

Segregación de polimorfismos en μ -calpaína y calpastatina en ganado para carne en Puerto Rico¹

Jonael Bosques², Melvin Pagán-Morales^{3*}, Américo Casas⁴, Aixa Rivera⁵ y Danilo Cianzio⁶

J. Agric. Univ. P.R. 99(2):105-116 (2015)

RESUMEN

Se determinó la distribución de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, por sus siglas en inglés) en dos regiones de calpaína (*CAPN1-316* y *CAPN1-4751*) y una en calpastatina (*CAST*) en ganado para carne criado en Puerto Rico (n=271). Las frecuencias genotípicas y alélicas se determinaron para cada SNP en las razas Senepol (n=53), Charolais (n=49), Angus (n=27), Charbray (n=38), Brahman (n=16), Cebú (n=16) y toros cruzados (n=72). Para *CAPN1-316*, las frecuencias genotípicas globales (n=219) fueron 0.07/CC (n=15), 0.38/CG (n=83) y 0.55/GG (n=121) con frecuencias alélicas de 0.26/C y 0.74/G. El genotipo CC estuvo ausente en las razas Charbray, Charolais, Angus, Cebú y Brahman. En toros Charolais, Cebú, Brahman y Charbray el genotipo GG fue mayor que el CG mientras lo inverso fue observado en toros Senepol. En animales Angus y en los cruces, los genotipos CG y GG se encontraron equitativamente distribuidos. Las frecuencias genotípicas globales (n=256) para *CAPN1-4751* fueron 0.17/CC (n=44), 0.45/CT (n=114) y 0.38/TT (n=98). Las frecuencias alélicas fueron 0.39/C y 0.61/T. Animales con el genotipo CT fueron más frecuentes en Charolais, Senepol, Angus y cruces. Los animales TT fueron más comunes en razas Charbray y Brahman. Para *CAST*, las frecuencias genotípicas globales (n=261) fueron 0.04/CC (n=10), 0.26/CT (n=68), y 0.70/TT (n=183), respectivamente, con frecuencias alélicas de 0.17/C y 0.83/T. No se encontraron animales de genotipo CC en Charolais, Angus y Brahman. El genotipo TT estuvo en mayor proporción en todas las razas y en los animales cruzados. La segregación de polimorfismos en *CAPN1* y *CAST* puede estar implicada en diferencias en características de importancia económica en bovinos para carne criados en Puerto Rico, esta posibilidad debe ser evaluada

¹Manuscrito resometido a la junta editorial el 1 de abril de 2015.

²Exestudiante graduado, Departamento de Industria Pecuaria, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

³Catedrático, Departamento de Ciencia Animal, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR 00681-9000.

*Autor para correspondencia: melvin.pagan1@upr.edu

⁴Catedrático Asociado, Departamento de Ciencia Animal, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

⁵Catedrática, Departamento de Ciencia Animal, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

⁶Catedrático (fallecido), Departamento de Ciencia Animal, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

mediante la genotipificación de un número grande de animales con registros de producción, previo a la incorporación de estos marcadores moleculares en programas de selección genética.

Palabras clave: nucleótidos, frecuencias genotípicas, *Bos taurus*, *Bos indicus*

ABSTRACT

Segregation of polymorphisms in μ -calpain and calpastatin in beef cattle in Puerto Rico

The distribution of single nucleotide polymorphisms (SNP) in two regions of Calpain (*CAPN1*-316 and *CAPN1*-4751) and a SNP in Calpastatin (*CAST*) was determined in beef cattle raised in Puerto Rico (n=271). Genotypic and allelic frequencies were determined for each SNP in Senepol (n=53), Charolais (n=49), Angus (n=27), Charbray (n=38), Brahman (n=16), Zebu (n=16) and crossbred bulls (n=72). For *CAPN1*-316, the global genotypic frequencies (n=219) were 0.07/CC (n=15), 0.38/CG (n=83) and 0.55/GG (n=121) with allelic frequencies of 0.21/C and 0.74/G. The CC genotype was absent in Charbray, Charolais, Angus, Zebu and Brahman bulls. In Charolais, Zebu, Brahman and Charbray the GG genotype was in greater proportion than CG, while the inverse was observed in the Senepol breed. In Angus and crossbred animals, the CG and GG genotype were found in equal distribution. The global genotypic frequencies for *CAPN1*-4751 (n=256) were 0.17/CC (n=44), 0.45/CT (n=114) and 0.38/TT (n=98). The allelic frequencies were 0.39/C and 0.61/T. Animals inheriting the CT genotype were more frequent in Charolais, Senepol, Angus and crossbred bulls, while the TT was more common in Charbray and Brahman. For *CAST*, the global genotypic frequencies (n=261) were 0.04/CC (n=10), 0.26/CT (n=68), and 0.70/TT (n=183), respectively. The global allelic frequencies were 0.17/C and 0.83/T. The CC genotype was not found in Charolais, Angus and Brahman breeds. The TT animals were more frequent in all breeds, as well as in the crossbred population. The segregation of polymorphisms in *CAPN1* and *CAST* could potentially be associated with differences in economically important traits for Puerto Rican beef cattle, but this possibility should be evaluated by genotyping a broad range of animals with detailed phenotypic data before incorporating these SNP into marker-assisted selection programs.

