



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPASTATINA, IGF1, LEPTINA, Y CALPAÍNA COMO INDICADORES DE TERNEZA DE LA CARNE OVINA

FIDEL MIGUEL TORRES LEMUS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: **POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPASTATINA, IGF1, LEPTINA, Y CALPAÍNA COMO INDICADORES DE TERNEZA DE LA CARNE OVINA**, realizada por el alumno: **Fidel Miguel Torres Lemus**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

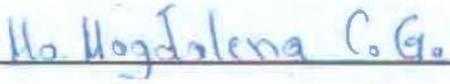
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Omar Hernández Mendo

ASESOR:



Dr. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR:



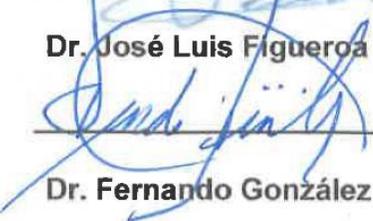
Dr. César Cortez Romero

ASESOR:



Dr. José Luis Figueroa Velasco

ASESOR:



Dr. Fernando González Cerón

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Octubre 2020

POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPASTATINA, IGF1, LEPTINA, Y CALPAÍNA COMO INDICADORES DE TERNEZA DE LA CARNE OVINA

Fidel Miguel Torres, Dr.
Colegio De Postgraduados, 2020

RESUMEN

La presente tesis se compone de la introducción general, revisión de literatura y 4 artículos que conforman el total de la investigación, además de conclusiones y recomendaciones generales. El Capítulo 1 consiste en una revisión bibliográfica dada la circunstancia de la utilización de marcadores moleculares relacionados con la producción y calidad de la carne en ovinos. Se realizó una revisión exhaustiva de artículos científicos en los cuales se ha reportado los avances genéticos a través del uso de marcadores moleculares (Web Science, Scopus, Cab Abstract, PubMed), los cuales están relacionados a una mayor productividad de carne y la calidad de la misma. El capítulo 2 consiste en la estandarización de un método de extracción de DNA de sangre de ovinos, mediante la utilización de una lisozima bacteriana. En este capítulo se describe la modificación de un método de extracción de DNA en sangre mediante la utilización de una lisozima bacteriana empleada únicamente en bacterias Gram negativas las cuales, debido a su doble membrana, imposibilita el acceso al DNA mitocondrial. Considerando que el método de extracción de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) no ha tenido los resultados óptimos de pureza y concentración del material genético (DNA), la adición de la lisozima mejora de manera notable los parámetros de pureza y concentración del DNA de las células provenientes de tejido y sangre animal, resultando adecuados para pruebas sensibles y específicas como lo son la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y Secuenciación. El Capítulo 3 consiste en el estudio de una población de ovinos, con la finalidad de identificar los polimorfismos de los genes Calpastatina (CAPN316) y Calpaína (CAST1), relacionadas por sus recombinaciones genéticas con la terneza y calidad de la carne; así como, el desarrollo de un estudio genético poblacional para identificar individuos dominantes que han sido relacionados con la terneza de la carne en ovinos. Se utilizó una población de 300 ovinos pertenecientes a un hato, y mediante

la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) se determinó el análisis de población, observando la distribución de heterocigocidad, identificación de polimorfismos, distribución de dominancia y recesividad de los genes CAST1 y CAPN316.

En el capítulo 4 se discute la variabilidad genética e identificación de haplotipos en seis razas de ovinos especializadas en la producción de carne, así como la identificación de polimorfismos de los genes IGF1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1), LEP271 (Leptina-271) y LEP245 (Leptina-245). La secuenciación y estudio de los polimorfismos detectados en animales sobresalientes generó datos para poder realizar un estudio poblacional y la construcción de una red de haplotipos con individuos muestreados en otras latitudes y que fueron registrados en el banco mundial de genes (GenBank).

Palabras clave: Gen, DNA, secuenciación, polimorfismo, CTAB, lisozima.

GENETIC VARIABILITY OF THE GENES IGF1, LEPTINE CALPAINE AND CALPASTATINE IN SHEEP FROM MEAT

Fidel Miguel Torres, Dr.
Colegio De Postgraduados, 2020

ABSTRACT

This thesis is made up of the general introduction, literature review and 4 articles that make up the total research, in addition to general conclusions and recommendations. Chapter 1 consists of a bibliographic review given the circumstance of the use of molecular markers related to the production and quality of meat in sheep. An exhaustive review of scientific articles was carried out in which genetic advances have been reported through the use of molecular markers (Web Science, Scopus, Cab Abstract, PubMed), which are related to higher meat productivity and the quality of the same. Chapter 2 consists of the standardization of a method of extracting DNA from sheep blood, using a bacterial lysozyme. This chapter describes the modification of a blood DNA extraction method using a bacterial lysozyme used only in Gram negative bacteria which, due to their double membrane, make access to mitochondrial DNA impossible. Considering that the extraction method of Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) has not had the optimal results of purity and concentration of the genetic material (DNA), the addition of lysozyme significantly improves the purity and concentration parameters of the DNA of the cells from animal tissue and blood, making it suitable for sensitive and specific tests such as polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Chapter 3 consists of the study of a population of sheep, in order to identify the polymorphisms of the Calpastatin (CAPN316) and Calpain (CAST1) genes, related by their genetic recombination with tenderness and meat quality; as well as the development of a population genetic study to identify dominant individuals that have been related to the tenderness of meat in sheep. A population of 300 sheep belonging to a herd was used, and the population analysis was determined using the single chain conformation polymorphism (SSCP) technique, observing the distribution of heterozygosity, identification of polymorphisms, dominance distribution and recessivity of the CAST1 and CAPN316 genes.

Chapter 4 discusses genetic variability and haplotype identification in six specialized sheep breeds in meat production, as well as the identification of polymorphisms of the IGF1 (Insulin Growth Factor Type 1) genes, LEP271 (Leptin-271). and LEP245 (Leptin-245). The sequencing and study of the polymorphisms detected in outstanding animals generated data to carry out a population study and the construction of a haplotype network with individuals sampled in other latitudes and which were registered in the World Gene Bank (GenBank).

Key words: Gene, DNA, sequencing, polymorphism, CTAB, lysozyme.

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Daniel y Dolores:

Por apoyarme a seguir adelante y estar siempre presentes en los momentos buenos y adversos, además de ser la fuente de inspiración y motivación para superarme cada día.

A mis hermanos Eva, Ramón y Elizabeth:

Aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos.

Muchas gracias hermanos.

A María José:

Tu afecto y cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Aún a tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñado muchas cosas de esta vida. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y satisfactorio de la vida. Fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de vida. Gracias, princesa.

A mi amiga e inseparable esposa Jennifer, por darme la alegría más grande de mi vida, por estar al lado de mi hombro luchando día a día por convertirme en un mejor esposo y mejor persona, gracias.

Dedico esta tesis a todos aquellos que no creyeron en mí, a aquellos que esperaban mi fracaso en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que nunca esperaban que lograra terminar el doctorado, a todos aquellos que apostaban a que me rendiría a medio camino, a todos los que dedujeron que no lo lograría, a todos ellos les dedico esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al área de Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad Ganadería por la confianza otorgada durante mi formación.

A mi asesor el Dr. Omar Hernández Mendo que compartió su experiencia y conocimientos de manera desinteresada y por exigirme más allá de su deber.

