Según la apreciación del panel de catadores, la carne de los animales de genotipo AA fue levemente más jugosa (0,93 y 0,76 desviaciones típicas, incluyendo todas las razas y sólo las continentales, respectivamente) que la carne de los animales GG.

Tabla 8. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *CYP1A1*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP CYP1A1								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
jugosidad de la carne	AA	0,56	0,93	0,60	12,09	11,81	0,0006	0,14
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
jugosidad de la carne	AA	0,60	0,76	0,79	11,9	11,48	0,0006	0,16

CAPN1

El SNP *CAPN1* g.5709 del gen de la u-calpaína se halló significativamente asociado a los niveles de actividad de la enzima u-calpaína B y cerca del umbral de significación para la actividad promedio de la u-calpaína total, teniendo en cuenta todas las razas (Tabla 9). El genotipo CC aumenta la actividad de la unidad B de la enzima en 0,6 desviaciones típicas con respecto al genotipo GG. No se observan efectos significativos de este SNP sobre la actividad de la u-calpaína A ($F = 3,06 / F_{\text{umbral}} = 11,51$). Para la actividad promedio de la u-calpaína, tomando en cuenta las unidades A y B, el efecto es de un incremento de 0,46 desviaciones típicas para el

genotipo CC con respecto al genotipo GG, aunque no es estadísticamente significativo. Cuando se excluyen las razas británicas estos efectos no se observan, estando muy lejos de la significación ($F < 4/F_{\text{umbral}} > 11$ en todos los casos).

Los otros SNPs estudiados de este gen no se hallaron asociados a ninguna de estas características. No se observó ningún tipo de asociación entre los polimorfismos de este gen y las mediciones de ternura de la carne.

Tabla 9. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *CAPN1* g.5709. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP CAPN1 g.5709								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
actividad mu-calpain B	CC	0,76	0,60	1,26	16,24	11,46	0,00007	0,09
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
actividad promedio mu-calpáinas	CC	0,46	0,46	1,01	8,72	11,36	0,003	0,08

LEP

El SNP *LEP* (ss77832159) del gen de la leptina se halló significativamente asociado al contenido del isómero 9c11t del ácido linoleico conjugado (ω 9c11tCLA), presente en la grasa intramuscular de la carne, tanto para el total de razas como para la muestra sólo de razas continentales (Tabla 10). Si bien los efectos son pequeños a moderados, la asociación fue más notoria para el contenido porcentual más que para el contenido neto de este ácido graso, y se observó en las tres fracciones lipídicas analizadas (lípidos totales, fosfolípidos y lípidos neutros). El efecto del genotipo TT (en comparación con el homocigoto AA) es un aumento de 0,89 a 1 desviaciones típicas de 9c11tCLA en los lípidos totales, según si se incluye o no a las razas británicas; un incremento de 0,80 y 1,20 desviaciones típicas en la

fracción fosfolipídica, incluyendo y excluyendo a las razas británicas, respectivamente; y un aumento de 1 desviación típica en los lípidos neutros, excluyendo a las razas británicas. Tomando en cuenta todas las razas, el aumento en el porcentaje de 9c11tCLA en la fracción neutra es de 0,73 desviaciones típicas, aunque no llega al límite de significación estadística. En cuanto al contenido neto, sólo fue significativo en la fracción fosfolipídica, registrándose un incremento de 0,26 mg/100g (1 desviación típica) para el genotipo TT, incluyendo y excluyendo a las razas británicas.

No se detectaron asociaciones significativas ni cercanas a la significación entre este SNP y otros ácidos grasos, así como tampoco para el otro SNP estudiado de este gen (*LEP g.198 CbT*, AF120500).

Tabla 10. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *LEP*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP LEP								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA fosfolípidos (mg)	TT	0,26	1,00	0,26	18,13	11,18	0,00003	0,03
w9c11tCLA lípidos totales (%)	TT	0,08	0,89	0,09	14,41	11,23	0,00020	0,01
w9c11tCLA fosfolípidos (%)	TT	0,04	0,80	0,05	16,35	11,74	0,00006	0,01
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA fosfolípidos (mg)	TT	0,26	1,04	0,25	16,50	11,46	0,00006	0,03
w9c11tCLA lípidos totales (%)	TT	0,08	1,00	0,08	17,14	11,94	0,00005	0,01
w9c11tCLA fosfolípidos (%)	TT	0,06	1,20	0,05	18,50	11,43	0,00002	0,01
w9c11tCLA lípidos neutros (%)	TT	0,10	1,00	0,10	16,59	11,73	0,00006	0,01
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos neutros (%)	TT	0,08	0,73	0,11	10,65	11,41	0,00100	0,01

CFL1

El SNP estudiado del gen de la cofilina 1 (*CFL1*, ss77831721) también se halló significativamente asociado a la cantidad neta de 9c11tCLA, teniendo en cuenta la totalidad de las razas en el análisis (Tabla 11). Los animales con genotipo TT presentan un incremento de 0,41 y de 0,38 desviaciones típicas en la fracción de lípidos totales y en la de lípidos neutros, respectivamente. Cuando se excluye a los animales de origen británico del análisis los efectos en las fracciones lipídicas mencionadas son muy similares, aunque no son estadísticamente significativos. Los resultados del análisis de asociación entre *CFL1* y la cantidad de 9c11tCLA en fosfolípidos, así como la cantidad porcentual de este ácido graso en las tres fracciones lipídicas, se encuentran muy alejados del umbral de significación estadística ($F < 6/F_{\text{umbral}} > 11$).

Se observó además una asociación débil pero cercana al nivel de significación entre este SNP y la relación entre ácido linoleico y ácido linolénico ($\omega 18:2/\omega 18:3$), sin incluir a las razas británicas. El efecto del genotipo TT es un incremento de 0,28 desviaciones típicas. No se detectó este efecto cuando se incluye la totalidad de las razas en el análisis.

Tabla 11. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *CFL1*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP CFL1								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos totales (mg)	TT	0,24	0,41	0,58	13,04	11,12	0,0003	0,06
w9c11tCLA lípidos neutros (mg)	TT	0,18	0,38	0,47	12,6	11,51	0,0004	0,04
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos totales (mg)	CC	0,012	0,40	0,03	10,53	11,66	0,001	0,002
w9c11tCLA lípidos neutros (mg)	TT	0,22	0,38	0,58	8,65	11,84	0,004	0,04
w18:2/w18:3	TT	0,0014	0,28	0,01	9,27	11,59	0,003	0,0002

Genes *PPARG* y *PPARGC1A*

Tomando en cuenta la totalidad de las razas estudiadas, el genotipo GG del SNP analizado del gen del receptor nuclear *gamma* activado por factores proliferadores de peroxisomas (*PPARG*, ss62850198) presenta un efecto significativo sobre la cantidad neta de ácido linoleico conjugado (9c11tCLA), aumentando su nivel en 0,55 desviaciones típicas (Tabla 12). Su efecto sobre este mismo ácido graso en la fracción de lípidos neutros es de 0,51 desviaciones típicas, estando cerca del nivel de significación estadística. El efecto en la fracción fosfolípídica es menor (aumento de 0,12 mg/100g), estando más alejado del nivel de significación ($F = 5,41$; $p = 0,021$). Ninguno de estos efectos es significativo si se excluyen las razas británicas, aunque el estadístico F de la regresión toma valores relativamente elevados (*PPARG* vs. 9c11tCLA: $F = 6,48$; $p = 0,011$ en lípidos totales; $F = 7,06$; $p = 0,008$ en lípidos neutros; $F = 4,53$; $p = 0,034$ en fosfolípidos).

PPARG además tendría un efecto potencial sobre la cantidad porcentual de ácido docosapentaenoico ($\omega_{22:5}$ n3), ácido graso del tipo ω_3 de cadena larga. Si bien no alcanza el umbral de significación, el genotipo AA de *PPARG* provocaría un

aumento de 0,10 mg de ω 22:5 n3 (0,59 desviaciones típicas) incluyendo todas las razas y de 0,16 mg (0,89 desviaciones típicas) si se excluyen las británicas. Este SNP parece tener también un efecto potencial sobre la cantidad de grasa intramuscular, ya que los animales de genotipo GG tendrían casi un 2% más que los animales AA ($F = 5,45$; $p = 0,020$ incluyendo todas las razas, no significativo).

Tabla 12. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *PPARG*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP PPARG								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos totales (mg)	GG	0,32	0,55	0,58	11,31	11,12	0,0009	0,05
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos neutros (mg)	GG	0,24	0,51	0,47	10,63	11,51	0,001	0,04
w22:5n3 lípidos totales (%)	AA	0,10	0,59	0,17	7,95	11,18	0,005	0,02
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w22:5n3 lípidos totales (%)	AA	0,16	0,89	0,18	10,12	11,27	0,002	0,02

Por otro lado, dos SNPs del gen coactivador 1-alfa de *PPARG* (*PPARGC1A*) se encontraron significativamente asociados a los niveles de ácido linoleico conjugado (ω 9c11tCLA) y ácido eicosaenoico (ω 20:1) (Tabla 13). El SNP *PPARGC1A* presenta un efecto significativo sobre la cantidad de ω 9c11tCLA en la fracción de lípidos neutros (generando el genotipo CC un aumento de 0,60 desviaciones típicas) tomando en cuenta todas las razas. Esta asociación no es significativa para el caso de los lípidos totales, aunque se encuentra cerca de la significación. No se halló una asociación similar en los fosfolípidos. Cuando se excluyen las razas británicas la asociación con ω 9c11tCLA de la fracción de lípidos neutros deja de ser significativa ($F = 5,18$; $p = 0,023$) y tampoco se encuentra cercana al nivel de significación en los lípidos totales y en fosfolípidos.

Incluyendo todas las razas, el SNP *PPARGC1A* ex8_1209 presentó una asociación significativa con la cantidad neta de ω 20:1 de la fracción fosfolípida, siendo el genotipo CC responsable de un aumento de 0,44 desviaciones típicas de este ácido graso con respecto al genotipo TT. Se encuentra cercano al límite de significación para la cantidad porcentual de esta sustancia en la misma fracción lipídica, con un efecto similar. Ninguna de estas asociaciones es significativa si sólo se incluyen las razas continentales, aunque van en la misma dirección y los estadísticos F son relativamente elevados (cantidad neta de ω 20:1 en fosfolípidos: F = 5,68; p = 0,018; porcentaje de ω 20:1 en fosfolípidos: F = 6,75; p = 0,010).

Tomando en cuenta la totalidad de la muestra de animales, el SNP *PPARGC1A* ex8_1209 parece tener además un efecto sobre el rendimiento de la canal. Si bien no es significativo, los animales de genotipo CC tendrían un rendimiento 1,2% mayor a los animales de genotipo TT. Esta relación se mantiene, aunque se aleja más del umbral de significación, cuando se excluyen las razas británicas.

Al igual que *PPARG*, el SNP *PPARGC1A* estaría asociado a la cantidad porcentual de ácido docosapentaenoico (ω 22:5 n3). Si bien no sobrepasa el umbral de significación, el genotipo TT generaría un aumento de 0,71 desviaciones típicas cuando se incluyen todas las razas en el análisis y de 0,61 desviaciones típicas cuando se excluyen las británicas (F= 6,22; p= 0,014).

Es importante destacar que ambos genes, *PPARG* y *PPARGC1A*, se encuentran muy relacionados en cuanto a su función, como se describirá más adelante.

Tabla 13. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para los SNPs del gen *PPARGC1A*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP PPARGC1A y PPARGC1A ex8_1209									
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS									
TODAS LAS RAZAS									
carácter	SNP	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos neutros (mg)	PPARGC1A	CC	0,28	0,60	0,47	12,86	11,51	0,0004	0,04
w20:1 fosfolípidos (mg)	PPARGC1A ex8_1209	CC	0,08	0,44	0,18	12,04	11,51	0,0006	0,01
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN									
TODAS LAS RAZAS									
carácter	SNP	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c11tCLA lípidos totales (mg)	PPARGC1A	CC	0,28	0,48	0,58	8,20	11,12	0,004	0,05
w22:5n3 lípidos totales (%)	PPARGC1A	TT	0,12	0,71	0,17	9,63	11,18	0,002	0,02
w20:1 fosfolípidos (%)	PPARGC1A ex8_1209	CC	0,01	0,40	0,03	8,09	11,20	0,005	0,002
rendimiento de la canal (%)	PPARGC1A ex8_1209	CC	1,20	0,27	4,43	10,62	11,36	0,001	0,18
SIN RAZAS BRITÁNICAS									
carácter	SNP	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
rendimiento de la canal (%)	PPARGC1A ex8_1209	CC	1,20	0,30	3,98	7,68	11,52	0,006	0,21

SCD

El SNP estudiado del gen de la enzima estearoil-CoA-desaturasa (*SCD g.10329 TbC, AY241932*) se encontró significativamente asociado al porcentaje de ácido linoleico (ω 18:2 n6), ácido graso esencial de la familia de los ω 6, de la fracción fosfolípida en razas continentales (Tabla 14). El efecto del genotipo TT es un aumento de 2,22% (0,45 desviaciones típicas) de la cantidad de esta sustancia en la carne. En esta misma muestra de animales, la asociación con el porcentaje de ácido linoleico de lípidos totales no es significativa, pero se encuentra muy cerca del umbral de significación. Para la fracción de lípidos neutros esta relación no se mantiene ($F = 3,76$; $F_{\text{umbral}} = 11,41$; $p = 0,053$). Cuando se incluyen las razas británicas, la asociación con el porcentaje de ω 18:2n6 de los fosfolípidos de membrana ya no es significativa pero se encuentra muy cercana al umbral de significación estadística, generando un aumento de 1,78% (0,39 desviaciones típicas). Esta asociación se mantiene relativamente cercana al nivel de significación

para el porcentaje de ácido linoleico en lípidos totales y en la fracción de lípidos neutros.

Se observó asimismo una relación débil y no significativa, aunque potencialmente interesante, con el porcentaje de ácido oleico ($\omega 9c18:1$) de los fosfolípidos en razas continentales. El genotipo CC aumentaría en 1,52% (0,36 desviaciones típicas) el ácido oleico en comparación con el genotipo TT. Cuando se incluyen todas las razas esta relación es más débil ($F = 5,93$; $F_{\text{umbral}} = 11,36$; $p = 0,015$; efecto genotipo CC = +1,18%).

Tabla 14. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *SCD g.10329 TbC*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP SCD g.10329 TbC								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w18:2n6 fosfolípidos (%)	TT	2,22	0,45	4,97	12,39	11,34	0,0005	0,1
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w18:2n6 lípidos totales (%)	TT	0,56	0,43	1,29	7,53	11,47	0,006	0,10
w18:2n6 fosfolípidos (%)	TT	1,78	0,39	4,60	10,48	11,18	0,001	0,1
w18:2n6 lípidos neutros (%)	TT	0,28	0,38	0,73	8,18	11,41	0,005	0,08
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w18:2n6 lípidos totales (%)	TT	0,04	0,50	0,08	10,14	11,43	0,002	0,006
w9c18:1 fosfolípidos (%)	CC	1,52	0,36	4,20	7,11	11,44	0,008	0,56

HSPB1

En forma similar a *SCD*, el gen de esta proteína de *shock* térmico se halló significativamente asociado al porcentaje de ácido linoleico ($\omega 18:2n6$) de los fosfolípidos de membrana, tanto incluyendo como excluyendo a las razas británicas (Tabla 15). En el primer caso el efecto del genotipo TT es un aumento de 2,44% (0,53 desviaciones típicas) de la cantidad de este ácido graso $\omega 6$ en la carne, en comparación con el genotipo CC. Sin los animales de origen británico el aumento es de 2,98% (0,60 desviaciones típicas). En los animales de razas continentales se observó además una asociación positiva y cercana al umbral de significación entre este genotipo y la relación entre $\omega 6$ y $\omega 3$, probablemente relacionada al aumento que provoca en el ácido $\omega 18:2 n6$.

La asociación con el porcentaje del isómero del ácido oleico $\omega 9c18:1$ de los fosfolípidos se encontró cercana al umbral de significación estadística, con un aumento de 0,47 desviaciones típicas generado por el genotipo CC incluyendo todas las razas, y de 0,53 cuando se excluyen las británicas. Dicha asociación no se observó en la fracción lipídica total en ninguna de las muestras ($F < 5/ F_{\text{umbral}} > 11$). También se observó una asociación muy cercana al umbral de significación entre este SNP y la relación entre ácido linoleico y linolénico ($\omega 18:2/\omega 18:3$), siendo el efecto del genotipo CC favorable a la cantidad de linoleico con respecto al linolénico en 0,80 desviaciones típicas. El aumento que este genotipo provoca en el porcentaje de $\omega 18:1$ podría estar relacionado con esto, ya que el ácido oleico ($\omega 18:1$) es un precursor del linoleico ($\omega 18:2$).

Esta proteína también se halló asociada en forma significativa con el pH de la carne después de su descongelación, pero sólo para la muestra de razas continentales. El efecto del genotipo TT es un aumento de 0,67 desviaciones típicas en el pH. Si se incluyen las razas británicas, no se alcanza el umbral de significación, pero el efecto es similar.

Tabla 15. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *HSPB1*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP HSPB1								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DE	DE	F reg	F umb.	p valor	SE
w18:2n6 fosfolípidos (%)	TT	2,44	0,53	4,6	11,78	11,18	0,0007	0,1
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w18:2n6 fosfolípidos (%)	TT	2,98	0,60	4,97	12,94	11,34	0,0004	0,10
pH carne descongelada	TT	0,04	0,67	0,06	12,84	11,51	0,0004	0,01
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN								
TODAS LAS RAZAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c18:1 fosfolípidos (%)	CC	1,80	0,47	3,86	8,49	11,36	0,004	0,62
pH carne descongelada	TT	0,03	0,60	0,05	7,82	11,09	0,005	0,01
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w9c18:1 fosfolípidos (%)	CC	2,22	0,53	4,20	9,12	11,44	0,003	0,37
w18:2/w18:3	CC	0,004	0,80	0,01	10,17	11,59	0,002	0,0003
w6/w3	TT	1,30	0,38	3,40	7,10	11,80	0,008	0,48

PCSK1

El polimorfismo estudiado del gen de la pro-proteína convertasa *subtilisin/kexin* tipo 1 (*PCSK1*, ss77831755) se halló significativamente asociado a la cantidad total de colágeno en la carne de los animales de razas continentales (Tabla 16). El efecto del genotipo TT es un aumento de 0,32 mg de colágeno por gramo de

tejido muscular (0,51 desviaciones típicas). Cuando se incluyen las razas británicas el efecto es menor (0,20 mg/g) y no alcanza el umbral de significación estadística ($F = 8,04$; $p \text{ valor} = 0,005$).

Tabla 16. Resultados significativos y cercanos al umbral de significación estadística para el SNP *PCSK1*. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica del carácter fenotípico. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

SNP PCSK1								
RESULTADOS SIGNIFICATIVOS								
SIN RAZAS BRITÁNICAS								
carácter	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
colágeno total (promedio; mg)	TT	0,32	0,51	0,63	13,57	11,56	0,0003	0,08

Otros SNPs que presentan asociaciones cercanas al nivel de significación

Varios SNPs correspondientes a un número similar de genes presentaron resultados que si bien no alcanzan el umbral de significación estadística, son interesantes debido a los efectos que insinúan en varias características de la carne vacuna y en los cuales se podría profundizar en el futuro (Tabla 17).

El SNP estudiado del gen de la hormona liberadora de corticotropina (*CRH g.22 CbG, AF340152*) se encontró muy cercano al nivel de significación para dos ácidos grasos de cadena larga muy importantes en la dieta humana. Tomando en cuenta la totalidad de las razas, el genotipo CC de *CRH g.22CbG* generaría un aumento de 0,35 desviaciones típicas de ácido araquidónico ($\omega 20:4 \text{ n}6$), ácido $\omega 6$ precursor de otros ácidos grasos de cadena larga. Cuando se excluyen las razas británicas su efecto es de 0,43 desviaciones típicas. Produce también un efecto similar en la cantidad neta de araquidónico presente en la fracción de fosfolípidos, aumentando en 0,34 y 0,38 desviaciones típicas según se incluyan o se excluyan las razas británicas, respectivamente. Este SNP influiría además en la cantidad porcentual de ácido eicosapentaenoico ($\omega 20:5 \text{ n}3$), ácido graso esencial del tipo $\omega 3$, estando apenas por debajo del umbral de significación estadística para el conjunto

de razas continentales y generando el genotipo CC un aumento de 0,55 desviaciones típicas.

Tomando en cuenta la totalidad de las razas, los siguientes SNPs presentaron valores cercanos a la significación para varias características. *PLOD3* (SNP presente en el gen *procolágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxygenasa 3*, ss77831757) parece tener relación con la cantidad porcentual de ácido vaccénico (ω 11c18:1) en músculo. El genotipo AA generaría un aumento de 0,42 desviaciones típicas. Además tendría relación con el diámetro mínimo de la chuleta, generando dicho genotipo una disminución de 0,44 desviaciones típicas. El genotipo GG del SNP del gen *SUSP1* (supresor de producción de superóxido, o *Sentrin-specific protease 6*, ss77831761) produciría un aumento del porcentaje de ácido linoleico conjugado (ω 9c11tCLA) de 0,55 desviaciones típicas en la fracción de lípidos neutros. El SNP de *FIT2* (*transcripto inductor de grasas 2*, ss61961642) también estaría relacionado con el porcentaje de vaccénico (ω 11c18:1), generando su genotipo CC un aumento de 0,32 desviaciones típicas. El gen de la enzima aldehído-deshidrogenasa 2 (*ALDH2*, ss77831990) podría estar relacionado con el porcentaje de ácido linoleico (ω 18:2 n6), ya que se detectó que el genotipo CC genera un aumento de 0,47 desviaciones típicas en la carne de los animales estudiados. El alelo A del SNP de la enzima matriz-metalopeptidasa 1 (*MMP1*, ss77831916) estaría relacionado con el porcentaje de ácido eicosenoico (ω 20:1) de la fracción fosfolipídica, generando el genotipo GA un aumento de 0,60 desviaciones típicas, y con el porcentaje de ácido linoleico conjugado de la fracción de lípidos neutros, generando un aumento de 0,55 desviaciones típicas. Por último, el SNP estudiado del gen de la enzima ácido graso desaturasa 1 (*FADS1*, ss63322537) tendría relación con la cantidad porcentual de ácido vaccénico (ω 11c18:1) de la fracción fosfolipídica. El genotipo CC produciría un aumento de 0,30 desviaciones típicas.

Si se excluyen las razas británicas, las únicas relaciones que se mantienen de manera similar son las del genotipo AA de *PLOD3* con el porcentaje de ácido vaccénico en músculo (aumento de 0,63 desviaciones típicas) y con el diámetro mínimo de la chuleta (disminución de 0,52 desviaciones típicas), y de *SUSP1* con la disminución del porcentaje de ácido linoleico conjugado. En este último caso, el efecto del genotipo AA es algo mayor (disminución de 0,60 desviaciones típicas), y se encuentra mucho más cerca del umbral de significación estadística. Otro SNP que parece estar relacionado con el porcentaje de ácido vaccénico de la fracción fosfolipídica es *ME3* (SNP del gen *malic enzyme 3* mitocondrial, ss77831909), cuyo genotipo GG generaría un aumento de 0,43 desviaciones típicas. Los resultados insinúan además una relación entre *ABCA1* (*ATP-binding cassette A1*), gen

relacionado con el transporte de lípidos, y la cantidad de ácido oleico (ω 9c18:1). El genotipo AA generaría una disminución de 0,49 desviaciones típicas de este ácido graso en la carne. El SNP del gen *SCAP* (chaperona de la enzima *sterol regulatory element-binding protein*, ss62839002) estaría relacionado con el porcentaje de ácido adrenico (ω 22:4 n6). Los animales con genotipo GA tendrían 0,71 desviaciones típicas más de este ácido graso del tipo ω 6 de cadena larga en la carne. El gen *CAV3* (*caveolina 3*) parece tener relación con la proporción de ácidos grasos ω 6 vs. ω 3, ya que el genotipo CC generaría un aumento de 0,30 desviaciones típicas en dicha relación. Por último, los resultados muestran una posible relación entre el índice de compacidad corporal de los animales continentales y los SNPs de los genes *ACACA* y *GLUT4*. Tanto el genotipo AA de *ACACA* como el genotipo AA de *GLUT4* tendrían un efecto sobre el índice de compacidad de 0,69 desviaciones típicas.

Tabla 17. Otros SNPs con resultados cercanos al umbral de significación estadística. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DT: desviación típica fenotípica. Freg.: estadístico F de la regresión. Fumb.: umbral de significación. p valor: valor de p de la regresión. SE: error estándar de la regresión.

OTROS SNPs									
RESULTADOS CERCANOS A LA SIGNIFICACIÓN									
TODAS LAS RAZAS									
carácter	SNP	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w20:4n6 lípidos totales (mg)	CRH g.22 CbG	CC	3,22	0,35	9,1	11,05	11,53	0,001	0,48
w20:4n6 fosfolípidos (mg)	CRH g.22 CbG	CC	3,18	0,34	9,29	11,12	11,36	0,0009	0,48
w11c18:1 lípidos totales (%)	PLOD3	AA	0,16	0,42	0,38	8,72	11,47	0,003	0,03
diámetro mín. chuleta (cm)	PLOD3	GG	0,44	0,44	1,01	9,29	11,49	0,002	0,07
w9c11tCLA lípidos neutros (%)	SUSP1	GG	0,06	0,55	0,11	8,79	11,41	0,003	0,01
w11c18:1 lípidos totales (%)	FIT2	CC	0,12	0,32	0,38	7,98	11,47	0,005	0,02
w18:2n6 lípidos totales (%)	ALDH2	CC	0,6	0,47	1,29	9,55	11,47	0,002	0,1
w20:1 fosfolípidos (%)	MMP1	GA	0,018	0,60	0,03	8,98	11,2	0,003	0,003
w9c11tCLA lípidos neutros (%)	MMP1	GA	0,06	0,55	0,11	8,11	11,41	0,005	0,01
w11c18:1 fosfolípidos (%)	FADS1	CC	0,14	0,30	0,47	8,22	11,34	0,004	0,02
SIN RAZAS BRITÁNICAS									
carácter	SNP	genotipo	efecto	efecto/DT	DT	F reg	F umb.	p valor	SE
w20:4n6 lípidos totales (mg)	CRH g.22 CbG	CC	0,006	0,43	0,014	10,93	11,48	0,001	0,0008
w20:4n6 fosfolípidos (mg)	CRH g.22 CbG	CC	3,60	0,38	9,37	10,95	11,60	0,001	0,48
w20:5n3 lípidos totales (%)	CRH g.22 CbG	CC	0,06	0,55	0,11	11,65	11,70	0,0008	0,009
w11c18:1 lípidos totales (%)	PLOD3	AA	0,20	0,63	0,32	8,93	11,45	0,003	0,03
diámetro mín. chuleta (cm)	PLOD3	GG	0,50	0,52	0,97	8,09	11,59	0,005	0,13
w9c11tCLA lípidos neutros (%)	SUSP1	GG	0,06	0,60	0,10	11,32	11,73	0,0009	0,009
w9c18:1 lípidos totales (mg)	ABCA1	AA	86,22	0,49	174,80	8,10	11,78	0,005	15,15
w11c18:1 fosfolípidos (%)	ME3	GG	0,20	0,43	0,47	8,32	11,45	0,004	0,02
w22:4n6 fosfolípidos (%)	SCAP	GA	0,22	0,71	0,31	10,47	11,54	0,001	0,02
w6/w3	CAV3	CC	1,02	0,30	3,40	8,70	11,80	0,004	0,17
compacidad de la canal	ACACA	AA	0,22	0,69	0,32	8,37	11,69	0,004	0,04
compacidad de la canal	GLUT4	AA	0,22	0,69	0,32	8,83	11,69	0,003	0,04

DISCUSIÓN

Dentro de la denominada “genómica funcional”, la **estrategia de genes candidatos** permite centrar el análisis en genes particulares que por diversas razones se considera probable que estén involucrados en la característica fenotípica de interés. A la hora de seleccionar los genes a analizar puede utilizarse una aproximación fisiológica, eligiendo genes con funciones biológicas conocidas relacionadas con dicha característica. Otra opción es la del clonaje posicional, en la cual se seleccionan genes localizados en regiones cromosómicas determinadas en las cuales previamente se ha identificado un QTL. Por último, es posible elegir los genes a estudiar mediante una aproximación comparativa, en la cual se analizan genes que presentan un efecto significativo sobre la característica de interés (u otra característica relacionada) en otras especies, y se exploran sus posibles efectos en la especie en estudio (Ron y Weller, 2007; Jiang *et al.*, 2009). Actualmente es posible seleccionar los genes a estudiar mediante el análisis de miles de SNPs distribuidos en todo el genoma, detectando los que estén significativamente asociados a la característica de interés (Hayes y Goddard, 2010). Estas aproximaciones no son mutuamente excluyentes, pudiéndose utilizar una estrategia que combine todas las fuentes de información posibles.

En la actualidad, los extraordinarios avances en la secuenciación de genomas y en la anotación de genes han generado una enorme cantidad de información que complementa las estrategias mencionadas, permitiendo seleccionar genes candidatos de una forma mucho más precisa. El presente trabajo se valió de las ventajas de tener el genoma bovino totalmente secuenciado, ya que para la mayoría de los genes se contó con información de su secuencia, de la ubicación de sus exones, intrones y regiones reguladoras, de la ubicación exacta de sus SNPs conocidos, y de información complementaria de otras especies gracias a las bases de datos genómicas disponibles en Internet.

Métodos de genotipado utilizados

Los métodos de genotipado utilizados permitieron el análisis de un elevado número de SNPs para un gran número de animales, de 15 razas diferentes y con perfiles productivos muy diversos.

Ambos métodos de genotipado utilizados demostraron ser útiles y fiables a la hora de asignar los genotipos a los animales muestreados. Mediante el ensayo de diferentes variables en la metodología de *PCR-SSCP*, fue posible lograr un protocolo de laboratorio sencillo y de bajo coste, capaz de discriminar con elevada potencia entre los tres genotipos.

De particular eficacia resultó la técnica de *Multiplex-Primer Extension*, dado que permitió genotipar un gran número de animales para decenas de SNPs en muy corto tiempo, con relativamente bajo coste y con una precisión incluso mayor a la electroforesis en gel. La flexibilidad y reproducibilidad que presenta esta metodología la hacen muy conveniente para análisis de bajo a medio rendimiento, e incluso de alto rendimiento cuando se incorpora a plataformas adecuadas, como es el caso del “*Arrayed Primer Extension*” o APEX (Schrijver *et al.*, 2005; Sevane *et al.*, 2010).

Si bien actualmente existen plataformas capaces de genotipar miles de marcadores a la vez (por ejemplo, las utilizadas en Selección Genómica), para los análisis que implican un número menor de SNPs (menos de 100) resulta más conveniente utilizar metodologías como el *Multiplex-Primer Extension*, debido a sus menores costos globales, menores requerimientos de infraestructura y mayor flexibilidad. Es el caso, por ejemplo, cuando se desea investigar la posible acción de cierto gen candidato, cuando se efectúan diagnósticos de casos clínicos, cuando se desean analizar parámetros poblacionales y de paternidad en razas locales muy reducidas, o cuando se desea implementar trazabilidad y autenticación de productos locales de alta calidad (Sevane *et al.*, 2010).

En resumen, ambas técnicas sirvieron para cumplir con los objetivos de la presente tesis, destacándose para análisis futuros la metodología de *Multiplex-Primer Extension*.

Muestra de animales y metodología estadística utilizadas

Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, la muestra total de animales consistió en 436 bovinos machos sin castrar, de 15 razas diferentes

(aproximadamente 30 animales por raza), pertenecientes al proyecto GeMQual (*Assessment of Genetic Variation in Meat Quality and Evaluation of the Role of Candidate Genes in Beef Characteristics with a View to Breeding for Improved Product Quality*, <http://www.gemqual.org/>). La elección de las razas se basó en su aptitud productiva y origen geográfico. Se priorizaron razas de aptitud carnicera, algunas muy extendidas internacionalmente y muy seleccionadas (Limousin, Aberdeen Angus, Simmenthal y Charolais) y otras de uso circunscripto a su país de origen (como Asturiana de los Valles, Marchigiana y South Devon, por ejemplo). También fueron incluidas razas lecheras (Jersey y Holstein) y razas menos seleccionadas de aptitud materna (como Avileña, Highland y Casina, por ejemplo). Se utilizaron razas provenientes de los cinco países que participaron del proyecto (España, Reino Unido, Francia, Italia y Dinamarca). El objetivo detrás de esta selección de razas fue maximizar las posibilidades de hallar polimorfismos genéticos, a la vez que generar una amplia muestra de animales necesaria para detectar posibles asociaciones entre los polimorfismos hallados y características de interés productivo en la industria cárnica. Para ello era necesario que las razas fueran genéticamente diversas y que los animales muestreados no estuvieran emparentados (Albertí *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009).

La gran heterogeneidad demostrada por los animales de la muestra sirvió para detectar un número importante de SNPs en los genes candidatos (Williams *et al.*, 2009). Sin embargo, dicha heterogeneidad aumentó la complejidad de los análisis estadísticos posteriores, en particular a la hora de normalizar los datos fenotípicos. Como se mencionó anteriormente, se detectaron diferencias significativas entre las varianzas de las distintas razas, especialmente para caracteres relacionados con la canal y el porcentaje de grasa. También se observaron ciertas diferencias entre las razas británicas y las continentales, particularmente en el contenido de ácidos grasos. En muchos casos la tendencia seguida por las razas británicas fue compartida por las razas danesas. Este hecho podría deberse a características propias de dichas razas (por ejemplo, el mayor porcentaje de grasa que presentan las razas Aberdeen Angus, Highland, Holstein y Red Danish) o a diferencias en la alimentación, en especial en las británicas que tuvieron una dieta más calórica (Albertí *et al.*, 2006)

La muestra de 30 animales por raza simplificó en cierta medida la búsqueda de animales no emparentados y es más que suficiente para detectar diferentes polimorfismos moleculares entre las razas, pero es un número relativamente bajo para efectuar un estudio de asociación genotipo-fenotipo. La dispersión de los animales por raza y, dentro de éstas, por fecha de faena, genera un número muy

bajo de animales por categoría, disminuyendo el poder estadístico del análisis, especialmente cuando se incluyen las razas británicas. Muy probablemente éste fue un factor clave en el presente análisis y explicaría, al menos en parte, el hecho de no haber hallado asociaciones entre ciertos marcadores ampliamente probados y las características fenotípicas medidas, como por ejemplo el gen *CAPN1* y terneza de la carne, o el gen *DGAT1* y variables relacionadas con el metabolismo lipídico. Resulta llamativo que se haya detectado una asociación significativa entre uno de los SNPs de *CAPN1* y la actividad de la enzima calpaína, responsable del proceso de maduración, y no con las propias medidas de terneza de la carne. El relativamente bajo poder estadístico resultante explicaría, además, que varias asociaciones ya probadas y con amplia bibliografía que las apoya no alcanzaran el umbral de significación, quedando muy cerca de éste en muchos casos, como por ejemplo entre los genes *PPARG*, *PPARGC1A* y *SCD* y los niveles de ciertos ácidos grasos.

Así como es posible que no se hayan detectado todas las asociaciones existentes, también es posible que algunas de las asociaciones encontradas no sean reales, por más que la probabilidad de detectar falsos positivos fue tomada en cuenta en el modelo, con el fin de minimizarla. En algunos casos la relación detectada entre los SNPs y las características fenotípicas fue inesperada, en el sentido de que no existe información previa o evidencia de la existencia de dicha asociación. En esos casos es posible que la asociación sea espuria, fruto de relaciones no causales entre el genotipo y el fenotipo, producto de frecuencias alélicas y genotípicas muy asimétricas o de otros factores no determinados que estén incidiendo en esta relación aparente. Este podría ser el caso, por ejemplo, de la asociación de *PCSK1* con el contenido de colágeno, *CYP1A1* y jugosidad de la carne, o *HSPB1* y pH, aunque no puede descartarse que sean consecuencia de posibles efectos pleiotrópicos de estos genes, aún no reportados.

El conjunto de razas británicas supone un caso particular dentro de la muestra total, ya que fueron muestreadas en un número mayor de oportunidades (resultando en un menor número de animales por fecha de faena), no fueron muestreadas durante los mismos años que las otras razas y existieron algunas diferencias de manejo, como se mencionó anteriormente (Albertí *et al.*, 2006). El análisis incluyendo y excluyendo estas razas permitió realizar algunas comparaciones, como el hecho de haber localizado más asociaciones significativas en el total de las razas que cuando se excluyen las británicas. Dadas las diferencias durante el muestreo y la toma de datos entre ambos subgrupos, se podría inferir que los resultados obtenidos con toda la muestra tendrían menos validez que los obtenidos excluyendo a las razas británicas, sobre todo aquellos que son

significativos solamente cuando se incluyen éstas últimas (por ejemplo, la relación entre *GDF8* y ciertos ácidos grasos; o la de *CAPN1* g.5709 con actividad de la u-calpaína). El hecho de que el número de animales por grupo de faena sea menor en las británicas disminuye la potencia del análisis, aumentando la probabilidad de falsos positivos. Los animales de las razas continentales fueron faenados durante los mismos años y en una menor cantidad de fechas. Al haber más animales por grupo de faena, aumenta el poder estadístico del análisis. Por este motivo, consideramos que los resultados obtenidos solamente con las razas continentales serán más fiables.

Sin embargo, es posible que las diferencias entre ambas muestras se deban, al menos en parte, a la cantidad de animales hipermusculados. Las razas en las cuales se detectaron animales portadores del alelo C del SNP *GDF8* incluyen tres razas británicas: South Devon (10 heterocigotos CG y 3 homocigotos CC), Aberdeen Angus (2 heterocigotos CG) y Highland (un heterocigoto CG). Las continentales en las cuales se detectó este alelo son: Asturiana de los Valles (15 heterocigotos CG y 13 homocigotos CC) y Pirenaica (siete heterocigotos CG). Con las británicas, entonces, la cantidad de animales con el alelo C aumenta en 16 individuos. Dada la magnitud y variedad de efectos que produce este alelo mutado sobre el metabolismo, el crecimiento y la calidad de la carne, es posible que varios de los efectos detectados sean fruto de las diferencias entre los animales portadores del alelo C y los normales (genotipo GG), y que dichas diferencias se reflejen en la expresión y la función de otros genes analizados.