Key words: nucleotides, genotypic frequencies, *Bos taurus*, *Bos indicus*

INTRODUCCIÓN

Estudios previos han señalado que existe una gran variación en la ternera de la carne de res en el mercado (Morgan et al., 1991; Hamby, 1992; Shackelford et al., 1997). A su vez, la selección genética tradicional para mejorar esta característica resulta muy difícil, ya que solo es posible coleccionar datos fenotípicos del animal sacrificado (Geesink et al., 2006). La selección de animales basándose en marcadores moleculares asociados a tan importante característica podría representar una ruta alterna y una herramienta adicional a los esquemas normalmente utilizados en la producción animal (White et al., 2005).

La terneza de la carne puede ser afectada por numerosos factores ambientales, sin embargo, la genética juega un papel de importancia fundamental (Shackelford et al., 1994). Se ha identificado regiones en el genoma bovino que influyen en la terneza de la carne (Smith et al., 2001). Mediante el análisis de loci para características cuantitativas (QTL, por sus siglas en inglés) se encontraron dos regiones asociadas con variaciones en la terneza de la carne: una en el cromosoma 7 (BTA 7, por sus siglas en inglés; Keele et al., 1999) y otra en la región telomérica del BTA 29 (Casas et al., 2000; Smith et al., 2001). En la región del QTL del BTA 7 se encuentra el gen de μ -calpaína (*CAPNI*) y en el BTA 29, el de calpastatina (*CAST*). Posteriormente se han identificado diversos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, por sus siglas en inglés) en dichos genes causantes de diferencias en el grado de terneza de la carne de bovinos (Page et al., 2002 y 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2006). Sin embargo, no se han realizado estudios similares en el trópico. El objetivo de este estudio fue determinar la segregación de dos SNP en *CAPNI* y uno en *CAST* dentro de las principales razas de bovinos utilizadas en Puerto Rico para la producción de carne.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de sangre de animales de las razas Senepol, Brahman, Charolais, Angus, Charbray, Cebú y sus cruces vía vena cocígea en diferentes fincas de Puerto Rico. El número total de animales incluidos de cada raza y sus fincas de procedencia se presentan en el Cuadro 1.

Colección de sangre

Se colectaron 8.0 ml de sangre por animal. De esta cantidad se destinaron 300 μ l al método de extracción de ácido desoxirribonucleico utilizando el "Aquapure DNA Isolation Kit" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)⁷. El resto de la muestra de sangre se sometió a extracción de células blancas ("buffy cotas"). Esta última se almacenó en un ultracelador a temperaturas menores de 50° C para análisis futuros.

Condiciones de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las regiones donde se localizan los diferentes SNP se amplificaron utilizando PCR según descrito por White et al. (2005) y Casas et al. (2006). La lista de iniciadores utilizados se presenta en el Cuadro 2.