A los miembros del Comité Particular Dra. María Magdalena Crosby Galván, Dr. José Luis Figueroa Velasco, Dr. Cesar Cortez Romero y al Dr. Fernando González Cerón por sus acertados consejos y sugerencias.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por compartir su conocimiento, apoyo y paciencia. Le estaré eternamente agradecido.

Al ingeniero Margarita Crosby Galván y Dra. Martha Hernández Rodríguez por su apoyo y sabios consejos.

A mis amigos (A. Zamora, Joel, Víctor, Sergio, Cordero, Rafael y V. Zamora), gracias por su eterna amistad.

Al personal administrativo y a todos aquellos que me brindaron su amistad.

Gracias a todos.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-----------|
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | v |
| DEDICATORIA | vii |
| AGRADECIMIENTOS | viii |
| LISTA DE CUADROS | xii |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 15 |
| Literatura citada | 17 |
| CAPÍTULO 1. POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPASTATINA Y CALPAÍNA COMO INDICADORES DE TERNEZA DE LA CARNE: UNA REVISIÓN | 19 |
| 1.1 RESUMEN | 19 |
| 1.2 INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1.3 La Genética y Biología molecular: aspectos importantes en ovinos | 21 |
| 1.4 Genes involucrados en la calidad de la carne | 22 |
| 1.5 Calpastatina en la conversión del músculo a carne | 24 |
| 1.6 Calpaína y su efecto en la terneza de la carne | 25 |
| 1.7 Polimorfismos de los genes CAST y CAPN y su relación con la calidad de carne | 26 |
| 1.8 Detección de polimorfismos de importancia económica | 28 |
| 1.8.1 SNP (Polimorfismo de Base Única) | 28 |
| 1.8.2 SSR (Microsatélites o Secuencias Repetidas Cortas) | 29 |
| 1.8.3 RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) | 30 |
| 1.9 El estudio de diversidad genética como parte de la selección animal | 30 |
| 1.10 Modulación de la expresión de Calpaína y Calpastatina | 32 |
| 1.11 Nutrigenómica (Alimentación y expresión génica) | 33 |
| 1.12 Perspectivas | 34 |
| 1.13 CONCLUSIÓN | 34 |
| 1.14 LITERATURA CITADA | 35 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPTER II. A NOVEL MODIFICATION TO THE CTAB METHOD FOR THE SUCCESSFUL EXTRACTION OF DNA FROM ANIMAL BLOOD BY ADDING BACTERIAL LYSOZYME..... | 41 |
| 2.1 ABSTRACT..... | 41 |
| 2.2 INTRODUCTION..... | 42 |
| 2.3 MATERIALS AND METHODS..... | 43 |
| 2.3.1 Sampling | 43 |
| 2.3.2 Modifications to the 2% CTAB protocol | 43 |
| 2.3.3 DNA extraction | 44 |
| 2.3.4 Absorbance, quality, and DNA quantification | 45 |
| 2.3.5 PCR and sequencing | 45 |
| 2.3.6 Statistical analyses..... | 47 |
| 2.4 RESULTS..... | 47 |
| 2.4.1 Measurement of DNA absorbance | 47 |
| 2.4.2 The concentration of total DNA | 48 |
| 2.4.3 PCR and sequencing | 49 |
| 2.5 DISCUSSION..... | 52 |
| 2.6 CONCLUSIONS..... | 54 |
| 2.7 REFERENCES..... | 56 |
| CAPÍTULO III. POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPAÍNA Y CALPASTATINA EN OVINOS SUFFOLK-DORSET UTILIZANDO PCR-SSCP | 59 |
| 3.1 RESUMEN..... | 59 |
| 3.2 INTRODUCCIÓN..... | 60 |
| 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 61 |
| 3.3.1 Extracción de DNA..... | 61 |
| 3.3.2 Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) | 61 |
| 3.3.3 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) | 63 |
| 3.4 RESULTADOS..... | 64 |
| 3.4.1 Análisis por sexo | 64 |
| 3.4.2 Análisis poblacional..... | 65 |
| 3.5 DISCUSIÓN..... | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6 CONCLUSIONES E IMPLICACIONES | 69 |
| 3.7 LITERATURA CITADA | 71 |
| CAPITULO IV. VARIABILIDAD GENÉTICA DE SEIS RAZAS DE OVINOS | |
| PRODUCTORES DE CARNE GENETIC VARIABILITY OF SHEEP IN SIX MEAT | |
| BREEDS | 74 |
| 4.1 RESUMEN | 74 |
| 4.2 INTRODUCCIÓN..... | 75 |
| 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 76 |
| 4.3.1 Recurso animal | 76 |
| 4.3.2 Extracción del mtDNA, PCR y Secuenciación..... | 77 |
| 4.3.3 Red de haplotipos | 78 |
| 4.3.4 Análisis filogenético multilocus..... | 78 |
| 4.4 RESULTADOS..... | 80 |
| 4.4.1 Detección de la diversidad a través de la red de haplotipos | 80 |
| 4.4.2 Análisis filogenético multilocus..... | 83 |
| 4.5 DISCUSIÓN..... | 85 |
| 4.5.1 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (Lep275) | 86 |
| 4.5.2 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (Lep471) | 86 |
| 4.5.3 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (IGF1)..... | 87 |
| 4.6 CONCLUSIONES..... | 88 |
| 4.7 REFERENCIAS..... | 89 |
| CONCLUSIÓN GENERAL..... | 92 |

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

Pág.

Cuadro 1 Polimorfismos de genes involucrados en la calidad y ternura de la carne en especies domésticas 23

CAPÍTULO II

Cuadro 1 Optical density relationships of DNA in sheep blood samples^a..... **¡Error! Marcador no definido.**47

CAPÍTULO III

Cuadro 1 Secuencias de primer´s requeridos para la amplificación de los genes Calpaína (CAST1) y Calpastatina (CAPN316). **¡Error! Marcador no definido.**2

Cuadro 2 Frecuencias genotípicas por SEXO para los locus CAST1 y CAPN316. **¡Error! Marcador no definido.**5

Cuadro 3 Frecuencias alélicas y genotípicas POBLACIONAL de los locus CAST1 y CAPN316. **¡Error! Marcador no definido.**6

Cuadro 4 Heterocigocidad y prueba de equilibrio de Harding-Weiberg para los locus CAPN316 y CAST1. 66

CAPÍTULO IV

Cuadro 1 Secuencias de primer´s requeridos para la amplificación de los genes Lep275, Lep471 e IGF1. 78

Cuadro 2 Registro y números de accesoión al NCBI de los Genes Lep275, Lep471 e IGF1. 79

Cuadro 3 Parámetros de diversidad genética estimados de los genes Lep275, Lep471 e IGF1 de mtDNA en las seis razas de ovinos. 81