El efecto de la raza es muy elevado y generalmente es el más importante sobre las características fenotípicas analizadas (en la Tabla 18 se muestran los valores del estadístico F del efecto raza sólo para las asociaciones significativas). Esto se debería a que este efecto está confundido con el efecto de la toma de los registros fenotípicos en cada país, como se explicó en la sección Materiales y Métodos, y a las grandes diferencias que existen entre las razas debidas principalmente a su aptitud productiva y grado de selección, como fuera notado por Albertí y colaboradores (2006). El efecto del establecimiento de origen combinado con el grupo de faena no es significativo en ningún caso ($F_{\text{Est./faena}}$ menor a F_{umbral} en todos los casos) (Tabla 18). Esto indicaría que el factor que más afecta a las características fenotípicas es la raza del animal y el país donde fue muestreado, sólo superado por el efecto del SNP en algunas de las asociaciones significativas. Esto concuerda con lo esperable en este tipo de estudios y resulta lógico que las razas, siendo tan diferentes entre sí, ejerzan una influencia altamente significativa en el fenotipo. El país donde fueron tomados los registros también es esperable que tenga

un efecto pronunciado, ya que dentro de este factor entran posibles diferencias entre los operarios y técnicos involucrados y, aunque sean mínimas, en la calibración de los instrumentos de medida utilizados, por ejemplo. Por último, dentro del factor grupo de faena entra el efecto de la fecha de faena, la cual es determinante de varias variables que afectan el análisis, como posibles variaciones estacionales según el momento del año en que fueron sacrificados los animales, variaciones según el año de su sacrificio, diferencias propias de cada planta de faena, como operarios, balanzas, tiempos y variables que afectan el nivel de estrés de los animales, etc. Dentro de grupo de faena también entra el efecto del establecimiento de crianza, el cual incluye factores relacionados al manejo de los animales, variaciones climáticas según el país, distancia a las plantas de faena, etc. Recuérdese que el país y el establecimiento de crianza es el mismo para cada raza, excepto para las razas danesas en las cuales se utilizaron dos establecimientos. El hecho de no haber podido separar el efecto país del efecto raza, ni el efecto establecimiento de origen del efecto fecha de faena (por quedar subdividida la muestra en grupos de animales excesivamente pequeños) no permitió evaluar con exactitud la magnitud de las diferencias entre los animales británicos y los continentales, si bien el efecto de la raza cuando se incluyen las británicas es más elevado (Tabla 18).

Debido a que no se detectó ningún efecto significativo del grupo de faena, no se incluyó la interacción entre este factor y la raza en el modelo, principalmente para no disminuir el número de grados de libertad y el poder estadístico del análisis.

Es de destacar el gran esfuerzo que realizaron las instituciones involucradas en el proyecto GeMQual al haber logrado confeccionar una base de datos fenotípicos con tal cantidad y variedad de análisis y medidas fenotípicas, lo cual no es común en este tipo de estudios según la bibliografía consultada.

Tabla 18. Estadístico F de la raza (F_{raza}) y del establecimiento y fecha de faena combinados ($F_{\text{est./faena}}$) para las asociaciones significativas.

TODAS LAS RAZAS			
carácter	SNP	F_{raza}	$F_{\text{est./faena}}$
rendimiento de la canal	GDF8	133.00	4.28
porcentaje de músculo	GDF8	106.50	6.55
área de la chuleta	GDF8	49.87	2.81
compacidad de la canal	GDF8	59.90	1.80
cantidad de colágeno A	GDF8	18.54	2.95
cantidad de colágeno B	GDF8	17.80	4.22
colágeno total (promedio)	GDF8	20.57	3.94
jugosidad de la carne	CYP1A	3.75	1.63
actividad mu-calpain B	CAPN1 g.5709	14.86	14.61
% 9c11tCLA	LEP	15.72	2.38
w9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	11.66	2.14
% 9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	21.45	1.35
w9c11tCLA	CFL1	28.25	1.23
w9c11tCLA (lípidos neutros)	CFL1	32.02	1.79
w9c11tCLA	PPARG	26.74	1.13
w9c11tCLA (lípidos neutros)	PPARGC1A	27.76	0.99
w20:1 (fosfolípidos)	PPARGC1A ex8_1209	28.61	5.32
% 18:2n6 (fosfolípidos)	HSPB1	27.49	3.69
SIN RAZAS BRITANICAS			
carácter	SNP	F_{raza}	$F_{\text{est./faena}}$
rendimiento de la canal	GDF8	114.70	9.02
área de la chuleta	GDF8	30.18	3.63
cantidad de colágeno B	GDF8	16.43	7.88
colágeno total (promedio)	GDF8	19.44	7.90
colágeno total (promedio)	PCSK1	19.34	7.93
jugosidad de la carne	CYP1A	4.18	3.63
pH (carne descongelada)	HSPB1	11.21	5.46
% 9c11tCLA	LEP	7.00	4.82
w9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	10.10	1.66
% 9c11tCLA (fosfolípidos)	LEP	18.05	0.62
% 9c11tCLA (lípidos neutros)	LEP	10.43	7.32
% 18:2n6 (fosfolípidos)	SCD	36.20	6.41
% 18:2n6 (fosfolípidos)	HSPB1	36.69	5.86

Análisis de genética poblacional

En los marcadores que presentaron frecuencias alélicas muy extremas, el genotipo homocigoto para el alelo minoritario puede estar infrarepresentado. En estos casos los resultados del análisis de asociación genotipo-fenotipo pueden verse alterados, ya que la cantidad de animales dentro de ese grupo puede no ser suficiente para efectuar el análisis. Por este motivo todos los marcadores cuyo alelo minoritario estuviese presente con una frecuencia menor a 0,05 no fueron contemplados en los análisis posteriores. Este umbral es el usual en este tipo de estudios (Balding, 2006; Cho *et al.*, 2007).

Debido a que el objetivo del proyecto es la evaluación de marcadores asociados a características de la carne, los animales que conforman la muestra no fueron tomados siguiendo los criterios habituales de un análisis poblacional. Por esta causa, los parámetros poblacionales obtenidos deben ser interpretados teniendo esto en cuenta. La muestra de animales no fue tomada al azar sino que fueron seleccionados especialmente terneros machos, de raza pura y con ausencia de parentesco entre ellos. Esta última condición tendería a generar un aumento en los índices de diversidad genética y podría ser una de las causas de los excesos de heterocigotos observados en varios marcadores, como los que se ejemplifican en la sección Resultados.

Por otro lado, las frecuencias alélicas y genotípicas observadas pueden ser reflejo de la presión de procesos selectivos indirectos. Por ejemplo, en la raza Limousin se observa una tendencia al aumento de heterocigotos CT para el SNP estudiado de *POMC*. El alelo T de este gen se asocia con un aumento del apetito, de la ganancia diaria de peso y del peso de la canal caliente (Buchanan *et al.*, 2005). Siendo el alelo C el más frecuente, la selección a favor de mejores índices de crecimiento puede estar afectando indirectamente a este gen, provocando un aumento de los heterocigotos CT. El gen *DGAT1*, determinante del nivel de lípidos en la leche, presenta una clara predominancia del alelo asociado a bajos niveles de lípidos (alelo G, que determina la aparición del amino ácido alanina) en razas de clara aptitud carnífera, como South Devon, Simmenthal, Limousin y Charolais, mientras que presenta frecuencias similares de ambos alelos en razas lecheras especializadas (Jersey y Holstein) o en razas de carne de aptitud materna (por ejemplo, Marchigiana). El alelo G (denominado "A" en la bibliografía) es el más común en *Bos taurus*, por lo que su mayor frecuencia en las razas analizadas en este trabajo no es sorprendente (Grisart *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002; Kaupe *et*

al., 2004). En las razas de leche las frecuencias relativas de estos alelos están determinadas por la presión de selección bien en el sentido de aumentar el volumen de leche, bien la cantidad de grasa y proteínas. Una frecuencia más elevada del alelo A (denominado “K” en la bibliografía, que determina la aparición del amino ácido lisina) puede estar relacionada con el hecho de que es favorable para la producción de quesos, por generar mayores niveles de grasa en la leche (Grisart *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002; Túpac-Yupanqui *et al.*, 2004; Kaupe *et al.*, 2004; Naslund *et al.*, 2008). Un mayor nivel de lípidos en la leche también se asocia con una mayor velocidad de crecimiento y engorde del ternero, por lo que podría ser la causa de la mayor frecuencia de este alelo en las razas de aptitud materna.

La raza y la dirección de la presión de selección dentro de ella también influyen en las frecuencias alélicas observadas de los polimorfismos del gen de la miostatina (*GDF8*). La delección de 11 pares de bases, denominada aquí *GDF8*, se presenta en una frecuencia más elevada en las razas Asturiana de los Valles, South Devon y Pirenaica, y en una frecuencia muy baja en Aberdeen Angus y Highland (Anexo 1). Esta mutación, que genera hiperplasia muscular, se ha observado preferentemente en razas españolas, británicas y belgas (Grobet *et al.*, 1997 y 1998; Dunner *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2008). La frecuencia elevada del alelo C (indicador de la mutación) en Asturiana de los Valles y en South Devon sería un indicador de la presión de selección a favor del fenotipo “culón”, debido a su mayor rendimiento carnicero y a que se adapta mejor al sistema de producción utilizado en estas razas (Dunner *et al.*, 2003). Las frecuencias halladas en el presente trabajo para el alelo mutado en las razas británicas South Devon y Aberdeen Angus coinciden con las halladas por otros autores (0,35 y 0,033 vs. 0,40 y 0,04, respectivamente; Gill *et al.*, 2008). Por otro lado, la mutación *GDF8_F94L* se presenta en muy alta frecuencia (cercana a la fijación) en la raza Limousin, y también existe, aunque en menor proporción, en Charolais y en Pirenaica. Esta mutación se ha descrito preferentemente en razas francesas, como Limousin y Charolais (Grobet *et al.*, 1998; Sellick *et al.*, 2007; Esmailizadeh *et al.*, 2008). De las frecuencias alélicas obtenidas en este trabajo es claro que en el caso de Limousin ha existido una fuerte presión de selección a favor del alelo que genera una notable tendencia a un incremento en el musculo. Con respecto a la mutación *GDF8_Q204X*, se ha descrito principalmente en las razas Charolais y Limousin (Grobet *et al.*, 1997; Dunner *et al.*, 2003). Si bien en el presente trabajo se halló la mutación en varias razas, las frecuencias fueron siempre bajas o muy bajas, con una frecuencia global menor a 0,05.

Otros estudios en las mismas razas coinciden en gran medida con las frecuencias halladas para varios marcadores en el presente trabajo. Por ejemplo, el alelo C del SNP *CAPN1 g.4751* presenta una frecuencia de 0,65 en Aberdeen Angus de Escocia (Gill *et al.*, 2009) y 0,47 en Red Angus de Estados Unidos (Van Eenennaam *et al.*, 2007). El alelo A de *CAST g.2959* presenta una frecuencia de 0,89 en Angus de Estados Unidos (Van Eenennaam *et al.*, 2007), mientras que el genotipo homocigoto para ese alelo presenta una clara predominancia también en cruces Limousin x Jersey y Aberdeen Angus puros de Nueva Zelanda (Morris *et al.*, 2006), al igual que ocurre en los datos presentados aquí (Anexo 1). En Charolais de Canadá, Buchanan *et al.* (2005) detectan un claro predominio del alelo C frente al T de *POMC g.437del1* (frecuencias 0,77 y 0,33, respectivamente), mientras que en *GHR g.4962 TbA* Gill *et al.* (2009) hallan una frecuencia de 0,87 para el alelo T y de 0,13 para el alelo A en Aberdeen Angus de Escocia. Los mismos autores informan de frecuencias cercanas a 0,50 para ambos alelos de *LEP g.198 CbT*, al igual que Buchanan *et al.* (2002) en Angus de Canadá, aunque no en Charolais ni Simmenthal. En el caso del SNP de *DGAT1*, el claro predominio del alelo G observado aquí en las razas carniceras se evidencia en Aberdeen Angus, Charolais y Simmenthal de Alemania, así como en Piamontesa y Casina (Kaupe *et al.*, 2004). Estos autores también detectan frecuencias similares a las halladas en el presente trabajo para las razas Holstein y Jersey, en las cuales ambos alelos se encuentran en frecuencias más parejas (no existiría selección sobre ese gen) o incluso predomina el alelo A.

En varios casos la frecuencia observada de heterocigotos es muy elevada y se refleja en índices F_{IS} también elevados y de signo negativo, indicando un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado. Esto sucede, por ejemplo, en varias razas de carne para el marcador *TG g.1696 CbT* (aunque en este caso puede ser por los problemas de genotipado mencionados), en Charolais para *CAST*, en Jersey y Danish Red para *CAPN1 g.6545*, en la raza Marchigiana para *CAST g.2959*, en South Devon para *FIT2*, o en Jersey para *CRYAB*. El muestreo de animales no emparentados podría ser una causa de ello, ya que es muy probable que éstos provengan de varias líneas diferentes, aumentando por tanto la diversidad genética de la población. Sin embargo, el hecho de provenir de líneas diferentes podría generar el efecto contrario (disminución de los heterocigotos), en el caso en que el alelo mayoritario sea diferente en cada línea. Se sabe que se buscaron individuos no emparentados como forma de representar la mayor cantidad de líneas posible (S. Dunner, com. pers.). En ciertos casos podría ser también reflejo de la selección indirecta a favor del alelo menos frecuente, lo que aumenta transitoriamente la

cantidad de heterocigotos, como en el ejemplo citado de *POMC g.437del1* y Limousin, o de *CAST* en la raza Charolais.

Por otro lado, índices F_{IS} elevados pero de signo positivo reflejan una deficiencia de heterocigotos. Es el caso por ejemplo de Asturiana de los Valles y Limousin para el marcador *CAPN1 g.6545*, Marchigiana para *CYP1A1*, Aberdeen Angus para *LEP*, Jersey, Aberdeen Angus y Pirenaica para *CTSF*, Highland para *ME3*, Charolais para *CRH g.22 CbG*, etc. En ciertos casos esta situación podría deberse a los efectos de la selección indirecta actuando a favor de cierto tipo de homocigoto, como por ejemplo en el marcador *CAPN1 g.6545* en razas de carne. Si bien es un gen relacionado con la terneza de la carne, característica que usualmente no se considera al momento de seleccionar a los reproductores por las inconveniencias en su evaluación, existen evidencias de que las calpaínas inciden también en la masa muscular y el peso corporal (Chung *et al.*, 2007). En otros casos, la deficiencia de heterocigotos observada en varios genes podría estar relacionada con la situación de baja diversidad genética global que existe en algunas razas fruto de la endogamia y la deriva génica, como se ha reportado en varias razas locales europeas (Jordana *et al.*, 2003). Este podría ser el caso de la raza escocesa Highland.

En cuanto a las diferencias detectadas entre las razas en los índices de diversidad globales, se observa que razas menos especializadas y que han sufrido procesos de selección menos acentuados presentan, en general, niveles de diversidad más elevados, como Asturiana de los Valles, Avileña y Pirenaica. Las razas que presentan los índices más bajos de diversidad son razas muy seleccionadas, como Limousin, o razas de uso local, con bajos tamaños poblacionales y mayor nivel de endogamia, como Highland (Anexo 3). Tomando en cuenta todos los marcadores, el estadístico F_{IS} presenta valores cercanos a cero en todas las razas, no habiéndose detectado desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg en ninguna de ellas. Los índices F_{IS} detectados en las razas españolas son más bajos que los calculados por Jordana y colaboradores (2003) con marcadores microsatélites, pudiendo esto ser reflejo del muestreo de animales no emparentados.

Asociaciones detectadas

Gen GDF8

El gen de la miostatina (*MSTN* o *GDF8*) codifica el factor de crecimiento β , perteneciente a una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación celular altamente expresados en el músculo e implicados en la regulación del desarrollo y la homeostasis del tejido muscular (*Growth and Differentiation Factors*, o *GDF*). La miostatina se expresa específicamente en el músculo esquelético y funciona como regulador negativo de la miogénesis en varias especies. La inactivación de este gen en ratones transgénicos, así como su inactivación natural debido a mutaciones en bovinos, ovinos, caninos y humanos, genera el fenotipo conocido como “doble grupa”, “culón” o de hipermuscularidad. Este aumento notable de la masa muscular se debe a la hiperplasia (aumento en número) y a la hipertrofia (aumento de tamaño) de las fibras musculares (Mc Pherron y Lee 1997; Dunner *et al.*, 2003; Hennebry *et al.*, 2009; Mc Pherron, 2010).

Este gen regula la proliferación de células musculares y su diferenciación durante el desarrollo embrionario, influyendo así en el tipo de fibras musculares que compondrán el tejido en el animal adulto. Se ha observado un aumento del número de fibras glicolíticas rápidas en los animales hipermusculados (Hennebry *et al.*, 2009), además de una disminución en la cantidad de grasa. Debido a su influencia en el metabolismo del músculo y en la expresión de otros genes se le atribuyen efectos pleiotrópicos (Mc Pherron y Lee 1997; Esmailzadeh *et al.*, 2008; Alexander *et al.*, 2009; Wiener *et al.*, 2009).

Se trata de un gen mayor autosómico que presenta variaciones en su expresión y penetrancia. Varias mutaciones han sido caracterizadas en diferentes razas bovinas, siendo la más extendida y estudiada una delección de 11 pares de bases en el tercer exón (denominada nt821(del11)). En el presente trabajo se analizó dicha mutación, además de otra que genera un cambio aminoacídico en el primer exón, donde cambia una fenilalanina por una leucina (denominada F94L) (Mc Pherron y Lee 1997; Dunner *et al.*, 2003).

La mutación nt821(del11) fue detectada por primera vez en la raza Blanco Azul Belga y en la raza Asturiana de los Valles por Grobet y colaboradores (1997). Estos autores detectaron una delección de 11 pares de bases entre los nucleótidos

821 y 831, contando desde el codón de iniciación. Provoca un cambio en el marco de lectura después del primer residuo de cisteína del dominio carboxiterminal, interrumpiendo la secuencia aminoacídica y generando un codón *stop* prematuro en la posición del codón 14. Se elimina así la actividad de la proteína, generando en los animales homocigotos un aumento de 20% a 25% en la masa muscular, así como una disminución de la grasa intramuscular y del tejido conectivo (Grobet *et al.*, 1997; Mc Pherron y Lee 1997). Se han detectado también efectos sobre el contenido de colágeno, el color de la carne, el metabolismo energético y los niveles hormonales (Wiener *et al.*, 2009). El genotipo homocigoto mutado tiene una penetrancia incompleta y se ha detectado en varias razas además de la Blanca Azul Belga, como Asturiana de los Valles, South Devon, Aberdeen Angus, etc. (Mc Pherron y Lee 1997; Grobet *et al.*, 1997; Dunner *et al.*, 2003; Wiener *et al.*, 2009). Debido a sus efectos en la calidad de la carne, en el rendimiento de los animales afectados y en la incidencia de partos distócicos, su utilidad en mejora genética depende de la raza y de los sistemas productivos empleados (Grobet *et al.* 1997 y 1998; Wiener *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se detectaron efectos similares aunque más pequeños generados por el alelo que incluye a la delección, el cual provoca un aumento de 4,4% en el porcentaje de músculo, de entre 3 y 4% en el rendimiento de la canal, de entre 8,8 y 13,5 cm² en el área de la chuleta, entre otros (Tabla 7). Estos efectos seguramente están muy relacionados, ya que al aumentar el tamaño y desarrollo de los músculos se aumenta su participación en el rendimiento de la canal.

La mutación *GDF8_F94L* es una transversión C/A que provoca un cambio aminoacídico en una región menos conservada del gen. Debido a esto y a que se han observado animales homocigotos para la mutación que no presentaban ningún signo de desarrollo muscular excepcional, se postula que el alelo mutado es parcialmente recesivo y que no interfiere en gran medida con la actividad de la miostatina (Grobet *et al.*, 1997; Esmailizadeh *et al.*, 2008). Especialmente en la raza Limousin y sus cruces, varios autores detectan una asociación entre esta mutación y un aumento moderado del área de la chuleta, aumento del porcentaje de músculo y del porcentaje de cortes caros, disminución de la cantidad de grasa subcutánea e intramuscular y variaciones en la composición de ácidos grasos (Sellick *et al.*, 2007; Esmailizadeh *et al.*, 2008; Alexander *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2009). Debido a que en el presente estudio el alelo mutado sólo fue hallado en Limousin y Pirenaica, no habría suficiente número de animales homocigotos como para detectar su efecto.

En estudios de expresión génica de tejido muscular en desarrollo, varios autores han mostrado una disminución significativa de la expresión de los genes

relacionados con el colágeno en fetos portadores de mutaciones en el gen de la miostatina (Lehnert *et al.*, 2007; Cassar-Malek *et al.*, 2009). Durante el desarrollo normal del tejido muscular, la matriz extracelular (en donde se acumula mayormente el colágeno) disminuye a medida que aumenta la cantidad y el tamaño de las fibras estructurales y contráctiles. Los ARN mensajeros fruto de la expresión de los genes relacionados con el colágeno disminuyen, al tiempo que aumentan los mensajeros relacionados con la generación de fibras musculares. Estos autores comprueban que las mutaciones en el gen *GDF8* afectan la regulación génica de la miogénesis en el feto bovino al promover este último evento. Además, al generar un aumento en el tamaño de las fibras musculares, los fibroblastos del tejido conectivo (junto con el colágeno que generan) contribuyen proporcionalmente menos al total de la masa muscular de lo que lo hacen en el tejido muscular normal (Esmailizadeh *et al.*, 2008). Todo esto explicaría la asociación del alelo mutado para la delección de 11 pares de bases con la importante disminución del contenido de colágeno total en muestras de carne de animales portadores observada en el presente trabajo. En los animales normales se detectó entre 1,3 y 1,8 desviaciones típicas más de colágeno en su carne, siendo el efecto significativo más elevado de los hallados en este análisis (Tabla 7).

La pérdida de la actividad de la miostatina conlleva también una supresión parcial de la acumulación de grasa corporal y un metabolismo anormal de la glucosa. En animales que presentan el fenotipo “culón” (homocigotos para la mutación *GDF8*) de la raza Blanco Azul Belga se ha observado una disminución significativa de grasa corporal e intramuscular, una proporción mayor de ácidos grasos poli-insaturados y menor de mono-insaturados (Esmailizadeh *et al.*, 2008). En animales de la raza South Devon portadores de la mutación se observó que el alelo responsable de la pérdida de función de la miostatina reduce en forma significativa los niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, disminuye la concentración de grasa en el músculo y aumenta la proporción de poli-insaturados frente a los saturados (Wiener *et al.*, 2009). Estas observaciones coinciden con lo que sugieren los resultados hallados en el presente trabajo, donde, si bien se trata de efectos pequeños que sólo se aproximan al umbral de significación, el alelo responsable de la delección de 11 pares de bases estaría relacionado con un aumento del porcentaje de ω 18:2n6 y una disminución del porcentaje de ω 9c18.1, ambos en la fracción de fosfolípidos (Tabla 7). Otros autores hallan un efecto significativo y en la misma dirección para la mutación *GDF8_F94L*, donde en animales cruzados con Limousin portadores de la mutación la proporción 18:1/18:0

disminuye 19,3% (+/-4,4) y el contenido total de mono-insaturados disminuye en 1116,1 (+/-267,9) mg/100g de tejido seco (Alexander *et al.*, 2009).

Varias hipótesis han sido planteadas para explicar la relación entre la miostatina y la cantidad y composición de la grasa corporal. Más allá de su papel como reguladora de la masa muscular, esta proteína cumpliría funciones reguladoras relacionadas con la cantidad de tejido adiposo, la sensibilidad a la insulina, la diferenciación y el metabolismo de los adipocitos (Alexander *et al.*, 2009; McPherron, 2010). La reducción de la cantidad de grasa en animales homocigotos para estas mutaciones podría ser debida a una reducción en el tamaño o en el número de los adipocitos, a su vez debida al mayor gasto energético en el músculo (McPherron, 2010). En el músculo normal, un promotor de la actividad de la miostatina es activado por la acción de genes inductores de la adipogénesis, como *PPARG* y *SREBP* (McPherron, 2010). En muestras del músculo semitendinoso de fetos portadores de la mutación se observó una disminución en la expresión de estos genes y de *FABP4* y *FABP5*, así como la regulación negativa de genes asociados a la diferenciación celular de los adipocitos (Lehnert *et al.*, 2007). Estas observaciones constituyen indicios firmes del efecto pleiotrópico que exhibe el gen de la miostatina y de su relación con el metabolismo lipídico.

Las variantes alélicas observadas en este gen tendrían, entonces, efectos que van más allá del crecimiento muscular, alterando también la cantidad de colágeno y la cantidad y composición de la grasa corporal. Debido a esto, afectan directamente los atributos de la carne y la canal bovina. Algunos autores no observan efectos en varios parámetros de calidad de la carne ni en la conformación y peso de los huesos, y suponen que la disminución del tejido conectivo y del colágeno generaría carne de mayor ternura (Esmailizadeh *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros estudios se han detectado características negativas en la carne de los animales con hipertrofia muscular, como color pálido, menor sabor, menor capacidad de retención de agua y menor ternura (Wiener *et al.*, 2009). El efecto de estas mutaciones sobre el metabolismo lipídico podría explicar en parte las alteraciones en los parámetros de calidad de la carne. La composición de ácidos grasos se relaciona con atributos de sabor y aroma, además de afectar la salud del consumidor. Hasta cierto punto la oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados mejora el sabor, más allá del cual genera efectos que van en detrimento de la calidad del producto, como olor rancio o cambios en el color de la carne (Bernard *et al.*, 2007). Debido a esto, en un estudio en la raza South Devon utilizando un panel de degustadores las variantes mutantes del gen de la miostatina se asociaron con

una disminución en el sabor y la aceptabilidad general de la carne (Wiener *et al.*, 2009).

Otra de las mayores restricciones para el uso generalizado de animales hipermusculados en la cría de ganado son los problemas causados por partos distócicos. Para muchos productores, especialmente para los que practican la cría extensiva, los beneficios que aportarían en cuanto a cantidad y calidad de carne no compensan las pérdidas causadas por la potencial mortalidad de la vaca y/o del ternero en el parto. Este problema es menor en la raza Limousin, ya que la mutación *GDF8_F94L* no genera una hipermuscularidad tan exagerada como la *GDF8*, aunque también los efectos beneficiosos se verían disminuidos (Sellick *et al.*, 2007).

En conclusión, si bien los beneficios que aportan estas mutaciones a la cantidad de carne producida y al rendimiento carnicero de los animales son bien notorios, no es tan clara su relación con una mejora en la calidad de la carne. Las diferencias encontradas entre los distintos estudios se deben, al parecer, a la raza y a la mutación estudiada, encontrándose diferencias entre Limousin y South Devon, por ejemplo; entre los efectos más tenues de la mutación *F94L* en comparación con la *GDF8*, y entre animales portadores (heterocigotos) en comparación con animales homocigotos para estas mutaciones. La aplicación de marcadores asociados a la calidad de la carne en la cría y selección del ganado podrían contribuir a generar un producto de mejor calidad y más saludable. El conocimiento detallado de los genes involucrados y sus potenciales efectos es clave para poner esto en práctica y tomar decisiones de manejo bien fundamentadas.

Gen CYP1A

El gen *CYP1A1* es un gen nuclear que codifica una enzima de la familia 1 de los citocromos P450 (CYP), relacionada con el metabolismo de ciertos fármacos, la síntesis del colesterol, de esteroides y de otros lípidos. Los CYP son proteínas asociadas a las membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplasmático, formando parte de cadenas de transferencia de electrones y participando del metabolismo energético de la célula. El gen *CYP1A1* ha sido asociado con características reproductivas en bovinos (Thanislass *et al.*, 2010) y con eliminación de toxinas, transformación de xenobióticos y metabolismo de fármacos en diferentes especies (Matal *et al.*, 2009; Darwish *et al.*, 2010).

La relación entre los citocromos y la jugosidad de la carne ha sido documentada. Jiang y colaboradores (2009) encontraron que 13 de las 17

características relacionadas con la calidad de la carne bovina que estudiaron, incluida la jugosidad evaluada por panel de consumidores, estaban influenciadas por genes relacionados con la actividad de las mitocondrias, entre ellos varios que codifican citocromos. Sin embargo, en un estudio de expresión génica en animales de la raza Charolais con el objetivo de detectar genes potencialmente relacionados con caracteres de calidad de la carne, Bernard y colaboradores (2007) analizaron el gen de otro citocromo P450 (*CYP2C50*) y no detectaron ninguna correlación entre sus niveles de expresión y la jugosidad, la terneza ni el sabor de la carne en animales de 15 y 19 meses.

Otros autores investigaron la relación entre los citocromos y otros aspectos de la calidad de la carne. Se hallaron niveles altos de expresión de genes mitocondriales (citocromo oxidasa y citocromo b, asociados al metabolismo energético) en tejido adiposo de porcinos (Chen *et al.*, 2006). Lehnert y colaboradores (2007) detectaron un aumento de la expresión del gen de la citocromo C oxidasa en bovinos hipermusculados de la raza Piamontesa con respecto a los de fenotipo normal, probablemente relacionado con un aumento de las necesidades energéticas.

El SNP estudiado aquí del gen *CYP1A1* se ubica en un intrón, por lo tanto no es probable que sea la mutación causal de la variación fenotípica. Es necesario notar, asimismo, que hay sólo 12 animales homocigotos para el alelo A en la muestra total de animales genotipados para este gen (427), por lo que no se puede descartar que el efecto detectado sea provocado por un sesgo azaroso de los datos y no tenga una base biológica real.

Como se mencionó anteriormente, la jugosidad de la carne es uno de los atributos sensoriales más importantes y depende mayormente de la capacidad de retención de agua del músculo (cantidad de agua retenida entre las fibras musculares; Bernard *et al.*, 2007; Feed, 2010). Indirectamente está relacionada también con el pH y con la presencia de grasa intramuscular, ya que ésta al derretirse durante la cocción genera una mayor sensación de jugosidad y una mayor palatabilidad (Feed, 2010). La posible relación entre la jugosidad y el gen *CYP1A1* no es clara: podría estar relacionada al papel que juega este gen en el metabolismo de los lípidos, o tal vez a una relación aún no determinada con la capacidad de retención de agua o con el pH del tejido muscular.

Gen CAPN1

Como se mencionó anteriormente, la terneza de la carne está dada mayormente por una serie de procesos metabólicos anaeróbicos que comienzan en el músculo esquelético inmediatamente después del sacrificio del animal, que implican el debilitamiento de la unión de las proteínas miofibrilares y su proteólisis. La magnitud de este proceso *post-mortem* es el mayor responsable de la variación de la terneza, motivo por el cual se deja madurar la carne refrigerada por un período variable previo a su comercialización (Soria y Corva, 2004; Bernard *et al.*, 2007; Feed, 2010).

El gen *CAPN1* codifica la μ -calpaína, una proteasa activada por el calcio intracelular y principal responsable del proceso proteolítico que aumenta la terneza de la carne, junto con la m-calpaína y la calpastatina. Se han detectado varios polimorfismos en este gen que alteran la actividad de la enzima y están asociados a mediciones de terneza. En particular, la mutación no sinónima *CAPN1 g.5709*, ubicada en el noveno exón, es un SNP en la posición 5709 del gen que involucra la sustitución de una citosina (alelo C) por una guanina (alelo G), provocando el cambio de alanina por glicina en el aminoácido 316 de la proteína resultante (también llamada *CAPN1 316*; Page *et al.*, 2002). El exón 9 codifica parte del dominio II de la proteína, el cual presenta actividad cisteína-proteasa dependiente del calcio, por lo que un polimorfismo en este sitio alteraría la actividad de la enzima (Costello *et al.*, 2007).

Diversos estudios, llevados a cabo en varias razas y utilizando mediciones de terneza basadas en métodos organolépticos y mecánicos, indican una asociación significativa de este polimorfismo de la μ -calpaína con la terneza e identifican al genotipo CC como el más ventajoso (Page *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005; Esmailzadeh *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006; Van Eenennaam, 2007; Costello *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009; Johnston y Graser, 2010). Según estos estudios, la carne de los animales portadores del genotipo CC requiere una menor fuerza de corte, siendo válido este efecto para animales de varias razas (aunque el efecto varía de una raza a otra) y para diferentes piezas musculares. Esta disminución va de -0,26kg (Page *et al.*, 2002) a -1,17 kg (Morris *et al.*, 2006) en animales CC vs. GG de razas taurinas. Este marcador forma parte del panel “*GeneSTAR Tenderness*” de uso comercial, junto con un SNP del gen de la calpastatina y otro SNP del gen de la μ -calpaína (*CAPN1 g.4751*), y se cree podría ser la mutación causal del QTL asociado a

terneza ubicado en el cromosoma 29 bovino (Page *et al.*, 2002; Esmailizadeh *et al.*, 2005).

Una menor fuerza de corte implica una mayor actividad proteolítica de estas enzimas. En el presente trabajo se detectó una asociación significativa entre el genotipo CC del marcador *CAPN1 g.5709* con una mayor actividad de la μ -calpaína B, lo cual coincide con lo hallado en los estudios mencionados. Sin embargo, esta asociación sólo es significativa cuando se toman todas las razas muestreadas, pero no cuando se excluyen las razas británicas (ni siquiera cerca de la significación en este último caso; $p \gg 0,05$). Ambos agrupamientos de razas presentan frecuencias alélicas globales similares (Anexos 1 y 2), por lo que ello no sería una razón que explique esta diferencia. En los artículos mencionados se detectaron grandes diferencias en cuanto a los efectos entre las variantes de este marcador según la raza estudiada. Esto podría estar influyendo en el presente análisis, dando como resultado un efecto significativo sólo cuando se incluyen ciertas razas, y no en otros escenarios. El hecho de que gran parte de los animales de origen británico hayan sido muestreados en períodos diferentes con respecto a las otras razas, lo que implica variaciones importantes en muchos factores ambientales (por ejemplo: variaciones estacionales y anuales, posibles variaciones a nivel nutricional de los animales, variación del personal a cargo de las medidas en laboratorio, etc.), podría explicar estas diferencias. En este caso la validez de estos resultados, aunque estén de acuerdo con la bibliografía consultada, podría ser cuestionable. Es importante resaltar, además, que el alelo C es el que se encuentra en menor frecuencia en ambos casos, existiendo muy pocos animales con genotipo CC (Anexo 3). Una distribución muy desequilibrada de las frecuencias genotípicas no es deseable en estudios de asociación, ya que puede sesgar los resultados (Costello *et al.*, 2007). Esta situación ha sido observada en otros estudios, y podría ser una de las causas de las diferencias detectadas entre razas. Por ejemplo, Page y colaboradores (2002) hallaron una frecuencia baja de este alelo en razas europeas (0,14; razas no coincidentes con las estudiadas aquí) e inexistente en la raza Simmenthal. Gill y colaboradores (2009) observaron al alelo C con una frecuencia de 0,22 en animales Aberdeen Angus, y Costello y colaboradores (2007) hallaron una frecuencia de 0,12 para este mismo alelo en animales cruzados de razas taurinas.

Se detectó además un indicio de una posible asociación entre el genotipo CC y la actividad media de la μ -calpaína (subunidades A y B). Si bien no alcanza el umbral de significación, se encuentra más cerca del mismo cuando se incluyen a las razas británicas. Probablemente esto sea consecuencia del efecto significativo sobre la actividad de la μ -calpaína B en este mismo escenario.

En ambos agrupamientos, ninguno de los SNP analizados del gen *CAPN1*, ni siquiera *CAPN1 g.5709*, resultó asociado significativamente con la terneza de la carne, como sería esperable. Ninguna de las formas diferentes en las que fue evaluada la terneza dio un resultado significativo (cizalla de Warner-Bratzler y células de compresión, tanto en carne cruda como cocida y después de distintos períodos de maduración, y panel de degustadores). Una razón puede ser que la diferencia en los niveles de μ -calpaína B provocada por los diferentes genotipos no sea suficiente como para que se traduzca en diferencias en la fuerza de corte o en las características sensoriales de la carne. La diferencia entre los efectos de los genotipos opuestos es relativamente pequeña (incremento de 0,76 U/g en animales CC con respecto a GG). Como la actividad de las enzimas proteolíticas no se suele medir, no es posible saber cuál es el umbral a partir del cual un aumento de la actividad proteolítica se traduce en diferencias medibles o apreciables de la terneza. Debe tenerse presente que las diferencias significativas de actividad sólo se observaron para la μ -calpaína B, no hallándose diferencias para la actividad de la μ -calpaína A ($p \geq 0,05$), por lo que el efecto es tenue. Dado que la terneza de la carne es una característica cuantitativa compleja, seguramente existen otros genes que influyen y que aún no han sido identificados (Morris *et al.*, 2006). Por último, además del proceso de proteólisis *post-mortem*, existen otros factores que también afectan la terneza y que podrían estar interfiriendo en estos resultados, como el contenido de colágeno y de tejido conectivo, la cantidad de grasa intramuscular, el tipo de fibras musculares presentes y el largo del sarcómero (Bernard *et al.*, 2007; Costello *et al.*, 2007).

Gen LEP

La leptina es una proteína hormonal secretada por los adipocitos que actúa como un sensor periférico de la cantidad de grasa, a nivel del centro regulador del peso corporal (hipotálamo) y de los tejidos. En rumiantes así como en varias especies estudiadas, modula el apetito y el metabolismo energético, interviniendo en la regulación del peso corporal (Rahman *et al.*, 2001; Minokoshi *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002).

El gen de la leptina fue identificado por primera vez en ratones como gen *ob* (obesidad) en 1994 (Zhang *et al.*, 1994). Se observó que ratones sin leptina funcional se caracterizaban por un incremento en el consumo de alimento y una tendencia muy marcada hacia la obesidad. La inyección de leptina en estos

animales disminuía el consumo de alimento, aumentaba el gasto energético, el consumo de oxígeno, la temperatura corporal y la actividad locomotora, disminuyendo el peso y el porcentaje de grasa corporal.

Todas estas propiedades hacen del gen de la leptina un importante gen candidato cuyas variantes puedan tener un efecto apreciable en la calidad de la carne y la canal bovinas. Varios autores han detectado asociaciones significativas entre polimorfismos del gen de la leptina y la cantidad total de grasa de la canal, la cantidad de grasa intramuscular, la eficiencia en la conversión de alimento, el espesor de la grasa dorsal, el consumo residual de alimento y el crecimiento en bovinos y otras especies domésticas (Buchanan *et al.*, 2002; Switonsky, 2002; Lagonigro *et al.*, 2003; Soria y Corva, 2004; Schenkel *et al.*, 2005; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Bonnet *et al.*, 2007; Corva *et al.*, 2009). El análisis comercial *IgenityTM-L* de Merial, utilizado para seleccionar bovinos con diferente potencial de acumulación de grasa, se basa precisamente en un polimorfismo del gen de la leptina (<http://www.igenity.com>).