⁷Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

CUADRO 1.—*Distribución por raza de animales y lugar de procedencia (finca y área geográfica).*

<i>Raza</i>	<i>Número</i>	<i>Procedencia</i>
Senepol	60	UPRM: Aguadilla (noroeste) y Corozal (centro)
Charolais	62	UPRM: Aguadilla (noroeste) y Corozal (centro); Finca Agropecuaria Inc. (sur); Finca Ponce Fantauzzi (norte); Finca Ruiz (oeste)
Charbray	43	Finca Agropecuaria Inc. (sur); Finca Ponce Fantauzzi (norte); Finca Altamira (suroeste);
Brahman	19	Finca Ponce Fantauzzi (norte); Finca Ruiz (oeste); Finca Agropecuaria Inc. (sur)
Angus	39	Finca Altamira (suroeste); Hacienda Las Carolinas (sur)
Cebú	17	Finca Agropecuaria Inc. (sur)
Cruces	132	UPRM: Aguadilla (noroeste) y Corozal (centro); Finca Agropecuaria Inc. (sur); Finca Ponce Fantauzzi (norte); Finca Ruiz (oeste); Finca Altamira (suroeste); Hacienda Las Carolinas (sur)
Total	372	

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en geles de 2% de agarosa utilizando el amortiguador 1X TBE y mediante visualización por tinción con bromuro de etidio. Estos se fotografiaron utilizando Quality One® v 4.1 software en un sistema de imagen Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Genotipificación de SNP en CAPN1 y CAST por medio de espectrometría en masa (MALDI)

Para identificar los genotipos de las regiones específicas 316 y 4751 del gen de *CAPN1* y el de *CAST*, las muestras se sometieron a espectrometría en masa (MALDI-TOF Mass Spectrometry; Figura 1), según Stone et al. (2005). Respecto a la primera y segunda región variable estudiada (*CAPN1*-316 y 4751, respectivamente), los SNP constan de una transversión de citosina (C) por guanina (G) y una transición de citosina (C) por timina (T), respectivamente. El SNP *CAST* consiste de una transición entre C/T.

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias en cuanto al equilibrio poblacional Hardy-Weinberg, se utilizó los procedimientos descritos por Rodríguez et al. (2009), los cuales están basados en la ecuación $p^2+2pq+q^2$, donde:

p^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

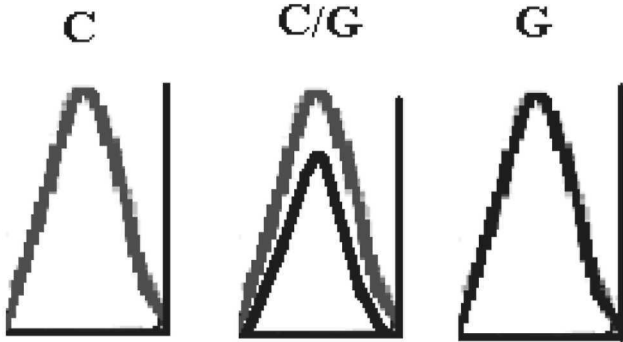
CUADRO 2—*Secuencia de iniciadores utilizados para la identificación de SNP en CAPN1 y CAST.*

<i>Iniciador</i> ¹	<i>Secuencia</i>	<i>Localización</i>	<i>Dirección</i>
<i>CAPN1-316</i>	5'-GTGACTTTGTGCTGCGTTTCT-3'	Exón 9	5' - 3'
<i>CAPN1-316</i>	5'-CCTTGCTGGCTAGAGACCAA-3'	Exón 9	3' - 5'
<i>CAPN1-4751</i>	5'-AAGGGACAGATGTGGACAGG-3'	Intrón 17	5' - 3'
<i>CAPN1-4751</i>	5'-GAGGGGTGTTCTCTGAGTGC-3'	Intrón 17	3' - 5'
<i>CAST</i>	5'-CATTGGAAAACGATGCCTCAC-3'	3'UTR ²	5' - 3'
<i>CAST</i>	5'-TCTACGATTAGCAGCTCAAGAGGAG-3'	3'UTR	3' - 5'

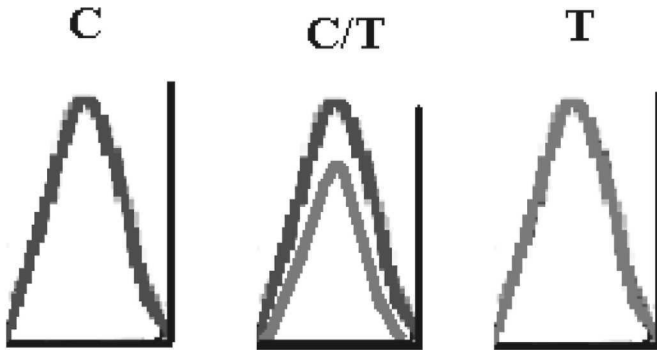
¹Secuencia de iniciadores según Page et al. (2002) y Barendse (2002).