LISTA DE FIGURAS CAPITULO I

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1 Proceso de maduración de la carne desde el sacrificio, hasta el efecto proteolítico..... | 25 |
| Figura 2 Identificación de un polimorfismo (B), ocasionado por una sustitución de un nucleótido (Gen calpastatina) en un gel de acrilamida al 2%..... | 29 |
| Figura 3 Estructura de la población de ovejas francesas, un promedio de coeficientes de ascendencia individuales dentro de la raza para cuatro poblaciones ancestrales. | 31 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Figura 1 Estructura de la población de ovejas francesas. un Promedio de coeficientes de ascendencia individuales dentro de la raza para cuatro poblaciones ancestrales. | 31 |
| Figura 2 Concentration of total DNA (ng/μL) by 2% CTAB method modified with (CTABML) and without the addition of lysozyme (CTABM). ¡Error! Marcador no definido.49 | 49 |
| Figura 3 Total DNA of high molecular weight obtained from sheep blood on the 2% agarose gel. Lanes 1-3 correspond to CTABM. Lanes 4-7 correspond to CTABML. All wells with 60 ng/μL of total DNA..... ¡Error! Marcador no definido.0 | 0 |
| Figura 4 Amplification of the Leptin and IGF-1 genes in the 2% agarose gel using the 2% CTAB protocol with the addition of lysozyme (CTABML). Lanes 1-6 correspond to the Leptin275 gene. Lanes 7-11 correspond to the IGF-1 gene. All wells with 60 ng/μL of the PCR..... ¡Error! Marcador no definido. | 0 |
| Figure 5 The electropherograms that depict the results obtained by the direct sequencing of the Insulin-like Growth Factor (IGF-1). a Sequences showing noise obtained with the CTABM method. b Sequences demonstrating well-defined peaks obtained with the CTABML (bacterial lysozyme addition) by the DNA extraction method..... | 52 |

CAPÍTULO III

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1 PCR CAST1, electroforesis en el gel de agarosa al 2% (1552 pb) | 62 |
| Figura 2 PCR CAPN316, electroforesis en el ge de agarosa al 2% (739 pb)..... | 62 |
| Figura 3 Gel de acrilamida, genotipos del gen CAST1. Carril 1 identificación del genotipo AA. Carril 2 y 3, identificación del genotipo AB. | 63 |
| Figura 4 Gel de acrilamida, genotipos del gen CAPN316. Carril 1,4,5 identificación del genotipo BB. Cariil 2 y 3, identificación del genotipo AB. | 64 |

CAPÍTULO IV

| | |
|--|----|
| Figura 1 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen LEP275, generado a partir en 250 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas cercanas a secuencias reportas en GenBank..... | 81 |
| Figura 2 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen IGF1. Generado a partir en 250 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas (2-4 sustituciones) comparadas con genes de individuos reportados en GenBank. | 82 |
| Figura 3 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen LEP471. Generado a partir en 470 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas cercanas a secuencias reportas en GenBank..... | 82 |
| Figura 4 Árbol de población de máxima probabilidad de razas ovinas estimado utilizando el marcador de IGF1. Las razas de este conjunto de datos de estudio están identificadas con el nombre del país del que proceden. | 84 |
| Figura 5 Árbol de población de máxima probabilidad de razas ovinas estimado utilizando el marcador de LEP471. Las razas de este conjunto de datos de estudio están identificadas con el nombre del país del que proceden. | 85 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México la industria productora de carne para abasto se origina principalmente de rumiantes; esta ha llegado a ser una de las fuentes importantes de ingreso para la economía de la ganadería (SIAP, 2010). El aporte de nutrientes para el ser humano es necesario e indispensable; la carne de la mejor calidad tiene un elevado valor nutritivo y sensorial que basa su naturaleza principalmente en el sabor y ternura (Geay *et al.*, 2001).

La industria ganadera nacional ocupa el tercer lugar en la economía del país. La globalización e industrialización ha orillado a esta industria a volverse competitiva y sustentable; la población se ha vuelto selectiva y precisa al momento de seleccionar aquellos productos que conforman su canasta de consumo para las familias, buscando mercancías que satisfagan sus propias necesidades y gustos (Ayala *et al.*, 2011).

La carne de pequeños rumiantes, específicamente la de los ovinos, se ha vuelto pieza clave para el desarrollo y firmeza de la economía de pequeñas regiones del país, la competencia desleal con productos extranjeros ha detenido un crecimiento en mayor proporción de esta industria; países desarrollados con infraestructura y biotecnología disponible han realizado una eficiencia al momento de transformar sus productos en artículos de calidad suprema, dejando que los consumidores sufraguen estos productos en el mercado nacional (Esperbent, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proyecta que, de no hacer conciencia sobre este tema, en 2030 casi 23,6 millones de personas morirán al año por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares (OMS, 2016). Por otra parte, la Secretaría de Salud (SSA) en México ha reportado que las causas principales de muerte en nuestro país estarán dadas por enfermedades cardiodegenerativas principalmente, relacionadas al estilo de vida y tipo de dieta de los mexicanos, que basan su alimentación en productos y subproductos originados con grasas de origen animal. La SSA en México hace la recomendación para disminuir el consumo de grasas de origen animal a todos los sectores de la población (Secretaría de salud, 2019).

Una respuesta certera y precisa de las industrias cárnicas fue la búsqueda de estrategias específicas auxiliándose de biotecnologías que pudieran revertir y sosegar el daño que pudieran ocasionar las carnes, convirtiéndolas en productos molde de excelente calidad; tomando en cuenta que el principal factor determinante en el animal vivo es el sistema calpaína - calpastatina del músculo, ya que participa en el crecimiento y diferenciación de los mioblastos y formación de grasas (Goll *et al.*, 1992), por lo tanto, se han dado a la tarea de buscar alternativas sustentables y adecuadas para que desde la alimentación y mejoramiento genético pueda darse este cambio asequible y plausible.

En la industria cárnica, la transformación en los procesos puede perjudicar la producción y calidad; este proceso proteolítico en la carne, es el principal factor que desencadena el desarrollo de la gran mayoría de aquellas carnes duras o llamadas carnes DFD que modifican la composición y calidad del proceso de madurez óptimo para la carne. Algunos autores como Eimori (1988), demostró que la calpastatina era un inhibidor competitivo de dos proteasas dependientes de Ca^{2+} , la μ -calpaína y la m -calpaína, y que la mayor proporción de esta misma podría llegar a inhibir cuatro moléculas de calpaína (Cong *et al.*, 1998), dando así la posibilidad de retardar el proceso natural de desnaturalización activada por las calpaínas y de esta manera brindar una carne de mejor calidad.

En la última década de 2015, la búsqueda de dietas que puedan explicar los cambios asociados a la terneza de la carne, han llegado a determinar e involucrar aquellos principales genes envueltos en la regulación de estas cualidades, siendo la calpastatina, calpaína, miostatina y tiroglobulina principalmente, genes implicados directamente en la conformación, síntesis, metabolismo y degradación del músculo; diferentes trabajos coinciden en que la concentración de calpastatina al momento de la muerte del animal es uno de los factores que afecta la calidad de la carne.

La asociación de algunos de los genes y la expresión de los mismos ha llegado a estar relacionada con su modulación y expresión, primordialmente en bovinos; no obstante, en ovinos la información es muy limitada, por lo que para confirmar el papel que desarrollan los genes Leptina e IGF1 en la capacidad de crecimiento muscular y

calpastatina/calpaína en la terneza de la carne de ovinos, es necesario identificar la presencia de sus polimorfismos (Zhou *et al.*, 2010).

Por lo anterior, el objetivo de la siguiente investigación fue identificar animales heterocigotos dominantes en una población para los genes CAST1 y CAPN316, con la finalidad de sintetizar y validar nuestros propios marcadores moleculares, logrando de esta manera identificar animales que puedan conferir las cualidades deseables de calidad y terneza.