El SNP *LEP* es un polimorfismo no sinónimo en el exón 2 del gen de la leptina bovina, identificado por primera vez por Lagonigro y colaboradores en 2003. Genera un cambio de adenina por timina, resultando en la sustitución aminoacídica tirosina por fenilalanina (posición 252 de la secuencia nro. AY138588; Lagonigro *et al.*, 2003), sustitución que podría alterar la función de la proteína. Estos autores detectaron una asociación significativa entre los diferentes genotipos de este SNP y el consumo diario de alimento en una población experimental de bovinos (N = 460): el promedio de consumo de los animales AT fue de 10,14 kg por día, mientras que los animales AA consumieron en promedio 8,54 kg de alimento por día (un 19% menos). Dada la baja frecuencia del alelo T no fue posible realizar una comparación con el genotipo TT. Si bien no se detectó ninguna asociación entre este SNP y la cantidad de grasa, sí se halló una asociación significativa del haplotipo TCC (SNPs *LEP* alelo T, más *LEP g.198 CbT* alelo C –ambos en el exón 2-, más alelo C de otro SNP en el exón 3) con un aumento de la grasa intermuscular y una asociación del haplotipo ACC con la disminución de la grasa subcutánea, lo cual es coherente con el efecto mencionado del SNP *LEP* sobre el aumento del apetito. Estos resultados tienden a apoyar la hipótesis de que el alelo T del SNP *LEP* promovería la acumulación de grasa. Sin embargo, Schenkel y colaboradores (2005) detectan para este alelo (denominado por ellos “E2JW”) un efecto contrario en tres poblaciones experimentales de bovinos de carne (N = 914), en donde los animales AT presentaban un menor nivel de engrasamiento y un mayor rendimiento de carne magra que los animales AA. El genotipo TT también se encontraba en muy baja

proporción, y al igual que Lagonigro y colaboradores (2003), no detectaron asociación con la cantidad de grasa intramuscular y el nivel de veteado de la carne.

En el presente trabajo no se halló una asociación significativa entre este SNP y la cantidad total de grasa de la canal, aunque se observa una tendencia del alelo T a aumentar el porcentaje de grasa (efecto de +1,46% del genotipo TT vs AA) que no alcanza el umbral de significación ($F = 2,21$; $p = 0,13$). Sí se detectó una asociación significativa entre *LEP* y la cantidad total y porcentual de ácido linoleico conjugado (CLA) de diferentes fracciones lipídicas de la grasa intramuscular (Tabla 10), en donde el alelo T se asocia con mayores niveles de CLA. Se trata de una asociación novedosa, dado que el perfil de ácidos grasos no es un análisis habitual en los trabajos consultados sobre la leptina y su relación con parámetros productivos, ya que suelen hacer énfasis en el crecimiento y la cantidad de grasa corporal. Sin embargo, como se describirá a continuación, existen evidencias recientes de la relación entre la leptina, la desaturación y oxidación de ácidos grasos y el contenido de CLA en bovinos de carne, animales de laboratorio y en cultivos de adipocitos.

Orrú y colaboradores (2011) demuestran varias asociaciones entre diferentes SNPs del gen de la leptina y el perfil de ácidos grasos de la carne bovina en una muestra de 103 toros jóvenes de la raza Simmenthal. Si bien en su estudio incluyen al SNP *LEP* estudiado aquí, éste no fue tomado en cuenta en los análisis de asociación debido a la muy baja frecuencia del alelo T. Sin embargo, otros SNPs de este gen presentaron asociaciones significativas o cercanas a la significación con el contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados (en particular, $\omega 18:1$), y poli-insaturados (como $\omega 18:3$ n3, $\omega 20:2$ n6 y $\omega 20:5$ n3). Los autores afirman que estos efectos pueden ser consecuencia de la regulación negativa que la leptina ejerce sobre la enzima esteroil-CoA-desaturasa (SCD1), dado que la leptina disminuye la expresión del gen *SCD* y la actividad de dicha enzima. Estos hallazgos se encuentran en línea con los efectos del SNP *LEP* sobre la cantidad de ácido linoleico detectados en la presente tesis, tomando en cuenta que la leptina afecta a su precursor ($\omega 18:1$) y a sus productos (como $\omega 18:3$).

Como se mencionó anteriormente, la leptina es mayormente secretada por los adipocitos y la cantidad de leptina circulante es directamente proporcional a la masa de tejido adiposo corporal (Rahman *et al.*, 2001; Lagonigro *et al.*, 2003). Por otro lado, la cantidad de CLA en el tejido muscular es también proporcional a la cantidad de grasa total (De Smet *et al.*, 2004). Por estos motivos, resulta coherente que un alelo que tienda a un aumento del apetito y a una mayor deposición de grasa esté también asociado a un mayor contenido de CLA en los tejidos. Esto coincidiría

con las conclusiones de Lagonigro y colaboradores (2003) y con los hallazgos detectados en el presente trabajo.

De todas formas, la relación entre leptina y CLA es muy compleja y permite distintas lecturas. Se ha comprobado que la suplementación con CLA en la dieta inhibe la secreción de leptina y disminuye los niveles de su ARN mensajero (Rahman *et al.*, 2001; Kang y Pariza, 2001; Cammisotto *et al.*, 2003). Pérez-Matute y colaboradores (2007) hallaron que el ácido linoleico interfiere con una vía metabólica mediada por la insulina -diferente de la que controla los niveles de glucosa- en la cual controla la producción y regulación de la leptina y la adiponectina. El CLA además favorece la oxidación de otros ácidos grasos, disminuyendo las reservas de triglicéridos y promoviendo la disminución de la cantidad de grasa total y del peso corporal (Rahman *et al.*, 2001). Por lo tanto, un alelo que favorezca la acumulación de CLA en los tejidos podría estar también asociado a una disminución de la grasa corporal, efecto que según Schenkel y colaboradores (2005) presenta el alelo T.

Por otro lado, se ha comprobado que la leptina estimula la oxidación de ácidos grasos para la obtención de energía metabólica, por medio de la activación de la enzima protein-quinasa activada por el AMP cíclico (AMPK) y la inhibición de la enzima acetil-coenzima A carboxilasa (ACC) en el músculo, previniendo así la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos. Esta interacción de la leptina con el metabolismo de los ácidos grasos en tejido muscular fue descrita por primera vez por Minokoshi y colaboradores en 2002, e identifican a la AMPK como la principal molécula mediadora. De esta forma, las variaciones en el contenido de CLA en el músculo podrían también estar relacionadas con la capacidad oxidativa de la leptina. Claramente se requiere más investigación en este tema para obtener datos concluyentes acerca de los efectos de este SNP del gen de la leptina sobre la capacidad de acumulación de grasa y los niveles de CLA.

El CLA, y en particular su isómero *cis*-9 *trans*-11 CLA, es un ácido graso muy apreciado en nutrición humana ya que posee propiedades benéficas para la salud. Es el más potente anticancerígeno natural conocido, y al igual que otros ácidos grasos poli-insaturados, contribuye a disminuir el colesterol y el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Se encuentra naturalmente en mayores concentraciones en la carne y leche de rumiantes en comparación con la carne de otros animales, ya que se genera por el proceso de biohidrogenación del ácido linoleico en el rumen (Laborde *et al.*, 2001; Bauman *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2004; De La Torre *et al.*, 2006).

La MAS podría ser una herramienta muy útil en la producción de alimentos funcionales (también llamados “de diseño”), es decir, alimentos con ciertas

propiedades nutricionales dirigidos a mejorar la salud y disminuir el riesgo de contraer determinadas enfermedades. En la mayoría de los casos estos alimentos se elaboran agregándoles componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas y antioxidantes. Otras alternativas son la administración de cierta dieta a animales de producción para que acumulen el compuesto de interés en su carne, leche o huevos, o la selección de animales que generen naturalmente cierto compuesto en sus tejidos (Laborde *et al.*, 2001; Bauman *et al.*, 2003). En este contexto, y si se comprobaran sus efectos, el SNP LEP aquí analizado podría llegar a ser útil en un programa de MAS para generar animales con un mayor contenido de CLA en su carne. Para ello sería necesario un estudio más profundo, en el que se analizaran más animales y se validaran sus efectos en otras poblaciones. Los efectos aquí descriptos son moderados (aumento de 1 DT, en promedio) y tal vez no compensarían el uso de MAS con este fin, pero constituyen un indicio interesante.

Al igual que en otros trabajos (Lagonigro *et al.*, 2003; Schenkel *et al.*, 2005; Orrú *et al.*, 2011), la frecuencia del alelo T hallada en la muestra analizada es extremadamente baja, encontrándose sólo cuatro animales homocigotos TT, por lo que no se puede descartar que el efecto detectado sea una asociación casual. Esta tendencia a la fijación del alelo A en casi todas las razas estudiadas no contribuye a dilucidar si el marcador sería útil o no para MAS, siendo necesario analizar este polimorfismo en una muestra mayor de animales para confirmar las asociaciones detectadas. El ejemplo de este SNP pone en evidencia la necesidad de efectuar estudios poblacionales previos a la posible aplicación de los marcadores moleculares en producción animal.

El otro SNP estudiado aquí del gen de la leptina (*LEP g.198 CbT*) es una sustitución de citosina por timina en el exón 2 que genera un cambio aminoacídico de arginina por cisteína en la proteína resultante. Varios autores han reportado asociaciones significativas entre este SNP y el contenido de grasa de la canal e intramuscular (por ejemplo, Buchanan *et al.*, 2002; Soria y Corva, 2004; Schenkel *et al.*, 2005), pero dicha asociación no fue detectada en el presente trabajo ($p \gg 0,05$ en todos los casos).

Gen CFL1

Las cofilinas constituyen una familia de proteínas de unión a la actina, muy conservadas y presentes en todas las células eucariotas. Junto con otras moléculas,

como los factores de depolimerización de la actina (ADF), participan en la modulación de la dinámica de los filamentos de actina, especialmente en células musculares y neuronas (Choi *et al.*, 2003; Obinata y Sato, 2007; Bamburg y Bernstein, 2010). Existen dos isoformas: la muscular (codificada por el gen *CFL2*) y la no-muscular (codificada por el gen *CFL1*). La isoforma muscular es abundante en el músculo de los vertebrados, estando su función asociada al corte de subunidades y depolimerización de los filamentos de actina, imprescindible para el desarrollo normal del tejido muscular. La cofilina no-muscular es más ubicua, interviene en los mecanismos de respuesta celular (ej. fagocitosis y degranulación en neutrófilos), en el desarrollo embrionario y en la acumulación de lípidos, especialmente en las vísceras (Choi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009^a; Bamburg y Bernstein, 2010).

En un estudio de expresión diferencial en tejido adiposo de dos líneas divergentes de pollos, se observó que la cofilina 2 (junto con otras proteínas del citoesqueleto) estaba significativamente más expresada en el tejido adiposo abdominal de aves con más grasa en comparación con las que presentaban menos grasa. Según los autores, esto sugiere una relación entre la capacidad de acumulación de grasa de los adipocitos y las características de su citoesqueleto, controlado por las cofilinas y otras proteínas de unión a la actina (Wang *et al.*, 2009^a).

En estudios de expresión génica comparando diferentes depósitos de grasa en distintas especies, Choi y colaboradores (2003) hallaron en la especie bovina una mayor acumulación de ARNm de *CFL1* en la grasa subcutánea que en el tejido adiposo visceral, al contrario de lo detectado en ratón y cerdo. En ningún caso detectaron altos niveles de expresión de este gen en el tejido muscular, ni del gen *CFL2* en tejido adiposo. Estos hallazgos ponen en evidencia que las dos isoformas de la cofilina presentan patrones de expresión diferentes, seguramente debidos a que cumplen distintas funciones, y que el gen *CFL1* está involucrado en la adipogénesis. Los autores proponen que las diferencias observadas entre bovinos, ratones y cerdos podrían deberse a las diferencias en el metabolismo de los lípidos existentes entre rumiantes y monogástricos, ya que la fermentación y biohidrogenación en el rumen hace que la composición en ácidos grasos de los lípidos de los rumiantes sea menos dependiente de la dieta que en otros animales.

En razas bovinas de Corea, Bong y colaboradores (2009) detectaron una mayor expresión de cofilina 1 en la grasa subcutánea en comparación con la grasa intramuscular, coincidiendo con lo hallado por Choi y colaboradores (2003).

El SNP del gen *CFL1* analizado en el presente trabajo es una mutación no sinónima que provoca un cambio de isoleucina por treonina en la posición 47 de la

proteína. Estudios posteriores deberán demostrar si este cambio aminoacídico altera la función de la proteína y si puede ser la mutación causal de la variación fenotípica observada. Los resultados hallados con este SNP se enmarcan en la misma línea que los anteriormente mencionados. En la Tabla 11 se observa que este SNP incide en los niveles de ciertos ácidos grasos de la grasa bovina, en especial 9cis-11trans CLA, uno de los principales ácidos grasos fruto de la biohidrogenación de los lípidos en el rumen, y de la relación entre ácido linoleico y ácido linolénico (ω 18:2/ ω 18:3). Si bien los efectos son pequeños, constituye un indicio de gran importancia y un punto de partida para análisis más profundos de la relación entre este gen y la adipogénesis, incluyendo la posibilidad de variar la composición y la calidad de la grasa bovina mediante selección genética.

Genes *PPARG* y *PPARGC1A*

El gen *PPARG* codifica un receptor nuclear activado por factores proliferadores de peroxisomas, denominado PPAR γ . Los peroxisomas son organelas de las células eucariotas relacionadas con el catabolismo de ácidos grasos de cadena larga y otras moléculas, y con el metabolismo energético. Una vez activado, *PPARG* modula la transcripción de otros genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis y metabolismo de los lípidos, como *ACACA*, *FASN*, *FABP4*, *SCD* e *INSIG1*. A su vez, el gen *PPARGC1A* codifica un coactivador de *PPARG*, la proteína PGC1- α , la cual permite la interacción de PPAR γ con los factores de transcripción. Ambos genes están muy relacionados funcionalmente, actuando a nivel del metabolismo lipídico y en la determinación del tipo de fibra muscular (oxidativas o glicolíticas; Nakamura y Nara, 2002; Puigserver y Spiegelman, 2003; Graugnard *et al.*, 2009).

PPARG es considerado el gen principal que dirige la diferenciación de los adipocitos, con una función clave en la regulación de la expresión génica en las células del tejido adiposo blanco (Puigserver y Spiegelman, 2003). Controla la transcripción de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico y la adipogénesis en varias especies de mamíferos y aves, siendo indispensable para el mantenimiento de la diferenciación de los adipocitos, en los cuales se expresa en forma abundante (Graugnard *et al.*, 2009). Estudios en ratones *knock out* y en cultivos celulares han demostrado que la activación y la expresión de *PPARG* es indispensable para el desarrollo del tejido adiposo (Hausman *et al.*, 2008). Está asociado con la obesidad y la respuesta fisiológica a la ingesta de grasas en

humanos (Mamisoglu *et al.*, 2003). En bovinos, inicialmente fue identificado por su relación con la cantidad de grasa en la leche. Junto con *PPARGC1A*, *INSIG1* y *SCD*, son los principales actores de una red de genes cuya acción coordinada regula la síntesis de lípidos en la glándula mamaria (Bionaz y Looor, 2008).

En cuanto a la deposición de grasa intramuscular, se ha observado que la regulación positiva de *PPARG* es suficiente para inducir la diferenciación y proliferación de adipocitos en el tejido muscular, y que ningún factor promotor de la adipogénesis funciona en ausencia de PPAR γ (Lee *et al.*, 2007; Graugnard *et al.*, 2009). En un análisis de las redes transcripcionales que controlan la adipogénesis y el metabolismo energético en el músculo bovino en desarrollo, Graugnard y colaboradores (2009) observaron que la expresión de *PPARG* aumentaba casi al doble a medida que avanzaba la formación de adipocitos, especialmente en animales a los que se les suministró una dieta de elevado contenido calórico. Al mismo tiempo, observaron un incremento de hasta 25 veces en la expresión de genes activados por *PPARG*, como *ACACA*, *FASN*, *FABP4* y *SCD*. Wang y colaboradores (2009^b) identificaron a *PPARG* como uno de los genes potencialmente más útiles en la predicción de la capacidad de almacenamiento de grasa intramuscular en novillos. Analizando el transcriptoma de dos poblaciones extremas (Wagyu x Hereford, con un elevado nivel de veteado, y Piamontesa x Hereford, con un menor nivel de veteado) detectaron diferencias significativas en la expresión de *PPARG*, cuya expresión aumentaba en las fases de acumulación de depósitos de grasa. Resultados muy similares obtuvieron Lee y colaboradores (2007) en novillos de razas coreanas, en los cuales los niveles de expresión de la proteína PPAR γ fueron ocho veces más altos en las últimas etapas del período de engorde que al comienzo del experimento. Por otro lado, Gutiérrez-Gil y colaboradores (2008) detectaron un QTL para grasa intramuscular en el cromosoma 22 bovino. Dada la influencia crucial de este gen en la adipogénesis, bien podría tratarse de *PPARG*.

Como se mencionó anteriormente, el gen *PPARGC1A* codifica un coactivador de *PPARG*, la proteína PGC1- α . Los coactivadores funcionan como intermediarios entre los factores de transcripción y el aparato transcripcional de la célula. Si bien no se unen directamente al ADN, aumentan la tasa de expresión del gen diana al promover su transcripción. *PPARGC1A* está involucrado en la regulación de una gran variedad de funciones celulares y respuestas biológicas relacionadas a la homeostasis energética, la regulación de la temperatura corporal, el metabolismo de la glucosa en el músculo y la biosíntesis de lípidos, interactuando directamente con *PPARG* (Puigserver y Spiegelman, 2003; Weikard *et al.*, 2005). Se expresa en forma

elevada en el tejido adiposo pardo y regula la biogénesis de mitocondrias en el tejido adiposo y muscular. Esta última función está asociada al tipo de fibra del músculo esquelético: *PPARGC1A* se expresa mayormente en las fibras musculares de tipo I, donde promueve el metabolismo oxidativo (en oposición al metabolismo glicolítico) en estas fibras de respuesta lenta, ricas en mitocondrias (Puigserver y Spiegelman, 2003; Graugnard *et al.*, 2009; Hudson *et al.*, 2009). En humanos está asociado a la obesidad y a la resistencia a la insulina, mientras que en estudios de mapeo comparativo entre especies se observó que varios QTLs asociados a la obesidad se localizan en las regiones cromosómicas equivalentes de ratones y cerdos donde está ubicado *PPARGC1A*, una región cromosómica conservada con una alta influencia en la síntesis de grasa (Weikard *et al.*, 2005).

Al igual que *PPARG*, sus efectos sobre características productivas en bovinos fueron descritos primeramente en razas lecheras. Varios estudios apuntaban hacia un QTL en BTA6 para cantidad de grasa y proteína de la leche, siendo *PPARGC1A* uno de los principales genes candidatos en esa región (Weikard *et al.*, 2005). Estos autores detectaron asociaciones significativas entre ciertos SNPs de este gen y la cantidad de leche y cantidad de grasa en la leche de vacas Frisonas de Alemania. Otros autores no detectaron estas asociaciones pero mostraron la asociación entre otros SNPs de este gen y la cantidad de proteína en la leche (Khatib *et al.*, 2008). Estudios de expresión génica de glándula mamaria indican que una red de reguladores de la transcripción y receptores nucleares, incluyendo a *PPARG* y *PPARGC1A* entre otros, son los responsables de la activación coordinada de los genes que dirigen la síntesis de lípidos durante la lactación (Bionaz y Looor, 2008). Estos resultados y su estrecha interacción con *PPARG* apoyan la hipótesis de que *PPARGC1A* también es un fuerte gen candidato para la cantidad y composición de la grasa intramuscular, y potencialmente para otras características relacionadas a la calidad de la carne.

En el presente trabajo se hallaron asociaciones significativas entre SNPs de los genes *PPARG* y *PPARGC1A* y los niveles de ácido linoleico conjugado (9c11tCLA) y ácido eicosaenoico (ω 20:1) presentes en la grasa de la carne bovina. Además se detectaron otras asociaciones potencialmente interesantes, cercanas al nivel de significación, entre estos SNPs y los niveles de ácido docosapentaenoico (22:5 n3), el porcentaje de grasa intramuscular y el rendimiento de la canal. Debido a la gran influencia que tienen estos genes sobre el metabolismo lipídico, no sería de extrañar que afectaran de diversas maneras la composición y calidad de la carne y la canal.

El SNP estudiado de *PPARG* se encuentra en la región 5' UTR del gen, por lo que podría tener incidencia en la regulación de su expresión. Es necesario notar, sin embargo, que hay sólo 4 animales homocigotos para el alelo A en la muestra total de animales genotipados para este gen (415), aunque hay 113 heterocigotos, por lo que no puede asegurarse que la asociación sea real y no simplemente fruto de un sesgo azaroso de los datos. El SNP *PPARGC1A* se ubica en el quinto intrón del gen, siendo poco probable que dicha mutación tenga un efecto directo sobre el fenotipo.

Por otro lado, el SNP *PPARGC1A* ex8_1209 es un SNP conservativo ubicado en la posición 1209 del exón 8 del gen. No causa sustitución aminoacídica en la posición 403 de la proteína PGC1- α (Weikard *et al.*, 2005), por lo que no se considera una mutación causal de la variación fenotípica, aunque podría estar en elevado desequilibrio de ligamiento con ésta. El genotipo CC de este SNP favorece el aumento de ácido eicosaenoico (ω 20:1) en la carne, tanto en su cantidad neta como porcentual, así como el rendimiento de la canal. Estos efectos probablemente estén relacionados entre sí, dada la influencia de este gen en el metabolismo lipídico y la determinación del tipo de fibra muscular, si bien no se halló asociación con porcentaje de grasa, como sí ocurre con *PPARG*.

Tanto el genotipo GG de *PPARG* y el genotipo CC de *PPARGC1A* parecen ser favorables para los niveles de 9c11tCLA en la carne bovina, un ácido graso de gran valor nutricional, como se describió anteriormente. Si bien sus efectos serían pequeños, sus efectos combinados junto con los del SNP estudiado del gen *LEP* podrían ser potencialmente utilizados en MAS para aumentar la cantidad de esta sustancia en la carne vacuna. El mismo genotipo de *PPARG* parece favorecer una mayor deposición de grasa intramuscular, lo que concuerda con la observación de que a mayor cantidad de grasa en el músculo mayor es la proporción de 9c11tCLA presente en la carne (De Smet *et al.*, 2004). Este efecto coincide con lo observado por varios autores en cuanto a la acción clave de este gen en la diferenciación y proliferación de adipocitos en el músculo (Lee *et al.*, 2007; Graugnard *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009^b). El genotipo opuesto (AA), sin embargo, sería el más favorable para el aumento del ácido docosapentaenoico (ω 22:5n3 o DPA) en la carne, al igual que el genotipo TT de *PPARGC1A*. El DPA se genera por la elongación del ácido eicosaenoico (ω 20:5n3, o EPA) y es precursor del ácido docosahexaenoico (ω 22:6n3, o DHA). Un SNP que afectara las cantidades relativas de DPA podría también influir en los niveles de EPA y DHA, todos ácidos grasos poli-insaturados de la familia de los ω 3, con propiedades benéficas para la salud humana. Los ω 3 contribuyen a disminuir el colesterol, prevenir enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer (Laborde *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2004). La composición

en ácidos grasos determina, además, el sabor y el aroma de la carne, e influye en la oxidación de los lípidos que puede provocar olores rancios (Bernard *et al.*, 2007). Debido a la interacción entre *PPARG* y otros genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos (especialmente *SCD* y *FASN*), estos efectos podrían ser indirectos y deberse a la acción de *PPARG* sobre estos genes.

Ninguna de las asociaciones mencionadas es estadísticamente significativa cuando se excluyen las razas británicas del análisis, aunque todas se encuentran cercanas al nivel de significación y coinciden en la dirección del efecto esperado.

Varios autores registran diferencias entre razas y entre individuos en los niveles de ácidos grasos de cadena larga en la carne, especialmente los poliinsaturados de tipo $\omega 3$, que no pueden atribuirse simplemente a diferencias en la cantidad de grasa (Laborde *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2004). Estos efectos seguramente reflejan diferencias subyacentes de expresión génica y actividad enzimática en los procesos de síntesis, desaturación y elongación de ácidos grasos, por lo que la cría selectiva de ganado podría utilizarse para modificar la composición de ácidos grasos de la carne. Además, a diferencia de los monogástricos, en los rumiantes no es sencillo modificar el perfil lipídico de la grasa solamente mediante el manejo nutricional de los animales. Debido a que obtener los perfiles de ácidos grasos es demasiado costoso como para que sea implementado en programas de mejora genética tradicionales, la búsqueda de loci que afecten los perfiles de ácidos grasos y su uso en selección asistida por marcadores ofrece una alternativa muy interesante para modificar las características nutricionales de la carne bovina mediante selección genética.

Gen SCD

La enzima esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) convierte ácidos grasos saturados en monoinsaturados mediante la introducción de un doble enlace en la posición $\Delta 9$. A partir de ácido esteárico ($\omega 18:0$) cataliza la síntesis de ácido oleico ($\omega 18:1$ n9), el cual a su vez es transformado en linoleico ($\omega 18:2$ n6), afectando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, los triglicéridos y los ésteres de colesterol. Es una enzima clave en la generación de este ácido graso y sus isómeros, entre ellos el ácido linoleico conjugado (9c11tCLA). Su actividad es inducida, entre otros factores, por PPAR γ y otros proliferadores de peroxisomas (Peterson *et al.*, 2002; Nakamura y Nara, 2002; Graugnard *et al.*, 2009; Orrú *et al.*, 2011).

Como fue mencionado anteriormente, varios autores han determinado la relevancia del gen *SCD* en la síntesis de ácidos grasos, el metabolismo lipídico y la acumulación de grasa, en interacción con otros genes como *PPARG*, *SREBP* y *LEP* (Bionaz y Loor, 2008; Graugnard *et al.*, 2009; Orrú *et al.*, 2011). Lee y colaboradores (2008) detectaron diferencias muy significativas en los niveles de expresión del gen *SCD* en muestras de tejido adiposo intramuscular de novillos de razas coreanas con niveles variables de veteado, por lo que se lo considera un gen candidato para esta característica. En un análisis de los efectos combinados de varios genes relacionados con características de la canal, eficiencia alimentaria y composición de ácidos grasos empleando varias estrategias, Jiang y colaboradores (2009) detectaron tres SNPs en el gen *SCD* asociados significativamente con la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados presentes en el músculo bovino.

En un estudio en la raza Wagyu, conocida por su alto nivel de engrasamiento, Taniguchi y colaboradores (2004) detectaron que la actividad de la enzima SCD1 se correlacionaba positivamente con el contenido de ácidos grasos insaturados del tejido adiposo, y detectaron asociaciones significativas entre ciertos polimorfismos del gen *SCD* y el perfil de ácidos grasos de la carne. En particular el SNP *SCD g.10329 TbC* (analizado aquí), que causa una sustitución de valina por alanina, se asoció con variaciones en el nivel de actividad enzimática, en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (1,7% de diferencia entre genotipos opuestos) y en el punto de fusión de la grasa intramuscular. En su estudio en la raza Simmenthal mencionado anteriormente, Orrú y colaboradores (2011) detectaron asociaciones entre el alelo C de este polimorfismo y un aumento en la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados a expensas de los saturados, especialmente en los ácidos grasos de 18 carbonos.

Otros autores refieren asociaciones significativas similares entre éste y otros polimorfismos del gen *SCD* y la actividad de la enzima y la concentración de ácidos grasos insaturados en la leche bovina (Mele *et al.*, 2007; Milanesi *et al.*, 2008; Kgwatalala *et al.*, 2009). El efecto estimado de este gen sobre la variación total de ácidos grasos mono-insaturados sería bajo ($R^2 = 0,04$ según Taniguchi *et al.*, 2004; $R^2 = 0,05$ según Mele *et al.*, 2007), lo cual reflejaría la existencia de otros genes involucrados e interacciones complejas entre ellos, como por ejemplo con la leptina (Orrú *et al.*, 2011).

En el presente trabajo detectamos una asociación significativa entre el SNP mencionado y el porcentaje de ácido linoleico ($\omega 18:2n6$) en los fosfolípidos de membrana, así como una asociación cercana al nivel de significación para el porcentaje de $\omega 18:2n6$ en las otras fracciones lipídicas (triglicéridos y totales). Se

detectó también una asociación sugerente entre este SNP y el porcentaje de ácido oleico ($\omega 9c18:1$) de los fosfolípidos. Los datos apuntan a que el genotipo CC favorecería la generación de ácidos grasos monoinsaturados (coincidiendo con lo expresado por Taniguchi *et al.*, 2004, y Orrú *et al.*, 2011), mientras que el genotipo TT favorecería la generación de ácido linoleico, todo lo cual apoyaría la hipótesis de que este SNP incide en la actividad de la enzima. El presente trabajo coincide con los estudios anteriores mencionados en cuanto a que no se detecta una asociación significativa con la variación de ácido linoleico conjugado o CLA.

La carne con una mayor proporción de ácidos grasos insaturados aportaría mayores beneficios nutricionales, ya que éstos disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, contrarrestando la acción nociva de las grasas saturadas (De La Torre *et al.*, 2006; Kraft *et al.*, 2009). Por otro lado, un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados disminuye el punto de fusión de la grasa intramuscular, afectando el sabor, el aroma, la textura y la ternura de la carne (Farmer, 1994; Bernard *et al.*, 2007; Grompone, 2010). Si bien en el presente trabajo no se hallaron asociaciones significativas o potenciales entre este gen y las propiedades organolépticas de la carne, si se quisiera utilizar en MAS este punto debería ser evaluado, ya que el exceso de ácidos grasos insaturados, por más favorables que éstos sean para la salud del consumidor, puede alterar negativamente la calidad sensorial del producto.

Es claro que el perfil de ácidos grasos de la carne está influenciado por muchos genes que interactúan entre sí, siendo el gen *SCD* un muy buen candidato que explica una parte de la variabilidad genética de esta característica compleja.

Gen *HSPB1*

El gen *HSPB1* (*heat shock 27kDa protein beta1*) codifica una proteína perteneciente a la familia *hsp20* de las proteínas pequeñas de choque térmico. Estas proteínas funcionan como chaperonas, previniendo el daño celular y la proteólisis y confiriendo resistencia al estrés térmico (Bernard *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009^a). La proteína HSPB1 está involucrada en el metabolismo lipídico de mamíferos y aves debido a su interacción con el factor de crecimiento similar a la insulina (*IGF1*) y protein-quinazas transductoras de señales (Wang *et al.*, 2009^a). Se asocia a la ocurrencia de obesidad y diabetes en humanos (Thorleifsson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009^a). En un estudio en músculo esquelético bovino en desarrollo, Zhang y colaboradores (2010) hallaron que HSPB1 se encuentra doblemente expresada

durante la fase de desarrollo de los depósitos de grasa intramuscular en comparación con la fase de desarrollo del propio tejido muscular. Wang y colaboradores (2009^b) detectaron una expresión diferencial de *HSPB1*, así como de otras proteínas de choque térmico, comparando los transcriptomas de músculo en distintas etapas del desarrollo de terneros de dos líneas divergentes en cuanto a cantidad de grasa intramuscular (animales de cruce Wagyu x Hereford vs. animales de cruce Piamontesa x Hereford). En un estudio similar en aves, Wang y colaboradores (2009^a) hallaron una diferencia significativa en la expresión de *HSPB1* en el tejido adiposo abdominal de dos líneas divergentes de pollos seleccionados según la cantidad de grasa.

En el presente trabajo se halló un SNP del gen *HSPB1* significativamente asociado al porcentaje de ácido linoleico (ω 18:2n6) de la fracción fosfolipídica de la grasa intramuscular bovina y se observó una tendencia, cercana al umbral de significación, a estar asociado también con el porcentaje de ácido oleico (ω 9c18:1) de la misma fracción lipídica. Sus efectos sobre estos ácidos grasos se reflejan en la relación entre el ácido linoleico y el linolénico (ω 18:2/ ω 18:3) y en la relación de ácidos grasos ω 6 vs. ω 3, relaciones que este SNP parecería estar influyendo (Tabla 15). Todos estos resultados están de acuerdo con los trabajos anteriormente mencionados, e indican una relación, potencialmente útil en MAS, entre este SNP y la composición de la grasa intramuscular bovina. Las propiedades benéficas de los ácidos grasos insaturados, y especialmente de los ω 3, en la salud humana son ampliamente reconocidos (De Smet *et al.*, 2004). Un SNP que afecte significativamente las cantidades relativas de estas sustancias en la grasa intramuscular puede ser de interés a la hora de seleccionar animales que produzcan carne con un perfil lipídico más saludable, aunque no habría que descuidar la calidad organoléptica de la carne, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, en un estudio de expresión diferencial durante la miogénesis en cultivos *in vitro* y de proteómica comparativa entre toros y novillos castrados, Zhang y colaboradores (2011) encontraron que el nivel de ARNm de *HSPB1* se incrementaba muy significativamente durante la miogénesis, especialmente después de la adición de testosterona, y que la cantidad de proteína *HSPB1* era mucho más elevada en el músculo esquelético de los toros que en el de los novillos. En esta misma línea, analizando perfiles de expresión génica de músculo en novillos Charolais, Bernard y colaboradores (2007) detectaron que *HSPB1* se encuentra relacionado con el nivel de terneza, jugosidad y sabor de diferentes cortes de carne. Los autores lo atribuyen a la función que esta proteína cumple en la polimerización de la actina, asociándose a la tubulina y a los microtúbulos del citoesqueleto y

favoreciendo la estabilidad de los microfilamentos de actina. La regulación negativa de *HSPB1* provocaría la desorganización de la actina y su degradación durante el proceso de maduración de la carne, reduciendo la resistencia al corte y aumentando la terniza. Estos resultados coinciden con lo hallado por Moreno-Sánchez y colaboradores (2010), los cuales detectaron diferencias de expresión de *HSPB1* en distintos tipos de músculos bovinos.

En el presente trabajo se detectó una asociación significativa de este gen con el pH de la carne (Tabla 15). Como se mencionó anteriormente, el pH influye en gran medida en la capacidad de retención de agua (y por lo tanto en la jugosidad), el color, el sabor, la textura y la terniza de la carne (Maltin *et al.*, 2003; Aaslyng, 2009; Feed, 2010), por lo que este resultado podría estar relacionado con las observaciones de Bernard y colaboradores (2007). Además, la relación de este gen con el contenido lipídico del músculo podría explicar, en parte, sus efectos sobre la jugosidad y el sabor.

Este SNP se halla en la región inmediatamente anterior al gen *HSPB1* (*upstream*), por lo que podría tener incidencia en la regulación de la expresión de dicho gen. Dado que sólo se detectaron 10 homocigotos para el alelo T en la muestra analizada, no puede descartarse que las asociaciones halladas sean fruto del azar, si bien existe un número elevado de heterocigotos CT (111) como para sostener estos resultados. Según la bibliografía consultada, es claro que *HSPB1* interviene en forma significativa en el metabolismo lipídico y en el desarrollo muscular de los bovinos, por lo que estudios más exhaustivos en el SNP aquí analizado contribuirían a dilucidar la veracidad de esta asociación y, si así fuera, a aportar datos para su posible aplicación en la selección de animales que produzcan una carne de mejor calidad nutricional y sensorial.

Gen PCSK1

Las pro-proteínas (o pro-hormonas) convertasas *subtilisin/kexin* (PCSKs) son una familia de nueve proteasas presentes en múltiples tejidos, responsables de la maduración de una gran variedad de proteínas y precursores de péptidos hormonales. PCSK1 en particular se encuentra en gránulos densos dentro de las células endócrinas y neuroendócrinas y procesa la ruptura de varias hormonas y precursores de neuropéptidos (Morash *et al.*, 2009; Choquet *et al.*, 2011). En humanos y ratones se han asociado varios polimorfismos presentes en el gen *PCSK1* con un mayor riesgo de padecer obesidad y susceptibilidad a la diabetes tipo

II (Benzinou *et al.*, 2008; Heni *et al.*, 2010; Rouskas *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011). Otra proteína de la misma familia, PCSK5, se relaciona con la regulación del desarrollo folicular en los ovarios (Bae *et al.*, 2008).

El SNP analizado en el presente trabajo del gen *PCSK1* es una mutación sinónima en el exón 14, por lo que no es probable que cause variación a nivel fenotípico, si bien podría estar en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Se halló significativamente asociado a la cantidad de colágeno en la carne de los animales de razas continentales. A diferencia de lo esperable, no se detectó ninguna asociación con aspectos del metabolismo lipídico. Si bien no se ha registrado ninguna relación de este gen con el colágeno, sí existen evidencias de la acción de otras proteasas de la misma familia en el crecimiento y en la deposición de colágeno en los tejidos. Marchesi y colaboradores (2011) estudiaron ratones a los que se les inactivó el gen de la *proproteína convertasa 5/6* (PC5/6) en células endoteliales (su inactivación total en ratones *knock out* provoca la muerte en etapas embrionarias), y detectaron una disminución significativa del contenido de colágeno en los fibroblastos del músculo cardíaco y los vasos sanguíneos. Por otro lado, la inactivación del gen de la *pro-proteína convertasa S1P*, otra enzima de la misma familia, genera ratones condrodisplásicos, deficientes en el desarrollo óseo y con una matriz cartilaginosa defectuosa, carente del colágeno II (Patra *et al.*, 2011). Estos hallazgos recientes apoyan una posible relación entre *PCSK1* y el contenido de colágeno en músculo, aunque esta asociación debe ser estudiada en mayor profundidad antes de inferir su potencial en la mejora de la calidad de la carne.