²Región en el terminal tres primo del gen donde no ocurre traducción.

A. SNP *CAPN1*-316



B. SNP *CAPN1*-4751



C. SNP *CAST*

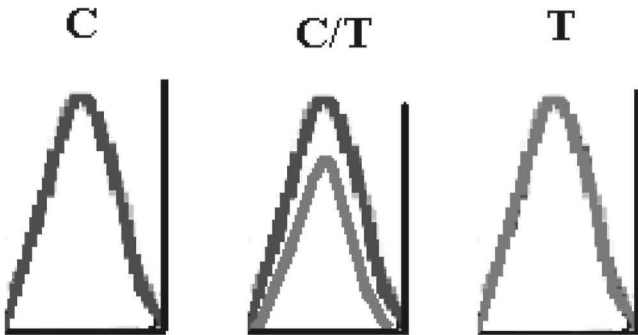


FIGURA 1. Regiones variables (genotipos de los SNP) de los genes *CAPN1* y *CAST*.

2pq = frecuencia predicha para heterocigotos

q² = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo *m*

Las diferencias en frecuencias alélicas se determinaron utilizando la ecuación de Chi cuadrado $\Sigma (E - O)^2 / E$, donde:

E = valor esperado

O = valor obtenido

RESULTADOS

Segregación global de polimorfismos de CAPN1

Para *CAPN1*-316, se observó que la frecuencia del genotipo CC fue de solamente 7.0% de la población global (n=219). En cambio, los genotipos CG y GG constituyeron el 55.0 y 38.0% de los animales, respectivamente. El alelo C constituyó el 26% del total mientras que el G formó 74%. La distribución alélica se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2 P = 0.99$).

En el análisis de *CAPN1*-4751 se observó que la frecuencia genotípica para CC, CT y TT fue 17.0, 45.0 y 38.0%, respectivamente. Los animales que presentaron el alelo C representaron el 39.0% de la población total (n=256), mientras que los T constituyeron el 61.0%. Al igual que el marcador anterior, *CAPN1*-4751 también se encontró en equilibrio ($X^2 P = 0.11$).

Segregación por raza de SNP en CAPN1

Para *CAPN1*-316, se observó el genotipo CC solamente en la raza Senepol y en animales cruzados (Figura 2). En estos respectivos grupos el genotipo CC tuvo una frecuencia de 23.0% y 5.0%, y el genotipo CG fue el más frecuente (50.0 y 49.0%). Para las razas Charolais, Charbray, Brahman y animales cebuinos el genotipo más frecuente fue el

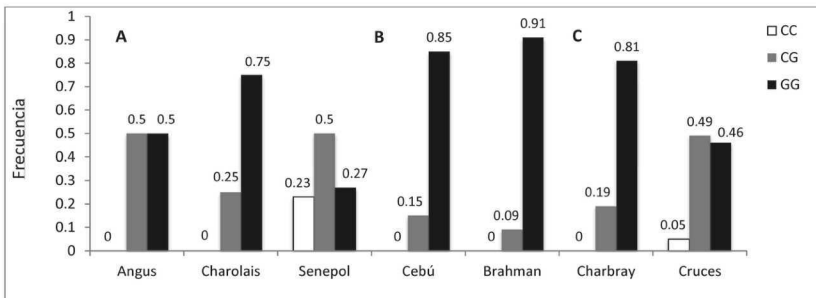


FIGURA 2. Frecuencia genotípica de *CAPN1*-316 en razas de: A) *Bos taurus*; B) *Bos indicus*; y C) Charbray y cruces.

GG (Figura 2), mientras, en la raza Angus la frecuencia genotípica de CG y GG fue similar. La frecuencia genotípica para la sustitución CG fue mayor en las razas Angus, Senepol y en animales cruzados. Sin embargo, en la raza Brahman y Cebú el genotipo observado con mayor frecuencia fue el GG con un 91.0 y 85.0%, respectivamente (Figura 2B).