Literatura citada

- Ayala G., A. V., Sangerman-Jarquín D. M., Schwentesius Rindermann R., Almaguer Vargas G., Jolalpa Barrera J. L. 2011. Determinación de la competitividad del sector agropecuario en México, 1980-2009. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2: 501-514.
- Cong M., Thompson V.F., Goll D.E., Antin P. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 660–666.
- Eimori Y., Kawasaki H.S., Imajoh Y., Minami K., Suzuki K. 1988. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 2364-2370.
- Esperbent C. E. 2017. Carnes alternativas: símbolo de las economías regionales. Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional, DNA SICC, INTA.
- Geay Yves. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*, 2001, 41:1-26.
- Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Christiansen J.A. 1992. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*, 74: 225-237.
- Organización Mundial de la Salud. 2016. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Secretaría de Salud. 2019. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria: estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. México DF: Sub-Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud de la Secretaría de Salud 311.
- SIAP, Servicio de información agraria y pesquera, de Ganadería, C. G. 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. SAGARPA. *Clarid Agropec*, 199: 3-34.

Zhou G., Cao Y., Li M., Zhang L., Yu Y., Jin H. 2010. Meat quality and carcass traits in relation to HGD-BstXI and HGD-HaeIII PCR-RFLP polymorphism in Chinese red cattle. *Meat Science*, 85: 270-273.

CAPÍTULO 1. POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPASTATINA Y CALPAÍNA COMO INDICADORES DE TERNEZA DE LA CARNE: UNA REVISIÓN

1.1 RESUMEN

La terneza de la carne representa una característica de la carne que tiene importancia económica en la industria cárnica, dado que entre otros factores es una cualidad que determinará las compras posteriores a su consumo. En esta revisión bibliográfica se discuten los factores involucrados para una selección oportuna de individuos genéticamente superiores en un rebaño, asegurando la descendencia de una progenie sobresaliente, capaz de abastecer la industria cárnica de productos altamente demandados. Diversos estudios indican que los genes Calpastatina (CAST) y Calpaína (CAPN) están relacionados con la modulación del sistema enzimático calpastatina-calpaína, el cual es responsable de proveer suavidad o firmeza de las fibras musculares, característica que se puede llegar a modular durante el proceso de maduración de la carne. Para lograr esta selección de individuos sobresalientes, existen diferentes herramientas moleculares que facilitan la identificación de mutaciones específicas causantes de la variabilidad genética, las cuales han mostrado ser responsables de la expresión fenotípica del individuo, y que, además, determina la calidad de la carne. La utilización de marcadores moleculares es primordial para la identificación de individuos que modulen, expresen y transfieran genes a su progenie capaces de producir una mejor carne con un valor agregado en beneficio de la salud humana. De manera que, la presente revisión se pretende profundizar en el conocimiento de la modulación y expresión de los genes CAST y CAPN involucrados en la terneza de la carne.

Palabras clave: Marcadores moleculares, terneza, calidad de la carne, genes.

1.2 INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética de los ovinos ha disminuido durante el proceso de mejoramiento genético dirigido, el cual implica intensa selección de razas para producción de lana y carne (Rochus *et al.*, 2018). El estudio del genoma ovino nos acerca al entendimiento e identificación de mutaciones genéticas relacionadas con la expresión fenotípica, que se fundamenta en la regulación, silenciamiento, expresión y modulación de los genes de mayor interés productivo.

La industria cárnica es una de las principales fuentes económicas de la ganadería; es clave por la generación de productos de calidad al consumidor. Estudios recientes indican que el potencial genético de cada animal es el factor determinante en cualidades organolépticas como la ternera y calidad de la carne (Motter *et al.*, 2009), generando un interés creciente en la investigación en esta área. A este respecto, Goll *et al.* (1998), demostraron que la ternera de la carne está relacionada con la actividad del sistema calpastatina-calpaína, teniendo una relación importante con la renovación de proteínas musculares y el proceso de ablandamiento *post mortem* de la carne. De la misma manera, Eimori *et al.* (1988) y Cong *et al.* (1998) reportaron a la calpastatina como una proteína inhibidora de proteasas dependientes de calcio (Ca^{2+}), y que μ -calpaína y m-calpaína en mayor proporción son capaces de inhibir moléculas de calpaína, motivo por el cual se retarda el proceso de desnaturalización de la carne y, por tanto, de mayor dureza.

Por ejemplo, Cheong *et al.* (2008) reportan que calpaína tiene capacidad de modificar la estabilidad de ARN mensajero (ARNm) y así modificar la expresión de lo UTR (región no traducida) quien tiene la función de modular la expresión genética del gen, por lo tanto, este mecanismo genético podría intensificar la ternera y marmoleo de la carne. Por otra parte, Motter *et al.* (2013) identificaron que individuos recesivos para el gen calpastatina, los cuales sufrían una sustitución de una base (G/C), eran favorables para la predicción de la ternera de la carne en bovinos Brangus. Así, la predisposición genética de las razas para producir un tipo de carne específica podría estar establecida (Uzcátegui-Bracho *et al.*, 2008), aunque el dominio o recesión de genes en individuos que poseen los genes

de calpastatina y calpaína podrían expresarse en las dos especies tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*.

Esta revisión resalta los enfoques biológicos y genéticos que llegan a afectar el mecanismo de tenderización y calidad de la carne. Además de brindar la información básica en el conocimiento referente a identificar mutaciones de los genes calpaína y calpastatina, los cuales nos permiten entender el proceso evolutivo de los genes y la diversidad biológica dentro de las especies.

1.3 La Genética y Biología molecular: aspectos importantes en ovinos

Estudios sobre la diversidad de secuencias de ovinos (Hiendleder *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2005) se han basado principalmente en ovejas europeas o asiáticas, relegando el estudio y procedencia de las ovejas latinoamericanas y su proceso evolutivo. De forma que la identificación de genes polimórficos causantes de la variación genética es elemental en genética; la relación genotípica ligada a caracteres de aptitud con los locus de un carácter cuantitativo (QTL) favorecen la selección de individuos que representan regiones preservadas en el genoma, lo que ayuda al estudio evolutivo de la especie. A este respecto, se han realizado estudios que analizaron la similitud genética de varias razas de ovinos entre los que destacan los americanos (Zhang *et al.*, 2013) y estudios que incluyen poblaciones de ovejas provenientes de todo el mundo (Fariello *et al.*, 2014), donde se utilizó el conjunto de datos del ISGC (Consorcio Internacional de genética-Genoma de la Oveja), con lo que se detectó firmas genéticas que contenían genes o QTL asociados con pigmentación, morfología, musculatura, producción de leche y calidad de la lana, permitiendo la realización de la historia evolutiva. Sintetizando, los escaneos genómicos y la biología molecular permiten la selección de muestras de secuenciación masivas, disponibles en el cerdo (Li *et al.*, 2013), bovinos (Qanbari *et al.*, 2011) o pollos (Roux *et al.*, 2015), teniendo la ventaja al utilizar datos de secuenciación y detectar firmas de selección aún no establecidas, preservando y reproduciendo animales de alto valor genético.

1.4 Genes involucrados en la calidad de la carne

La terneza de la carne es el atributo más importante y valorado por los consumidores, seguido del marmoleo, donde existen múltiples factores que los determinan, y dado que el factor genético de cada animal predispone la calidad de su carne, las investigaciones se han enfocado a la identificación de los genes involucrados en la producción de músculo y desarrollo de este, con lo cual se promueve la selección animal oportuna de individuos con capacidades superiores. Existen diversos genes relacionados con la producción de carne en las diferentes especies domésticas (Cuadro 1). Cabe la pena resaltar el hecho que la selección exhaustiva de individuos emparentados con la finalidad de fijar un rasgo o cualidad productiva ocasiona endogamia y fijación de alelos dominantes (calpastatina) en el ganado brahman en bovinos (Rojas *et al.*, 2017) o bien, el caso del gen halotano en cerdos (Marine *et al.*, 2012), que ocasionan fijación de un gen no deseable y pérdida de diversidad biológica.