Otros genes con resultados cercanos al nivel de significación

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es generada en la región cerebral encargada del control del apetito. Provoca la liberación de glucocorticoides, los cuales interactúan con la leptina y la pro-opiomelanocortina (POMC), regulando el apetito, el crecimiento y el peso corporal (Buchanan *et al.*, 2005). Estos autores demuestran la asociación existente entre el SNP estudiado aquí (*CRH g.22 CbG*) y varios parámetros de calidad de la canal bovina. El SNP altera la secuencia aminoacídica de la proteína resultante, cambiando una prolina (alelo C) por una arginina (alelo G). Los animales con genotipo GG presentaron una mayor área de la chuleta y peso de la canal caliente que los de genotipo CC. Si bien estos efectos no fueron hallados en la presente tesis, sí se detectó una posible relación, cercana al umbral de significación estadística, entre este SNP y la cantidad de ciertos ácidos

grasos de cadena larga. Aunque no se ha demostrado la relación entre este gen y la cantidad y composición de la grasa corporal, existen evidencias de que los glucocorticoides generan un aumento en la expresión de varios genes relacionados al metabolismo lipídico y a la síntesis de ácidos grasos, como *PPARG*, *SREBF1*, *FABP4*, *ACSL1* y *FASN*, en cultivos de pre-adipocitos perimusculares bovinos (Graugnard *et al.*, 2009). Por lo tanto, es posible que un polimorfismo que altere la función de la hormona liberadora de corticotropina, y por lo tanto la liberación de glucocorticoides, esté asociado con variaciones en la composición lipídica de la grasa bovina. Este efecto, en último término, podría estar incidiendo en el crecimiento y en los parámetros de la canal mencionados. La incidencia de este gen y su utilidad potencial en MAS para aumentar la cantidad de ácidos grasos beneficiosos en la carne vacuna, sin alterar otros parámetros de calidad de la carne y la canal, deberá ser analizada en mayor profundidad.

La enzima *lysyl hydroxylasa 3* (codificada por el gen *PLOD3*) cataliza varias de las modificaciones post-traduccionales requeridas durante la síntesis de colágeno. Mutaciones deletéreas en este gen detectadas en humanos causan patologías asociadas al tejido conectivo y muscular (Salo *et al.*, 2008). Si bien no existen evidencias acerca de la relación entre *PLOD3*, la composición lipídica de la carne y parámetros de la calidad de la canal, su relación con el desarrollo del tejido conectivo podrían explicar las asociaciones cercanas al umbral de significación detectadas en el presente trabajo. Chen y colaboradores (2006) hallan varios genes relacionados con el colágeno en un estudio de expresión génica en adipocitos de cerdo, probablemente asociados a la organización de la matriz extracelular. Se ha demostrado la existencia de una elevada expresión de varios genes relacionados con el colágeno en el músculo bovino en desarrollo, probablemente relacionados con lo mismo (Wang *et al.*, 2005; Lehnert *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, también se halló una fuerte disminución en la expresión de los genes relacionados con el colágeno en los animales portadores de la mutación en el gen *GDF8* que genera el fenotipo “culón” (Lehnert *et al.*, 2007). La asociación entre el genotipo GG de *PLOD3* y el aumento en el diámetro de la chuleta que se insinúa en los datos de la presente tesis podría estar relacionada a este hecho, ya que de los 52 animales portadores de la delección de 11 pares de bases en el gen de la miostatina (36 heterocigotos CG y 16 homocigotos CC), todos portaban el alelo G del gen *PLOD3* (8 en forma heterocigota y el resto en forma homocigota), con la excepción de un solo individuo que era homocigoto AA para *PLOD3*.

La Δ -5 desaturasa (*FADS1*) es una enzima clave en la síntesis de ácidos grasos en mamíferos, junto con las desaturasas Δ -6 (*FADS2*) y Δ -9 (*FADS3*)

(Nakamura y Nara, 2002). Se han encontrado fuertes asociaciones entre variantes genéticas de estas enzimas y el contenido de ciertos ácidos grasos en los fosfolípidos del suero y de la membrana eritrocitaria en humanos (Schaeffer *et al.*, 2006; Malerba *et al.*, 2008; Rzehak *et al.*, 2008; Lattka *et al.*, 2010). En bovinos se ha estudiado su expresión durante la lactancia y su relación con la desaturación de ácidos grasos en la glándula mamaria (Bionaz y Loor, 2008). Si bien se relaciona principalmente con el metabolismo de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, no puede descartarse un efecto indirecto de este gen sobre otros ácidos grasos, como los monoinsaturados.

La enzima *Acetyl-CoA carboxylasa 1* (ACACA) forma parte de las vías metabólicas relacionadas con la adipogénesis, la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo energético celular. Junto con otras enzimas, es activada por *PPARG* durante el desarrollo del tejido adiposo en bovinos (Graugnard *et al.*, 2009) y por *SREBP1* en la lipogénesis en la glándula mamaria (Bionaz y Loor, 2008). Se asocia a la cantidad de grasa en la leche caprina (Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008). La relación detectada aquí entre un polimorfismo del gen *ACACA* y la compacidad de la canal podría estar relacionada con un mayor nivel de engrasamiento de los animales homocigotos AA, si bien no se detectó una relación con el porcentaje de grasa intramuscular. Dado que las frecuencias alélicas de este SNP presentan un fuerte sesgo a favor del alelo G, es posible que la asociación detectada sea espuria. Algo similar ocurre con el polimorfismo analizado del gen *GLUT4*. El transportador de glucosa dependiente de insulina *GLUT4* pertenece a la familia de proteínas transportadoras de glucosa y se encuentra exclusivamente en el músculo (especialmente el músculo oxidativo) y en el tejido adiposo. Está regulado por la insulina y por *PPARG*, y juega un papel muy importante en el metabolismo energético de los adipocitos (Hocquette *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 1997; Fernyhough *et al.*, 2007). El gen *GLUT4* ha sido propuesto como candidato para mejorar aspectos relacionados con la calidad de la canal bovina y porcina (Fernyhough *et al.*, 2007), por lo que una posible relación con el índice de compacidad resulta interesante. Sin embargo, al igual que *ACACA*, presenta un fuerte sesgo a favor del alelo G, por lo que es muy probable que la asociación no sea real.

El gen *SCAP* codifica una proteína chaperona de *SREBP1*, una proteína de unión reguladora de esteroides que es clave en la síntesis de lípidos y ácidos grasos en la glándula mamaria y en el tejido adiposo. La proteína *SCAP* activa a *SREBP1* mediante su transporte al aparato de Golgi y posterior clivaje, luego del cual *SREBP1* migra al núcleo celular y activa una cascada de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como *G6PD*, *ACACA*, *FASN* y *SCD*, entre

otros. Existe una fuerte interacción entre *SREBP1* y *PPARG*, y ambos, al igual que *SCAP*, afectan el perfil de ácidos grasos y el contenido lipídico de la leche y el músculo bovino (Bionaz y Loor, 2008; Graugnard *et al.*, 2009). También es considerado un gen candidato para mejorar la calidad del jamón porcino mediante MAS (Renaville *et al.*, 2010). Por esta razón, la posible relación detectada entre *SCAP* y ω 22.4n6 tendría sustento biológico y sería de interés continuar con su estudio.

La proteína transmembrana inductora de depósitos de grasa FIT1 pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas, localizadas en el retículo endoplasmático e involucradas en la formación de gotas lipídicas y acumulación de triglicéridos en las células. En cultivos celulares de adipocitos, su silenciamiento impide la formación de gotas lipídicas, y en ratones se ha detectado un genotipo mutante que aumenta la acción de FIT2, incrementando la cantidad y tamaño de las gotas lipídicas acumuladas (Kadereit *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2010). Se trata, por lo tanto, de un muy buen gen candidato en relación a la cantidad de grasa de la canal e intramuscular en bovinos, y su posible relación con éstas características y el perfil de ácidos grasos merece un análisis más exhaustivo.

La proteína transportadora *ATP-binding cassette A1* (*ABCA1*) es conocida por el importante papel que cumple en el transporte de fosfolípidos de membrana y colesterol en humanos. Su actividad ha sido demostrada también en la glándula mamaria bovina, especialmente al final del período de lactancia y durante el período seco, en la cual aumentan sus niveles de expresión y se asocia a la membrana de los glóbulos grasos de la leche (Farke *et al.*, 2006; Farke *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2011). Su actividad también fue detectada en el músculo bovino, por lo que se reconoce a *ABCA1* como gen candidato para la homeostasis y el metabolismo lipídico en bovinos (Farke *et al.*, 2006). El hallazgo en el presente trabajo de una posible asociación entre el SNP estudiado de *ABCA1* y la cantidad de ω 9c18:1 podría estar relacionado a ello, y constituye un indicio de su posible relación con la composición lipídica de la carne.

Las caveolinas son un componente crucial de las caveolas, invaginaciones de la membrana plasmática y de las membranas de los compartimientos intracelulares, especialmente del aparato de Golgi y los cuerpos lipídicos, implicadas en el tráfico de moléculas, la regulación de los canales iónicos y la transducción de señales. El componente principal de la estructura de las caveolas en el músculo esquelético es la caveolina 3 (*CAV3*). En humanos y ratones se detectaron varias mutaciones en el gen *CAV3* asociadas a distintos tipos de distrofias musculares (Pol *et al.*, 2005; Gazzerri *et al.*, 2011). Una de sus funciones más importantes se relaciona con el

transporte de lípidos hacia dentro de la célula, principalmente ácidos grasos y colesterol, promoviendo la generación de triglicéridos (Maxwell *et al.*, 2005; Pol *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2010). En el presente trabajo se detectó una débil asociación entre el polimorfismo estudiado del gen CAV3 bovino y la relación entre ácidos grasos poli-insaturados $\omega 6$ y $\omega 3$. Este hallazgo bien podría estar relacionado con la actividad transportadora de CAV3, en la cual los animales homocigotos CC incorporarían más $\omega 6$ a las células, aumentando la relación $\omega 6/\omega 3$. En experimentos con roedores se encontró que la expresión de CAV3 está modulada precisamente por la presencia de este tipo de ácidos grasos (Bousserouel *et al.*, 2004; Ficcardi *et al.*, 2010), lo que explicaría dicha asociación. El estudio más exhaustivo de la relación entre las caveolinas, principalmente CAV3, y la calidad de la carne bovina podría generar hallazgos muy interesantes.

Varios de los SNPs analizados corresponden a los detectados mediante resecuenciación de genes candidatos en el proyecto GeMQual, los cuales se considera probable que presenten efectos medibles en la calidad de la carne y la canal (Williams *et al.*, 2009). Entre ellos se encuentran *SUSP1* (*Sentrin-specific protease 6*, también conocido como *SENP6*), *ALDH2* (*aldehído deshidrogenasa 2*), *MMP1* (*Matrix metalloproteinase-1*) y *ME3* (*Malic enzyme 3*).

SUSP1 codifica una proteasa integrante del sistema SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*), responsable de la modificación y degradación de una gran variedad de proteínas celulares. También actúa como factor de transcripción, interviene en la estabilidad de las proteínas y en la respuesta celular al estrés (Yeh *et al.*, 2000). Su relación con el metabolismo lipídico no es clara, por lo que su posible relación con el contenido de ácidos grasos aquí detectada deberá ser analizada en mayor profundidad. La enzima *aldehído deshidrogenasa 2* convierte al acetaldehído en acetato. Se asocia con el metabolismo del alcohol en humanos y los efectos de ciertas mutaciones en el gen que la codifica sobre la intolerancia al alcohol son conocidos. Además de dicha función, está involucrada en el metabolismo de otros aldehídos generados en el organismo, por ejemplo durante la transformación de lípidos, aminoácidos y otros metabolitos. Se ha demostrado que ALDH2 afecta los niveles de colesterol en humanos, más precisamente de la lipoproteína de alta densidad (HDL; Wada *et al.*, 2008). Su relación con el contenido de ciertos ácidos grasos detectada en el presente trabajo podría estar relacionada con esta función.

Por otro lado, la enzima MMP1 degrada las moléculas de colágeno tipo 1 (colagenólisis), estando implicada en la remodelación normal de los tejidos, así como en patologías asociadas a modificaciones anormales de la matriz extracelular (Lauer-Fields *et al.*, 2002). Se esperaba hallar el gen que la codifica asociado al

crecimiento y desarrollo muscular o a textura y terniza de la carne. Sin embargo, sólo se detectó una débil asociación con ciertos ácidos grasos. Al igual que para *SUSP1*, y dado que existen dudas acerca de la asignación de los genotipos para este marcador, no puede descartarse que se trate de asociaciones espurias. Por último, la ME3 es una enzima mitocondrial dependiente de NADP, de acción conocida en el metabolismo lipídico. Forma parte de las enzimas lipogénicas generadoras de ácidos grasos, por lo que su posible relación con un aumento de las cantidades porcentuales de ácido vaccénico tendría sustento biológico. Se la ha hallado asociada a vías metabólicas determinantes de la cantidad de grasa bovina, tanto subcutánea como intramuscular, al desarrollo de adipocitos en fetos bovinos, a las pérdidas por cocción, al pH de la carne y al área de la chuleta (Bonnet *et al.*, 2007; Taga *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

Ninguno de los genes y polimorfismos mencionados en esta sección tuvieron efectos significativos sobre los caracteres analizados, y los efectos cercanos al umbral de significación detectados son pequeños o moderados. Debido a que la validez biológica de algunas de estas asociaciones es cuestionable, deben ser tomadas con cautela. Otros, por el contrario, poseen una buena sustentación en cuanto a su relación con el carácter al cual se hallaron asociados y la profundización en su estudio podría arrojar resultados provechosos. En todo caso, se trata de caminos posibles de ser transitados en la búsqueda de genes asociados a la calidad de la carne y la canal bovinas.

Efectos detectados y su aplicabilidad en MAS

En casi todos los casos presentados aquí, a excepción de los efectos detectados del SNP *GDF8* sobre ciertos parámetros de la calidad de la canal y el contenido de colágeno en la carne, los efectos estimados de los genes son pequeños. Esta suele ser la regla en la bibliografía consultada, habiendo muy pocos casos en los que un solo gen explica un porcentaje elevado de la varianza de una característica productiva (Dekkers, 2004; Ron y Weller, 2007; Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008; Simm *et al.*, 2009). Ello se debe principalmente al hecho de que son características fenotípicas complejas, en las que están involucrados muchos genes.

Los caracteres relacionados con la calidad de la carne, el crecimiento y el desarrollo muscular no son excepciones a esta regla. En su estudio con *microarrays* de expresión génica en bovinos Charolais, Bertrand y colaboradores (2007) identificaron 615 genes con expresión diferencial en la carne de animales

divergentes para terneza de la carne, 1005 genes que diferían en su expresión en relación a la jugosidad, y 799 genes que presentaban diferencias significativas de expresión al comparar las carnes más sabrosas con las menos sabrosas. Estos genes se encontraban involucrados en rutas metabólicas y procesos biológicos muy diversos, como el metabolismo de lípidos y proteínas, procesamiento de ácidos nucleicos y transducción de señales. Los autores concluyeron que la calidad sensorial de la carne no depende de una vía o proceso determinado, sino que cada característica es el resultado de una combinación de diferentes procesos biológicos. Por ejemplo, y más allá de factores tecnológicos o de manejo *pre* y *post* faena, la terneza de la carne no dependería solamente de la actividad proteolítica de las calpaínas, sino también de la cantidad de tejido conectivo, la cantidad relativa de los diferentes tipos de fibras musculares y la cantidad y composición de la grasa intramuscular no visible. Esto podría explicar el hecho de que no se haya detectado ninguna asociación entre los polimorfismos del gen *CAPN1* y la terneza de la carne, aunque uno de dichos polimorfismos sí afectó la actividad de la enzima.

Además del gran número de genes, existen otros factores genéticos que inciden en los parámetros de calidad de la carne y que afectarían una posible aplicación de MAS. No es suficiente sólo con determinar los genes involucrados, sino que además muchas características varían de una raza a otra según se puede ver en las diferencias en los niveles de expresión de dichos genes. Un mismo gen puede expresarse de forma diferente en razas distintas debido a que el contexto genómico de los individuos no es el mismo, dependiendo de los procesos evolutivos (entre ellos, los selectivos) a los que hayan sido sometidas. Las diferencias en las frecuencias alélicas observadas entre las razas para ciertos SNPs comentadas anteriormente, como en *GDF8*, *DGAT1*, *POMC* y *CAST*, bien pueden ser reflejo de procesos selectivos tendientes a mejorar determinados parámetros productivos. Los fenómenos epigenéticos, además, generan cambios a nivel fenotípico en ausencia de mutaciones en el ADN y pueden ser transmitidos de una generación a otra. Por lo tanto, además de los alelos presentes, las interacciones entre los genes, la existencia de ARNs no codificantes y los procesos epigenéticos forman parte del contexto genómico, todo lo cual cumpliría funciones aún no determinadas en la regulación de la expresión génica del músculo bovino (Lehnert *et al.*, 2007; Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008).

Los análisis de asociación genotipo-fenotipo, como el presentado en este trabajo, así como los estudios comparativos de transcriptómica y expresión génica, contribuyen a la disección de los QTL relacionados con características productivas complejas. La identificación de los genes y las variantes alélicas subyacentes

permite una mejor comprensión de las bases genéticas de las vías metabólicas y mecanismos fisiológicos que afectan a parámetros económicamente importantes, como las variables de calidad de la carne, y provee las bases moleculares para poder efectuar selección asistida por marcadores (Weikard *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2009). El presente trabajo coincide con estudios anteriores y contribuye a sustentar la hipótesis de que los genes *PPARG*, *PPARGC1A*, *SCD*, *LEP*, *GDF8*, *HSPB1*, *CRH* y *CFL1* están involucrados en la cantidad y composición lipídica de la grasa intramuscular; de que la cantidad de colágeno en la carne se ve afectada por el gen de la miostatina y es probable que dependa de varios otros, como *PCSK1*; y de que genes relacionados con el metabolismo lipídico, como *PPARGC1A*, inciden en el rendimiento de la canal. También subraya el hecho de que el gen de la miostatina tiene efectos pleiotrópicos, al afectar características muy diversas.

De los efectos observados aquí, los mejores SNPs candidatos a ser utilizados en MAS serían *GDF8* (ampliamente reconocido y utilizado, dependiendo de la raza y el sistema productivo), *LEP* (por su aparente relación con el contenido de ácido linoleico conjugado de la carne) y *CYP1A1* (si se confirma su asociación con la jugosidad de la carne, atributo muy complejo y difícil de seleccionar). Estos tres marcadores generan efectos mayores o iguales a una desviación típica de magnitud. Por otro lado, parece claro que la mayoría de los genes relacionados con el metabolismo lipídico y al perfil de ácidos grasos, como *SCD*, *PPARG* y *PPARGC1A*, generan efectos pequeños o moderados en el fenotipo, por lo que para lograr variaciones importantes en estas características se deberían tomar en conjunto.

De todas formas, previo a su aplicación en un programa de mejora genética que incluya marcadores moleculares, es necesario validar los efectos de los SNPs en poblaciones independientes de la cual fueron detectados dichos efectos (Dekkers, 2004; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Ron y Weller, 2007; Johnston y Graser, 2010). En la bibliografía citada existen numerosos ejemplos de SNPs que no presentan los efectos previstos cuando son analizados en otras poblaciones, ya sea porque sus efectos no son significativos o porque presentan efectos opuestos (por ejemplo, el caso ya mencionado del SNP *LEP* en Lagonigro *et al.*, 2003 *versus* Schenkel *et al.*, 2005; o los hallazgos contradictorios en la relación de *PPARGC1A* y los lípidos de la leche informados por Weikard *et al.*, 2005, y Khatib *et al.*, 2008). Por lo tanto, todos los SNPs descritos en el presente trabajo que generaron efectos significativos en el fenotipo deberán pasar por esa etapa antes de pensar en su posible aplicación práctica. Los resultados comentados aquí son asociaciones estadísticas cuya validez biológica deberá ser probada en estudios posteriores, y

que aportan evidencias que pueden conducir a lograr comprender mejor la arquitectura genético-molecular de estos caracteres complejos.

Un aspecto destacable del proyecto GeMQual y la base de datos fenotípicos generada es que incluye animales de un número elevado de razas de carne de diferentes países, lo que permite avanzar más que los estudios que sólo se basan en una raza o en un cruce entre dos razas.

Como se dijo en la introducción, MAS es especialmente útil para características de difícil medición, como por ejemplo las relacionadas con la calidad de la carne, las cuales deben ser evaluadas después de la muerte del animal y cuyo análisis suele ser costoso (Dekkers, 2004; Simm *et al.*, 2009). Esto último es especialmente válido para el perfil de ácidos grasos, característica de gran importancia para la nutrición y salud humana pero muy onerosa y difícil de medir, que además afecta el sabor y el aroma de la carne (Bernard *et al.*, 2007). Los efectos detectados en el presente trabajo de los polimorfismos relacionados con la cantidad neta y porcentual de diferentes ácidos grasos presentes en el músculo bovino podrían ser de interés como punto de inicio de estudios futuros. El conocimiento detallado de los genes involucrados en los procesos bioquímicos que determinan diferencias apreciables en la composición lipídica de la carne, como por ejemplo las variantes genéticas que afectan a la actividad de las elongasas o de las desaturasas, permitirá nuevas posibilidades de mejora genética asistida por marcadores en el futuro, como la incorporación de determinados ácidos grasos en este alimento (Laborde *et al.*, 2001; de Smet *et al.*, 2004).

Los estudios de expresión génica y los que identifican las conexiones entre los genes involucrados indican que las medidas de la canal, la eficiencia alimentaria y la composición de ácidos grasos de la carne no comparten la mayoría de los genes, sino que cada una depende de grupos de genes diferentes (Jiang *et al.*, 2009). Esto permitiría la selección de una variable sin interferir con el proceso selectivo de otra, aumentando las posibilidades de la MAS. De todas formas, la viabilidad y aplicabilidad de MAS dependerá en última instancia de que el consumidor pague por productos de calidad diferenciada, por ejemplo carne con cierto grado de ternura garantizado, de forma que sea beneficioso para el productor invertir en MAS. Estudios de mercado confirman que los consumidores estarían dispuestos a pagar más por un producto de tales características (Morris *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009; Simm *et al.*, 2009; Van Eenennaam *et al.*, 2011).

Los mayores logros en el uso de marcadores moleculares en producción animal se obtienen cuando se identifica la mutación causal del QTL (denominada también *Quantitative Trait Nucleotide*, o *QTN*). Lograr identificarla no es sencillo e

implica obtener pruebas provenientes de varias fuentes, entre ellas los análisis de asociación como el presentado en esta tesis. De los polimorfismos analizados aquí, muy pocos han probado ser el QTN causal de la variación fenotípica, como lo son la delección de 11 pares de bases del gen de la miostatina (*GDF8*) y la sustitución de lisina por alanina en el gen *DGAT1* (*DGAT1 g.6829 AbG*; Ron y Weller, 2007). Otros varios, como los SNP estudiados de los genes *SCD* y *CAPN1*, se encuentran en proceso de validación.

Una vez identificada, los resultados de su aplicación en MAS dependerán de la precisión con que hayan sido estimados sus efectos, de la magnitud de dicho efecto, así como del coste de genotipado (Dekker, 2004; Ron y Weller, 2007; Simm *et al.*, 2009). Las simulaciones de MAS a largo plazo demuestran que el aumento en la respuesta a la selección provocado por el uso de marcadores disminuye a medida que transcurren las generaciones, debido a la disminución en la varianza del QTL que se genera por el aumento de la frecuencia del alelo favorable, que en última instancia quedaría fijado (Mewissen y Goddard, 1996). La naturaleza poligénica de las características a seleccionar podría comprometer el progreso genético de un proceso que utilice MAS, ya que ésta implica centrarse en uno o pocos marcadores. Debido a esto, se aconseja el uso de MAS como complemento de un esquema de selección basado en evaluaciones fenotípicas (Dekker, 2004; Simm *et al.*, 2009).

En ocasiones ocurre que la acción genética de la mutación causal no sigue un patrón mendeliano, por ejemplo, cuando su efecto depende de si el alelo favorable fue heredado del padre o de la madre (Freking *et al.*, 2002; Goodall y Schmutz, 2007). En esos casos se requieren planes de cruzamientos especialmente diseñados para optimizar los efectos del QTN. Un problema similar ocurre cuando existen relaciones complejas entre los alelos, como la sobredominancia, o interacciones de tipo epistáticas entre los genes involucrados (Balding, 2006). En el presente trabajo se asumieron efectos aditivos para todos los marcadores, pero la existencia de fenómenos tales como la impronta o la epístasis no pueden descartarse y deberán ser investigados.

Varios estudios demuestran la utilidad de MAS en la mejora de características productivas, por ejemplo en el aumento de la concentración de determinadas proteínas de la leche bovina (Heck *et al.*, 2009), en el control de enfermedades hereditarias en bovinos (Nagahata, 2004; Schutz *et al.*, 2008), en el aumento de la fertilidad en ovinos y en el control del síndrome de estrés porcino (Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008).

Estudios futuros y perspectivas

Los resultados de la presente tesis y la bibliografía consultada demuestran la validez de la **estrategia de genes candidatos** en el proceso de descubrir los genes que subyacen a los caracteres fenotípicos complejos y de evaluar sus efectos individuales. También confirman que los efectos de cada SNP particular suelen ser pequeños, por lo que en su aplicación potencial en MAS deberían tomarse en conjunto, sobre todo para caracteres tales como el perfil de ácidos grasos y otros aspectos del metabolismo de los lípidos.

Dentro de esta estrategia, además del análisis de SNPs individuales efectuado en la presente tesis, otra posibilidad no explorada aquí es estudiar grupos de SNPs ligados (haplotipos) en regiones cromosómicas de interés, por ejemplo, varios SNPs dentro de un mismo gen. Los **análisis de haplotipos** permiten detectar posibles efectos fenotípicos con un poder estadístico mayor, dado que se evalúan los efectos de una región cromosómica más grande y no sólo de un nucleótido puntual. Como se mencionó en la introducción de esta tesis, MAS puede aplicarse utilizando directamente la mutación causal del QTL (*Gene-MAS* o GAS, por *Gene Assisted Selection*), o cuando ésta mutación es desconocida, otro SNP cercano y conocido en desequilibrio de ligamiento con la verdadera mutación causal (LD-MAS). En este último caso, es más probable captar el efecto del QTL con un conjunto de SNPs ligados (haplotipo) que con un solo SNP. Además, como la mutación causal (QTN) estaría contenida en la región cromosómica comprendida por el haplotipo, el nivel de LD con el QTL es mayor, explicando una proporción mayor de la varianza del QTL. Las desventajas con respecto al análisis utilizando SNPs individuales radican en que es necesario inferir los haplotipos a partir de los genotipos y estimar los efectos para cada uno de los diferentes haplotipos que se encuentren en la población (Hayes, 2007). La utilización de haplotipos podría ser de gran interés en ciertos genes estudiados aquí, como por ejemplo *CAPN1*, *SCD*, *FADS1* (y el *cluster* formado con *FADS2* y *FADS3*, Schaeffer *et al.*, 2006), *OPN* y *PPARGC1A*, en los cuales se han descrito varios SNPs formando haplotipos, potencialmente capaces de afectar de forma significativa al fenotipo. El análisis de haplotipos en estos genes complementaría los resultados hallados aquí, y permitiría detectar con mayor poder algunos efectos ampliamente mencionados en la bibliografía consultada pero que no fueron detectados en este análisis, como por ejemplo la relación entre polimorfismos

de *CAPN1* y la terneza de la carne, o la relación entre el gen *SCD* y la cantidad total de ácidos grasos monoinsaturados.

El **análisis de expresión génica** es otra estrategia complementaria y de enorme potencial para la detección y caracterización de genes relacionados con características productivas y que constituye un campo muy prometedor. Hoy en día es posible obtener el transcriptoma completo de un tejido, lo que ha abierto el camino al estudio exhaustivo de la expresión diferencial de los genes en cualquier tipo histológico. El transcriptoma es el conjunto de todos los ARN mensajeros (ARNm) que se generan en un tipo celular mediante el proceso de transcripción. Su análisis permite conocer qué genes se expresan en ese tejido (entre ellos, los genes tejido-específicos), su nivel de expresión (cuánto se expresan, medido por las diferencias en las concentraciones de los distintos ARNm), detectar polimorfismos en los genes que han generado cambios en el ARNm resultante (por ejemplo, SNPs), etc. (Mortazavi *et al.*, 2008; Hestand *et al.*, 2010).

Los *microarrays* de expresión son pequeños dispositivos (o *chips*) que contienen miles de oligonucleótidos (sondas) de ADN, diseñados para hibridar con secuencias de ADNc obtenidas a partir de ARNm específicos. Si bien han sido ampliamente utilizados con buenos resultados (por ejemplo, Wang *et al.*, 2005; Cassar-Malek *et al.*, 2009; Sadkowsky *et al.*, 2009), la tecnología del *RNA-Seq*, de reciente aparición, es más atractiva. Con un coste similar, permite obtener el transcriptoma completo y no limita el estudio a las sondas presentes en el *chip*, permitiendo un análisis sumamente exhaustivo. Además, no sólo detecta qué genes se están expresando, sino en qué proporción, ya que permite medir diferencias sutiles en las cantidades relativas de los distintos ARNm (Mortazavi *et al.*, 2008; Sadkowsky *et al.*, 2009). Varios estudios mencionados en la presente tesis han revelado resultados sumamente interesantes en este campo, la mayoría utilizando *microarrays* de ADNc y los más recientes utilizando la tecnología del *RNA-Seq*. Mediante estas técnicas es posible comparar el transcriptoma del músculo en individuos criados bajo las mismas condiciones pero con fenotipos opuestos (por ejemplo, para parámetros de calidad de la carne; Wang *et al.*, 2005 y 2009^b; Bernard *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008), en distintos tipos musculares (Moreno-Sánchez *et al.*, 2010), en animales de distintas razas (Sadkowsky *et al.*, 2009), en diferentes momentos del desarrollo (Lehnert *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007) y en animales sometidos a dietas u otras formas de manejo diferentes (Graugnard *et al.*, 2009; Cassar-Malek *et al.*, 2009). De esta forma puede evaluarse la expresión de los genes y detectar cuáles son clave en la generación de dichos fenotipos. El resultado es una base de datos de genes y polimorfismos que se expresan diferencialmente

en el tejido muscular bovino, candidatos a tener un efecto apreciable en la calidad de la carne, los cuales pueden ser luego validados mediante análisis de asociación genotipo-fenotipo como el que se presenta en este trabajo.

En una muestra de animales como la estudiada aquí, sería de gran interés analizar las diferencias de expresión a nivel de tejido muscular y adiposo entre animales con especializaciones productivas diferentes, por ejemplo entre los de razas lecheras y los de razas de carne altamente seleccionadas, así como entre los animales con fenotipo “culón” y los de fenotipo normal. Una aproximación de este tipo fue llevada a cabo por Pérez y colaboradores (2010), analizando la presencia de ARN mensajeros de genes relacionados con el perfil de ácidos grasos en la sangre de los animales de razas españolas del proyecto GeMQual. Los autores observaron diferencias significativas en la expresión de ciertos genes entre los animales con alto y bajo contenido de ácidos grasos $\omega 3$ en la carne, y entre animales hipermusculados y normales. Una de los puntos a destacar del proyecto GeMQual es precisamente la inclusión de animales heterogéneos, con fenotipos contrastantes, lo que facilita la detección de asociaciones genéticas y de expresión diferencial de genes, y permitiría, si hubiese muestras de tejido debidamente conservadas, efectuar análisis de expresión tejido-específicos.

Como se mencionó anteriormente, y más allá del ambiente, el fenotipo no es el resultado solamente de las secuencias de ADN presentes en las células del organismo, sino también de su expresión. Existe evidencia de que las variantes que afectan la expresión de los genes (denominados *expression QTLs*, o “eQTLs”) juegan un importante papel en la explicación de las bases genéticas de fenotipos complejos. Éstas pueden ser mutaciones en regiones no codificantes de los genes, como por ejemplo en regiones promotoras 5' o 3', o en las denominadas “islas CpG” de los intrones, o que afectan de modo diverso a los factores de regulación de la transcripción. Varios de los SNPs analizados aquí corresponden a mutaciones en regiones reguladoras e intrónicas, como *CYP1A1*, *PPARG* y *HSPB1*, por lo que su posible papel en la regulación de la expresión del gen correspondiente no puede descartarse. La comprensión cabal de estos procesos implica una combinación de análisis genómicos (por ejemplo, secuenciación de ADN o genotipado de SNPs) con análisis en transcriptómica y proteómica (por ejemplo, perfiles de expresión). Conocer los genes implicados y su expresión permitirá entender, y eventualmente utilizar en provecho de la industria cárnica, los procesos moleculares y fisiológicos del músculo que afectan la calidad de la carne (Casas *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009).

La **secuenciación de alto rendimiento** (también denominada *Next Generation Sequencing*, o NGS), como la utilizada en el *RNA-Seq*, es una nueva y muy atractiva herramienta para análisis genómicos. Entre otras cosas, permite detectar nuevos SNPs y genotipar de forma masiva decenas de miles de SNPs para muestras muy grandes de individuos. La secuenciación del genoma bovino y el descubrimiento de SNPs en dicho genoma han permitido este genotipado a gran escala en poblaciones bovinas, con el fin de identificar genes relacionados a características económicamente importantes en sanidad, producción de carne y de leche. Los denominados **estudios de asociación de genoma completo** (*Genome-Wide Association Studies*, o GWAS) permiten efectuar análisis de asociación con características fenotípicas utilizando miles de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma, de forma similar a la búsqueda de QTLs utilizando microsatélites. Las mayores ventajas con respecto a los microsatélites radican en su facilidad de genotipado y en la gran abundancia de SNPs presentes en los genomas. Cuantos más marcadores se incluyan, más regiones genómicas estarán cubiertas, por lo que la resolución del análisis será mayor. De esta forma, los SNPs utilizados podrán ser en sí mismos la mutación causal de la variación fenotípica, o, más probablemente, estar ligados por cercanía física a la mutación causal aún desconocida. Una vez que se detecta algún SNP significativamente asociado al fenotipo, se investiga la región cromosómica en la cual se encuentra a la búsqueda del gen más probable de ser el causante de la variación fenotípica. La técnica de *Primer Extension* aplicada en este trabajo es la base de las nuevas plataformas de genotipado masivo de SNPs. Su utilidad en análisis de bajo a mediano rendimiento (menos de 100 SNPs) ha quedado demostrada en la presente tesis, donde se logró genotipar con éxito 61 SNPs presentes en 51 genes diferentes y obtener casi 25.000 genotipos.

Numerosos estudios en medicina humana avalan el gran potencial de este tipo de análisis en la detección de genes involucrados en enfermedades y características poligénicas como la diabetes (Cooper *et al.*, 2008), la obesidad (Meyre *et al.*, 2009; Thorleifsson *et al.*, 2009) y el peso corporal (Willer *et al.*, 2009), por ejemplo. En bovinos se han utilizado para analizar la base genética de características complejas (como calidad de la carne y eficiencia alimentaria; Kim *et al.*, 2011; Mujibi *et al.*, 2011), la diversidad genética y estructura poblacional de las diferentes razas y para detectar la existencia de señales de selección (Hayes *et al.*, 2008; The Bovine HapMap Consortium *et al.*, 2009).

Para la aplicación práctica de esta técnica es importante considerar el coste del genotipado (cada vez menor gracias al desarrollo de técnicas más eficientes) y el hecho de que requieren muestras muy grandes de animales. Actualmente existen

microarrays o *chips* de SNPs para desarrollar GWAS en varias especies domésticas. En el caso del bovino, el *chip* más utilizado hasta el momento es el *BovineSNP50 Bead-Chip*, de la empresa Illumina (www.illumina.com). Incluye 54.609 SNPs informativos distribuidos uniformemente cada 50 kilobases del genoma bovino. La misma empresa ha lanzado al mercado recientemente el *BovineHD BeadChip*, con 777.962 SNPs, lo que implica una resolución mucho mayor. Sería interesante aplicar esta tecnología a la muestra de animales utilizada en el presente trabajo, y comparar sus resultados con los obtenidos en esta tesis.

MAS y Selección Genómica

Así como MAS es la aplicación de la estrategia de genes candidatos en producción animal, la selección genómica es la aplicación práctica de los análisis GWAS. Se trata de una nueva forma de selección asistida por marcadores que ha abierto nuevas puertas a la mejora de características complejas. Su desarrollo se debe precisamente al avance de las tecnologías de genotipado masivo y de detección de SNPs mencionadas, así como a la secuenciación de los genomas de especies domésticas. Se basa en el uso de un panel de miles de SNPs para predecir el mérito genético de un reproductor mediante un análisis previo del efecto sobre cierta característica de interés de cada porción cromosómica (de forma similar al análisis de haplotipos mencionado), abarcando todo el genoma. Cuanto mayor sea la densidad de SNPs, mayor será la probabilidad de “capturar” todos los QTLs que contribuyen a la variación de esta característica cuantitativa, por desequilibrio de ligamiento, y por tanto mayor será la precisión de la estimación. Para cada reproductor analizado se calcula un índice global (“Valor de Cría Genómico”) mediante la suma de los efectos de cada SNP, o de cada haplotipo formado por estos marcadores. Los efectos sobre los QTLs, inferidos a partir de los SNPs individuales o de los haplotipos, se estiman en primer lugar en una población de referencia que cuente con información fenotípica. En subsiguientes generaciones, para estimar el Valor de Cría Genómico sólo será necesario genotipar a los candidatos a selección (Mewissen *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2009; Garrick, 2011).

El concepto central que sustenta la selección genómica es que, dado que los caracteres cuantitativos dependen de muchos genes y que los efectos de cada QTL individual sobre estas características complejas son muy pequeños, se requiere de un gran número de QTLs para explicar su variación genética. Este hecho se observa claramente en los resultados obtenidos en la presente tesis, en los que sólo dos

marcadores (*GDF8* y *LEP*) mostraron efectos moderados (iguales o mayores a una desviación típica), mientras que el resto mostraron efectos pequeños. Además, se observó una importante cantidad de SNPs que afectan el perfil de ácidos grasos, muchos de los cuales tienen efectos contrapuestos y por lo tanto deberían considerarse en conjunto a la hora de su posible aplicación práctica. Como se mencionó anteriormente, el uso de un número reducido de marcadores explica los resultados modestos de la MAS, ya que ésta se limita a pocos QTLs y lo deseable sería que se utilizaran la mayor cantidad posible de los QTLs involucrados. Por lo tanto, un sistema que incluya una cantidad suficiente de marcadores como para abarcar el genoma completo tendría más probabilidad de detectar los efectos de todos los QTLs (Mewissen *et al.*, 2001; Hayes y Goddard, 2010).

Es necesario destacar que el ideal en MAS es detectar y utilizar SNPs que efectivamente sean la mutación causal de la variación fenotípica (o QTNs), seleccionados mediante la estrategia de genes candidatos, mientras que en selección genómica se utilizan miles de SNPs espaciados a distancias similares a lo largo de los cromosomas, sin importar si puedan ser o no verdaderos QTNs. Por este motivo la aplicación de selección genómica depende de la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs utilizados y las mutaciones causales desconocidas.