En cuanto a *CAPN1*-4751, para las razas Angus, Charolais y Senepol se observó que existe una mayor frecuencia de animales con el genotipo CT (Figura 3A). La frecuencia del genotipo CC en los animales Angus y Charolais fue de 18.0%, mientras que en Senepol se observó un mayor nivel (32.0%). En los animales *Bos indicus* (Cebú y Brahman) no se observó el genotipo CC, mientras que el TT se encontró en mayor proporción (53.0% y 82.0%, respectivamente) que el genotipo CT (Figura 3B). Todos los genotipos se observaron en los toros Charbray y Cruces; sin embargo, los animales cruzados presentaron una mayor proporción del genotipo CT, mientras que en los Charbray el genotipo TT fue el más observado (Figura 3C).

Segregación de SNP en *CAST*

Para *CAST* se observó una frecuencia genotípica global (n=261) de 4.0% para CC. Los genotipos CT y TT abarcaron el 26.0 y 70.0% de los animales, respectivamente. El alelo C constó de 17.0% mientras que el T de 83.0%. La distribución de alelos se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2 P = 0.73$).

Segregación de SNP por raza en *CAST*

Con respecto al marcador *CAST*, no se observó el genotipo CC en las razas Angus, Charolais y Brahman, mientras que el genotipo más común fue el TT, que se observó en todas las razas y cruces (Figura 4). El genotipo CC se observó solamente en Senepol, Cebú, Charbray y en los toros cruzados.

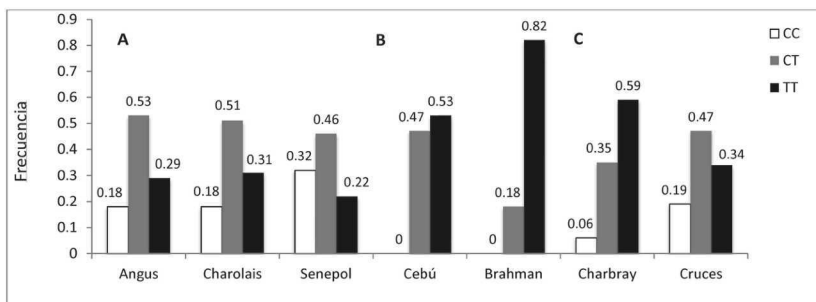


FIGURA 3. Frecuencia genotípica de *CAPN1*-4751 en razas de: A) *Bos taurus*; B) *Bos indicus*; y C) Charbray y cruces.

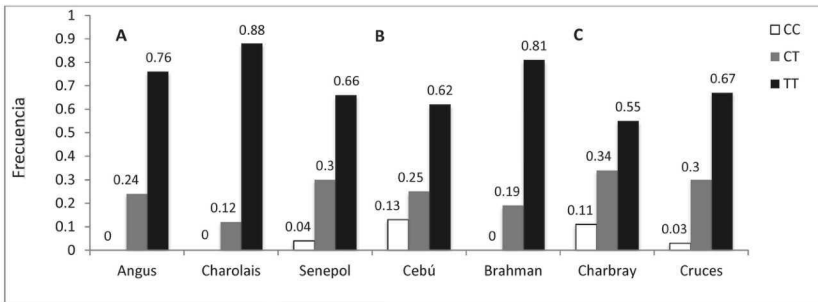


FIGURA 4. Frecuencia genotípica para *CAST* en razas de: A) *Bos taurus*; B) *Bos indicus*; y C) Charbray y cruces.

DISCUSIÓN

El sistema de calpaínas/calpastatina juega un papel importante a nivel molecular en la diferenciación celular y en la degradación de proteínas musculares (Van den Maagdenberg et al., 2007). Estas proteínas están involucradas en la regulación de la miogénesis y se ha propuesto que la relación μ -*CAPN1*/*CAST* se halla en estrecha relación con la degradación de proteínas de la membrana celular durante la fusión de los mioblastos, al formarse el miotubo, y de células satélites (Moyen et al., 2004). Además, la acción del sistema de *CAPN1*/*CAST* es de suma importancia en el crecimiento muscular como responsable del balance existente entre la síntesis y la degradación de proteínas en la miofibrilla (Van den Maagdenberg et al., 2007).