Cuadro 1. Polimorfismos de genes involucrados en la calidad y terneza de la carne en especies domésticas.

| GEN | NOMBRE | MECANISMO DE ACCIÓN | ESPECIE | REFERENCIA |
|---------------|--|--------------------------------------|---------------------------|---|
| <i>RYR1</i> | Halotano | Doble musculatura | <i>Porcinos</i> | Hernández <i>et al.</i> , 2008; Martínez-Quintana <i>et al.</i> , 2006; Marine <i>et al.</i> , 2012; Krencova <i>et al.</i> , 1999. |
| <i>PRKAG3</i> | Napole | Rendimiento de la canal | <i>Porcinos</i> | Martínez-Quintana <i>et al.</i> , 2006; Pinheiro <i>et al.</i> , 2007; Zhurina <i>et al.</i> , 2007. |
| <i>CAPN</i> | Calpaína | Terneza de la carne | <i>Ovinos/bovinos</i> | Leal-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2015; Torres-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015. |
| <i>CAST</i> | Calpastatina | Terneza de la carne | <i>Ovinos/bovinos</i> | Vergara <i>et al.</i> , 2019; Fernandes, 2015; Rojas <i>et al.</i> , 2017. |
| <i>LEP</i> | Leptina | Apetito y regulación de termogénesis | <i>Todas las especies</i> | Guerra <i>et al.</i> , 2005; Camacho y Gutiérrez, 2012. |
| <i>IGF1</i> | Factor de Crecimiento tipo insulínico | Crecimiento muscular | <i>Todas las especies</i> | Cervieri <i>et al.</i> , 2005; Garza-Brenner <i>et al.</i> , 2019. |
| <i>MSTN</i> | Miostatina | Aumento de masa muscular | <i>Todas las especies</i> | Epishko <i>et al.</i> , 2018; Pogoverec <i>et al.</i> , 2005. |

1.5 Calpastatina en la conversión del músculo a carne

La enzima calpastatina organizada en cuatro dominios (I a IV) está formada por secuencias repetidas de 140 aminoácidos, entre los cuales existe una homología del 23 al 36% (Killefer *et al.*, 1994), donde cada dominio contiene tres subdominios (A, B y C), a través de los cuales se une a las calpaínas. El subdominio B posee alta homología entre especies y es esencial para la actividad inhibitoria de Calpaína (Goll *et al.*, 2003). Diversos estudios han demostrado que la calpastatina es un inhibidor competitivo de dos proteasas dependientes de calcio (Ca^{2+}), la μ -calpaína y la m-calpaína (Eimori *et al.*, 1988). En presencia de calcio (Ca^{2+}) una molécula de calpastatina puede inhibir hasta cuatro moléculas de calpaína (Cong *et al.*, 1998), esto inhibe una proteólisis muscular después de la muerte a las enzimas proteolíticas (Koochmaraie, 1994, Taylor *et al.*, 1995), lo que genera evidentemente una carne dura y menos palatable para el consumidor.

En la búsqueda por aumentar la eficiencia productiva de los animales, se ha realizado una adición de beta-agonistas como aditivos en la dieta, que mejoran el rendimiento de la masa muscular y consecuentemente un mayor peso de la canal (Ricks *et al.*, 1984), con la desventaja de que estos beta-agonistas influyen negativamente en la terneza de la carne debido a que provocan reducción de la actividad de la μ -calpaína (Gessink *et al.*, 1993) y un incremento de actividad de la calpastatina (Wheeler y Koochmaraie, 1992); cuya concentración incrementa al momento de la muerte del animal, consecuentemente una mayor dureza de la carne (Sensky *et al.*, 2001) (Figura 1).

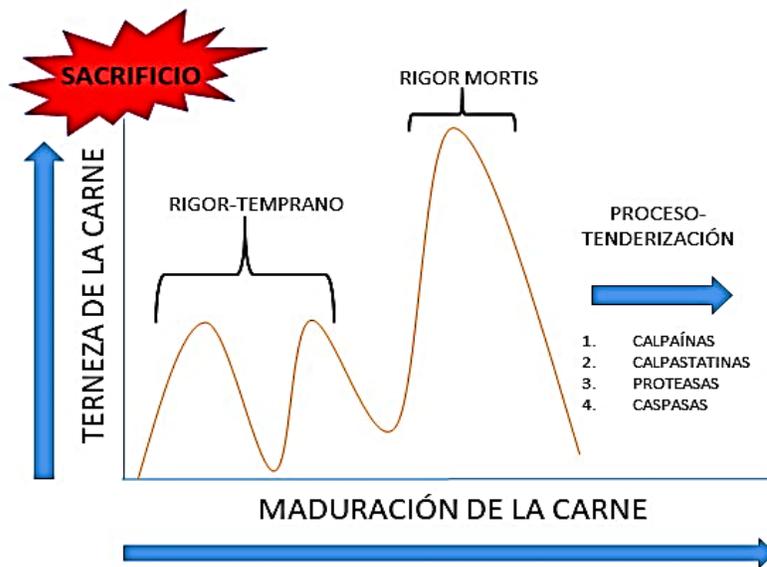


Figura 1 Proceso de maduración de la carne desde el sacrificio, hasta el efecto proteolítico. Fuente: Cruzen, (2014).

1.6 Calpaína y su efecto en la terneza de la carne

Las calpaínas asumen un rol importante como enzimas proteolíticas, de las cuales se han identificado al menos 16 enzimas diferentes (Franco y Huttenlocher, 2005), que participan como inhibidoras de la degradación de proteína-sustrato de la nebulina, metavinculina, desmina y troponina-t presentes en los procesos de formación de la carne (Geesink *et al.*, 2006) y terneza de la carne (Boehm *et al.*, 1998; Pomponio *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2011; Kristensen *et al.*, 2006). Existen mecanismos de regulación de las calpaínas como el de activación por calcio (Ca^{+2}) (Guroff, 1964); mientras el mecanismo de m-calpaína requiere de concentraciones milimolares de calcio (Ca^{+2}), el μ -Calpaína necesita concentraciones micromolares de calcio (Ca^{+2}) (Suzuki *et al.*, 1981). Estos mecanismos regulan la enzima calpastatina, quien es la encargada de la degradación de las fibras musculares. El pH es un factor de regulación de calpaína, donde valores de 6.5 a 7.5 son necesarios para una mayor actividad en μ -Calpaína y m-calpaína (Maddock *et al.*, 2005); los fosfolípidos también participan en la reducción de requerimientos de

concentración de calcio necesario para autólisis y activación de μ -calpaína, siendo insuficientes para activar m-calpaína a concentraciones fisiológicas normales de calcio (Suzuki y Sorimachi, 1998). Por tal motivo, genes que codifiquen, regulen o expresen calpaína y calpastatina son candidatos para estudios de comportamiento (Byun *et al.*, 2008), rendimiento de la canal (Fang *et al.*, 2013) y calidad de la carne en ovinos (Bagatoli *et al.*, 2013).