Si bien aún es pronto para sacar conclusiones, la aplicación de la selección genómica parece ser prometedora en producción de leche (Hayes *et al.*, 2009; König *et al.*, 2009), en producción avícola (Recio *et al.*, 2009) y en producción porcina (Lillehammer *et al.*, 2011), principalmente por la reducción sustancial del intervalo generacional. En consumo residual de alimento en bovinos, sin embargo, las pruebas hasta el momento no han sido satisfactorias e indican un pobre desempeño de la selección genómica, que daría estimaciones con una precisión significativamente menor que las calculadas con métodos convencionales basados en mediciones fenotípicas (Mujibi *et al.*, 2011^b).

Debido al sistema de producción y al uso habitual de la inseminación artificial en ganado de leche, los toros de razas lecheras usualmente poseen una progenie mucho mayor que los toros de razas carniceras, permitiendo una mejor estimación de su mérito genético mediante técnicas genómicas. Por este motivo, sumado al hecho de que las poblaciones de ganado de carne son más diversas en cuanto a razas e incluso especies (*Bos taurus* y *Bos indicus*), la selección genómica en ganado de carne ha tenido un desarrollo menor. Sin embargo, en Aberdeen Angus de Estados Unidos, varias empresas comerciales en asociación con organismos del estado y agrupaciones de criadores han desarrollado paneles de SNPs para

selección genómica en características relacionadas con la calidad de la carne (como contenido de minerales y ciertos ácidos grasos) y salud. Además, demostraron que un gran porcentaje de la variabilidad fenotípica de varios parámetros de calidad de la carne y la canal puede ser explicada por los SNPs del panel 50k (40-50% para peso de canal caliente, grado de veteado y espesor de grasa subcutánea, y 30% para rendimiento, área de la chuleta y terneza; Garrick, 2011).

Como se mencionó anteriormente, y a diferencia de MAS, la selección genómica no requiere del conocimiento previo de los genes involucrados en la característica de interés. Sin embargo, tiene otras necesidades que dificultan su aplicación práctica. Por un lado, la capacidad de predicción del Valor de Cría Genómico se verá influenciada por la heredabilidad de la característica, el tamaño efectivo poblacional y la cantidad de animales utilizados para la estimación de los efectos (población de referencia), cantidad que a su vez dependerá del grado de desequilibrio de ligamiento existente en la raza o población en la que se aplicará. Relacionado con esto, el coste de la obtención de las medidas fenotípicas y de los genotipos puede ser muy alto en el caso de que sea necesario muestrear miles de animales, hasta el punto de que pueda llegar a no ser económicamente rentable su aplicación. Otro problema es la necesidad de recalcular periódicamente los efectos de los SNPs debido a la pérdida de desequilibrio de ligamiento a medida que transcurren las generaciones, así como la necesidad de validar dichos efectos en cada raza o cruce en los que se quiera aplicar, dado que las diferentes razas pueden presentar diferencias en los QTLs, en las relaciones entre alelos (dominancia, epístasis, etc.), en las frecuencias alélicas y en el grado de desequilibrio de ligamiento (Mewissen *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2009; König *et al.*, 2009; Garrick, 2011).

La gran mayoría de los SNPs analizados en selección genómica no tendrán ningún efecto sobre la característica fenotípica que se desea mejorar, ya que sólo una muy pequeña proporción de ellos se encontrarán en genes o regiones reguladoras asociadas (Hayes y Goddard, 2010). Por ello, el alto costo asociado al genotipado de miles de SNPs para miles de animales puede ser un serio inconveniente para la aplicación práctica de la selección genómica en muchos países. Una posible solución a este problema son los paneles reducidos de SNPs, en los cuales sólo se incluyen los marcadores más fuertemente asociados a la característica que se desea mejorar. El conocimiento preciso de cuáles genes tienen un efecto apreciable sobre cierta característica, el análisis de SNPs dentro de estos genes y los estudios de expresión génica permitirán enfocarse en ciertas regiones genómicas, disminuir el número de marcadores a genotipar y diseñar paneles de

SNPs más ajustados al sistema productivo en cuestión, disminuyendo los costes y aumentando la precisión y eficacia de la selección utilizando marcadores moleculares (Jiang *et al.*, 2009; Garrick, 2011; Van Eenennaam *et al.*, 2011). Por este motivo, la estrategia de genes candidatos no debería dejarse de lado. El análisis presentado en esta tesis y la bibliografía consultada demuestran que es una estrategia válida en la realización de este objetivo. Todo parece indicar que MAS, por lo menos para genes mayores, no será totalmente sustituida por los estudios GWAS y la selección genómica, sino que muy probablemente coexistan y se complementen mutuamente, aumentando el conocimiento sobre la arquitectura genética de las características complejas y la relevancia de la genómica en la ganadería moderna (Hocquette *et al.*, 2007; Neuner *et al.*, 2009).

Consideraciones finales

Si bien la productividad del ganado se ha incrementado de forma espectacular gracias a los métodos convencionales de mejora genética, la precisión y, sobre todo, la velocidad de este proceso podrían ser aumentadas en gran medida mediante el uso de marcadores moleculares en la toma de decisiones de selección, en todas sus variantes. Además, permitiría la mejora de características complejas que no se suelen evaluar en los programas de selección convencionales. Varios problemas enfrentados por la industria de la carne bovina, como por ejemplo inconsistencias en la calidad del producto (mayormente relacionados con la terneza), o la percepción de que puede generar problemas en la salud debido a su elevada proporción de grasas saturadas, podrían ser atenuados utilizando herramientas moleculares de selección (Laborde *et al.*, 2001; Grisart *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2009). De todas formas, actualmente se utilizan estas herramientas sin abandonar totalmente los métodos tradicionales, entendiendo que MAS o la selección genómica son, por el momento, solamente un componente más del programa de selección genética aplicado y no sustituyen a la selección fenotípica (Ibehaga-Awemu *et al.*, 2008; Simm *et al.*, 2009).

Al igual que otras industrias agropecuarias, la industria de la carne está atravesando actualmente una época de grandes cambios, pasando de un sistema de bajos costes y productos poco diferenciados a un sistema basado en el valor añadido y la calidad diferencial de los productos. Estos cambios han forzado a todos los actores de la cadena cárnica a valorar y generar cada vez más información: datos de calidad de la carne y la canal, datos de DEPs y datos de marcadores

moleculares. Si bien las tecnologías basadas en el ADN requieren información más compleja y más costosa de obtener, añaden la posibilidad de explotar directamente los efectos de los genes y beneficiar a toda la cadena productiva, incluido el consumidor.

CONCLUSIONES

Los métodos de genotipado utilizados demostraron ser útiles y precisos a la hora de determinar los genotipos de los animales para todos los marcadores analizados. La técnica de *Multiplex-Primer Extension* resultó eficaz, en particular porque posibilita el genotipado simultáneo de un conjunto de SNPs.

La lista de SNPs analizados constituyó una buena muestra de marcadores presentes en genes relacionados con caracteres de calidad de la carne y la canal, algunos de los cuales habían sido previamente confirmados en la bibliografía consultada.

La muestra de animales resultó adecuada en términos generales, si bien un número mayor de animales por raza hubiera aportado un mayor poder estadístico para detectar los efectos de los SNPs en los caracteres fenotípicos. Las diferencias en los resultados entre las muestras con y sin las razas británicas pueden deberse a las diferencias de muestreo entre ambos grupos de razas, a las diferencias propias entre razas continentales y británicas, o al aumento de la variación en los caracteres fenotípicos generado al incluir más razas en el análisis.

Como consecuencia de diferencias en el historial genético de las razas incluidas en el análisis se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas, índices de diversidad genética, y la situación de equilibrio Hardy-Weinberg.

Los genes asociados significativamente a caracteres de calidad de la canal fueron GDF8 (porcentaje de músculo, área de la chuleta, rendimiento y compacidad) y HSPB1 (pH), siendo esperables los resultados en el primer caso. Los genes PPARGC1A, PLOD3, ACACA y GLUT4 mostraron efectos no significativos pero sugerentes sobre este tipo de caracteres.

La cantidad de colágeno en la carne se halló significativamente asociada a los genotipos de GDF8 y PCSK1, lo cual confirma estudios anteriores y muestra para este carácter un efecto de interacción entre diferentes genes.

Uno de los polimorfismos analizados del gen de la u-calpaína (CAPN1) se asoció de forma significativa con la actividad de dicha enzima, aunque no se detectó asociación con ninguna de las medidas de terneza de la carne, lo que pone en evidencia la importancia de la validación de los marcadores previo a la implementación de MAS.

El SNP analizado del gen CYP1A1 se halló asociado con la jugosidad de la carne, lo que constituye un resultado novedoso que ameritaría un estudio más profundo, dado que se trata de un carácter muy difícil de seleccionar por métodos convencionales.

Se detectaron asociaciones significativas entre los genes LEP, SCD, PPARG, PPARGC1A, HSPB1 y CFL1 y la cantidad neta y porcentual de varios ácidos grasos, algunos de gran importancia para la salud humana. Además, se hallaron asociaciones cercanas al nivel de significación para estas características entre los polimorfismos analizados de los genes CRH, FADS1, GDF8, PLOD3, SUSP1, FIT2, ALDH2, MMP1, ABCA1, ME3, SCAP y CAV3, lo que muestra que el perfil de ácidos grasos de la carne es el resultado de interacciones complejas entre varios genes.

Los efectos detectados son entre moderados y pequeños, coincidiendo con la bibliografía en cuanto a que los caracteres del tipo de los estudiados son fruto de la interacción entre varios genes, cada uno aportando un efecto pequeño al fenotipo.

A excepción de GDF8, cuyos efectos han sido ampliamente corroborados, La posible aplicación en MAS de los SNPs descritos en el presente trabajo dependerá de la confirmación de los efectos detectados en estudios independientes y de su validación en otras razas y sistemas productivos.

La estrategia de genes candidatos ha demostrado ser útil en el presente trabajo, contribuyendo a la elucidación de la arquitectura genética de los caracteres estudiados. Conocer los genes responsables de las características de importancia económica contribuye en gran medida a comprender los procesos biológicos involucrados y a su mejora genética.

CONCLUSIONS

Both genotyping methods proved to be useful and accurate in determining the genotypes for all the markers analyzed. Multiplex-Primer Extension technique was efficient, particularly because it allowed simultaneous genotyping of several SNPs.

The SNPs analyzed were a good sample of markers present in genes related to meat and carcass quality, as showed by the literature cited, by previous studies and by the great variety of effects that were detected.

The sample of animals was adequate in general terms, although a higher number of animals per breed would have given a higher statistical power to detect SNP effects. The differences observed between the samples including and excluding British breeds may be due to sampling differences between both groups of breeds, to intrinsic differences between British and continental breeds, or to the increase in trait variation generated when more breeds are included in the analysis.

As a consequence of differences in the genetic history of the breeds included in the analysis, differences were found in allelic and genotypic frequencies, genetic diversity indexes, and Hardy-Weinberg equilibrium situation.

Genes showing significant associations with meat and carcass traits were *GDF8* (muscle percentage, rib area, dressing percentage and blockiness) and *HSPB1* (pH). Such results were expected for *GDF8*. Genes *PPARGC1A*, *PLOD3*, *ACACA* and *GLUT4* showed near significance effects that suggest a possible relationship with these traits.

Meat collagen content was significantly associated to *GDF8* and *PCSK1* genes, confirming previous studies and showing that this trait is influenced by the interaction of different genes.

One of the studied SNPs of u-calpain gene (*CAPN1*) showed a significant association with the activity of this enzyme, although no association was detected with any of the meat tenderness measures, what highlights the importance of marker validation before Marker Assisted Selection (MAS) implementation.

The SNP of gene *CYP1A1* showed a significant association with meat juiciness, a novel result that deserves a more thorough study, as it is a very difficult trait to select with conventional breeding methods.

Significant associations were detected between *LEP*, *SCD*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *HSPB1* and *CFL1* genes and net content and percentage of several fatty acids, some very important for human health. Moreover, other SNPs in genes *CRH*, *FADS1*, *GDF8*, *PLOD3*, *SUSP1*, *FIT2*, *ALDH2*, *MMP1*, *ABCA1*, *ME3*, *SCAP* and *CAV3* showed near significance results for these traits, showing that meat fatty acid profiles are the result of complex interactions of several genes.

Detected effects were low to moderate, in agreement with the literature cited, as traits like the ones studied in this work are polygenic, each gene adding a small effect to the phenotypic outcome.

With the exception of *GDF8*, with effects widely confirmed, the possible application in MAS of the SNPs described here will depend on the confirmation of the detected effects in independent studies and on their validation in other breeds and production systems.

Candidate gene strategy has proven to be useful in the present study, contributing to the elucidation of the genetic architecture that underlies the analyzed traits. Knowledge of the genes responsible for economically important traits contributes to understand the biological processes involved and to their genetic improvement.

BIBLIOGRAFÍA

Aaslyng MD (2009). Trends in meat consumption and the need for fresh meat and meat products of improved quality. In: Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat. J.P. Kerry & D. Ledward Eds., Woodhead Publishing Ltd., Reino Unido. Pp. 3-18.

Abe H, Morimatsu M, Nikami H, Miyashige T, Saito M (1997). Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *J Anim Sci* 75(1):182-188.

Albertí P, Panea B, Sañudo C, Olleta JL, Ripoll G, Ertbjerg P, Christensen M, Gigli S, Failla S, Concetti S, Hocquette JF, Jailler R, Rudel S, Renand G, Nute GR, Richardson RI, Williams JL (2008). Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Liv Sci* 114: 19–30.

Alexander LJ, Kuehn LA, Smith TPL, Matukumalli LK, Mote B, Koltjes JE, Reecy J, Geary TW, Rule DC, MacNeil MD (2009). A Limousin specific myostatin allele affects *longissimus muscle* area and fatty acid profiles in a Wagyu-Limousin F 2 population. *J Anim Sci* 87:1576-1581.

Bae JA, Park HJ, Seo YM, Roh J, Hsueh AJ, Chun SY (2008). Hormonal regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 expression during ovarian follicle development in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 289(1-2):29-37.

Balding DJ (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews (Genetics)* 7: 781-791

Bamburg JR, Bernstein BW (2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep* 2:62.

Barendse W, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S, Donaldson N (2004). The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust J Exp Agr* 44: 669-674.

Barreiro M (2005). El mercado de la carne desde el punto de vista del consumidor. *XXI curso de especialización FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal)*, http://www1.etsia.upm.es/fedna/capitulos/05CAP_I.pdf

Barroso A, Dunner S, Cañon J (1999). Use of PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) analysis for detection of bovine-casein (CASB) variants A¹, A², A³, and B¹. *J Anim Sci* 77: 2629-2632.

Bauman DE, Perfield JW, de Veth M, Lock AL (2003). New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutr. Conf.* 175-189.

Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, Lobbens S, Dina C, Durand E, Guerardel A, Boutin P, Jouret B, Heude B, Balkau B, Tichet J, Marre M, Potoczna N, Horber F, Le Stunff C, Czernichow S, Sandbaek A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Andersen G, Kiess W, Körner A, Kovacs P, Jacobson P, Carlsson LM, Walley AJ, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O, Meyre D, Froguel P (2008). Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet* 40 (8):943-945.

Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G, Hocquette JF (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem* 55 (13): 5229-5237.

Bielli A (2010). La estructura del músculo. In: Introducción a la Ciencia de la Carne. G. Bianchi & O. Feed Eds. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay. Pp: 51-74.

Bionaz M, Looor JJ (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366.

Bong JJ, Cho KK, Baik M (2009). Comparison of gene expression profiling between bovine subcutaneous and intramuscular adipose tissues by serial analysis of gene expression. *Cell Biol Int* 34(1):125-133.

Bonnet M, Faulconnier Y, Leroux C, Jurie C, Cassar-Malek I, Bauchart D, Boulesteix P, Pethick D, Hocquette JF, Chilliard Y (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and leptin are related to marbling differences among Limousin and Angus or Japanese Black × Angus steers. *J Anim Sci* 85:2882-2894.

Bousserouel S, Raymondjean M, Brouillet A, Béréziat G, Andréani M (2004). Modulation of cyclin D1 and early growth response factor-1 gene expression in interleukin-1 β -treated rat smooth muscle cells by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Biochem* 271(22):4462-4473.

Box GEP, Cox DR (1964). "An analysis of transformations". *J Roy Stat Soc, Series B*, 26 (2): 211–252.

Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, Schmutz SM (2002). A missense mutation in the bovine leptin gene is correlated with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet Sel and Evol* 34: 1-12.

Buchanan FC, Thue TD, Yu P, Winkelman-Sim DC (2005). Single nucleotide polymorphisms in the corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin genes are associated with growth and carcass yield in beef cattle. *Anim Gen* 36: 127-131

Cammisotto PG, Gélinas Y, Deshaies Y, Bukowiecki LJ (2003). Regulation of leptin secretion from white adipocytes by free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: 521-526.

Caputi P, Méndez C (2010). Producción de carne en el mundo y la inserción de Uruguay en el comercio exterior. In: Introducción a la Ciencia de la Carne. G. Bianchi & O. Feed Eds. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay. Pp: 17-50.

Casas E (2002). Identification of quantitative trait loci in beef cattle. *Arch Lat Prod Anim* 10(1): 54-61.

Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC, Johnson DD, Smith TPL (2006). Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci* 84:520-525.

Casas E, White SN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M, Bennett GL, Smith TPL (2007). Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *J Anim Sci* 85:2807-2814.

Cassar-Malek I, Jurie C, Bernard C, Barnola I, Micol D, Hocquette JF (2009). Pasture-feeding of Charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *J Physiol Pharmacol* 60: 83-90.

Chen CH, Lin EC, Cheng WT, Sun HS, Mersmann HJ, Ding ST (2006). Abundantly expressed genes in pig adipose tissue: an expressed sequence tag approach. *J Anim Sci* 84(10): 2673-2683.

Cho S, Park TS, Yoon DH, Cheong HS, Namgoong S, Park BL, Lee HW, Han CS, Kim EM, Cheong IC, Kim H, Shin HD (2008). Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. *BMB Rep* 41(1): 29-34.

Choi KC, Roh SG, Hishikawa D, Miyahara H, Kuno M, Tsuzuki H, Tomimatsu A, Hong YH, Cho KK, Han KH, Sasaki S (2003). Differential expression of the nonmuscle-type cofilin gene between subcutaneous and visceral adipose tissue. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(10): 2262-2265.

Choquet H, Stijnen P, Creemers JW (2011). Genetic and Functional Characterization of PCSK1. *Methods Mol Biol* 768: 247-253.

Chung H, Choi B, Jang G, Lee K, Kim H, Yoon S, Im S, Davis M, Hines H (2007). Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *J Appl Genet* 48(1): 61-68.

Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, Downes K, Barrett JC, Healy BC, Mychaleckyj JC, Warram JH, Todd JA (2008). Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 40(12): 1399-1401.

Corva PM, Fernández Macedo GV, Soria LA, Papaleo Mazzucco J, Motter M, Villarreal EL, Schor A, Mezzadra CA, Melucci LM, Miquel MC (2009). Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet Mol Res* 8 (1): 105-116.

Costello S, O'Doherty E, Troy DJ, Ernst CW, Kim KS, Stapleton P, Sweeney T, Mullen AM (2007). Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat Sci* 75: 551–557.

Darwish W, Ikenaka Y, Eldaly E, Ishizuka M (2010). Mutagenic activation and detoxification of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 1A1 and phase II enzymes in three meat-producing animals. *Food Chem Toxicol* 48(8-9): 2526-2531.

de Felipe I, Briz J (2001). Seguridad alimentaria y actitud del consumidor: el vacuno en la Unión Europea V congreso de la AEEA (Asociación Española de Economía Agraria). Pamplona 19-21 de septiembre de 2001.

De La Torre A, Debiton E, Juaneda P, Durand D, Chardigny JM, Barthomeuf C, Bauchart D, Gruffat D (2006). Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. *Br J Nutr* 95: 346–352.

De Smet S, Raes K, Demeyer D (2004). Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim Res* 53: 81–98.

Dekkers JCM (2004). Commercial application of marker and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci* 82: 313-328.

Dunner S, Miranda ME, Amigues Y, Cañon J, Georges M, Hanset R, Williams J, Ménissier F, (2003). Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *Gen Sel Evol* 35: 103-118.

Esmailizadeh AK, Bottema CDK, Kruk ZA, Morris CA, Cullen NG, Crawford AM, Pitchford WS (2005). Association of the exon 9 single-nucleotide polymorphism of *CAPN1* with beef tenderness. *Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet* 16: 258-261.

Esmailizadeh AK, Bottema CDK, Sellick GS, Verbyla AP, Morris CA, Cullen NG, Pitchford WS (2008). Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. *J Anim Sci* 86: 1038-1046.

Farke C, Viturro E, Meyer HH, Albrecht C (2006). Identification of the bovine cholesterol efflux regulatory protein ABCA1 and its expression in various tissues. *J Anim Sci* 84(11): 2887-94.

Farke C, Meyer HH, Bruckmaier RM, Albrecht C (2008). Differential expression of ABC transporters and their regulatory genes during lactation and dry period in bovine mammary tissue. *J Dairy Res* 75(4): 406-414.

Farmer L (1994). The role of nutrients in meat flavour formation. *Proc Nutr Soc* 53: 327-333.

Feed O (2010). Metodología para la evaluación de las características cualitativas de la canal y de la carne. In: Introducción a la Ciencia de la Carne. G. Bianchi & O. Feed Eds. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay. Pp: 181-214.

Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV (2007). *PPARgamma* and *GLUT-4* expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domest Anim Endocrinol* 33(4): 367-378.

Fiaccavento R, Carotenuto F, Vecchini A, Binaglia L, Forte G, Capucci E, Maccari AM, Minieri M, Di Nardo P (2010). An ω 3 fatty acid-enriched diet prevents skeletal muscle lesions in a hamster model of dystrophy. *Am J Pathol* 177(5): 2176-2184.

Fisher RA (1935). The logic of inductive inference. *J Roy Stat Soc* 98(1): 39-82.

Frank PG, Cheung MW, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(2): 677-686.

Freking BA, Murphy SK, Wylie AA, Rhodes SJ, Keele JW, Leymaster KA, Jirtle RL, Smith TP (2002). Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Res* 12(10): 1496-1506.

Fuji J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna V K, Weiler J E (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.

García D, Cañon J, Dunner S (2002). Genetic location of inheritable traits through association studies: A review. *Curr Genom* 3: 188-200.

Garrick DJ (2011). The nature, scope and impact of genomic prediction in beef cattle in the United States. *Gen Sel Evol* 43: 17.

Gazzerro E, Bonetto A, Minetti C (2011). Caveolinopathies: translational implications of caveolin-3 in skeletal and cardiac muscle disorders. *Handb Clin Neurol* 101: 135-142.

Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P (2009). Associations between the 11-bp deletion in the myostatin gene and carcass quality in Angus-sired cattle. *Anim Genet* 40(1): 97-100.

Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P (2009). Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genet Sel Evol* 41: 36.

Goodall JJ, Schmutz SM (2007). *IGF2* gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. *Anim Genet* 38(2): 154-161.

Goodson KJ, Morgan WW, Reagan JO, Gwartney BL, Courington SM, Wise JW, Savell JW (2002). Beef customer satisfaction: factors affecting consumer evaluations of clod steaks. *J Anim Sci* 80(2): 401-408.

Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Looor JJ (2009). Adipogenic and energy metabolism gene networks in *Longissimus lumborum* during rapid

post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics* 10: 142.

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford CH, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R (2002). Positional candidate cloning of a QTL in Dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with effect on milk yield and composition. *Genome Res* 12: 222-231.

Grobet L, Royo LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics* 17: 71-74.

Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Mémissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Gen* 9: 210-213.

Grompone MA (2010). Composición química de los tejidos: lípidos. In: Introducción a la Ciencia de la Carne. G. Bianchi & O. Feed Eds. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay. Pp: 75-113.

Gross DA, Snapp EL, Silver DL (2010). Structural insights into triglyceride storage mediated by fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2. *PLoS One* 5(5): e10796.

Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Nute GR, Burton D, Gill JL, Wood JD, Williams JL (2008). Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. *Anim Genet* 39(1): 51-61.

Harper GS, Pethick DW (2004). Fatness in production animals: using genetic and environmental levers to meet consumer demand. *Asia Pacific J Clin Nutr* 13 (Suppl): 37.

Hausman GJ, Poulos SP, Pringle TD, Azain MJ (2008). The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J Anim Sci* 86(14 Suppl): 236-243.

Hayes BJ, Lien S, Nilsen H, Olsen HG, Berg P, Maceachern S, Potter S, Meuwissen TH (2008). The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. *Anim Genet* 39(2): 105-111.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME (2009). Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J Dairy Sci* 92: 433-443.

Hayes B, Goddard M (2010). Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. *Genome* 53(11): 876-883.

Hayes BJ, Chamberlain AJ, McPartlan H, Macleod I, Sethuraman L, Goddard ME (2007). Accuracy of marker-assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. *Genet Res* 89(4): 215-220.

Heck JM, Schennink A, van Valenberg HJ, Bovenhuis H, Visker MH, van Arendonk JA, van Hooijdonk AC (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci* 92(3): 1192-1202.

Heni M, Haupt A, Schäfer SA, Ketterer C, Thamer C, Machicao F, Stefan N, Staiger H, Häring HU, Fritsche A (2010). Association of obesity risk SNPs in *PCSK1* with insulin sensitivity and proinsulin conversion. *BMC Med Genet* 11:86.

Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, Sharma M, Kambadur R (2009). Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating *MEF2* and *MyoD* gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(3): 525-534.

Hestand MS, Klingenhoff A, Scherf M, Ariyurek Y, Ramos Y, van Workum W, Suzuki M, Werner T, van Ommen G, den Dunnen JT, Harbers M, Hoen P (2010). Tissue-specific transcript annotation and expression profiling with complementary next-generation sequencing technologies. *Nuc Ac Res* 38 (16): e165.

Hocquette JF, Graulet B, Castiglia-Delavaud C, Bornes F, Lepetit N, Ferre P (1996). Insulin-sensitive glucose transporter transcript levels in calf muscles assessed with a bovine *GLUT4* cDNA fragment. *Int J Biochem Cell Biol* 28(7): 795-806.

Hocquette JF, Lehnert S, Barendse W, Cassar-Malek I, Picard B (2007). Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1:159–173.

Hudson NJ, Reverter A, Wang Y, Greenwood PL, Dalrymple BP (2009). Inferring the transcriptional landscape of bovine skeletal muscle by integrating co-expression networks. *PLoS One* 4(10): e7249.

Ibehaga-Awemu E, Kgwatalala P, Zhao X (2008). A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep and pig. *Mamm Gen* 19: 591-617.

Jiang Z, Michal JJ, Chen J, Daniels TF, Kunej T, Garcia MD, Gaskins CT, Busboom JR, Alexander LJ, Wright RW Jr, Macneil MD (2009). Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. *Int J Biol Sci* 5(6): 528-542.

Johnston DJ, Graser HU (2010). Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J Anim Sci* 88: 1917-1935.

Jordana J, Alexandrino P, Beja-Pereira A, Bessa I, Cañon J, Carretero Y, Dunner S, Laloë D, Moazami-Goudarzi K, Sanchez A, Ferran N (2003). Genetic structure of eighteen local south european beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *J Anim Bre Gen* 120: 73-87.

Kadereit B, Kumar P, Wang WJ, Miranda D, Snapp EL, Severina N, Torregroza I, Evans T, Silver DL (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(1): 94-99.

Kaminski S, Brym P, Rusc A, Wojcik E (2006). Associations between milk performance traits in holstein cows and 16 candidate snps identified by arrayed primer extension (APEX) microarray. *Anim Biotech* 17:1–11.

Kang K, Pariza MW (2001). *trans*-10,*cis*-12-Conjugated Linoleic Acid reduces leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 287, Issue 2: 377-382.

Kaupe B, Winter A, Fries R, Erhardt G (2004). *DGAT1* polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J Dairy Res* 71: 182-187.

Kgwatalala PM, Ibeagha-Awemu EM, Mustafa AF, Zhao X (2009). Influence of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows. *J Dairy Sci* 92(3): 1220-1228.

Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM, Rosa GJ (2007). The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *J Dairy Sci* 90(6): 2966-2970.

Kim Y, Ryu J, Woo J, Kim JB, Kim CY, Lee C (2011). Genome-wide association study reveals five nucleotide sequence variants for carcass traits in beef cattle. *Anim Genet* 42(4): 361-365.

König S, Simianer H, Willam A (2008). Economic evaluation of genomic breeding programs. *J Dairy Sci* 92: 382–391.

Kraft J, Kramer JKG, Schoene F, Chambers JR, Jahreis G (2008). Extensive analysis of long-chain polyunsaturated fatty acids, CLA, trans-18:1 isomers, and plasmalogenic lipids in different retail beef types. *J Agric Food Chem* 56 (12): 4775–4782.

Laborde F L, Mandell IB, Tosh JJ, Wilton JW, Buchanan-Smith JG (2001). Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. *J Anim Sci* 79: 355-365.

Lachance J (2009). Detecting selection-induced departures from Hardy-Weinberg proportions. *Genet Sel Evol* 41:15.

Lagonigro R, Wiener P, Pilla F, Woolliams JA, Williams JL (2003). A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim Genet* 34(5): 371-374.

Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J (2010). Genetic variants of the *FADS1 FADS2* gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 21(1): 64-69.

Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB (2002). Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* 66(1): 19-32.

Lee SH, Park EW, Cho YM, Kim SK, Lee JH, Jeon JT, Lee CS, Im SK, Oh SJ, Thompson JM, Yoon D (2007). Identification of differentially expressed genes related to intramuscular fat development in the early and late fattening stages of Hanwoo steers. *J Biochem Mol Biol* 40(5): 757-764.

Lee SH, Cho YM, Lee SH, Kim BS, Kim NK, Choy YH, Kim KH, Yoon D, Im SK, Oh SJ, Park EW (2008). Identification of marbling-related candidate genes in *M. longissimus dorsi* of high- and low marbled Hanwoo (Korean Native Cattle) steers. *BMB Rep* 41(12): 846-851.

Lehnert SA, Reverter A, Byrne KA, Wang Y, Nattrass GS, Hudson NJ, Greenwood PL (2007).

Gene expression studies of developing bovine longissimus muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Dev Biol* 7:95.

Lillehammer M, Meuwissen TH, Sonesson AK (2011). Genomic selection for maternal traits in pigs. *J Anim Sci* Aug 12 (publicación electrónica).

MacNeil MD, Grosz MD (2002). Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford x composite double backcross populations. *J Anim Sci* 80: 2316-2324.

Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L, Klopp N, Trabetti E, Biscuola M, Cavallari U, Galavotti R, Martinelli N, Guarini P, Girelli D, Olivieri O, Corrocher R, Heinrich J, Pignatti P, Illig T (2008). SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* 43(4): 289-299.

Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, Delday M (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc* 62: 337–347.

Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ (2003). Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet* 12(22): 2923-2929.

Mani O, Körner M, Ontsouka CE, Sorensen MT, Sejrsen K, Bruckmaier RM, Albrecht C (2011). Identification of ABCA1 and ABCG1 in milk fat globules and mammary cells--implications for milk cholesterol secretion. *J Dairy Sci* 94(3): 1265-1276.

Marchesi C, Essalmani R, Lemarié CA, Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Seidah NG, Schiffrin EL, Prat A (2011). Inactivation of endothelial proprotein convertase 5/6 decreases collagen deposition in the cardiovascular system: role of fibroblast autophagy. *J Mol Med* Jun 17 (publicación electrónica).

Marmer WN, Maxwell RJ, Williams JE (1984). Effects of dietary regimen and tissue site on bovine fatty acid profiles. *J Anim Sci* 59: 109–121.

Matal J, Tunková A, Siller M, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2009). Isolation of two cytochrome P450 forms, CYP2A19 and CYP1A, from pig liver microsomes. *J Vet Pharmacol Ther* 32(5): 470-476.

Maxwell MA, Cleasby ME, Harding A, Stark A, Cooney GJ, Muscat GE (2005). *Nur77* regulates lipolysis in skeletal muscle cells. Evidence for cross-talk between the beta-

adrenergic and an orphan nuclear hormone receptor pathway. *J Biol Chem* 280(13): 12573-12584.

Mc Pherron AC, Lee SJ (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12457–12461.

Mc Pherron AC (2010). Metabolic functions of *myostatin* and *gdf11*. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 10(4): 217–231.

Mele M, Conte G, Castiglioni B, Chessa S, Macciotta NPP, Serra A, Buccioni A, Pagnacco G, Secchiari P (2007). Stearoyl-Coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. *J Dairy Sci* 90: 4458–4465.

Meuwissen THE, Goddard ME (1996). The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* 28:161-176.

Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.

Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, Lecoeur C, Lobbens S, Gallina S, Durand E, Vatin V, Degraeve F, Proença C, Gaget S, Körner A, Kovacs P, Kiess W, Tichet J, Marre M, Hartikainen AL, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Levy-Marchal C, Pattou F, Heude B, Tauber M, McCarthy MI, Blakemore AI, Montpetit A, Polychronakos C, Weill J, Coin LJ, Asher J, Elliott P, Järvelin MR, Visvikis-Siest S, Balkau B, Sladek R, Balding D, Walley A, Dina C, Froguel P (2009). Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 41(2): 157-159.

Milanesi E, Nicoloso L, Crepaldi P (2008). Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *J Anim Breed Genet* 125(1): 63-67.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, Kahn BB (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343.

Moloney AP, Mooney MT, Kerry JP, Troy DJ (2001). Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proc Nutr Soc* 60: 221–229.

Morash MG, MacDonald AB, Croll RP, Anini Y (2009). Molecular cloning, ontogeny and tissue distribution of zebrafish (*Danio rerio*) prohormone convertases: PCSK1 and PCSK2. *Gen Comp Endocrinol* 162(2): 179-187.

Moreno-Sánchez N, Rueda J, Carabaño MJ, Reverter A, McWilliam S, González C, Díaz C (2010). Skeletal muscle specific genes networks in cattle. *Funct Integr Genomics* 10(4): 609-618.

Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Dobbie PM, Veenvliet BA, Manley TR, Pitchford WS, Kruk ZA, Bottema CD, Wilson T (2006). Genotypic effects of *calpain 1* and *calpastatin* on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim Genet* 37(4): 411-414.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5: 621-628.

Mujibi FD^a, Nkrumah JD, Durunna ON, Grant JR, Mah J, Wang Z, Basarab J, Plastow G, Crews DH Jr, Moore SS (2011). Associations of marker panel scores with feed intake and efficiency traits in beef cattle using pre-selected single nucleotide polymorphisms. *J Anim Sci* Jun 3 (publicación electrónica).

Mujibi FD^b, Nkrumah JD, Durunna ON, Stothard P, Mah J, Wang Z, Basarab J, Plastow G, Crews DH Jr, Moore SS (2011). Accuracy of genomic breeding values for residual feed intake in crossbred beef cattle. *J Anim Sci* Jun 3 (publicación electrónica).

Nagahata H (2004). Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *J Vet Med Sci* 66(12): 1475-1482.

Nakamura MT, Nara TY (2002). Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans* 30: 1076-1079.

Naslund J, Fikse WF, Pielberg GR, Lunden A (2008). Frequency and effect of the bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (*DGAT1*) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. *J Dairy Sci* 91: 2127-2134.

Neuner S, Edel C, Emmerling R, Thaller G, Götz K (2009). Precision of genetic parameters and breeding values estimated in marker assisted BLUP genetic evaluation. *Genet Sel Evol* 41: 26.

Nkrumah JD, Li C, Basarab JB, Guercio S, Meng Y, Murdoch B, Hansen C, Moore SS (2004). Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Can J Anim Sci* 84 (2): 211-219.

O'Brien PJ, MacLennan (1992). Application in the swine industry of a DNA-based test for porcine stress syndrome. *Proc Am Assoc Swine Pract Meet* 13: 835-837.

Obinata T, Sato N (2007). Formation and maintenance of muscle contractile apparatus. *J Physiol Sci* 57 Suppl: S34.

Orrù L, Cifuni GF, Piasentier E, Corazzin M, Bovolenta S, Moioli B (2011). Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the *LEP* and *SCD1* genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Sci* 87(4): 344-348.

Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, Crawford AM, Wheeler TL, Koohmaraie M, Keele JW, Smith TPL (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci* 80: 3077-3085.

Patra D, Delassus E, Hayashi S, Sandell LJ (2011). Site-1 protease is essential to growth plate maintenance and is a critical regulator of chondrocyte hypertrophic differentiation in postnatal mice. *J Biol Chem* Jun 7 (publicación electrónica).

Pérez R, Cañón J, Dunner S (2010). Genes associated with long-chain omega-3 fatty acids in bovine skeletal muscle. *J App Gen* 51: 479-487.

Pérez-Matute P, Martínez JA, Martí A, Moreno-Aliaga MJ (2007). Linoleic Acid Decreases Leptin and Adiponectin Secretion from Primary Rat Adipocytes in the Presence of Insulin. *Lipids* 42 (10): 913-920.

Peterson DG, Kelsey JA, Bauman DE (2002). Analysis of variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 85(9): 2164-2172.

Pol A, Martin S, Fernández MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell* 16(4): 2091-2105.

Puigserver P, Spiegelman BM (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24(1): 78-90.

Quaas RL, Li J, Thallman RM, Van Eenennaam AL, Fernando RL, Gill C (2006). Validation of commercial dna tests for quantitative beef traits. *8th World Congress on*

Genetics Applied to Livestock Production, 13 al 18 de agosto de 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Rahman SM, Wang Y, Yotsumoto H, Cha J, Han S, Inoue S, Yanagita T (2001). Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17(5): 385-90.

González-Recio O, Gianola D, Rosa GJ, Weigel KA, Kranis A (2009). Genome-assisted prediction of a quantitative trait measured in parents and progeny: application to food conversion rate in chickens. *Genet Sel Evol* 41:3.

Renaville B, Piasentier E, Fan B, Vitale M, Prandi A, Rothschild MF (2010). Candidate gene markers involved in San Daniele ham quality. *Meat Sci* 85(3): 441-445.

Rhee MS, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M (2004). Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *J Anim Sci* 82(2): 534-550.

Rincker C, Pyatt N, Berger L, Faulkner D (2006). Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J Anim Sci* 84: 686-693.

Ron M, Weller JI (2007). From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. *Anim Gen* 38: 429–439.

Rouskas K, Kouvatsi A, Paletas K, Papazoglou D, Tsapas A, Lobbens S, Vatin V, Durand E, Labrune Y, Delplanque J, Meyre D, Froguel P (2011). Common Variants in FTO, MC4R, TMEM18, PRL, AIF1, and PCSK1 Show Evidence of Association With Adult Obesity in the Greek Population. *Obesity* Jun 30 (publicación electrónica).

Rousset F (2008). Genepop v4: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8: 103-106.