Los polimorfismos estudiados en el presente trabajo fueron previamente asociados con diferencias en terneza de la carne, y propuestos como indicadores exclusivos de dicha característica (Casas et al., 2006). Sin embargo, el sistema *CAPN1*/*CAST* está ligado a diversos factores que regulan el crecimiento y desarrollo celular en etapas pre- y post-natales (Casas et al., 2006; Chung et al., 2007; Van den Maagdenberg et al., 2007). En un estudio realizado en Argentina por Miquel et al. (2007) se encontró que el SNP *CAPN1*-316 estuvo relacionado con variaciones en las características de ganancia en peso vivo y peso a la matanza en animales de las razas Angus y Brangus criados a pastoreo y sacrificados a un espesor de grasa dorsal promedio de 6.0 mm.

En los estudios de Page et al. (2002 y 2004), White et al. (2005) y Casas et al. (2005 y 2006) se identificaron SNP que afectan la morfología de la proteína de *CAPN1* de tal modo que su acción podría variar al cambiar la base nitrogenada. Page et al. (2004) describieron dos SNP responsables de variación en actividad del gen de μ -calpaína. El primero se denominó *CAPN1*-316 debido a que provoca un cambio en el ami-

noácido 316 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transversión consta de la sustitución de bases C/G, que a su vez se traduce en un cambio de glicina por alanina. El segundo SNP de importancia se denominó *CAPN1*-530 puesto que afecta la identidad del aminoácido 530 de la cadena polipeptídica de *CAPN1*. Esta transición de A/G se traduce en un cambio de valina por isoleucina, según White et al. (2005). Ambos polimorfismos han sido intensamente estudiados en varias poblaciones y subespecies bovinas (White et al., 2005). Estas investigaciones han demostrado que *CAPN1*-316 se relaciona con variaciones en terneza de la carne de todas las subespecies bovinas, mientras que *CAPN1*-530 ejerce un efecto similar solamente en el ganado *Bos taurus*.

Un tercer polimorfismo se identificó en el gen de *CAPN1*. Este se denomina *CAPN1*-4751 (Casas et al., 2006). Su nombre no lleva ninguna relación con la cadena polipeptídica de *CAPN1*, a diferencia del caso de los dos SNP anteriores (White et al., 2005). Este polimorfismo se encuentra en el intrón 17 de la región regulatoria de dicho gen. El mismo consta de una inserción/eliminación de C/T según Casas et al. (2006). Este SNP ha sido asociado con diferencias en el grado de terneza de la carne de todas las subespecies bovinas estudiadas incluyendo *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bubalis* (búfalo de agua), *Bos bison* (bisonte americano) y *Bos grunniens* (yak), según White et al. (2005).

En este estudio se evaluaron las frecuencias de los genotipos de *CAPN1*-316 y *CAPN1*-4751 debido a su conocida actividad en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*. Previamente se habían asociado los genotipos CC de ambos marcadores como aquellos que predisponían al animal a producir carne más tierna (White et al., 2005; Casas et al., 2006). En Puerto Rico se observaron patrones de segregación similares a los reportados previamente, siendo el genotipo CC el menos frecuente para todas las razas muestreadas (Page et al., 2004; White et al., 2005; Casas et al., 2005; Van Enennaam et al., 2007), aunque se observó una cantidad considerable de animales heterocigotos para ambos SNP. Es interesante que el genotipo CC fuera observado con mayor frecuencia en los animales Senepol con respecto a las otras razas muestreadas. En el caso de *CAPN1*-316, la raza Senepol fue la única que presentó todos los genotipos. Este resultado puede ser indicativo de que dicha raza no tan solo presenta características favorables de tolerancia a las condiciones ambientales en el clima del trópico húmedo, resistencia a parásitos y un temperamento dócil, sino que también presenta una predisposición genética para la producción de carne con perfiles de terneza aceptables.

El SNP encontrado en *CAST* se ubica en la región no traducible 3', según Barendse (2002). Este polimorfismo consta de una transición entre C y T. Previamente se había asociado el genotipo TT con la predis-

posición animal a un mayor grado de ternera (Casas et al., 2006). Dicho genotipo se encuentra en una alta proporción dentro de la población genotipificada en este estudio, irrespectivamente de la raza, confirmando lo informado por Casas et al. (2006) y Van Enennaam et al. (2007).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio revelaron los patrones de segregación de dos marcadores moleculares en *CAPNI* y uno en *CAST* de posible importancia económica en sistemas de producción de carne en Puerto Rico. Para ambos SNP en *CAPNI*, el genotipo CC, que fue el de menor frecuencia, ha sido asociado a mayor ternera de la carne; este genotipo, fue observado únicamente en la raza Senepol. Esta raza presentó todos los SNP en *CAPNI* y *CAST* analizados en este estudio, lo que sugiere una mayor variabilidad genética y por ende, mayores posibilidades de selección. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con mayor número de animales para caracterizar cada una de las razas en cuestión con una mayor exactitud. Sería deseable que nuevos muestreos incluyeran razas predominantes en otros países e islas del Caribe donde las razas criollas podrían constituir un acervo genético interesante.