1.7 Polimorfismos de los genes CAST y CAPN y su relación con la calidad de carne

El polimorfismo se entiende como la mutación o cambio de una base por otra en un fragmento específico de un gen, que en ocasiones llega a modificar la expresión de una proteína funcional o estructural en el animal. La selección de genes y la utilización de marcadores moleculares han contribuido a la identificación de polimorfismos como en el caso del gen CAST, que ha sido asociado a la variabilidad de la ternera en rumiantes (Motter *et al.*, 2009). Al respecto, Casas *et al.* (2006) reportaron que la región telomérica del cromosoma 29 de bovinos emparentados tiene una estrecha relación con un QTL (locus de carácter cuantitativo) relacionado con la calidad de la carne. Posteriormente Smith *et al.* (2000) observaron que en la misma región donde se encontraba el QTL se encontraban adicionalmente dos polimorfismos del gen calpastatina. Estas mutaciones fueron analizadas posteriormente por Page *et al.* (2002), quienes reportaron que los cambios en la secuencia de aminoácidos modificaban la conformación de la proteína funcional relacionada a la ternera de la carne. Los mismos autores identificaron dos SNP (polimorfismos de un nucleótido simple o de un solo nucleótido) presentes en el exón 9 (Ala316Gly) y 14 (Ile530Val) del gen bovino CAPN, el cual se ha demostrado que influye en los alelos CAPN1, involucrados con la ternera de la carne. Además, los loci 530Ile y 316Gly se asocian con la disminución de la ternera de la carne (mayor resistencia al corte) en comparación con los alelos alternativos en ambos loci. En un estudio posterior, Schenkel *et al.* (2006) reportan mutaciones puntuales que favorecían la ternera de la carne mediante la genotipificación de individuos capaces de producir una carne de mejor

calidad. Utilizando marcadores que codificaban para calpastatina, se identificó una transición en el exón 30/3' de adenina a guanina llamada CAST1, una transversión de guanina a citosina en el intrón 5 y una transición en el exón 3 llamada WSUCAST, las cuales se relacionaron únicamente con la terneza de la carne en animales *Bos Taurus* y algunas cruces con *Bos Indicus*.

Estudios reportados por Chung *et al.* (2007), quienes analizaron la relación entre genotipo (AA, AB, BB) y ganancia promedio de peso (GPP) en terneros de raza Angus; concluyeron que los genotipos AB (heterocigotos) y BB (homocigotos recesivos) tenían mayor peso en el día 56 ($P < 0.05$) que la del genotipo AA (homocigoto dominante). Sin embargo, en un estudio similar en cerdos, Kocwin-podsiadla *et al.* (2003) y Kurryl (2003), observaron una relación significativa entre el genotipo CAST y el rendimiento del lomo ($P < 0.05$), además evaluaron el efecto del gen CAST en la terneza de la carne.

En ovinos, la genotipificación con la utilización de marcadores para CAST1 ha dado como resultado la asociación del genotipo con la ganancia diaria de peso, encontrando que ovinos de la raza Kurdi identificados como heterocigotos (AB) para el gen de calpastatina, tienen una mejor conversión alimenticia en la ganancia diaria de peso (Nassiry *et al.*, 2007), lo cual contrasta con los datos reportados por Palmer *et al.* (2009), donde los individuos recesivos (AC) del gen CAST en corderos Dorset Down y Dorset Down x Coopworth fueron superiores a los animales dominantes (AA) de la misma raza.

Este tipo de estudio en regiones específicas dentro del cromosoma, representa una herramienta en los programas de selección genética asistida (MAS) para la predicción de terneza y marmoleo de la carne (Davis *et al.*, 1998). Los avances en biología molecular, proteómica y genómica hasta al momento se han enfocado únicamente a bovinos, de manera que se ha relegado el crecimiento y avance tecnológico hacia otras especies con alto potencial productivo y eficiente como los ovinos, caprinos y porcinos. Estos hallazgos podrían conducir eventualmente a la producción y garantía de calidad agroalimentaria con las diferentes especies productivas (Henchion *et al.*, 2017).

1.8 Detección de polimorfismos de importancia económica

La predicción y repetitividad de genes asociados al crecimiento y rendimiento en canal de ovinos ocurren desde etapas embrionarias hasta la pubertad; con el uso de herramientas moleculares se acortan los periodos de selección de animales con la capacidad genética productiva (Hossner, 2005). En la actualidad, el uso de marcadores genéticos genera una expectativa mayor, ya que precisa el mérito genético en animales donde sus características productivas son difíciles y costosas de medir. Existen metodologías moleculares que permiten la identificación de los polimorfismos genéticos o regiones genómicas que influyen en la expresión de caracteres productivos (Casas, 2005). Entre las técnicas mayormente aplicadas en la industria se encuentran: la selección asistida por marcadores (Markers Assisted Selection–MAS) (Negahdary *et al.*, 2013; Dodgson *et al.*, 1997), la selección asistida por genes (Genes Assisted Selection-GAS), método de mapeo de intervalo (QTL) (Lander y Botstein, 1989; Atlija *et al.*, 2013) y selección genómica (Genomic Selection-GS) (Marshall *et al.*, 2011).

1.8.1 SNP (Polimorfismo de Base Única)

La identificación de SNP's únicamente proporciona información de la diferencia en una posición nucleótida única, como lo hacen sustituciones, deleciones o inserciones de un sólo nucleótido. En la Figura 2 podemos observar variaciones de bandeo entre individuos de la misma especie; esto proporciona información necesaria para considerar una mutación puntual o sustitución de una base en un fragmento del gen calpastatina. La mayoría de los SNP's se localizan en regiones no codificantes, quiere esto decir, que no ocasionan un cambio fenotípico y biológico en el animal. Es pertinente mencionar que muchas de estos SNP's se localizan en sitios de genes (codificantes), los cuales se asocian principalmente a enfermedades o aspectos relacionados con la expresión fenotípica (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005), donde su alta frecuencia en el genoma de cualquier individuo y su baja tasa de mutación, lo constituyen como una herramienta ideal para el estudio de poblaciones mediante la construcción de mapas genéticos.

Hasta el momento el SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple) surge como una de las técnicas más importantes, donde se incluyen el análisis de secuencias de microsatélites, haplotipos, DNA mitocondrial, técnica AFLP o el uso cada vez mayor del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Lenstra *et al.*, 2012).

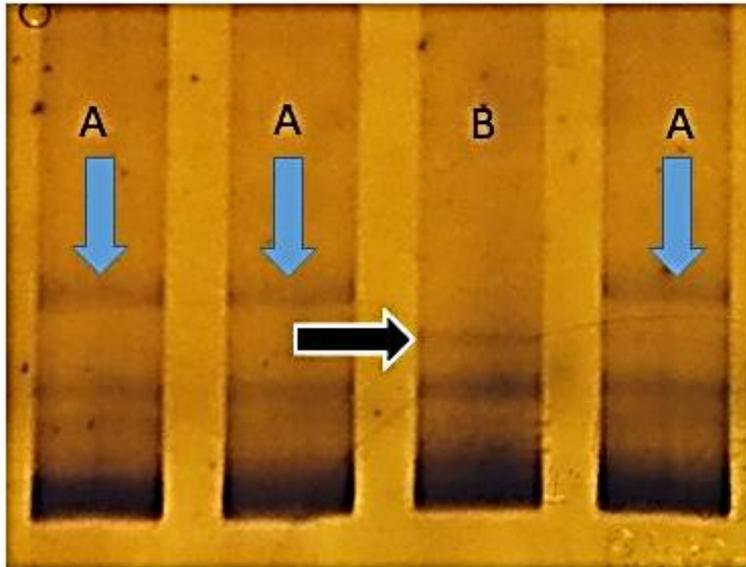


Figura 2 Identificación de un polimorfismo (B), ocasionado por una sustitución de un nucleótido (Gen calpastatina) en un gel de acrilamida al 2%. Fuente: Torres-Lemus *et al.* (2020).