Rzehak P, Heinrich J, Klopp N, Schaeffer L, Hoff S, Wolfram G, Illig T, Linseisen J (2008). Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 - fatty acid desaturase 2 (*FADS1-FADS2*) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *Br J Nutr* 15: 1-7.

Sadkowski T, Jank M, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Motyl T (2009). Transcriptomic index of skeletal muscle of beef breeds bulls. *J Physiol Pharmacol* 60: 15–28.

Salo AM, Cox H, Farndon P, Moss C, Grindulis H, Risteli M, Robins SP, Myllylä R (2008). A connective tissue disorder caused by mutations of the lysyl hydroxylase 3 gene. *Am J Hum Genet* 83(4): 495-503.

Schaeffer L, Gohlke H, Muller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I, Demmelmair H, Illig T, Koletzko B, Heinrich J (2006). Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Gen* 15: 1745–1756.

Schenkel FS, Miller SP, Ye X, Moore SS, Nkrumah JD, Yu CL, Mandell IB, Wilton JW, Williams JL (2005). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 83: 2009-2020.

Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 84: 291–299.

Schlee P, Graml R, Schallenberger E, Schams D, Rottmann O, Olbrich-Bludau A, Pirchner F (1994). Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theor App Gen* 88 (3-4): 497-500.

Schrijver I, Oitmaa E, Metspalu A, Gardner P (2005). Genotyping microarray for the detection of more than 200 CFTR mutations in ethnically diverse populations. *J Mol Diagn* 7(3): 375-87.

Schrooten C, Bovenhuis H, van Arendonk JA, Bijma P (2005). Genetic progress in multistage dairy cattle breeding schemes using genetic markers. *J Dairy Sci* 88(4): 1569-1581.

Schütz E, Scharfenstein M, Brenig B (2008). Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population. *J Dairy Sci* 91(12): 4854-4859.

Sellick GS, Pitchford WS, Morris CA, Cullen NG, Crawford AM, Raadsma HW, Bottema CD (2007). Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. *Anim Genet* 38(5): 440-446.

Sevane N, Cortés O, García D, Cañón J, Dunner S (2010). New single nucleotide polymorphisms in *Alectoris* identified using chicken genome information allow *Alectoris* introgression detection. *Mol Ecol Resour* 10(1): 205-213.

Sevane N, Crespo I, Cañón J, Dunner S (2011). A Primer-Extension Assay for simultaneous use in cattle Genotype Assisted Selection, parentage and traceability analysis. *Liv Sci* 137: 141–150.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS (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. *J Anim Sci* 86(1): 1-16.

Sillence MN (2004). Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. *Vet J* 167(3): 242-257.

Simard JR, Meshulam T, Pillai BK, Kirber MT, Brunaldi K, Xu S, Pilch PF, Hamilton JA (2010). Caveolins sequester FA on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, augment triglyceride formation, and protect cells from lipotoxicity. *J Lipid Res* 51(5): 914-922.

Simm G, Lambe N, Bünger L, Navajas E, Roehe R (2009). Use of meat quality information in breeding programmes. In: Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat. J.P. Kerry & D. Ledward Eds., Woodhead Publishing Ltd., Reino Unido. Pp. 680.

Soria LA, Corva PM (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Arch Lat Prod Anim* 12(2): 73-88.

Switonsky M (2002). Molecular genetics in beef cattle breeding – a review. *Anim Sci Papers and Reports* 20: 7-18.

Taga H, Bonnet M, Picard B, Zingaretti MC, Cassar-Malek I, Cinti S, Chilliard Y (2011). Adipocyte metabolism and cellularity are related to differences in adipose tissue maturity between Holstein and Charolais or Blond d'Aquitaine fetuses. *J Anim Sci* 89(3): 711-721.

Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome* 14: 142–148.

Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zühlke H, Fries R (2003). *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Gen* 34: 354-357.

Thanislass J, Dhanammal L (2010). Identification of single nucleotide variations in *CYP1A1* gene in repeat breeding cattle. *Online J Vet Res* 14 (2): 227-232.

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, et al. (2009). The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science* 324: 522-527.

The Bovine HapMap Consortium (2009). Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science* 324: 527.

Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Thorlacius S, Jonsdottir I, Jonsdottir T, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, Aben KK, Verbeek AL, Roeleveld N, Kampman E, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadottir L, Rafnar T, Becker DM, Gulcher J, Kiemenev LA, Pedersen O, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41(1):18-24.

Tupac-Yupanqui I, Baro JA, Dunner S (2004). Effects of *DGAT1* alleles on milk and components traits in Spanish Holstein breed. *Arch Zoot* 53: 293-299.

UCO (2006). Incidencia de la alimentación en el engrasamiento de la canal. Universidad de Córdoba, España. Documentos de trabajo. Producción animal y gestión. Issn: 1698-4226 DT 1, Vol. 1/2006.

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

Van Eenennaam AL, van der Werf JH, Goddard ME (2011). The value of using DNA markers for beef bull selection in the seedstock sector. *J Anim Sci* 89(2): 307-320.

Wada M, Daimon M, Emi M, Iijima H, Sato H, Koyano S, Tajima K, Kawanami T, Kurita K, Hunt SC, Hopkins PN, Kubota I, Kawata S, Kato T (2008). Genetic association between aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) variation and high-density lipoprotein

cholesterol (HDL-C) among non-drinkers in two large population samples in Japan. *J Atheroscler Thromb* 15(4): 179-84.

Wang YH, Byrne KA, Reverter A, Harper GS, Taniguchi M, McWilliam SM, Mannen H, Oyama K, Lehnert SA (2005). Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mamm Genome* 16(3): 201-210.

Wang D^a, Wang N, Li N, Li H (2009). Identification of differentially expressed proteins in adipose tissue of divergently selected broilers. *Poult Sci* 88(11): 2285-2292.

Wang YH^b, Bower NI, Reverter A, Tan SH, De Jager N, Wang R, McWilliam SM, Cafe LM, Greenwood PL, Lehnert SA (2009). Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *J Anim Sci* 87(1): 119-130.

Weikard R, Kühn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M (2005). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics* 21:1-13.

Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38: 1358-1370.

Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M (2004). The accuracy and repeatability of untrained laboratory consumer panelists in detecting differences in beef *longissimus* tenderness. *J Anim Sci* 82(2): 557-562.

White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC Jr, Johnson DD, Keele JW, Smith TP (2005). A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci* 83(9): 2001-2008.

Wiener P, Woolliams JA, Frank-Lawale A, Ryan M, Richardson RI, Nute GR, Wood JD, Homer D, Williams JL (2009). The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Sci* 83: 127–134.

Willer CJ (2009). The Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41(1): 25-34.

Williams JL, Dunner S, Valentín A, Mazza R, Amarger V, Checa ML, Crisà A, Razzaq N, Delourme D, Grandjean F, Marchitelli C, García D, Gomez RP, Negrini R, Ajmone-Marsan

P, Levéziel H (2009). Discovery, characterization and validation of single nucleotide polymorphisms within 206 bovine genes that may be considered as candidate genes for beef production and quality. *Anim Gen* 40: 486-491.

Winter A, Kramer W, Werner FAO, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp Womack JE, Thaller G, Fries R (2002). Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase *DGAT1* with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Nat Acad Sci* 99: 9300-9305.

Yeh ET, Gong L, Kamitani T (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*. 248(1-2):1-14.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432.

Zhang Q, Lee HG, Han JA, Kim EB, Kang SK, Yin J, Baik M, Shen Y, Kim SH, Seo KS, Choi YJ (2010). Differentially expressed proteins during fat accumulation in bovine skeletal muscle. *Meat Sci* 86(3):814-820.

Zhang Q, Lee HG, Han JA, Kang SK, Lee NK, Baik M, Choi YJ (2011). Differentially expressed proteins associated with myogenesis and adipogenesis in skeletal muscle and adipose tissue between bulls and steers. *Mol Biol Rep* May 20 (publicación electrónica).

Zheng X, Ren W, Zhang S, Liu J, Li S, Li J, Yang P, He J, Su S, Li P (2011). Association of type 2 diabetes susceptibility genes (*TCF7L2*, *SLC30A8*, *PCSK1* and *PCSK2*) and proinsulin conversion in a Chinese population. *Mol Biol Rep* Mar 25 (publicación electrónica).

Zhou GL, Zhang GL, Cao Y, Jin HG (2011). Cloning and polymorphisms of the 3' untranslated region of malic enzyme gene in Chinese red cattle. *Meat Sci* 89(1): 72-75.

Páginas de internet consultadas y citadas:

Asociación de Industrias de la Carne de España (<http://www.aice.es/>)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

DNA Data Bank of Japan (www.ddbj.nig.ac.jp).

EMBL Bank (European Molecular Biology Laboratory's Nucleotide Sequence Database, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) del Wellcome Trust Sanger Institute de Cambridge (Inglaterra).

GenBank (NIH's National Centre for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>).

Instituto Nacional de Carnes de Uruguay (www.inac.gub.uy).

Map Viewer del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>).

Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Proyecto GeMQual (<http://www.gemqual.org>).

R Project (<http://www.r-project.org/>).

Ruminant-Human Genome Browser del CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, <http://www.livestockgenomics.csiro.au/cow>, Australia).

UCSC Genome Browser de la Universidad de California en Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>).

ANEXO 1

Frecuencias alélicas de los SNPs analizados en la totalidad de la muestra de animales. En los SNPs cuya frecuencia del alelo minoritario es menor a 0,05 las frecuencias globales aparecen en cursiva.

Locus		Alelos	JERSEY	S. DEVON	A. ANGUS	HIGH.	HOLS.	D. RED	SIMM.	LIM.	CHA.	PIEDM.	MARCH.	A. VALLE	CASINA	AVILENA	PIREN.	Global
ABCA1	C	0,871	0,804	0,621	0,962	0,885	0,655	0,444	0,783	0,552	0,467	0,304	0,850	0,567	0,500	0,823	0,675	
	A	0,129	0,196	0,379	0,039	0,115	0,345	0,556	0,217	0,448	0,533	0,696	0,150	0,433	0,500	0,177	0,325	
	N	31	23	29	26	26	29	18	30	29	30	28	30	30	30	30	31	420
ACACA	G	1,000	1,000	1,000	1,000	0,827	0,759	1,000	1,000	1,000	0,900	0,982	0,983	1,000	0,967	0,984	0,96	
	A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,173	0,241	0,000	0,000	0,000	0,100	0,018	0,017	0,000	0,033	0,016	0,04	
	N	32	24	29	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	425	
ACAT2	T	0,185	0,526	0,550	0,225	0,500	0,414	0,667	0,419	0,250	0,367	0,500	0,586	0,733	0,586	0,436	0,460	
	C	0,815	0,474	0,450	0,775	0,500	0,586	0,333	0,581	0,750	0,633	0,500	0,414	0,267	0,414	0,565	0,540	
	N	27	19	20	20	26	29	18	31	30	30	28	29	30	29	31	397	
ALDH2	T	0,783	0,881	0,567	0,630	0,731	0,793	0,333	0,613	0,767	0,517	0,722	0,741	0,717	0,500	0,419	0,650	
	C	0,217	0,119	0,433	0,370	0,269	0,207	0,667	0,387	0,233	0,483	0,278	0,259	0,283	0,500	0,581	0,350	
	N	30	21	30	23	26	29	18	31	30	29	27	29	30	30	31	414	
CAPN1 g.6545	G	0,578	0,522	0,552	0,196	0,660	0,655	0,222	0,431	0,583	0,650	0,518	0,667	0,403	0,567	0,532	0,528	
	A	0,422	0,478	0,448	0,804	0,340	0,345	0,778	0,569	0,417	0,350	0,482	0,333	0,597	0,433	0,468	0,473	
	N	32	23	29	23	25	29	18	29	30	30	28	30	31	30	31	418	
CAPN1 g.5709	C	0,466	0,191	0,138	0,024	0,480	0,089	0,056	0,145	0,133	0,033	0,089	0,052	0,100	0,217	0,000	0,148	
	G	0,535	0,810	0,862	0,976	0,520	0,911	0,944	0,855	0,867	0,967	0,911	0,948	0,900	0,783	1,000	0,852	
	N	29	21	29	21	25	28	18	31	30	30	28	29	30	30	30	409	
CAPN1 g.4558	T	0,281	0,167	0,250	0,778	0,173	0,086	0,667	0,387	0,250	0,283	0,389	0,383	0,210	0,250	0,548	0,332	
	C	0,719	0,833	0,750	0,222	0,827	0,914	0,333	0,613	0,750	0,717	0,611	0,617	0,790	0,750	0,452	0,668	
	N	32	24	30	27	26	29	18	31	30	30	27	30	31	30	31	426	
CAPN1 g.4751	T	0,267	0,140	0,407	0,796	0,229	0,093	0,750	0,556	0,500	0,328	0,481	0,411	0,482	0,500	0,517	0,424	
	C	0,733	0,860	0,593	0,204	0,771	0,907	0,250	0,444	0,500	0,672	0,519	0,589	0,518	0,500	0,483	0,577	
	N	30	25	27	27	24	27	18	27	25	29	26	28	28	22	29	392	
CAST	C	0,031	0,208	0,345	0,074	0,346	0,483	0,583	0,355	0,333	0,383	0,232	0,267	0,113	0,500	0,323	0,298	
	G	0,969	0,792	0,655	0,926	0,654	0,517	0,417	0,645	0,667	0,617	0,768	0,733	0,887	0,500	0,677	0,702	
	N	32	24	29	27	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	426	
CAST g.2959	A	0,781	0,833	0,883	0,944	0,692	0,655	0,778	0,677	0,650	0,700	0,643	0,733	0,839	0,850	0,645	0,752	
	G	0,219	0,167	0,117	0,056	0,308	0,345	0,222	0,323	0,350	0,300	0,357	0,267	0,161	0,150	0,355	0,248	
	N	32	24	30	27	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	427	
CAV3	C	0,375	0,109	0,276	0,577	0,365	0,190	0,250	0,355	0,450	0,233	0,554	0,350	0,323	0,300	0,258	0,334	
	T	0,625	0,891	0,724	0,423	0,635	0,810	0,750	0,645	0,550	0,767	0,446	0,650	0,677	0,700	0,742	0,666	
	N	32	23	29	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	424	
CFL1	T	0,531	0,042	0,117	0,093	0,135	0,431	0,306	0,468	0,600	0,467	0,589	0,367	0,307	0,133	0,258	0,330	
	C	0,469	0,958	0,883	0,907	0,865	0,569	0,694	0,532	0,400	0,533	0,411	0,633	0,694	0,867	0,742	0,670	
	N	32	24	30	27	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	427	
CHRNA11 g.1145del20	T	0,018	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,306	0,065	0,017	0,017	0,000	0,017	0,086	0,067	0,048	0,039	
	C	0,982	1,000	0,983	1,000	1,000	1,000	0,694	0,936	0,983	0,983	1,000	0,983	0,914	0,933	0,952	0,961	
	N	28	21	29	23	26	29	18	31	30	29	28	30	29	30	31	412	
CPT1	G	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	1,000	0,983	0,983	1,000	0,981	1,000	1,000	0,914	0,977	0,988	
	C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,017	0,017	0,000	0,019	0,000	0,000	0,086	0,023	0,012	
	N	32	22	28	26	26	29	15	30	30	30	26	30	31	29	22	406	
CRH g.22 CbG	G	0,307	0,944	0,300	0,891	0,458	0,679	0,533	0,629	0,579	0,567	0,893	0,732	0,533	0,667	0,539	0,609	
	C	0,694	0,056	0,700	0,109	0,542	0,321	0,467	0,371	0,421	0,433	0,107	0,268	0,467	0,333	0,462	0,391	
	N	31	18	25	23	24	28	15	31	19	30	28	28	30	24	26	380	
CRI1	T	0,035	0,022	0,000	0,304	0,091	0,000	0,167	0,184	0,075	0,200	0,167	0,036	0,150	0,260	0,135	0,123	
	G	0,966	0,978	1,000	0,696	0,909	1,000	0,833	0,816	0,925	0,800	0,833	0,964	0,850	0,740	0,865	0,878	
	N	29	23	27	23	11	19	18	19	20	30	27	28	30	25	26	355	
CRYAB	T	0,371	0,217	0,241	0,278	0,120	0,000	0,250	0,210	0,283	0,150	0,179	0,233	0,177	0,233	0,121	0,204	
	C	0,629	0,783	0,759	0,722	0,880	1,000	0,750	0,790	0,717	0,850	0,821	0,767	0,823	0,767	0,879	0,796	
	N	31	23	29	27	25	29	18	31	30	30	28	30	31	30	29	421	
CTSF	G	0,815	0,786	0,583	0,260	1,000	0,800	0,559	0,891	0,885	0,844	0,727	0,683	0,946	0,974	0,886	0,759	
	A	0,185	0,214	0,417	0,740	0,000	0,200	0,441	0,109	0,115	0,156	0,273	0,317	0,054	0,026	0,114	0,241	
	N	27	14	24	25	4	10	17	23	26	16	22	30	28	19	22	307	
CYP1A1	A	0,063	0,229	0,017	0,000	0,019	0,035	0,056	0,177	0,067	0,283	0,125	0,133	0,323	0,033	0,274	0,125	
	G	0,938	0,771	0,983	1,000	0,981	0,966	0,944	0,823	0,933	0,717	0,875	0,867	0,677	0,967	0,726	0,875	
	N	32	24	30	27	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	427	
DGAT1 g.6829 AbG	G	0,393	1,000	0,621	0,907	0,558	0,879	0,906	0,903	0,900	0,983	0,537	0,672	0,750	0,733	0,667	0,757	
	A	0,607	0,000	0,379	0,093	0,442	0,121	0,094	0,097	0,100	0,017	0,463	0,328	0,250	0,267	0,333	0,243	
	N	28	22	29	27	26	29	16	31	30	30	27	29	30	30	27	411	
DNAJA1	T	0,323	0,813	0,683	1,000	0,540	0,431	0,833	0,783	0,655	0,817	0,500	0,683	0,903	0,500	0,862	0,682	
	C	0,677	0,188	0,317	0,000	0,460	0,569	0,167	0,217	0,345	0,183	0,500	0,317	0,097	0,500	0,138	0,318	
	N	31	24	30	26	25	29	18	30	29	30	28	30	31	30	29	420	
FABP4	G	0,387	0,523	0,414	0,923	0,462	0,345	0,625	0,483	0,517	0,433	0,375	0,433	0,321	0,333	0,483	0,461	
	C	0,613	0,477	0,586	0,077	0,539	0,655	0,375	0,517	0,483	0,567	0,625	0,567	0,679	0,667	0,517	0,539	
	N	31	22	29	26	26	29	16	30	30	30	28	30	28	30	29	414	
FADS1	T	0,259	0,290	0,518	0,546	0,481	0,466	0,333	0,419	0,667	0,654	0,661	0,617	0,597	0,650	0,694	0,536	
	C	0,741	0,711	0,482	0,455	0,519	0,535	0,667	0,581	0,333	0,346	0,339	0,383	0,403	0,350	0,307	0,464	

(continuación)

Locus	Alelos	JERSEY	S. DEVON	A. ANGUS	HIGH.	HOLS.	D. RED	SIMM.	LIM.	CHA.	PIEDM.	MARCH.	A. VALLE	CASINA	AVILENA	PIREN.	Global
IGF2R	A	0.031	0.646	0.483	0.654	0.058	0.272	0.333	0.145	0.217	0.183	0.089	0.167	0.065	0.150	0.290	0.242
	G	0.969	0.354	0.517	0.346	0.942	0.724	0.667	0.855	0.783	0.817	0.911	0.833	0.936	0.850	0.710	0.758
	N	32	24	30	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	426
INSIG2	A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	32	24	30	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	426
LEP	T	0.000	0.000	0.050	0.000	0.039	0.103	0.083	0.065	0.083	0.018	0.107	0.069	0.150	0.224	0.097	0.075
	A	1.000	1.000	0.950	1.000	0.962	0.897	0.917	0.936	0.917	0.982	0.893	0.931	0.850	0.776	0.903	0.926
	N	26	24	30	27	26	29	18	31	30	28	28	29	30	29	31	416
LEP g.198 CbT	T	0.375	0.625	0.500	0.741	0.400	0.586	0.222	0.419	0.300	0.150	0.536	0.433	0.800	0.533	0.446	0.474
	C	0.625	0.375	0.500	0.259	0.600	0.414	0.778	0.581	0.700	0.850	0.464	0.567	0.200	0.467	0.554	0.526
	N	32	24	30	27	25	29	18	31	30	30	28	30	30	30	28	422
LOX g.7548 CbT	C	0.241	0.781	0.396	0.425	0.712	0.466	0.528	0.565	0.583	0.707	0.580	0.648	0.550	0.655	0.677	0.566
	T	0.759	0.219	0.604	0.575	0.289	0.535	0.472	0.436	0.417	0.293	0.420	0.352	0.450	0.345	0.323	0.434
	N	29	16	24	20	26	29	18	31	30	29	25	27	30	29	31	394
LPL	T	0.000	0.000	0.063	0.000	0.096	0.052	0.056	0.000	0.100	0.050	0.000	0.000	0.083	0.086	0.016	0.041
	C	1.000	1.000	0.938	1.000	0.904	0.948	0.944	1.000	0.900	0.950	1.000	1.000	0.917	0.914	0.984	0.959
	N	29	19	24	21	26	29	18	31	30	30	28	29	30	29	31	404
ME3	A	0.242	0.354	0.333	0.833	0.673	0.500	0.278	0.371	0.483	0.133	0.750	0.350	0.433	0.533	0.065	0.419
	G	0.758	0.646	0.667	0.167	0.327	0.500	0.722	0.629	0.517	0.867	0.250	0.650	0.567	0.467	0.936	0.581
	N	31	24	30	27	26	28	18	31	30	30	28	30	30	30	31	424
MGAT1	T	1.000	1.000	0.983	0.904	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.929	0.983	0.968	1.000	1.000	0.985
	C	0.000	0.000	0.017	0.096	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.017	0.032	0.000	0.000	0.015
	N	32	24	30	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	426
MMP1	G	1.000	0.938	0.750	0.808	0.846	0.828	1.000	0.952	0.950	0.950	0.768	0.800	0.984	0.933	0.887	0.892
	A	0.000	0.063	0.250	0.192	0.154	0.172	0.000	0.048	0.050	0.050	0.232	0.200	0.016	0.067	0.113	0.108
	N	32	24	30	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	426
OPN g.3492	G	0.188	0.904	0.519	0.111	0.568	0.411	0.342	0.411	0.077	0.411	0.074	0.278	0.250	0.238	0.379	0.341
	A	0.813	0.096	0.482	0.889	0.432	0.589	0.658	0.589	0.923	0.589	0.926	0.722	0.750	0.762	0.621	0.659
	N	32	26	27	27	22	28	19	28	26	28	27	27	24	21	29	391
OPN g.10043	T	0.200	0.896	0.704	0.889	0.611	0.810	0.964	0.532	0.783	0.848	0.262	0.931	0.789	0.261	0.767	0.678
	C	0.800	0.104	0.296	0.111	0.389	0.191	0.036	0.468	0.217	0.152	0.738	0.069	0.212	0.739	0.233	0.322
	N	30	24	27	27	18	21	14	31	30	23	21	29	26	23	30	374
OPN g.1406	T	1.000	1.000	0.556	1.000	0.696	0.833	0.639	0.911	1.000	0.707	0.982	0.821	0.789	0.891	0.714	0.841
	C	0.000	0.000	0.444	0.000	0.304	0.167	0.361	0.089	0.000	0.293	0.019	0.179	0.212	0.109	0.286	0.159
	N	32	26	27	27	23	27	18	28	25	29	27	28	26	23	28	394
PCSK1	T	0.688	0.750	0.683	0.558	0.135	0.379	0.389	0.484	0.450	0.283	0.143	0.617	0.694	0.345	0.500	0.478
	C	0.313	0.250	0.317	0.442	0.865	0.621	0.611	0.516	0.550	0.717	0.857	0.383	0.307	0.655	0.500	0.523
	N	32	24	30	26	26	29	18	31	30	30	28	30	31	29	29	423
PLOD3	A	0.078	0.042	0.117	0.185	0.077	0.035	0.222	0.048	0.267	0.150	0.125	0.133	0.000	0.133	0.113	0.112
	G	0.922	0.958	0.883	0.815	0.923	0.966	0.778	0.952	0.733	0.850	0.875	0.867	1.000	0.867	0.887	0.888
	N	32	24	30	27	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	427
PLTP	A	0.609	0.609	0.800	0.280	0.289	0.276	0.417	0.710	0.400	0.633	0.696	0.586	0.290	0.638	0.482	0.520
	G	0.391	0.391	0.200	0.720	0.712	0.724	0.583	0.290	0.600	0.367	0.304	0.414	0.710	0.362	0.518	0.480
	N	32	23	30	25	26	29	18	31	30	30	28	29	31	29	28	419
POMC g.437del1	C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.583	0.636	0.889	0.848	0.889	0.929	0.929	0.844	0.650	0.873
	T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.417	0.364	0.111	0.152	0.111	0.071	0.071	0.156	0.350	0.213
	N	22	10	2	17	8	12	18	11	9	23	27	14	14	16	10	127
PPARG	G	0.875	0.786	0.724	0.958	0.885	0.810	0.861	0.823	0.750	0.883	0.893	0.900	0.897	0.944	0.839	0.854
	A	0.125	0.214	0.276	0.042	0.115	0.190	0.139	0.177	0.250	0.117	0.107	0.100	0.103	0.056	0.161	0.146
	N	32	21	29	24	26	29	18	31	30	30	28	30	29	27	31	415
PPARGC1A ex8_1209	T	0.936	0.771	0.821	0.407	0.658	0.727	0.269	0.717	0.914	0.674	0.762	0.759	0.926	0.717	0.883	0.753
	C	0.065	0.229	0.179	0.593	0.342	0.273	0.731	0.283	0.086	0.326	0.238	0.241	0.074	0.283	0.117	0.247
	N	31	24	28	27	19	22	13	30	29	23	21	29	27	23	30	376
PPARGC1A	T	0.000	0.500	0.000	0.148	0.000	0.023	0.077	0.210	0.317	0.000	0.000	0.130	0.130	0.000	0.317	0.133
	C	1.000	0.500	1.000	0.852	1.000	0.977	0.923	0.790	0.683	1.000	1.000	0.870	0.870	1.000	0.683	0.867
	N	31	24	28	27	19	22	13	31	30	23	21	27	27	24	30	377
PPM2C	T	0.032	0.174	0.117	0.174	0.481	0.379	0.361	0.307	0.183	0.207	0.130	0.117	0.032	0.350	0.150	0.208
	C	0.968	0.826	0.883	0.826	0.519	0.621	0.639	0.694	0.817	0.793	0.870	0.883	0.968	0.650	0.850	0.792
	N	31	23	30	23	26	29	18	31	30	29	23	30	31	30	30	414
PRKAG2	G	0.233	0.022	0.133	0.000	0.385	0.155	0.143	0.210	0.083	0.267	0.286	0.150	0.081	0.117	0.327	0.174
	A	0.767	0.978	0.867	1.000	0.615	0.845	0.857	0.790	0.917	0.733	0.714	0.850	0.919	0.883	0.673	0.827
	N	30	23	30	27	26	29	14	31	30	30	28	30	31	30	26	415
RORA	A	0.375	0.087	0.000	0.289	0.000	0.086	0.028	0.017	0.117	0.133	0.018	0.100	0.000	0.052	0.033	0.091
	G	0.625	0.913	1.000	0.712	1.000	0.914	0.972	0.983	0.883	0.867	0.982	0.900	1.000	0.948	0.967	0.909
	N	32	23	30	26	26	29	18	29	30	30	28	30	31	29	30	421
RORC g.3290	A	0.813	0.458	0.367	0.654	0.731	0.638	0.778	0.717	0.917	0.717	0.643	0.733	0.500	0.817	0.613	0.673
	C	0.188	0.542	0.633	0.346	0.269	0.362	0.222	0.283	0.083	0.283	0.357	0.267	0.500	0.183	0.387	0.327
	N	32	24	30	26	26	29	18	30	30	30	28	30	31	30		

ANEXO 2

Frecuencias alélicas de los SNPs analizados en la muestra de animales de razas continentales (se excluyen las británicas). En los SNPs cuya frecuencia del alelo minoritario es menor a 0,05 las frecuencias globales aparecen en cursiva.

Locus	Alelos	HOLS.	D. RED	SIMM.	LIM.	CHA.	PIEDM.	MARCH.	A. VALLE	CASINA	AVILENA	PIREN.	Global
ABCA1	C	0,885	0,655	0,444	0,783	0,552	0,467	0,304	0,850	0,567	0,500	0,823	0,627
	A	0,115	0,345	0,556	0,217	0,448	0,533	0,696	0,150	0,433	0,500	0,177	0,373
	N	26	29	18	30	29	30	28	30	30	30	31	311
ACACA	G	0,827	0,759	1,000	1,000	1,000	0,900	0,982	0,983	1,000	0,967	0,984	0,946
	A	0,173	0,241	0,000	0,000	0,000	0,100	0,018	0,017	0,000	0,033	0,016	0,054
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
ACAT2	T	0,500	0,414	0,667	0,419	0,250	0,367	0,500	0,586	0,733	0,586	0,436	0,489
	C	0,500	0,586	0,333	0,581	0,750	0,633	0,500	0,414	0,267	0,414	0,565	0,511
	N	26	29	18	31	30	30	28	29	30	29	31	311
ALDH2	T	0,731	0,793	0,333	0,613	0,767	0,517	0,722	0,741	0,717	0,500	0,419	0,631
	C	0,269	0,207	0,667	0,387	0,233	0,483	0,278	0,259	0,283	0,500	0,581	0,369
	N	26	29	18	31	30	29	27	29	30	30	31	310
CAPN1 g.6545	G	0,660	0,655	0,222	0,431	0,583	0,650	0,518	0,667	0,403	0,567	0,532	0,545
	A	0,340	0,345	0,778	0,569	0,417	0,350	0,482	0,333	0,597	0,433	0,468	0,455
	N	25	29	18	29	30	30	28	30	31	30	31	311
CAPN1 g.5709	C	0,480	0,089	0,056	0,145	0,133	0,033	0,089	0,052	0,100	0,217	0,000	0,125
	G	0,520	0,911	0,944	0,855	0,867	0,967	0,911	0,948	0,900	0,783	1,000	0,875
	N	25	28	18	31	30	30	28	29	30	30	30	309
CAPN1 g.4558	T	0,173	0,086	0,667	0,387	0,250	0,283	0,389	0,383	0,210	0,250	0,548	0,320
	C	0,827	0,914	0,333	0,613	0,750	0,717	0,611	0,617	0,790	0,750	0,452	0,681
	N	26	29	18	31	30	30	27	30	31	30	31	313
CAPN1 g.4751	T	0,229	0,093	0,750	0,556	0,500	0,328	0,481	0,411	0,482	0,500	0,517	0,431
	C	0,771	0,907	0,250	0,444	0,500	0,672	0,519	0,589	0,518	0,500	0,483	0,569
	N	24	27	18	27	25	29	26	28	28	22	29	283
CAST	C	0,346	0,483	0,583	0,355	0,333	0,383	0,232	0,267	0,113	0,500	0,323	0,347
	G	0,654	0,517	0,417	0,645	0,667	0,617	0,768	0,733	0,887	0,500	0,677	0,653
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
CAST g.2959	A	0,692	0,655	0,778	0,677	0,650	0,700	0,643	0,733	0,839	0,850	0,645	0,713
	G	0,308	0,345	0,222	0,323	0,350	0,300	0,357	0,267	0,161	0,150	0,355	0,287
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
CAV3	C	0,365	0,190	0,250	0,355	0,450	0,233	0,554	0,350	0,323	0,300	0,258	0,331
	T	0,635	0,810	0,750	0,645	0,550	0,767	0,446	0,650	0,677	0,700	0,742	0,669
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
CFL1	T	0,135	0,431	0,306	0,468	0,600	0,467	0,589	0,367	0,307	0,133	0,258	0,373
	C	0,865	0,569	0,694	0,532	0,400	0,533	0,411	0,633	0,694	0,867	0,742	0,627
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
CHRNE g.1145del20	T	0,000	0,000	0,306	0,065	0,017	0,017	0,000	0,017	0,086	0,067	0,048	0,048
	C	1,000	1,000	0,694	0,936	0,983	0,983	1,000	0,983	0,914	0,933	0,952	0,952
	N	26	29	18	31	30	29	28	30	29	30	31	311
CPT1	G	1,000	0,983	1,000	0,983	0,983	1,000	0,981	1,000	1,000	0,914	0,977	0,983
	C	0,000	0,017	0,000	0,017	0,017	0,000	0,019	0,000	0,000	0,086	0,023	0,017
	N	26	29	15	30	30	30	26	30	31	29	22	298
CRH g.22 CbG	G	0,458	0,679	0,533	0,629	0,579	0,567	0,893	0,732	0,533	0,667	0,539	0,625
	C	0,542	0,321	0,467	0,371	0,421	0,433	0,107	0,268	0,467	0,333	0,462	0,375
	N	24	28	15	31	19	30	28	28	30	24	26	283
CRI1	T	0,091	0,000	0,167	0,184	0,075	0,200	0,167	0,036	0,150	0,260	0,135	0,138
	G	0,909	1,000	0,833	0,816	0,925	0,800	0,833	0,964	0,850	0,740	0,865	0,862
	N	11	19	18	19	20	30	27	28	30	25	26	253
CRYAB	T	0,120	0,000	0,250	0,210	0,283	0,150	0,179	0,233	0,177	0,233	0,121	0,177
	C	0,880	1,000	0,750	0,790	0,717	0,850	0,821	0,767	0,823	0,767	0,879	0,823
	N	25	29	18	31	30	30	28	30	31	30	29	311
CTSF	G	1,000	0,800	0,559	0,891	0,885	0,844	0,727	0,683	0,946	0,974	0,886	0,827
	A	0,000	0,200	0,441	0,109	0,115	0,156	0,273	0,317	0,054	0,026	0,114	0,173
	N	4	10	17	23	26	16	22	30	28	19	22	217
CYP1A1	A	0,019	0,035	0,056	0,177	0,067	0,283	0,125	0,133	0,323	0,033	0,274	0,145
	G	0,981	0,966	0,944	0,823	0,933	0,717	0,875	0,867	0,677	0,967	0,726	0,855
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
DGAT1 g.6829 AbG	G	0,558	0,879	0,906	0,903	0,900	0,983	0,537	0,672	0,750	0,733	0,667	0,772
	A	0,442	0,121	0,094	0,097	0,100	0,017	0,463	0,328	0,250	0,267	0,333	0,228
	N	26	29	16	31	30	30	27	29	30	30	27	305
DNAJA1	T	0,540	0,431	0,833	0,783	0,655	0,817	0,500	0,683	0,903	0,500	0,862	0,681
	C	0,460	0,569	0,167	0,217	0,345	0,183	0,500	0,317	0,097	0,500	0,138	0,319
	N	25	29	18	30	29	30	28	30	31	30	29	309
FABP4	G	0,462	0,345	0,625	0,483	0,517	0,433	0,375	0,433	0,321	0,333	0,483	0,430
	C	0,539	0,655	0,375	0,517	0,483	0,567	0,625	0,567	0,679	0,667	0,517	0,570
	N	26	29	16	30	30	30	28	30	28	30	29	306
FADS1	T	0,481	0,466	0,333	0,419	0,667	0,654	0,661	0,617	0,597	0,650	0,694	0,576
	C	0,519	0,535	0,667	0,581	0,333	0,346	0,339	0,383	0,403	0,350	0,307	0,424
	N	26	29	18	31	30	26	28	30	31	30	31	310

(continuación)