LITERATURA CITADA

- Barendse, W. J., 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes y M. Koohmaraie, 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78: 560.
- Casas, E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. L. Smith, R. A. Breneman, T. A. Olson, D. D. Johnson, S. W. Coleman, G. L. Bennett y C. C. Chase, Jr., 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83:13.
- Casas, E., S. N. White, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase Jr., D. D. Johnson y T. P. L. Smith, 2006. Effects of *calpastatin* and *μ-calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520.
- Chung, H., B. Choi, G. Jang, K. Lee, H. Kim, S. Yoon, S. Im, M. Davis y H. Hines, 2007. Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *J. Appl. Genet.* 48:61.
- Geesink, G. H., S. Kuchay, A. H. Chishti y M. Koohmaraie, 2006. A-Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *J. Anim. Sci.* 84: 2834.
- Hamby, P., 1992. Palatability problems in restaurant beef. *En: G. C. Smith (Ed.). The Final Report of the National Beef Quality Audit-1991.* Colorado State Univ., Fort Collins and Texas A&M Univ., College Station.
- Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Koohmaraie y R. T. Stone, 1999. A region on bovine chromosome 15 influences beef *longissimus* tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 77: 1364.
- Miquel, M., E. Villareal, C. Mezzadra, L. Melucci, L. Soria, P. Corva y A. Schor, 2007. Growth and carcass traits of steers on pasture discriminating genotypes of *CAPNI* 316 marker. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú. PB041.

- Morgan, J. B., R. K. Miller, F. M. Mendez, D. S. Hale y J. W. Savell, 1991. Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *J. Anim. Sci.* 69: 4469.
- Moyen, C., S. Goudenege, S. Poussard, A. H. Sassi, J. J. Brustis y P. Cottin, 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 728.
- Page, B. T., E. Casas, M. P. Heaton, N. G. Cullen, D. L. Hyndman, C. A. Morris, M. Crawford, T. L. Wheeler, M. Koohmaraie, J. W. Keele y T. P. L. Smith, 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 3077.
- Page, B. T., E. Casas, R. L. Quaas, R. M. Thallman, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, S. N. White, J. W. Keele y T. P. L. Smith, 2004. Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. Anim. Sci.* 82: 3474.
- Rodríguez, S., T. R. Gaunt, e I. N. M. Day, 2009. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies. *Am. J. Epidemiol.* doi: 10.1093/aje/kwn359.
- Shackelford, S. D., M. Koohmaraie, L. V. Cundiff, K. E. Gregory, G. A. Rohrer y J. W. Savell, 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857.
- Shackelford, S. D., T. L. Wheeler y M. Koohmaraie, 1997. Tenderness classification of beef: I. Evaluation of beef longissimus shear force at 1 or 2 days postmortem as a predictor of aged beef tenderness. *J. Anim. Sci.* 75: 2417.
- Smith, T. P. L., F. A. Simmen, G. Zhao y J. L. Vallet, 2001. Rapid communication: nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA. *J. Anim. Sci.* 79: 552.
- Stone, R. T., E. Casas, T. P. L. Smith, J. W. Keele, G. Harhay, G. L. Bennett, M. Koohmaraie, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford y W. M. Snelling, 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: Development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 83: 2280.
- Van den Maagdenberg, K., E. Claeys, A. Stinckens, N. Buys y S. De Smet, 2007. Effect of age, muscle and insulin-like growth factor-II genotype in pigs on muscle proteolytic and lipolytic enzyme activities. *J. Anim. Sci.* 10: 2527.
- Van Enennaam, A. L., J. Li, R. M. Thallman, R. L. Quaas, M. E. Dikeman, C. A. Gill, D. E. Franke y M. G. Thomas, 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891.
- White, S. N., E. Casas, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase, Jr., D. D. Johnson, J. W. Keele y T. P. L. Smith, 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: 2001.