1.8.2 SSR (Microsatélites o Secuencias Repetidas Cortas)

La utilización de microsatélites se ha vuelto una herramienta necesaria para el estudio intrapoblacional, pruebas de paternidad e inclusive en la comparación interespecies. La utilización de microsatélites es deseable por sus características positivas en estudios genéticos, ya que presenta un elevado grado de polimorfismo, que contribuye a la identificación de zonas altamente mutables, su herencia mendeliana es simple y apta para estudios poblacionales, son codominantes ya que es observable la diferenciación de homocigotos-heterocigotos y altamente fiables al ser repetitivos (Schlötterer, 2000).

La utilización de microsatélites es un ejemplo claro en animales como prueba de paternidad oficial para caballos, o el caso específico del cruzamiento de cerdos, donde los cruzamientos están regulados por normas de la *International Society of Animal Genetics* (ISAG), quienes se encargan de asignar las líneas paternas y maternas durante los cruzamientos con la finalidad de evitar problemas de consanguinidad (Bowling y Clark, 1985; Bowling, 2001; Fornal *et al.*, 2013).

1.8.3 RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)

La RFLP se basa en el uso de tecnología mediante enzimas de restricción que cortan el DNA en sitios donde se encuentran una secuencia específica de nucleótidos, pero se ha limitado a pruebas de campo, ya que solo permiten dar una representación de la distribución genotípica de los individuos (Vance y Othmane, 1998). Por lo tanto, se vuelve una prueba poco precisa, pero de gran utilidad en pruebas de cruzamiento y restricción, mismas que no requieren ser del todo específicas. Uno de los principales usos de esta técnica molecular es la identificación de agentes externos que son causantes de enfermedades en ovinos, tal como lo reportado por Jalali *et al.* (2014), quienes identificaron diferentes especies de *Theileria* y el grado de infección en ovejas Ahvaz al sur de Irán, o el aislamiento y análisis filogenético de *Fasciola* hepática en bovinos en la zona tropical de Irán (Aryaeipour *et al.*, 2014).

La utilización de estas técnicas moleculares previamente descritas puede ser empleada para la construcción de mapas de ligamiento, pudiendo ser monitoreados a través de las relaciones genealógicas (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

1.9 El estudio de diversidad genética como parte de la selección animal

La intensa selección dirigida de ovinos proporciona una gran variabilidad fenotípica y alta capacidad de adaptación a entornos y condiciones naturales adversas (Rendo *et al.*,

2004); esto ha generado un elevado índice de endogamia y una reducción en la variabilidad genética de la población (Pariset *et al.*, 2003). Los estudios de diversidad genética en las especies domesticas permiten conocer las estructuras de cada población; esto facilita la posibilidad de establecer estrategias de cruzas, conservación y preservación de los recursos genéticos (Silva-Jarquin *et al.*, 2019). Mediante el estudio de datos genómicos concentrados en el banco mundial de genes (GenBank), los estudios poblacionales han permitido la geolocalización y establecimiento de las diferentes especies productivas, de modo que su historia evolutiva queda al descubierto con el descubrimiento eventual de genes ligados a sus antepasados (Rochus *et al.*, 2018).

Para tener una idea de la historia de la domesticación de las razas de ovinos, se ha incluido al muflón asiático y el muflón europeo como poblaciones externas en análisis reportados por Rochus (2018), donde las frecuencias alélicas en el muflón asiático, el antepasado de las ovejas domesticadas se utilizó para formar el árbol de población en los análisis de árbol de máxima probabilidad (Figura 3).

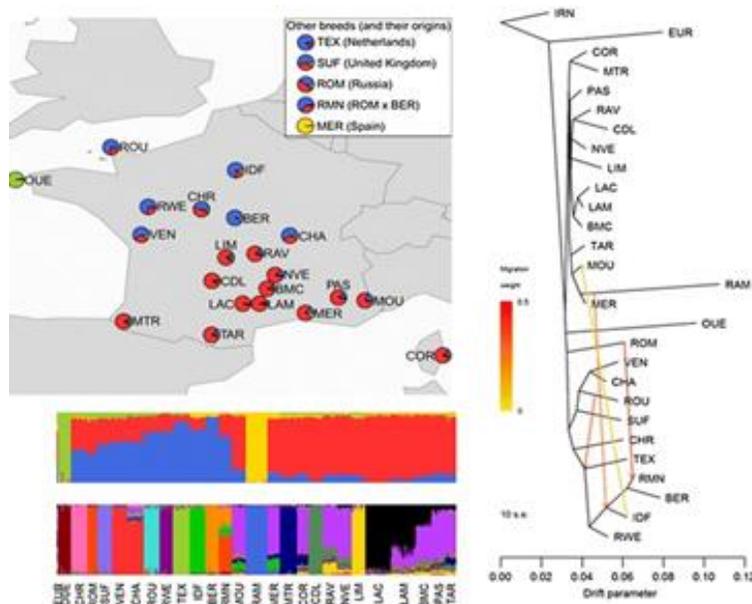


Figura 3 Estructura de la población de ovejas francesas. Promedio de coeficientes de ascendencia individuales dentro de la raza para cuatro poblaciones ancestrales.

Fuente: Epishko et al. (2018).

1.10 Modulación de la expresión de Calpaína y Calpastatina

Los mecanismos en la disminución de la expresión de las calpaínas o el aumento de la expresión de la calpastatina se asocian con la dureza y terneza de la carne (Illian *et al.*, 2001), sugieren que la expresión de la calpaína y calpastatina es modulada por el tipo de fibra y músculo en el que se presentan (Illian *et al.*, 2001; Saccá *et al.*, 2015), lo cual explica el proceso de proteólisis y posteriormente la terneza de la carne. Investigaciones en bovinos cebú sugieren que la menor terneza de su carne no es el resultado de una menor expresión de los genes que codifican las proteasas o calpaína, pero sí a la mayor expresión de CAST (Giusti *et al.*, 2013). Un factor importante a considerar al momento de evaluar la expresión de calpastatina y calpaína debe ser la edad de animal, así como, el sexo, raza y estado energético en el que se encuentra, los cuales por si solos, son capaces de regular la expresión genética mediante rutas metabólicas aun no establecidas.

En un estudio realizado por Giusti *et al.* (2013) se compararon la expresión de los genes calpastatina y calpaína en dos razas de bovinos (Nelore y Canchim) y observaron que la expresión genética es regulada primordialmente por el estado energético de los animales jóvenes. Recientemente Jennings *et al.* (2016) reportaron que fetos de vacas gestantes, a las cuales se les proporcionó dietas altas en energía, aumentaron la regulación muscular de calpaína (CAPN1). En este mismo sentido Coria *et al.* (2018) reportaron que la expresión génica, queda demostrado en la suplementación de vacas con silo de maíz durante el último tercio de gestación alteró la expresión de calpaína (1 y 2) y calpastatina, lo cual definió la calidad final de la carne. A este respecto Cruzen *et al.* (2014), sugieren que la actividad enzimática debida a la calpastatina está mediada por la edad, donde animales adultos presentan mayor cantidad que animales en crecimiento, por lo que esta diferencia contribuye a una menor degradación de proteínas aumentando la dureza de la carne.