Locus	Alelos	HOLS.	D. RED	SIMM.	LIM.	CHA.	PIEDM.	MARCH.	A. VALLE	CASINA	AVILENA	PIREN.	Global
FIT2	C	0,154	0,345	0,250	0,307	0,196	0,150	0,393	0,433	0,339	0,196	0,436	0,295
	A	0,846	0,655	0,750	0,694	0,804	0,850	0,607	0,567	0,661	0,804	0,565	0,705
	N	26	29	18	31	28	30	28	30	31	28	31	310
GDF8	G	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,317	1,000	1,000	0,887	0,921
	C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,683	0,000	0,000	0,113	0,079
	N	26	27	18	30	30	30	28	30	31	30	31	311
GDF8_F94L	C	1,000	1,000	1,000	0,016	0,983	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,694	0,869
	A	0,000	0,000	0,000	0,984	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,307	0,131
	N	26	25	17	31	30	30	28	30	31	30	31	309
GDF8_Q204X	C	1,000	1,000	1,000	0,984	0,833	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	0,936	0,973
	T	0,000	0,000	0,000	0,016	0,167	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,065	0,027
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	30	30	31	313
GHR g.4962 TbA	T	0,865	0,966	0,917	0,984	0,950	0,817	1,000	0,897	1,000	0,967	0,952	0,939
	A	0,135	0,035	0,083	0,016	0,050	0,183	0,000	0,103	0,000	0,033	0,048	0,061
	N	26	29	18	31	30	30	28	29	31	30	31	313
GLUT4	G	0,827	0,793	1,000	1,000	1,000	0,900	0,982	0,983	1,000	0,967	0,984	0,949
	A	0,173	0,207	0,000	0,000	0,000	0,100	0,018	0,017	0,000	0,033	0,016	0,051
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
HSPB1	T	0,039	0,086	0,607	0,016	0,217	0,133	0,054	0,317	0,129	0,185	0,183	0,159
	C	0,962	0,914	0,393	0,984	0,783	0,867	0,946	0,683	0,871	0,815	0,817	0,842
	N	26	29	14	31	30	30	28	30	31	27	30	306
IGF2R	A	0,058	0,276	0,333	0,145	0,217	0,183	0,089	0,167	0,065	0,150	0,290	0,175
	G	0,942	0,724	0,667	0,855	0,783	0,817	0,911	0,833	0,936	0,850	0,710	0,825
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
INSIG2	A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	T	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
LEP	T	0,039	0,103	0,083	0,065	0,083	0,018	0,107	0,069	0,150	0,224	0,097	0,096
	A	0,962	0,897	0,917	0,936	0,917	0,982	0,893	0,931	0,850	0,776	0,903	0,905
	N	26	29	18	31	30	28	28	29	30	29	31	309
LEP g.198 CbT	T	0,400	0,586	0,222	0,419	0,300	0,150	0,536	0,433	0,800	0,533	0,446	0,447
	C	0,600	0,414	0,778	0,581	0,700	0,850	0,464	0,567	0,200	0,467	0,554	0,553
	N	25	29	18	31	30	30	28	30	30	30	28	309
LOX g.7548 CbT	C	0,712	0,466	0,528	0,565	0,583	0,707	0,580	0,648	0,550	0,655	0,677	0,608
	T	0,289	0,535	0,472	0,436	0,417	0,293	0,420	0,352	0,450	0,345	0,323	0,392
	N	26	29	18	31	30	29	25	27	30	29	31	305
LPL	T	0,096	0,052	0,056	0,000	0,100	0,050	0,000	0,000	0,083	0,086	0,016	0,050
	C	0,904	0,948	0,944	1,000	0,900	0,950	1,000	1,000	0,917	0,914	0,984	0,950
	N	26	29	18	31	30	30	28	29	30	29	31	311
ME3	A	0,673	0,500	0,278	0,371	0,483	0,133	0,750	0,350	0,433	0,533	0,065	0,414
	G	0,327	0,500	0,722	0,629	0,517	0,867	0,250	0,650	0,567	0,467	0,936	0,587
	N	26	28	18	31	30	30	28	30	30	30	31	312
MGAT1	T	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,929	0,983	0,968	1,000	1,000	0,989
	C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,017	0,032	0,000	0,000	0,011
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
MMP1	G	0,846	0,828	1,000	0,952	0,950	0,950	0,768	0,800	0,984	0,933	0,887	0,898
	A	0,154	0,172	0,000	0,048	0,050	0,050	0,232	0,200	0,016	0,067	0,113	0,102
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
OPN g.3492	G	0,568	0,411	0,342	0,411	0,077	0,411	0,074	0,278	0,250	0,238	0,379	0,312
	A	0,432	0,589	0,658	0,589	0,923	0,589	0,926	0,722	0,750	0,762	0,621	0,688
	N	22	28	19	28	26	28	27	27	24	21	29	279
OPN g.10043	T	0,611	0,810	0,964	0,532	0,783	0,848	0,262	0,931	0,789	0,261	0,767	0,688
	C	0,389	0,191	0,036	0,468	0,217	0,152	0,738	0,069	0,212	0,739	0,233	0,312
	N	18	21	14	31	30	23	21	29	26	23	30	266
OPN g.1406	T	0,696	0,833	0,639	0,911	1,000	0,707	0,982	0,821	0,789	0,891	0,714	0,821
	C	0,304	0,167	0,361	0,089	0,000	0,293	0,019	0,179	0,212	0,109	0,286	0,179
	N	23	27	18	28	25	29	27	28	26	23	28	282
PCSK1	T	0,135	0,379	0,389	0,484	0,450	0,283	0,143	0,617	0,694	0,345	0,500	0,408
	C	0,865	0,621	0,611	0,516	0,550	0,717	0,857	0,383	0,307	0,655	0,500	0,592
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	29	29	311
PLOD3	A	0,077	0,035	0,222	0,048	0,267	0,150	0,125	0,133	0,000	0,133	0,113	0,115
	G	0,923	0,966	0,778	0,952	0,733	0,850	0,875	0,867	1,000	0,867	0,887	0,885
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
PLTP	A	0,289	0,276	0,417	0,710	0,400	0,633	0,696	0,586	0,290	0,638	0,482	0,497
	G	0,712	0,724	0,583	0,290	0,600	0,367	0,304	0,414	0,710	0,362	0,518	0,503
	N	26	29	18	31	30	30	28	29	31	29	28	309
POMC g.437del1	C	1,000	1,000	0,583	0,636	0,889	0,848	0,889	0,929	0,929	0,844	0,650	0,833
	T	0,000	0,000	0,417	0,364	0,111	0,152	0,111	0,071	0,071	0,156	0,350	0,167
	N	8	12	18	11	9	23	27	14	14	16	10	162
PPARG	G	0,885	0,810	0,861	0,823	0,750	0,883	0,893	0,900	0,897	0,944	0,839	0,861
	A	0,115	0,190	0,139	0,177	0,250	0,117	0,107	0,100	0,103	0,056	0,161	0,139
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	29	27	31	309

(continuación)

Locus	Alelos	HOLS.	D. RED	SIMM.	LIM.	CHA.	PIEDM.	MARCH.	A. VALLE	CASINA	AVILEÑA	PIREN.	Global
PPARGC1A ex8_1209	T	0,658	0,727	0,269	0,717	0,914	0,674	0,762	0,759	0,926	0,717	0,883	0,758
	C	0,342	0,273	0,731	0,283	0,086	0,326	0,238	0,241	0,074	0,283	0,117	0,243
	N	19	22	13	30	29	23	21	29	27	23	30	266
PPARGC1A	T	0,000	0,023	0,077	0,210	0,317	0,000	0,000	0,130	0,130	0,000	0,317	0,127
	C	1,000	0,977	0,923	0,790	0,683	1,000	1,000	0,870	0,870	1,000	0,683	0,873
	N	19	22	13	31	30	23	21	27	27	24	30	267
PPM2C	T	0,481	0,379	0,361	0,307	0,183	0,207	0,130	0,117	0,032	0,350	0,150	0,239
	C	0,519	0,621	0,639	0,694	0,817	0,793	0,870	0,883	0,968	0,650	0,850	0,761
	N	26	29	18	31	30	29	23	30	31	30	30	307
PRKAG2	G	0,385	0,155	0,143	0,210	0,083	0,267	0,286	0,150	0,081	0,117	0,327	0,198
	A	0,615	0,845	0,857	0,790	0,917	0,733	0,714	0,850	0,919	0,883	0,673	0,802
	N	26	29	14	31	30	30	28	30	31	30	26	305
RORA	A	0,000	0,086	0,028	0,017	0,117	0,133	0,018	0,100	0,000	0,052	0,033	0,055
	G	1,000	0,914	0,972	0,983	0,883	0,867	0,982	0,900	1,000	0,948	0,967	0,945
	N	26	29	18	29	30	30	28	30	31	29	30	310
RORC g.3290	A	0,731	0,638	0,778	0,717	0,917	0,717	0,643	0,733	0,500	0,817	0,613	0,706
	C	0,269	0,362	0,222	0,283	0,083	0,283	0,357	0,267	0,500	0,183	0,387	0,294
	N	26	29	18	30	30	30	28	30	31	30	31	313
SCAP	G	0,846	1,000	0,971	1,000	0,983	0,917	0,911	0,850	0,887	0,850	0,968	0,925
	A	0,154	0,000	0,029	0,000	0,017	0,083	0,089	0,150	0,113	0,150	0,032	0,075
	N	26	29	17	31	30	30	28	30	31	30	31	313
SCD g.10329 TbC	C	0,615	0,827	0,694	0,581	0,533	0,650	0,571	0,667	0,258	0,333	0,565	0,563
	T	0,385	0,173	0,306	0,419	0,467	0,350	0,429	0,333	0,742	0,667	0,436	0,437
	N	26	26	18	31	30	30	28	30	31	30	31	311
SOCS2B	T	0,096	0,086	0,111	0,065	0,183	0,267	0,054	0,217	0,267	0,121	0,097	0,144
	C	0,904	0,914	0,889	0,936	0,817	0,733	0,946	0,783	0,733	0,879	0,903	0,856
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	30	29	31	312
SREBP1C	T	0,500	0,293	0,708	0,161	0,233	0,350	0,232	0,233	0,400	0,345	0,258	0,314
	C	0,500	0,707	0,292	0,839	0,767	0,650	0,768	0,767	0,600	0,655	0,742	0,686
	N	26	29	12	31	30	30	28	30	30	29	31	306
SUSP1	A	0,904	0,845	0,694	0,968	0,733	0,833	0,893	0,650	0,758	0,800	0,855	0,815
	G	0,096	0,155	0,306	0,032	0,267	0,167	0,107	0,350	0,242	0,200	0,145	0,185
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314
TG g.1696 CbT	T	0,175	0,000	0,786	0,571	0,273	0,500	0,929	0,333	0,364	0,263	0,375	0,337
	C	0,825	1,000	0,214	0,429	0,727	0,500	0,071	0,667	0,636	0,737	0,625	0,663
	N	20	22	14	7	11	2	7	6	11	19	4	123
UCP2 g.812 GbA	C	0,019	0,103	0,083	0,290	0,143	0,133	0,111	0,250	0,224	0,308	0,267	0,181
	T	0,981	0,897	0,917	0,710	0,857	0,867	0,889	0,750	0,776	0,692	0,733	0,820
	N	26	29	18	31	28	30	27	28	29	26	30	302
VIM	T	0,385	0,483	0,583	0,887	0,683	0,683	0,679	0,717	0,387	0,667	0,887	0,647
	C	0,615	0,517	0,417	0,113	0,317	0,317	0,321	0,283	0,613	0,333	0,113	0,354
	N	26	29	18	31	30	30	28	30	31	30	31	314

ANEXO 3

SNP, razas, número de animales por genotipo, número total de animales por raza (N), heterocigosis observada (Hobs.), heterocigosis esperada (Hesp.), índice F_{IS} , p-valor y error estándar (S.E.) de la prueba de equilibrio de Hardy Weinberg.

ABCA1

genotipos									
	CC	CA	AA	N	Hobs	Hesp	F_{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	24	6	1	31	0,194	0,229	0,155	0,404	0,003
S. DEVON	14	9	0	23	0,391	0,320	-0,222	0,544	0,002
A. ANGUS	11	14	4	29	0,483	0,479	-0,008	1,000	0,000
HIGH.	24	2	0	26	0,077	0,075	-0,020	1,000	0,000
HOLS.	21	4	1	26	0,154	0,209	0,265	0,274	0,002
D. RED	12	14	3	29	0,483	0,459	-0,051	1,000	0,000
SIMM.	5	6	7	18	0,333	0,513	0,350	0,176	0,002
LIM.	20	7	3	30	0,233	0,347	0,328	0,102	0,002
CHA.	9	14	6	29	0,483	0,504	0,042	1,000	0,000
PIEDM.	5	18	7	30	0,600	0,505	-0,189	0,465	0,003
MARCH.	3	11	14	28	0,393	0,431	0,089	0,673	0,002
A. VALLE	21	9	0	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
CASINA	11	12	7	30	0,400	0,501	0,202	0,456	0,002
AVILEÑA	8	14	8	30	0,467	0,509	0,084	0,724	0,002
PIREN.	22	7	2	31	0,226	0,298	0,242	0,212	0,003

Total:	210	147	63	420
--------	-----	-----	----	-----

ACACA

genotipos									
	GG	AG	AA	N	Hobs	Hesp	F_{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	24	0	0	24	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	29	0	0	29	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	17	9	0	26	0,346	0,291	-0,191	1,000	0,000
D. RED	15	14	0	29	0,483	0,371	-0,302	0,156	0,002
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	24	6	0	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
MARCH.	27	1	0	28	0,036	0,036	0,000	-	
A. VALLE	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	28	2	0	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
PIREN.	30	1	0	31	0,032	0,032	0,000	-	

Total:	391	34		425
--------	-----	----	--	-----

ACAT2

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	2	6	19	27	0,222	0,309	0,281	0,188	0,002
S. DEVON	5	10	4	19	0,526	0,512	-0,029	1,000	0,000
A. ANGUS	5	12	3	20	0,600	0,505	-0,188	0,651	0,001
HIGH.	1	7	12	20	0,350	0,358	0,022	1,000	0,000
HOLS.	7	12	7	26	0,462	0,511	0,096	0,705	0,002
D. RED	2	20	7	29	0,690	0,490	-0,407	0,053	0,002
SIMM.	8	8	2	18	0,444	0,458	0,029	1,000	0,000
LIM.	5	16	10	31	0,516	0,495	-0,044	1,000	0,000
CHA.	3	9	18	30	0,300	0,383	0,216	0,328	0,002
PIEDM.	2	18	10	30	0,600	0,470	-0,276	0,234	0,002
MARCH.	7	14	7	28	0,500	0,509	0,018	1,000	0,000
A. VALLE	12	10	7	29	0,345	0,496	0,305	0,132	0,002
CASINA	18	8	4	30	0,267	0,400	0,333	0,145	0,002
AVILEÑA	8	18	3	29	0,621	0,491	-0,263	0,246	0,003
PIREN.	5	17	9	31	0,548	0,499	-0,099	0,716	0,002
Total:	90	185	122	397					

ALDH2

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	18	11	1	30	0,367	0,345	-0,063	1,000	0,000
S. DEVON	17	3	1	21	0,143	0,217	0,341	0,233	0,002
A. ANGUS	10	14	6	30	0,467	0,500	0,067	1,000	0,000
HIGH.	10	9	4	23	0,391	0,478	0,182	0,408	0,003
HOLS.	12	14	0	26	0,539	0,399	-0,351	0,133	0,002
D. RED	19	8	2	29	0,276	0,335	0,177	0,561	0,001
SIMM.	3	6	9	18	0,333	0,461	0,277	0,312	0,002
LIM.	10	18	3	31	0,581	0,481	-0,208	0,283	0,003
CHA.	16	14	0	30	0,467	0,362	-0,289	0,294	0,003
PIEDM.	8	14	7	29	0,483	0,509	0,051	1,000	0,000
MARCH.	13	13	1	27	0,482	0,407	-0,182	0,630	0,002
A. VALLE	14	15	0	29	0,517	0,388	-0,333	0,142	0,002
CASINA	17	9	4	30	0,300	0,415	0,277	0,180	0,002
AVILEÑA	7	16	7	30	0,533	0,508	-0,050	1,000	0,000
PIREN.	4	18	9	31	0,581	0,494	-0,177	0,464	0,003
Total:	178	182	54	414					

CAPN1 g.6545

genotipos									
	GG	AG	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	7	23	2	32	0,719	0,492	-0,461	0,014	0,001
S. DEVON	4	16	3	23	0,696	0,506	-0,375	0,105	0,002
A. ANGUS	9	14	6	29	0,483	0,504	0,042	1,000	0,000
HIGH.	1	7	15	23	0,304	0,322	0,055	1,000	0,000
HOLS.	9	15	1	25	0,600	0,455	-0,319	0,183	0,002
D. RED	9	20	0	29	0,690	0,456	-0,514	0,009	0,001
SIMM.	1	6	11	18	0,333	0,356	0,064	1,000	0,000
LIM.	8	9	12	29	0,310	0,503	0,382	0,056	0,002
CHA.	11	13	6	30	0,433	0,495	0,125	0,705	0,002
PIEDM.	11	17	2	30	0,567	0,461	-0,229	0,254	0,003
MARCH.	9	11	8	28	0,393	0,511	0,231	0,271	0,003
A. VALLE	16	8	6	30	0,267	0,455	0,414	0,040	0,001
CASINA	5	15	11	31	0,484	0,489	0,011	1,000	0,000
AVILEÑA	13	8	9	30	0,267	0,503	0,470	0,024	0,001
PIREN.	12	9	10	31	0,290	0,510	0,430	0,029	0,001
Total:	125	191	102	418					

CAPN1 g.5709

genotipos									
	CC	CG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	6	15	8	29	0,517	0,506	-0,022	1,000	0,000
S. DEVON	2	4	15	21	0,191	0,319	0,403	0,116	0,002
A. ANGUS	2	4	23	29	0,138	0,244	0,434	0,061	0,001
HIGH.	0	1	20	21	0,048	0,048	0,000	-	
HOLS.	8	8	9	25	0,320	0,513	0,377	0,104	0,002
D. RED	2	1	25	28	0,036	0,168	0,787	0,005	0,000
SIMM.	0	2	16	18	0,111	0,108	-0,030	1,000	0,000
LIM.	2	5	24	31	0,161	0,254	0,364	0,093	0,001
CHA.	1	6	23	30	0,200	0,236	0,151	0,415	0,002
PIEDM.	0	2	28	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
MARCH.	0	5	23	28	0,179	0,165	-0,080	1,000	0,000
A. VALLE	0	3	26	29	0,103	0,100	-0,037	1,000	0,000
CASINA	0	6	24	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
AVILEÑA	4	5	21	30	0,167	0,348	0,522	0,013	0,001
PIREN.	0	0	30	30	0,000	0,000	-		
Total:	27	67	315	409					

CAPN1 g.4558

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	3	12	17	32	0,375	0,411	0,088	0,675	0,002
S. DEVON	1	6	17	24	0,250	0,284	0,121	0,506	0,002
A. ANGUS	1	13	16	30	0,433	0,381	-0,139	0,638	0,002
HIGH.	16	10	1	27	0,370	0,352	-0,053	1,000	0,000
HOLS.	0	9	17	26	0,346	0,291	-0,191	1,000	0,000
D. RED	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
SIMM.	8	8	2	18	0,444	0,458	0,029	1,000	0,000
LIM.	5	14	12	31	0,452	0,483	0,065	1,000	0,000
CHA.	3	9	18	30	0,300	0,383	0,216	0,326	0,003
PIEDM.	4	9	17	30	0,300	0,415	0,277	0,178	0,002
MARCH.	5	11	11	27	0,407	0,486	0,161	0,440	0,002
A. VALLE	3	17	10	30	0,567	0,479	-0,182	0,441	0,003
CASINA	1	11	19	31	0,355	0,337	-0,054	1,000	0,000
AVILEÑA	1	13	16	30	0,433	0,381	-0,139	0,638	0,002
PIREN.	9	16	6	31	0,516	0,503	-0,026	1,000	0,000
Total:	60	163	203	426					

CAPN1 g.4751

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	2	12	16	30	0,400	0,398	-0,006	1,000	0,000
S. DEVON	0	7	18	25	0,280	0,245	-0,143	1,000	0,001
A. ANGUS	4	14	9	27	0,519	0,492	-0,055	1,000	0,000
HIGH.	17	9	1	27	0,333	0,331	-0,009	1,000	0,002
HOLS.	0	11	13	24	0,458	0,359	-0,278	0,289	0,002
D. RED	0	5	22	27	0,185	0,171	-0,083	1,000	0,003
SIMM.	10	7	1	18	0,389	0,386	-0,009	1,000	0,000
LIM.	11	8	8	27	0,296	0,507	0,416	0,050	0,000
CHA.	8	9	8	25	0,360	0,513	0,299	0,227	0,002
PIEDM.	2	15	12	29	0,517	0,447	-0,157	0,671	0,000
MARCH.	6	13	7	26	0,500	0,509	0,018	1,000	0,002
A. VALLE	5	13	10	28	0,464	0,493	0,059	1,000	0,003
CASINA	5	17	6	28	0,607	0,507	-0,198	0,448	0,000
AVILEÑA	7	8	7	22	0,364	0,515	0,294	0,218	0,002
PIREN.	7	16	6	29	0,552	0,507	-0,087	0,719	0,003
Total:	84	164	144	392					

|CAST

genotipos									
	CC	CG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	2	30	32	0,063	0,062	-0,016	1,000	0,000
S. DEVON	0	10	14	24	0,417	0,335	-0,243	0,539	0,002
A. ANGUS	2	16	11	29	0,552	0,458	-0,204	0,417	0,003
HIGH.	0	4	23	27	0,148	0,140	-0,061	1,000	0,000
HOLS.	4	10	12	26	0,385	0,463	0,169	0,424	0,003
D. RED	5	18	6	29	0,621	0,506	-0,226	0,279	0,003
SIMM.	7	7	4	18	0,389	0,503	0,227	0,375	0,003
LIM.	4	14	13	31	0,452	0,466	0,030	1,000	0,000
CHA.	0	20	10	30	0,667	0,448	-0,487	0,011	0,001
PIEDM.	7	9	14	30	0,300	0,484	0,380	0,056	0,001
MARCH.	1	11	16	28	0,393	0,362	-0,084	1,000	0,000
A. VALLE	1	14	15	30	0,467	0,397	-0,177	0,639	0,002
CASINA	0	7	24	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
AVILEÑA	10	10	10	30	0,333	0,512	0,348	0,075	0,002
PIREN.	5	10	16	31	0,323	0,446	0,277	0,211	0,002
Total:	46	162	218	426					

CAST g.2959

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	18	14	0	32	0,438	0,346	-0,265	0,296	0,002
S. DEVON	17	6	1	24	0,250	0,284	0,121	0,501	0,002
A. ANGUS	23	7	0	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,000
HIGH.	24	3	0	27	0,111	0,107	-0,040	1,000	0,000
HOLS.	12	12	2	26	0,462	0,434	-0,064	1,000	0,000
D. RED	12	14	3	29	0,483	0,459	-0,051	1,000	0,000
SIMM.	10	8	0	18	0,444	0,353	-0,259	0,527	0,002
LIM.	13	16	2	31	0,516	0,443	-0,165	0,436	0,002
CHA.	13	13	4	30	0,433	0,463	0,065	1,000	0,000
PIEDM.	13	16	1	30	0,533	0,425	-0,254	0,217	0,003
MARCH.	8	20	0	28	0,714	0,463	-0,543	0,004	0,000
A. VALLE	14	16	0	30	0,533	0,395	-0,349	0,074	0,001
CASINA	21	10	0	31	0,323	0,274	-0,177	0,570	0,001
AVILEÑA	21	9	0	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
PIREN.	11	18	2	31	0,581	0,463	-0,253	0,244	0,002
Total:	230	182	15	427					

CAV3

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	4	16	12	32	0,500	0,476	-0,051	1,000	0,000
S. DEVON	0	5	18	23	0,217	0,198	-0,100	1,000	0,000
A. ANGUS	4	8	17	29	0,276	0,409	0,325	0,150	0,002
HIGH.	6	18	2	26	0,692	0,494	-0,402	0,056	0,002
HOLS.	3	13	10	26	0,500	0,472	-0,059	1,000	0,000
D. RED	1	9	19	29	0,310	0,313	0,008	1,000	0,000
SIMM.	1	7	10	18	0,389	0,386	-0,009	1,000	0,000
LIM.	4	14	13	31	0,452	0,466	0,030	1,000	0,000
CHA.	5	17	8	30	0,567	0,502	-0,128	0,709	0,001
PIEDM.	0	14	16	30	0,467	0,362	-0,289	0,297	0,003
MARCH.	11	9	8	28	0,321	0,507	0,366	0,067	0,002
A. VALLE	4	13	13	30	0,433	0,463	0,065	1,000	0,000
CASINA	3	14	14	31	0,452	0,444	-0,017	1,000	0,000
AVILEÑA	4	10	16	30	0,333	0,429	0,223	0,375	0,002
PIREN.	0	16	15	31	0,516	0,387	-0,333	0,147	0,002
Total:	50	183	191	424					

CFL1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	8	18	6	32	0,563	0,505	-0,114	0,720	0,002
S. DEVON	0	2	22	24	0,083	0,082	-0,022	1,000	0,000
A. ANGUS	1	5	24	30	0,167	0,210	0,208	0,325	0,002
HIGH.	0	5	22	27	0,185	0,171	-0,083	1,000	0,000
HOLS.	0	7	19	26	0,269	0,237	-0,136	1,000	0,000
D. RED	7	11	11	29	0,379	0,501	0,243	0,258	0,002
SIMM.	1	9	8	18	0,500	0,435	-0,150	1,000	0,000
LIM.	7	15	9	31	0,484	0,507	0,045	1,000	0,000
CHA.	11	14	5	30	0,467	0,489	0,045	1,000	0,000
PIEDM.	8	12	10	30	0,400	0,508	0,213	0,287	0,002
MARCH.	9	15	4	28	0,536	0,492	-0,089	0,708	0,002
A. VALLE	4	14	12	30	0,467	0,472	0,012	1,000	0,000
CASINA	2	15	14	31	0,484	0,431	-0,122	0,678	0,002
AVILEÑA	2	4	24	30	0,133	0,237	0,437	0,056	0,001
PIREN.	0	16	15	31	0,516	0,387	-0,333	0,147	0,002
Total:	60	162	205	427					

|CHRNE g.1145del20

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	1	27	28	0,036	0,036	0,000	-	
S. DEVON	0	0	21	21	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	0	1	28	29	0,035	0,035	0,000	-	
HIGH.	0	0	23	23	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	0	0	26	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	0	0	29	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	1	9	8	18	0,500	0,435	-0,150	1,000	0,000
LIM.	0	4	27	31	0,129	0,123	-0,053	1,000	0,000
CHA.	0	1	29	30	0,033	0,033	0,000	-	
PIEDM.	0	1	28	29	0,035	0,035	0,000	-	
MARCH.	0	0	28	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	0	1	29	30	0,033	0,033	0,000	-	
CASINA	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
AVILEÑA	1	2	27	30	0,067	0,128	0,478	0,102	0,001
PIREN.	0	3	28	31	0,097	0,094	-0,035	1,000	0,000
Total:	2	28	382	412					

CPT1

genotipos									
	GG	CG	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	22	0	0	22	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	28	1	0	29	0,035	0,035	0,000	-	
SIMM.	15	0	0	15	0,000	0,000	-	-	
LIM.	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
CHA.	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
PIEDM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	25	1	0	26	0,039	0,039	0,000	-	
A. VALLE	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	25	3	1	29	0,103	0,161	0,359	0,173	0,002
PIREN.	21	1	0	22	0,046	0,046	0,000	-	
Total:	397	8	1	406					

CRH g.22 CbG

genotipos									
	GG	GC	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	4	11	16	31	0,355	0,433	0,181	0,408	0,002
S. DEVON	16	2	0	18	0,111	0,108	-0,030	1,000	0,000
A. ANGUS	5	5	15	25	0,200	0,433	0,539	0,012	0,001
HIGH.	18	5	0	23	0,217	0,198	-0,100	1,000	0,000
HOLS.	7	8	9	24	0,333	0,511	0,348	0,111	0,002
D. RED	15	8	5	28	0,286	0,447	0,361	0,085	0,002
SIMM.	3	10	2	15	0,667	0,510	-0,308	0,328	0,003
LIM.	13	13	5	31	0,419	0,475	0,118	0,703	0,002
CHA.	10	2	7	19	0,105	0,512	0,794	0,000	0,000
PIEDM.	11	12	7	30	0,400	0,501	0,202	0,453	0,002
MARCH.	22	6	0	28	0,214	0,194	-0,102	1,000	0,000
A. VALLE	17	7	4	28	0,250	0,402	0,378	0,064	0,002
CASINA	10	12	8	30	0,400	0,508	0,213	0,285	0,003
AVILEÑA	11	10	3	24	0,417	0,455	0,084	1,000	0,000
PIREN.	6	16	4	26	0,615	0,505	-0,220	0,428	0,002
Total:	168	127	85	380					

CRI1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	2	27	29	0,069	0,068	-0,018	1,000	0,000
S. DEVON	0	1	22	23	0,044	0,044	0,000	-	
A. ANGUS	0	0	27	27	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	1	12	10	23	0,522	0,431	-0,211	0,621	0,002
HOLS.	0	2	9	11	0,182	0,173	-0,053	1,000	0,000
D. RED	0	0	19	19	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	0	6	12	18	0,333	0,284	-0,172	1,000	0,000
LIM.	0	7	12	19	0,368	0,307	-0,200	1,000	0,000
CHA.	0	3	17	20	0,150	0,142	-0,056	1,000	0,000
PIEDM.	0	12	18	30	0,400	0,324	-0,234	0,559	0,001
MARCH.	0	9	18	27	0,333	0,282	-0,182	1,000	0,000
A. VALLE	0	2	26	28	0,071	0,070	-0,019	1,000	0,000
CASINA	0	9	21	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
AVILEÑA	1	11	13	25	0,440	0,392	-0,123	1,000	0,000
PIREN.	1	5	20	26	0,192	0,239	0,194	0,370	0,002
Total:	3	81	271	355					

CRYAB

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	23	8	31	0,742	0,470	-0,579	0,002	0,000
S. DEVON	0	10	13	23	0,435	0,346	-0,257	0,540	0,002
A. ANGUS	0	14	15	29	0,483	0,371	-0,302	0,155	0,002
HIGH.	0	15	12	27	0,556	0,406	-0,368	0,140	0,002
HOLS.	0	6	19	25	0,240	0,215	-0,116	1,000	0,000
D. RED	0	0	29	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	2	5	11	18	0,278	0,389	0,286	0,259	0,002
LIM.	0	13	18	31	0,419	0,336	-0,250	0,295	0,002
CHA.	3	11	16	30	0,367	0,414	0,114	0,653	0,003
PIEDM.	1	7	22	30	0,233	0,260	0,102	0,503	0,001
MARCH.	0	10	18	28	0,357	0,298	-0,200	0,555	0,001
A. VALLE	2	10	18	30	0,333	0,364	0,085	0,630	0,002
CASINA	0	11	20	31	0,355	0,296	-0,200	0,553	0,001
AVILEÑA	0	14	16	30	0,467	0,362	-0,289	0,299	0,002
PIREN.	1	5	23	29	0,172	0,217	0,205	0,341	0,002
Total:	9	154	258	421					

CTSF

genotipos									
	GG	GA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	21	2	4	27	0,074	0,312	0,763	0,001	0,000
S. DEVON	9	4	1	14	0,286	0,352	0,188	0,489	0,002
A. ANGUS	12	4	8	24	0,167	0,504	0,669	0,002	0,000
HIGH.	2	9	14	25	0,360	0,393	0,085	0,639	0,002
HOLS.	4	0	0	4	0,000	0,000	-	-	
D. RED	7	2	1	10	0,200	0,344	0,419	0,304	0,002
SIMM.	6	7	4	17	0,412	0,511	0,194	0,624	0,002
LIM.	18	5	0	23	0,217	0,198	-0,100	1,000	0,000
CHA.	20	6	0	26	0,231	0,208	-0,111	1,000	0,000
PIEDM.	11	5	0	16	0,313	0,271	-0,154	1,000	0,000
MARCH.	11	10	1	22	0,455	0,405	-0,123	1,000	0,000
A. VALLE	14	13	3	30	0,433	0,440	0,016	1,000	0,000
CASINA	25	3	0	28	0,107	0,103	-0,039	1,000	0,000
AVILEÑA	18	1	0	19	0,053	0,053	0,000	-	
PIREN.	19	1	2	22	0,046	0,210	0,784	0,008	0,001
Total:	197	72	38	307					

CYP1A1

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	4	28	32	0,125	0,119	-0,051	1,000	0,000
S. DEVON	0	11	13	24	0,458	0,359	-0,278	0,289	0,002
A. ANGUS	0	1	29	30	0,033	0,033	0,000	-	
HIGH.	0	0	27	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	0	1	25	26	0,039	0,039	0,000	-	
D. RED	0	2	27	29	0,069	0,068	-0,018	1,000	0,000
SIMM.	0	2	16	18	0,111	0,108	-0,030	1,000	0,000
LIM.	1	9	21	31	0,290	0,297	0,022	1,000	0,000
CHA.	0	4	26	30	0,133	0,126	-0,055	1,000	0,000
PIEDM.	4	9	17	30	0,300	0,415	0,277	0,179	0,003
MARCH.	2	3	23	28	0,107	0,225	0,524	0,036	0,001
A. VALLE	1	6	23	30	0,200	0,236	0,151	0,419	0,002
CASINA	2	16	13	31	0,516	0,443	-0,165	0,439	0,002
AVILEÑA	0	2	28	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
PIREN.	2	13	16	31	0,419	0,404	-0,037	1,000	0,000
Total:	12	83	332	427	0,200	0,028			

DGAT1 g.6829 AbG

genotipos									
	GG	AG	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	5	12	11	28	0,429	0,487	0,120	0,694	0,001
S. DEVON	22	0	0	22	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	12	12	5	29	0,414	0,480	0,139	0,688	0,002
HIGH.	22	5	0	27	0,185	0,171	-0,083	1,000	0,000
HOLS.	7	15	4	26	0,577	0,502	-0,150	0,690	0,002
D. RED	22	7	0	29	0,241	0,216	-0,120	1,000	0,000
SIMM.	13	3	0	16	0,188	0,175	-0,071	1,000	0,000
LIM.	25	6	0	31	0,194	0,177	-0,091	1,000	0,000
CHA.	24	6	0	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
PIEDM.	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
MARCH.	6	17	4	27	0,630	0,504	-0,249	0,255	0,003
A. VALLE	15	9	5	29	0,310	0,451	0,312	0,107	0,002
CASINA	17	11	2	30	0,367	0,382	0,039	1,000	0,000
AVILEÑA	18	8	4	30	0,267	0,400	0,333	0,148	0,002
PIREN.	12	12	3	27	0,444	0,453	0,019	1,000	0,000
Total:	249	124	38	411					

DNAJA1

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	2	16	13	31	0,516	0,443	-0,165	0,433	0,003
S. DEVON	16	7	1	24	0,292	0,312	0,064	1,000	0,000
A. ANGUS	13	15	2	30	0,500	0,439	-0,139	0,674	0,002
HIGH.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	7	13	5	25	0,520	0,507	-0,026	1,000	0,000
D. RED	5	15	9	29	0,517	0,499	-0,037	1,000	0,000
SIMM.	12	6	0	18	0,333	0,284	-0,172	1,000	0,000
LIM.	17	13	0	30	0,433	0,344	-0,261	0,290	0,002
CHA.	13	12	4	29	0,414	0,461	0,102	0,685	0,002
PIEDM.	21	7	2	30	0,233	0,306	0,237	0,221	0,003
MARCH.	8	12	8	28	0,429	0,511	0,161	0,464	0,004
A. VALLE	12	17	1	30	0,567	0,438	-0,294	0,201	0,002
CASINA	26	4	1	31	0,129	0,179	0,277	0,231	0,002
AVILEÑA	7	16	7	30	0,533	0,508	-0,050	1,000	0,000
PIREN.	21	8	0	29	0,276	0,241	-0,143	1,000	0,000
Total:	206	161	53	420					

FABP4

genotipos									
	GG	CG	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	2	20	9	31	0,645	0,480	-0,345	0,072	0,002
S. DEVON	7	9	6	22	0,409	0,513	0,203	0,413	0,003
A. ANGUS	8	8	13	29	0,276	0,498	0,446	0,024	0,001
HIGH.	22	4	0	26	0,154	0,145	-0,064	1,000	0,000
HOLS.	7	10	9	26	0,385	0,509	0,245	0,255	0,003
D. RED	5	10	14	29	0,345	0,462	0,253	0,227	0,003
SIMM.	7	6	3	16	0,375	0,488	0,231	0,591	0,001
LIM.	8	13	9	30	0,433	0,509	0,149	0,479	0,003
CHA.	7	17	6	30	0,567	0,507	-0,118	0,717	0,002
PIEDM.	6	14	10	30	0,467	0,500	0,067	1,000	0,000
MARCH.	4	13	11	28	0,464	0,478	0,028	1,000	0,000
A. VALLE	5	16	9	30	0,533	0,499	-0,069	1,000	0,000
CASINA	2	14	12	28	0,500	0,443	-0,128	0,669	0,001
AVILEÑA	3	14	13	30	0,467	0,452	-0,033	1,000	0,000
PIREN.	6	16	7	29	0,552	0,507	-0,087	0,720	0,002
Total:	99	184	131	414					

FADS1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	3	8	16	27	0,296	0,393	0,246	0,308	0,002
S. DEVON	2	7	10	19	0,368	0,424	0,131	0,608	0,002
A. ANGUS	7	15	6	28	0,536	0,508	-0,055	1,000	0,000
HIGH.	11	2	9	22	0,091	0,517	0,824	0,000	0,000
HOLS.	6	13	7	26	0,500	0,509	0,018	1,000	0,000
D. RED	7	13	9	29	0,448	0,507	0,117	0,710	0,002
SIMM.	2	8	8	18	0,444	0,458	0,029	1,000	0,000
LIM.	4	18	9	31	0,581	0,494	-0,177	0,464	0,004
CHA.	15	10	5	30	0,333	0,454	0,266	0,215	0,002
PIEDM.	11	12	3	26	0,462	0,462	0,000	1,000	0,000
MARCH.	11	15	2	28	0,536	0,455	-0,177	0,424	0,003
A. VALLE	11	15	4	30	0,500	0,481	-0,041	1,000	0,000
CASINA	11	15	5	31	0,484	0,489	0,011	1,000	0,000
AVILEÑA	14	11	5	30	0,367	0,464	0,210	0,417	0,003
PIREN.	14	15	2	31	0,484	0,431	-0,122	0,678	0,002
Total:	129	177	100	406					

FIT2

genotipos									
	CC	CA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	1	13	17	31	0,419	0,372	-0,127	0,646	0,002
S. DEVON	2	17	3	22	0,773	0,504	-0,532	0,029	0,001
A. ANGUS	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
HIGH.	0	0	27	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	0	8	18	26	0,308	0,265	-0,163	1,000	0,000
D. RED	2	16	11	29	0,552	0,458	-0,204	0,417	0,002
SIMM.	2	5	11	18	0,278	0,389	0,286	0,260	0,003
LIM.	2	15	14	31	0,484	0,431	-0,122	0,677	0,002
CHA.	3	5	20	28	0,179	0,324	0,449	0,038	0,001
PIEDM.	1	7	22	30	0,233	0,260	0,102	0,507	0,002
MARCH.	3	16	9	28	0,571	0,484	-0,180	0,441	0,003
A. VALLE	7	12	11	30	0,400	0,501	0,202	0,455	0,002
CASINA	5	11	15	31	0,355	0,457	0,224	0,248	0,002
AVILEÑA	1	9	18	28	0,321	0,321	0,000	1,000	0,000
PIREN.	7	13	11	31	0,419	0,501	0,163	0,463	0,003
Total:	36	152	231	419					

GDF8

genotipos									
	GG	GC	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	10	10	3	23	0,435	0,464	0,064	1,000	0,000
A. ANGUS	28	2	0	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
HIGH.	24	1	0	25	0,040	0,040	0,000	-	
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	27	0	0	27	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
CHA.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	2	15	13	30	0,500	0,439	-0,139	0,677	0,002
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	24	7	0	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
Total:	369	36	16	421					

GDF8_F94L

genotipos									
	CC	CA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	20	0	0	20	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	24	0	0	24	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	25	0	0	25	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	17	0	0	17	0,000	0,000	-	-	
LIM.	0	1	30	31	0,032	0,032	0,000	-	
CHA.	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
PIEDM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	15	13	3	31	0,419	0,432	0,030	1,000	0,000
Total:	365	15	33	413					

GDF8_Q204X

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	30	2	0	32	0,063	0,062	-0,016	1,000	0,000
S. DEVON	18	4	0	22	0,182	0,169	-0,077	1,000	0,000
A. ANGUS	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	21	4	0	25	0,160	0,150	-0,067	1,000	0,000
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	29	0	0	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	30	1	0	31	0,032	0,032	0,000	-	
CHA.	21	8	1	30	0,267	0,283	0,057	1,000	0,000
PIEDM.	28	2	0	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
MARCH.	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
CASINA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	28	2	1	31	0,065	0,124	0,478	0,097	0,001
Total:	397	23	2	422					

|GHR g.4962 TbA

genotipos									
	TT	TA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	22	10	0	32	0,313	0,267	-0,170	1,000	0,000
S. DEVON	19	3	0	22	0,136	0,130	-0,050	1,000	0,000
A. ANGUS	18	9	0	27	0,333	0,282	-0,182	1,000	0,000
HIGH.	4	17	3	24	0,708	0,505	-0,401	0,097	0,002
HOLS.	19	7	0	26	0,269	0,237	-0,136	1,000	0,000
D. RED	27	2	0	29	0,069	0,068	-0,018	1,000	0,000
SIMM.	16	1	1	18	0,056	0,160	0,653	0,085	0,001
LIM.	30	1	0	31	0,032	0,032	0,000	-	
CHA.	27	3	0	30	0,100	0,097	-0,036	1,000	0,000
PIEDM.	20	9	1	30	0,300	0,305	0,015	1,000	0,000
MARCH.	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	23	6	0	29	0,207	0,188	-0,098	1,000	0,000
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	28	2	0	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
PIREN.	28	3	0	31	0,097	0,094	-0,035	1,000	0,000
Total:	340	73	5	418					

GLUT4

genotipos									
	GG	GA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	24	0	0	24	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	18	7	1	26	0,269	0,292	0,079	1,000	0,000
D. RED	17	12	0	29	0,414	0,333	-0,244	0,302	0,002
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	24	6	0	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
MARCH.	27	1	0	28	0,036	0,036	0,000	-	
A. VALLE	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	28	2	0	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
PIREN.	30	1	0	31	0,032	0,032	0,000	-	
Total:	395	30	1	426					

HSPB1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	6	26	32	0,188	0,172	-0,088	1,000	0,000
S. DEVON	0	12	12	24	0,500	0,380	-0,314	0,272	0,002
A. ANGUS	0	8	22	30	0,267	0,235	-0,137	1,000	0,000
HIGH.	0	8	18	26	0,308	0,265	-0,163	1,000	0,000
HOLS.	0	2	24	26	0,077	0,075	-0,020	1,000	0,000
D. RED	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
SIMM.	4	9	1	14	0,643	0,489	-0,315	0,317	0,003
LIM.	0	1	30	31	0,032	0,032	0,000	-	
CHA.	1	11	18	30	0,367	0,345	-0,063	1,000	0,000
PIEDM.	0	8	22	30	0,267	0,235	-0,137	1,000	0,000
MARCH.	0	3	25	28	0,107	0,103	-0,039	1,000	0,000
A. VALLE	4	11	15	30	0,367	0,441	0,169	0,412	0,002
CASINA	0	8	23	31	0,258	0,228	-0,132	1,000	0,000
AVILEÑA	1	8	18	27	0,296	0,308	0,037	1,000	0,000
PIREN.	0	11	19	30	0,367	0,303	-0,208	0,551	0,001
Total:	10	111	297	418					

IGF2R

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	2	30	32	0,063	0,062	-0,016	1,000	0,000
S. DEVON	11	9	4	24	0,375	0,469	0,201	0,385	0,002
A. ANGUS	8	13	9	30	0,433	0,509	0,149	0,481	0,003
HIGH.	11	12	3	26	0,462	0,462	0,000	1,000	0,000
HOLS.	0	3	23	26	0,115	0,111	-0,042	1,000	0,000
D. RED	0	16	13	29	0,552	0,404	-0,366	0,071	0,001
SIMM.	2	8	8	18	0,444	0,458	0,029	1,000	0,000
LIM.	0	9	22	31	0,290	0,252	-0,154	1,000	0,000
CHA.	2	9	19	30	0,300	0,346	0,133	0,588	0,002
PIEDM.	1	9	20	30	0,300	0,305	0,015	1,000	0,000
MARCH.	0	5	23	28	0,179	0,165	-0,080	1,000	0,000
A. VALLE	1	8	21	30	0,267	0,283	0,057	1,000	0,000
CASINA	1	2	28	31	0,065	0,124	0,478	0,097	0,001
AVILEÑA	0	9	21	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
PIREN.	4	10	17	31	0,323	0,420	0,233	0,222	0,003
Total:	41	124	261	426					

INSIG2

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	24	0	0	24	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	29	0	0	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	28	0	0	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
CASINA	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
Total:	426			426					

LEP

genotipos									
	TT	AT	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	0	26	26	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	0	0	24	24	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	1	1	28	30	0,033	0,098	0,659	0,049	0,001
HIGH.	0	0	27	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	0	2	24	26	0,077	0,075	-0,020	1,000	0,000
D. RED	0	6	23	29	0,207	0,188	-0,098	1,000	0,000
SIMM.	0	3	15	18	0,167	0,157	-0,063	1,000	0,000
LIM.	0	4	27	31	0,129	0,123	-0,053	1,000	0,000
CHA.	0	5	25	30	0,167	0,155	-0,074	1,000	0,000
PIEDM.	0	1	27	28	0,036	0,036	0,000	-	
MARCH.	1	4	23	28	0,143	0,196	0,270	0,255	0,002
A. VALLE	0	4	25	29	0,138	0,131	-0,057	1,000	0,000
CASINA	1	7	22	30	0,233	0,260	0,102	0,505	0,002
AVILEÑA	1	11	17	29	0,379	0,353	-0,073	1,000	0,000
PIREN.	0	6	25	31	0,194	0,177	-0,091	1,000	0,000
Total:	4	54	358	416					

LEP g.198 CbT

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	6	12	14	32	0,375	0,478	0,215	0,265	0,003
S. DEVON	11	8	5	24	0,333	0,482	0,308	0,193	0,002
A. ANGUS	7	16	7	30	0,533	0,508	-0,050	1,000	0,000
HIGH.	16	8	3	27	0,296	0,393	0,246	0,310	0,002
HOLS.	4	12	9	25	0,480	0,490	0,020	1,000	0,000
D. RED	12	10	7	29	0,345	0,496	0,305	0,133	0,003
SIMM.	0	8	10	18	0,444	0,353	-0,259	0,529	0,002
LIM.	4	18	9	31	0,581	0,494	-0,177	0,465	0,003
CHA.	3	12	15	30	0,400	0,428	0,065	1,000	0,000
PIEDM.	0	9	21	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
MARCH.	8	14	6	28	0,500	0,507	0,013	1,000	0,000
A. VALLE	6	14	10	30	0,467	0,500	0,067	1,000	0,000
CASINA	22	4	4	30	0,133	0,329	0,594	0,005	0,000
AVILEÑA	9	14	7	30	0,467	0,507	0,079	0,724	0,002
PIREN.	3	19	6	28	0,679	0,500	-0,357	0,120	0,002
Total:	111	178	133	422					

LOX g.7548 CbT

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	1	12	16	29	0,414	0,372	-0,113	1,000	0,000
S. DEVON	10	5	1	16	0,313	0,354	0,118	1,000	0,000
A. ANGUS	3	13	8	24	0,542	0,487	-0,112	0,683	0,001
HIGH.	4	9	7	20	0,450	0,503	0,105	0,676	0,002
HOLS.	11	15	0	26	0,577	0,415	-0,389	0,068	0,001
D. RED	8	11	10	29	0,379	0,509	0,254	0,268	0,002
SIMM.	4	11	3	18	0,611	0,510	-0,199	0,632	0,002
LIM.	11	13	7	31	0,419	0,501	0,163	0,470	0,002
CHA.	11	13	6	30	0,433	0,495	0,125	0,702	0,002
PIEDM.	14	13	2	29	0,448	0,421	-0,064	1,000	0,000
MARCH.	7	15	3	25	0,600	0,495	-0,212	0,416	0,003
A. VALLE	11	13	3	27	0,482	0,464	-0,037	1,000	0,000
CASINA	10	13	7	30	0,433	0,505	0,141	0,482	0,002
AVILEÑA	12	14	3	29	0,483	0,459	-0,051	1,000	0,000
PIREN.	13	16	2	31	0,516	0,443	-0,165	0,435	0,002
Total:	130	186	78	394					

LPL

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	0	29	29	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	0	0	19	19	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	0	3	21	24	0,125	0,120	-0,046	1,000	0,000
HIGH.	0	0	21	21	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	1	3	22	26	0,115	0,179	0,353	0,191	0,002
D. RED	0	3	26	29	0,103	0,100	-0,037	1,000	0,000
SIMM.	0	2	16	18	0,111	0,108	-0,030	1,000	0,000
LIM.	0	0	31	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	0	6	24	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
PIEDM.	1	1	28	30	0,033	0,098	0,659	0,051	0,001
MARCH.	0	0	28	28	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	0	0	29	29	0,000	0,000	-	-	
CASINA	1	3	26	30	0,100	0,156	0,360	0,165	0,002
AVILEÑA	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
PIREN.	0	1	30	31	0,032	0,032	0,000	-	
Total:	3	27	374	404					

ME3

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	2	11	18	31	0,355	0,373	0,049	1,000	0,000
S. DEVON	1	15	8	24	0,625	0,464	-0,348	0,179	0,002
A. ANGUS	3	14	13	30	0,467	0,452	-0,033	1,000	0,000
HIGH.	22	1	4	27	0,037	0,288	0,871	0,000	0,000
HOLS.	11	13	2	26	0,500	0,448	-0,117	0,671	0,002
D. RED	5	18	5	28	0,643	0,507	-0,269	0,252	0,003
SIMM.	2	6	10	18	0,333	0,415	0,197	0,560	0,002
LIM.	2	19	10	31	0,613	0,472	-0,298	0,127	0,002
CHA.	5	19	6	30	0,633	0,506	-0,252	0,269	0,003
PIEDM.	0	8	22	30	0,267	0,235	-0,137	1,000	0,000
MARCH.	16	10	2	28	0,357	0,382	0,066	1,000	0,000
A. VALLE	3	15	12	30	0,500	0,462	-0,082	0,705	0,002
CASINA	5	16	9	30	0,533	0,499	-0,069	1,000	0,000
AVILEÑA	8	16	6	30	0,533	0,506	-0,055	1,000	0,000
PIREN.	0	4	27	31	0,129	0,123	-0,053	1,000	0,000
Total:	85	185	154	424					

MGAT1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	24	0	0	24	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
HIGH.	21	5	0	26	0,192	0,177	-0,087	1,000	0,000
HOLS.	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	29	0	0	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	24	4	0	28	0,143	0,135	-0,059	1,000	0,000
A. VALLE	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
CASINA	29	2	0	31	0,065	0,063	-0,017	1,000	0,000
AVILEÑA	30	0	0	30	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
Total:	413	13	0	426					

MMP1

genotipos									
	GG	GA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	21	3	0	24	0,125	0,120	-0,046	1,000	0,000
A. ANGUS	15	15	0	30	0,500	0,379	-0,318	0,145	0,002
HIGH.	16	10	0	26	0,385	0,315	-0,220	0,545	0,002
HOLS.	18	8	0	26	0,308	0,265	-0,163	1,000	0,000
D. RED	19	10	0	29	0,345	0,289	-0,192	0,559	0,001
SIMM.	18	0	0	18	0,000	0,000	-	-	
LIM.	28	3	0	31	0,097	0,094	-0,035	1,000	0,000
CHA.	27	3	0	30	0,100	0,097	-0,036	1,000	0,000
PIEDM.	27	3	0	30	0,100	0,097	-0,036	1,000	0,000
MARCH.	15	13	0	28	0,464	0,361	-0,286	0,284	0,002
A. VALLE	18	12	0	30	0,400	0,324	-0,234	0,559	0,002
CASINA	30	1	0	31	0,032	0,032	0,000	-	
AVILEÑA	26	4	0	30	0,133	0,126	-0,055	1,000	0,000
PIREN.	24	7	0	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
Total:	334	92	0	426					

OPN g.3492

genotipos									
	GG	AG	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	12	20	32	0,375	0,309	-0,216	0,558	0,000
S. DEVON	22	3	1	26	0,115	0,179	0,353	0,190	0,001
A. ANGUS	3	22	2	27	0,815	0,503	-0,620	0,002	0,000
HIGH.	0	6	21	27	0,222	0,201	-0,106	1,000	0,002
HOLS.	7	11	4	22	0,500	0,502	0,004	1,000	0,002
D. RED	4	15	9	28	0,536	0,492	-0,089	0,709	0,003
SIMM.	1	11	7	19	0,579	0,459	-0,261	0,345	0,002
LIM.	4	15	9	28	0,536	0,492	-0,089	0,709	0,000
CHA.	0	4	22	26	0,154	0,145	-0,064	1,000	0,002
PIEDM.	3	17	8	28	0,607	0,491	-0,237	0,260	0,000
MARCH.	0	4	23	27	0,148	0,140	-0,061	1,000	0,002
A. VALLE	2	11	14	27	0,407	0,409	0,004	1,000	0,003
CASINA	2	8	14	24	0,333	0,384	0,132	0,596	0,000
AVILEÑA	2	6	13	21	0,286	0,374	0,236	0,540	0,002
PIREN.	3	16	10	29	0,552	0,478	-0,155	0,458	0,003
Total:	53	161	177	391					

OPN g.10043

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	12	18	30	0,400	0,324	-0,234	0,560	0,000
S. DEVON	20	3	1	24	0,125	0,192	0,349	0,206	0,001
A. ANGUS	12	14	1	27	0,519	0,423	-0,226	0,367	0,000
HIGH.	22	4	1	27	0,148	0,202	0,268	0,267	0,002
HOLS.	7	8	3	18	0,444	0,490	0,093	1,000	0,002
D. RED	14	6	1	21	0,286	0,317	0,098	1,000	0,003
SIMM.	13	1	0	14	0,071	0,071	0,000	-	
LIM.	8	17	6	31	0,548	0,505	-0,085	0,725	0,000
CHA.	18	11	1	30	0,367	0,345	-0,063	1,000	0,002
PIEDM.	17	5	1	23	0,217	0,265	0,179	0,414	0,000
MARCH.	1	9	11	21	0,429	0,395	-0,084	1,000	0,002
A. VALLE	25	4	0	29	0,138	0,131	-0,057	1,000	0,003
CASINA	17	7	2	26	0,269	0,342	0,212	0,288	0,000
AVILEÑA	3	6	14	23	0,261	0,397	0,343	0,128	0,002
PIREN.	17	12	1	30	0,400	0,363	-0,101	1,000	0,003
Total:	194	119	61	374					

OPN g.1406

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	32	0	0	32	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	26	0	0	26	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	6	18	3	27	0,667	0,500	-0,333	0,124	0,000
HIGH.	27	0	0	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	9	14	0	23	0,609	0,429	-0,419	0,063	0,002
D. RED	19	7	1	27	0,259	0,284	0,085	0,549	0,003
SIMM.	7	9	2	18	0,500	0,474	-0,055	1,000	0,000
LIM.	23	5	0	28	0,179	0,165	-0,080	1,000	0,000
CHA.	25	0	0	25	0,000	0,000	-	-	
PIEDM.	14	13	2	29	0,448	0,421	-0,064	1,000	0,000
MARCH.	26	1	0	27	0,037	0,037	0,000	-	
A. VALLE	20	6	2	28	0,214	0,300	0,286	0,176	0,003
CASINA	16	9	1	26	0,346	0,340	-0,018	1,000	0,000
AVILEÑA	19	3	1	23	0,130	0,200	0,347	0,215	0,002
PIREN.	14	12	2	28	0,429	0,415	-0,032	1,000	0,003
Total:	283	97	14	394					

PCSK1

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	17	10	5	32	0,313	0,439	0,287	0,207	0,002
S. DEVON	12	12	0	24	0,500	0,380	-0,314	0,269	0,002
A. ANGUS	14	13	3	30	0,433	0,440	0,016	1,000	0,000
HIGH.	7	15	4	26	0,577	0,502	-0,150	0,691	0,001
HOLS.	0	7	19	26	0,269	0,237	-0,136	1,000	0,000
D. RED	4	14	11	29	0,483	0,479	-0,008	1,000	0,000
SIMM.	3	8	7	18	0,444	0,490	0,093	1,000	0,000
LIM.	8	14	9	31	0,452	0,509	0,112	0,718	0,002
CHA.	6	15	9	30	0,500	0,503	0,007	1,000	0,000
PIEDM.	3	11	16	30	0,367	0,414	0,114	0,656	0,001
MARCH.	0	8	20	28	0,286	0,249	-0,149	1,000	0,000
A. VALLE	11	15	4	30	0,500	0,481	-0,041	1,000	0,000
CASINA	13	17	1	31	0,548	0,430	-0,275	0,208	0,002
AVILEÑA	3	14	12	29	0,483	0,459	-0,051	1,000	0,000
PIREN.	9	11	9	29	0,379	0,511	0,258	0,257	0,003
Total:	110	184	129	423					

PLOD3

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	5	27	32	0,156	0,146	-0,069	1,000	0,000
S. DEVON	0	2	22	24	0,083	0,082	-0,022	1,000	0,000
A. ANGUS	0	7	23	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,000
HIGH.	1	8	18	27	0,296	0,308	0,037	1,000	0,000
HOLS.	0	4	22	26	0,154	0,145	-0,064	1,000	0,000
D. RED	0	2	27	29	0,069	0,068	-0,018	1,000	0,000
SIMM.	2	4	12	18	0,222	0,360	0,382	0,158	0,002
LIM.	0	3	28	31	0,097	0,094	-0,035	1,000	0,000
CHA.	3	10	17	30	0,333	0,399	0,164	0,384	0,003
PIEDM.	0	9	21	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
MARCH.	0	7	21	28	0,250	0,222	-0,125	1,000	0,000
A. VALLE	1	6	23	30	0,200	0,236	0,151	0,413	0,002
CASINA	0	0	31	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	2	4	24	30	0,133	0,237	0,437	0,060	0,002
PIREN.	0	7	24	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
Total:	9	78	340	427					

PLTP

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	12	15	5	32	0,469	0,484	0,031	1,000	0,000
S. DEVON	9	10	4	23	0,435	0,488	0,109	0,675	0,002
A. ANGUS	20	8	2	30	0,267	0,326	0,183	0,312	0,003
HIGH.	1	12	12	25	0,480	0,410	-0,171	0,625	0,002
HOLS.	2	11	13	26	0,423	0,419	-0,011	1,000	0,000
D. RED	3	10	16	29	0,345	0,408	0,154	0,636	0,002
SIMM.	3	9	6	18	0,500	0,500	0,000	1,000	0,000
LIM.	14	16	1	31	0,516	0,417	-0,237	0,374	0,003
CHA.	6	12	12	30	0,400	0,490	0,183	0,449	0,003
PIEDM.	13	12	5	30	0,400	0,474	0,155	0,444	0,003
MARCH.	14	11	3	28	0,393	0,431	0,089	0,667	0,002
A. VALLE	10	14	5	29	0,483	0,494	0,022	1,000	0,000
CASINA	2	14	15	31	0,452	0,418	-0,080	1,000	0,000
AVILEÑA	10	17	2	29	0,586	0,468	-0,253	0,241	0,003
PIREN.	6	15	7	28	0,536	0,508	-0,055	1,000	0,000
Total:	125	186	108	419					

POMC g.437del1

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	22	0	0	22	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	10	0	0	10	0,000	0,000	-	-	
A. ANGUS	2	0	0	2	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	17	0	0	17	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	8	0	0	8	0,000	0,000	-	-	
D. RED	12	0	0	12	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	7	7	4	18	0,389	0,503	0,227	0,378	0,002
LIM.	3	8	0	11	0,727	0,473	-0,539	0,193	0,002
CHA.	7	2	0	9	0,222	0,208	-0,067	1,000	0,000
PIEDM.	18	3	2	23	0,130	0,267	0,511	0,052	0,001
MARCH.	21	6	0	27	0,222	0,201	-0,106	1,000	0,000
A. VALLE	12	2	0	14	0,143	0,137	-0,040	1,000	0,000
CASINA	12	2	0	14	0,143	0,137	-0,040	1,000	0,000
AVILEÑA	11	5	0	16	0,313	0,271	-0,154	1,000	0,000
PIREN.	5	3	2	10	0,300	0,489	0,386	0,482	0,002
Total:	167	38	8	213					

PPARG

genotipos									
	GG	GA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	24	8	0	32	0,250	0,222	-0,127	1,000	0,000
S. DEVON	12	9	0	21	0,429	0,343	-0,250	0,532	0,001
A. ANGUS	15	12	2	29	0,414	0,406	-0,018	1,000	0,000
HIGH.	22	2	0	24	0,083	0,082	-0,022	1,000	0,000
HOLS.	20	6	0	26	0,231	0,208	-0,111	1,000	0,000
D. RED	18	11	0	29	0,379	0,312	-0,217	0,549	0,001
SIMM.	13	5	0	18	0,278	0,245	-0,133	1,000	0,000
LIM.	22	7	2	31	0,226	0,298	0,242	0,211	0,002
CHA.	15	15	0	30	0,500	0,379	-0,318	0,142	0,002
PIEDM.	23	7	0	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,000
MARCH.	22	6	0	28	0,214	0,194	-0,102	1,000	0,000
A. VALLE	24	6	0	30	0,200	0,183	-0,094	1,000	0,000
CASINA	23	6	0	29	0,207	0,188	-0,098	1,000	0,000
AVILEÑA	24	3	0	27	0,111	0,107	-0,040	1,000	0,000
PIREN.	21	10	0	31	0,323	0,274	-0,177	0,566	0,001
Total:	298	113	4	415					

PPARGC1A ex8_1209

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	27	4	0	31	0,129	0,123	-0,053	1,000	0,000
S. DEVON	14	9	1	24	0,375	0,361	-0,040	1,000	0,001
A. ANGUS	18	10	0	28	0,357	0,298	-0,200	0,553	0,000
HIGH.	7	8	12	27	0,296	0,496	0,402	0,051	0,002
HOLS.	8	9	2	19	0,474	0,462	-0,025	1,000	0,002
D. RED	13	6	3	22	0,273	0,409	0,333	0,270	0,003
SIMM.	0	7	6	13	0,539	0,404	-0,333	0,499	0,000
LIM.	16	11	3	30	0,367	0,414	0,114	0,655	0,000
CHA.	25	3	1	29	0,103	0,161	0,359	0,171	0,002
PIEDM.	8	15	0	23	0,652	0,445	-0,467	0,051	0,000
MARCH.	11	10	0	21	0,476	0,369	-0,290	0,292	0,002
A. VALLE	17	10	2	29	0,345	0,373	0,076	0,644	0,003
CASINA	23	4	0	27	0,148	0,140	-0,061	1,000	0,000
AVILEÑA	11	11	1	23	0,478	0,413	-0,158	0,626	0,002
PIREN.	23	7	0	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,003
Total:	221	124	31	376					

PPARGC1A

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	0	31	31	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	5	14	5	24	0,583	0,509	-0,146	0,683	0,002
A. ANGUS	0	0	28	28	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	0	8	19	27	0,296	0,256	-0,156	1,000	0,001
HOLS.	0	0	19	19	0,000	0,000	-	-	
D. RED	0	1	21	22	0,046	0,046	0,000	-	
SIMM.	0	2	11	13	0,154	0,147	-0,044	1,000	0,002
LIM.	0	13	18	31	0,419	0,336	-0,250	0,296	0,003
CHA.	4	11	15	30	0,367	0,441	0,169	0,413	0,000
PIEDM.	0	0	23	23	0,000	0,000	-	-	
MARCH.	0	0	21	21	0,000	0,000	-	-	
A. VALLE	1	5	21	27	0,185	0,231	0,198	0,358	0,002
CASINA	1	5	21	27	0,185	0,231	0,198	0,358	0,002
AVILEÑA	0	0	24	24	0,000	0,000	-	-	
PIREN.	4	11	15	30	0,367	0,441	0,169	0,413	0,003
Total:	15	70	292	377					

PPM2C

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	2	29	31	0,065	0,063	-0,017	1,000	0,000
S. DEVON	0	8	15	23	0,348	0,293	-0,189	1,000	0,000
A. ANGUS	0	7	23	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,000
HIGH.	0	8	15	23	0,348	0,293	-0,189	1,000	0,000
HOLS.	6	13	7	26	0,500	0,509	0,018	1,000	0,000
D. RED	2	18	9	29	0,621	0,477	-0,302	0,133	0,002
SIMM.	1	11	6	18	0,611	0,471	-0,299	0,319	0,003
LIM.	4	11	16	31	0,355	0,433	0,181	0,401	0,002
CHA.	2	7	21	30	0,233	0,306	0,237	0,228	0,002
PIEDM.	1	10	18	29	0,345	0,334	-0,033	1,000	0,000
MARCH.	1	4	18	23	0,174	0,233	0,254	0,311	0,002
A. VALLE	2	3	25	30	0,100	0,212	0,527	0,031	0,001
CASINA	0	2	29	31	0,065	0,063	-0,017	1,000	0,000
AVILEÑA	3	15	12	30	0,500	0,462	-0,082	0,711	0,002
PIREN.	2	5	23	30	0,167	0,261	0,361	0,100	0,002
Total:	24	124	266	414					

PRKAG2

genotipos									
	GG	AG	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	14	16	30	0,467	0,362	-0,289	0,292	0,002
S. DEVON	0	1	22	23	0,044	0,044	0,000	-	
A. ANGUS	1	6	23	30	0,200	0,236	0,151	0,411	0,002
HIGH.	0	0	27	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	2	16	8	26	0,615	0,480	-0,282	0,224	0,003
D. RED	0	9	20	29	0,310	0,266	-0,167	1,000	0,000
SIMM.	0	4	10	14	0,286	0,253	-0,130	1,000	0,000
LIM.	1	11	19	31	0,355	0,337	-0,054	1,000	0,000
CHA.	0	5	25	30	0,167	0,155	-0,074	1,000	0,000
PIEDM.	3	10	17	30	0,333	0,399	0,164	0,387	0,003
MARCH.	0	16	12	28	0,571	0,413	-0,385	0,065	0,002
A. VALLE	0	9	21	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
CASINA	0	5	26	31	0,161	0,151	-0,071	1,000	0,000
AVILEÑA	1	5	24	30	0,167	0,210	0,208	0,324	0,002
PIREN.	4	9	13	26	0,346	0,451	0,232	0,373	0,002
Total:	12	120	283	415					

RORA

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	3	18	11	32	0,563	0,475	-0,185	0,451	0,003
S. DEVON	0	4	19	23	0,174	0,162	-0,073	1,000	0,000
A. ANGUS	0	0	30	30	0,000	0,000	-	-	
HIGH.	0	15	11	26	0,577	0,415	-0,389	0,067	0,002
HOLS.	0	0	26	26	0,000	0,000	-	-	
D. RED	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
SIMM.	0	1	17	18	0,056	0,056	0,000	-	
LIM.	0	1	28	29	0,035	0,035	0,000	-	
CHA.	0	7	23	30	0,233	0,209	-0,115	1,000	0,000
PIEDM.	0	8	22	30	0,267	0,235	-0,137	1,000	0,000
MARCH.	0	1	27	28	0,036	0,036	0,000	-	
A. VALLE	1	4	25	30	0,133	0,184	0,275	0,240	0,002
CASINA	0	0	31	31	0,000	0,000	-	-	
AVILEÑA	0	3	26	29	0,103	0,100	-0,037	1,000	0,000
PIREN.	0	2	28	30	0,067	0,066	-0,018	1,000	0,000
Total:	4	69	348	421					

RORC g.3290

genotipos									
	AA	AC	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	22	8	2	32	0,250	0,311	0,195	0,272	0,002
S. DEVON	6	10	8	24	0,417	0,509	0,182	0,435	0,004
A. ANGUS	1	20	9	30	0,667	0,469	-0,422	0,045	0,001
HIGH.	11	12	3	26	0,462	0,462	0,000	1,000	0,000
HOLS.	12	14	0	26	0,539	0,399	-0,351	0,134	0,002
D. RED	12	13	4	29	0,448	0,470	0,047	1,000	0,000
SIMM.	11	6	1	18	0,333	0,356	0,064	1,000	0,000
LIM.	15	13	2	30	0,433	0,413	-0,050	1,000	0,000
CHA.	25	5	0	30	0,167	0,155	-0,074	1,000	0,000
PIEDM.	15	13	2	30	0,433	0,413	-0,050	1,000	0,000
MARCH.	9	18	1	28	0,643	0,464	-0,385	0,094	0,002
A. VALLE	14	16	0	30	0,533	0,395	-0,349	0,076	0,002
CASINA	6	19	6	31	0,613	0,507	-0,210	0,293	0,003
AVILEÑA	19	11	0	30	0,367	0,303	-0,208	0,550	0,002
PIREN.	12	14	5	31	0,452	0,483	0,065	1,000	0,000
Total:	190	192	43	425					

SCAP

genotipos									
	GG	GA	AA	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	21	11	0	32	0,344	0,288	-0,192	0,555	0,002
S. DEVON	11	13	0	24	0,542	0,400	-0,353	0,134	0,002
A. ANGUS	26	4	0	30	0,133	0,126	-0,055	1,000	0,000
HIGH.	12	14	0	26	0,539	0,399	-0,351	0,134	0,001
HOLS.	18	8	0	26	0,308	0,265	-0,163	1,000	0,000
D. RED	29	0	0	29	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	16	1	0	17	0,059	0,059	0,000	-	
LIM.	31	0	0	31	0,000	0,000	-	-	
CHA.	29	1	0	30	0,033	0,033	0,000	-	
PIEDM.	25	5	0	30	0,167	0,155	-0,074	1,000	0,000
MARCH.	23	5	0	28	0,179	0,165	-0,080	1,000	0,000
A. VALLE	21	9	0	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
CASINA	24	7	0	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
AVILEÑA	21	9	0	30	0,300	0,259	-0,160	1,000	0,000
PIREN.	29	2	0	31	0,065	0,063	-0,017	1,000	0,000
Total:	336	89	0	425					

|SCD g.10329 TbC

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	24	8	0	32	0,250	0,222	-0,127	1,000	0,000
S. DEVON	1	13	7	21	0,619	0,467	-0,327	0,182	0,002
A. ANGUS	20	9	0	29	0,310	0,266	-0,167	1,000	0,000
HIGH.	5	14	6	25	0,560	0,508	-0,102	0,701	0,002
HOLS.	9	14	3	26	0,539	0,482	-0,118	0,686	0,002
D. RED	17	9	0	26	0,346	0,291	-0,191	1,000	0,000
SIMM.	8	9	1	18	0,500	0,435	-0,150	1,000	0,000
LIM.	11	14	6	31	0,452	0,496	0,089	0,718	0,002
CHA.	7	18	5	30	0,600	0,505	-0,189	0,460	0,003
PIEDM.	10	19	1	30	0,633	0,460	-0,378	0,051	0,001
MARCH.	8	16	4	28	0,571	0,497	-0,149	0,464	0,002
A. VALLE	12	16	2	30	0,533	0,451	-0,184	0,422	0,002
CASINA	0	16	15	31	0,516	0,387	-0,333	0,146	0,001
AVILEÑA	3	14	13	30	0,467	0,452	-0,033	1,000	0,000
PIREN.	8	19	4	31	0,613	0,498	-0,231	0,282	0,002
Total:	143	208	67	418					

SOCS2B

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	0	0	28	28	0,000	0,000	-	-	
S. DEVON	1	4	19	24	0,167	0,225	0,258	0,302	0,002
A. ANGUS	0	15	13	28	0,536	0,397	-0,350	0,139	0,002
HIGH.	0	9	16	25	0,360	0,300	-0,200	0,559	0,002
HOLS.	1	3	22	26	0,115	0,179	0,353	0,190	0,002
D. RED	0	5	24	29	0,172	0,160	-0,077	1,000	0,000
SIMM.	0	4	14	18	0,222	0,203	-0,097	1,000	0,000
LIM.	1	2	28	31	0,065	0,124	0,478	0,097	0,002
CHA.	0	11	19	30	0,367	0,303	-0,208	0,549	0,002
PIEDM.	3	10	17	30	0,333	0,399	0,164	0,379	0,003
MARCH.	0	3	25	28	0,107	0,103	-0,039	1,000	0,000
A. VALLE	2	9	19	30	0,300	0,346	0,133	0,588	0,002
CASINA	0	16	14	30	0,533	0,395	-0,349	0,075	0,001
AVILEÑA	1	5	23	29	0,172	0,217	0,205	0,337	0,002
PIREN.	1	4	26	31	0,129	0,179	0,277	0,233	0,002
Total:	10	100	307	417					

SREBP1C

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	5	14	13	32	0,438	0,477	0,083	0,710	0,002
S. DEVON	0	6	15	21	0,286	0,250	-0,143	1,000	0,000
A. ANGUS	5	13	9	27	0,482	0,499	0,034	1,000	0,000
HIGH.	0	3	22	25	0,120	0,115	-0,044	1,000	0,000
HOLS.	4	18	4	26	0,692	0,506	-0,368	0,113	0,002
D. RED	1	15	13	29	0,517	0,420	-0,232	0,372	0,002
SIMM.	5	7	0	12	0,583	0,424	-0,375	0,488	0,002
LIM.	1	8	22	31	0,258	0,275	0,063	1,000	0,000
CHA.	2	10	18	30	0,333	0,364	0,085	0,634	0,002
PIEDM.	3	15	12	30	0,500	0,462	-0,082	0,709	0,002
MARCH.	0	13	15	28	0,464	0,361	-0,286	0,286	0,002
A. VALLE	1	12	17	30	0,400	0,363	-0,101	1,000	0,000
CASINA	3	18	9	30	0,600	0,486	-0,234	0,266	0,002
AVILEÑA	2	16	11	29	0,552	0,458	-0,204	0,415	0,003
PIREN.	3	10	18	31	0,323	0,390	0,174	0,365	0,002
Total:	35	178	198	411					

SUSP1

genotipos									
	AA	AG	GG	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	15	12	5	32	0,375	0,460	0,184	0,431	0,003
S. DEVON	21	3	0	24	0,125	0,120	-0,046	1,000	0,000
A. ANGUS	18	9	3	30	0,300	0,383	0,216	0,322	0,002
HIGH.	27	0	0	27	0,000	0,000	-	-	
HOLS.	21	5	0	26	0,192	0,177	-0,087	1,000	0,000
D. RED	21	7	1	29	0,241	0,267	0,097	0,516	0,003
SIMM.	10	5	3	18	0,278	0,441	0,370	0,254	0,003
LIM.	29	2	0	31	0,065	0,063	-0,017	1,000	0,000
CHA.	15	14	1	30	0,467	0,397	-0,177	0,636	0,002
PIEDM.	22	6	2	30	0,200	0,284	0,296	0,156	0,002
MARCH.	22	6	0	28	0,214	0,194	-0,102	1,000	0,000
A. VALLE	14	11	5	30	0,367	0,464	0,210	0,419	0,002
CASINA	16	15	0	31	0,484	0,371	-0,304	0,150	0,002
AVILEÑA	18	12	0	30	0,400	0,324	-0,234	0,558	0,002
PIREN.	22	9	0	31	0,290	0,252	-0,154	1,000	0,000
Total:	291	116	20	427					

TG g.1696 CbT

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	3	5	14	22	0,227	0,387	0,413	0,082	0,001
S. DEVON	0	5	4	9	0,556	0,417	-0,333	1,000	0,000
A. ANGUS	0	11	2	13	0,846	0,494	-0,714	0,024	0,001
HIGH.	0	3	5	8	0,375	0,321	-0,167	1,000	0,000
HOLS.	2	3	15	20	0,150	0,300	0,500	0,067	0,001
D. RED	0	0	22	22	0,000	0,000	-	-	
SIMM.	11	0	3	14	0,000	0,363	1,000	0,001	0,000
LIM.	4	0	3	7	0,000	0,571	1,000	0,012	0,001
CHA.	2	2	7	11	0,182	0,427	0,575	0,109	0,002
PIEDM.	1	0	1	2	0,000	1,000	1,000	0,331	0,002
MARCH.	6	1	0	7	0,143	0,143	0,000	-	
A. VALLE	2	0	4	6	0,000	0,533	1,000	0,031	0,001
CASINA	3	2	6	11	0,182	0,500	0,636	0,058	0,001
AVILEÑA	5	0	14	19	0,000	0,409	1,000	0,000	0,000
PIREN.	1	1	2	4	0,250	0,583	0,571	0,426	0,002
Total:	40	33	102	175					

UCP2 g.812 GbA

genotipos									
	CC	CT	TT	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	10	17	5	32	0,531	0,495	-0,073	0,731	0,002
S. DEVON	1	8	15	24	0,333	0,337	0,011	1,000	0,000
A. ANGUS	1	10	17	28	0,357	0,343	-0,043	1,000	0,000
HIGH.	1	10	15	26	0,385	0,362	-0,064	1,000	0,000
HOLS.	0	1	25	26	0,039	0,039	0,000	-	
D. RED	0	6	23	29	0,207	0,188	-0,098	1,000	0,000
SIMM.	0	3	15	18	0,167	0,157	-0,063	1,000	0,000
LIM.	4	10	17	31	0,323	0,420	0,233	0,219	0,003
CHA.	0	8	20	28	0,286	0,249	-0,149	1,000	0,000
PIEDM.	2	4	24	30	0,133	0,237	0,437	0,058	0,001
MARCH.	1	4	22	27	0,148	0,202	0,268	0,270	0,002
A. VALLE	1	12	15	28	0,429	0,381	-0,125	0,647	0,002
CASINA	1	11	17	29	0,379	0,353	-0,073	1,000	0,000
AVILEÑA	4	8	14	26	0,308	0,437	0,296	0,174	0,002
PIREN.	4	8	18	30	0,267	0,400	0,333	0,146	0,002
Total:	30	120	262	412					

VIM

genotipos									
	TT	CT	CC	N	Hobs	Hesp	F _{IS}	P valor	S.E.
JERSEY	3	11	18	32	0,344	0,397	0,135	0,651	0,001
S. DEVON	9	12	3	24	0,500	0,478	-0,046	1,000	0,000
A. ANGUS	10	16	4	30	0,533	0,487	-0,094	0,714	0,001
HIGH.	8	16	3	27	0,593	0,490	-0,209	0,423	0,003
HOLS.	3	14	9	26	0,539	0,482	-0,118	0,686	0,002
D. RED	5	18	6	29	0,621	0,506	-0,226	0,278	0,003
SIMM.	5	11	2	18	0,611	0,497	-0,230	0,622	0,002
LIM.	24	7	0	31	0,226	0,203	-0,111	1,000	0,000
CHA.	13	15	2	30	0,500	0,439	-0,139	0,674	0,001
PIEDM.	14	13	3	30	0,433	0,440	0,016	1,000	0,000
MARCH.	13	12	3	28	0,429	0,444	0,036	1,000	0,000
A. VALLE	15	13	2	30	0,433	0,413	-0,050	1,000	0,000
CASINA	4	16	11	31	0,516	0,482	-0,071	1,000	0,000
AVILEÑA	13	14	3	30	0,467	0,452	-0,033	1,000	0,000
PIREN.	25	5	1	31	0,161	0,204	0,211	0,317	0,002
Total:	164	193	70	427					