1.11 Nutrigenómica (Alimentación y expresión génica)

La respuesta productiva de los animales a una dieta es variable, aún entre individuos provenientes de los mismos progenitores, raza y medio ambiente. Este comportamiento productivo es inter-individual y dependerá de la carga génica de cada individuo (Bouchard y Ordovas, 2012). Con base en lo anterior, la carga genética de cada individuo es sensible al entorno nutricional, ya que pueden ser regulados mediante la expresión genética (Ordovas, 2006; Camargo *et al.*, 2012). Lo anterior origina la creación de una nueva ciencia, denominada Nutrigenómica o Genómica Nutricional, la cual estudia el efecto de la nutrición en el genoma, previendo en algunos años la realización de dietas personalizadas para cada individuo (Ordovas y Corella, 2004). En México, como en países europeos, la calidad de los productos de origen cárnico va en aumento, ya que los consumidores buscan una mejor calidad nutricional en sus alimentos, sobre todo en aquellos que tienen un valor agregado como los ácidos grasos poliinsaturados y bajos en grasas saturadas, lo que mejoraría su calidad de vida manteniendo una salud deseable (Dervishi, 2011). Por lo tanto, surge la necesidad de producir y mejorar la calidad de productos de origen animal como el de la carne; siendo las herramientas tecnológicas como la biología molecular una de las bases para la identificación mediante marcadores moleculares de animales con un potencial altamente productivo (De Vries *et al.*, 2000; Sosnicki *et al.*, 1998). Ante este escenario, hay que considerar que la calidad de carne es multifactorial ya que depende de la interacción entre potencial genético y medio ambiente. Por ello, el enfoque nutrigenómico parece ser el proceso biológico de mayor importancia, ya que tiene la capacidad de modificar la expresión fenotípica del individuo. Un ejemplo lo tenemos con las gallinas ponedoras, las gallinas de estirpes ligeras son capaces de sintetizar la enzima trimetilamina oxidasa necesaria para romper la trimetilamina, procedente de la sinapina (éster de ácido sinápico y colina) y que se halla en la harina de colza. En cambio, las gallinas semi-pesadas carecen de dicha enzima con lo que no destruyen la trimetilamina y ésta acaba apareciendo en los huevos, dando un desagradable sabor a pescado (Martín, 2007).

1.12 Perspectivas

Los estudios deben ser guiados en la identificación de eventos genéticos y epigenéticos que controlan la expresión génica y así poder explicar los procesos biológicos. Con las tecnologías de secuenciación del genoma en las diferentes especies de animales, nos acercaremos a la comprensión y entendimiento de la función primordial de los genes que favorecen una mayor capacidad de producción, así como los factores externos que la pueden llegar a modificar y tener un completo control sobre ellos.

Las investigaciones en animales en este momento deben centrarse en la comprensión de las mutaciones y polimorfismo de genes asociados a la producción, así como la interacción con el medio ambiente. La selección oportuna e inmediata de genes relacionados a la producción animal (QTL), serán de gran oportunidad en el desarrollo de la ganadería. Es así que el uso de marcadores genéticos permitirá establecer una mayor precisión del mérito genético de los animales, particularmente en características redituables y económicas.

1.13 CONCLUSIÓN

El sistema calpaína-calpastatina tienen una función central en la proteólisis *post mortem* y tenderización de la carne. Los estudios realizados en la última década indican que CAPN1, CAPN2 y CAST desempeñan un rol importante durante la degradación *post mortem* de las proteínas miofibrilares y la tenderización del músculo durante el proceso de maduración. Por lo tanto, es imprescindible identificar los polimorfismos cuya asociación con la terneza y suavidad de la carne se ha verificado. Estudios de genotipificación en ovinos nos brindarán la información de necesaria de las poblaciones e identificación de individuos con la capacidad genética de producir una mejor carne.

1.14 LITERATURA CITADA

- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, J. 2005. Microsatellites (STR s), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1), 30-42.
- Aryaeipour, M., Rouhani, S., Bandehpour, M., Mirahmadi, H., Kazemi, B., Rokni, M. B. 2014. Genotyping and phylogenetic analysis of *Fasciola* spp. isolated from sheep and cattle using PCR-RFLP in Ardabil province, northwestern Iran. *Iranian journal of public health*, 43(10), 1364.
- Atlija, M., Gutiérrez Gil, B., Martínez Valladares, M., de la Fuente, L. F., Arranz, J. J. 2013. Barrido genómico con el SNP-CHIP ovino 50K para la detección de QTL con influencia sobre la resistencia a nematodos intestinales en el ganado ovino de raza churra: análisis de ligamento para el recuento de huevos en heces.
- Bagatoli, A., Gasparino, E., Soares, M. A. M., Amaral, R. M., Macedo, F. A. F., Voltolini, D. M., Del Vesco, A. P. 2013. Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genetics and Molecular Research* 12(4), 6168-6175.
- Bouchard, C., Ordovas, J. M. 2012. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. In *Progress in molecular biology and translational science* 108: 1-15. Academic Press.
- Byun, S. O., Zhou, H., Forrest, R. H. J., Frampton, C. M., Hickford, J. G. H. 2008. Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning. *Animal genetics*, 39(5), 572-573.
- Camacho, R. E., Gutiérrez, A. 2012. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y de haplotipos para el gen de la Leptina con la ganancia de peso en la raza bovina blanco orejinegro usando técnicas bayesianas. *Comunicaciones en Estadística*, 5(1), 33-53.
- Camargo, A., Delgado-Lista, J., Garcia-Rios, A., Cruz-Teno, C., Yubero-Serrano, E. M., Perez-Martinez, P., Tinahones, F. J. 2012. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 500-508.
- Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Brenneman, R. A., Olson, T. A., Chase Jr, C. C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of animal science*, 83(1), 13-19.
- Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Smith, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84(3), 520-525.

- Cervieri, R. D. C., Arrigoni, M. D. B., Chardulo, L. A. L., Silveira, A. C., Oliveira, H. N. D., Martins, C. L. 2005. Peso vivo final, ganho de peso, características de carcaça e concentrações plasmáticas de IGF-I e hormônios tireoideanos de bezerros mestiços Angus-Nelore recebendo somatotropina bovina recombinante (rbST) até a desmama. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(6), 2009-2019.
- Cheong, H. S., Yoon, D. H., Park, B. L., Kim, L. H., Bae, J. S., Namgoong, S., Shin, H. D. 2008. A single nucleotide polymorphism in CAPN1 associated with marbling score in Korean cattle. *BMC genetics*, 9(1), 33.
- Chung, H., Choi, B., Jang, G., Lee, K., Kim, H., Yoon, S., Hines, H. 2007. Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *Journal of applied genetics*, 48(1), 63-68.
- Cruzen, S. M., Paulino, P. V., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E. 2014. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. *Meat science*, 96(2), 854-861.
- Dervishi, E., González Calvo, L., Joy Torrens, M., Calvo Lacosta, J. H. 2011. La genómica como herramienta de apoyo en la producción ganadera: Nutrigenómica en el ovino.
- Dodgson, J. B., Cheng, H. H., Okimoto, R. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*, 76(8), 1108-1114.
- Epishko, O. A., Sonich, N. A., Kuzmina, T. I., Tanana, L. A., Cheburanova, E. C., Vertinskaya, O. V. 2018. Lethal indicators a hereford x black and motley bulls depending on genotypes of genes of a tireoglobulin (tg5) and a miostatin (mstn). *Animal Breeding and Genetics*, 56, 104-109.
- Fang, Q., Forrest, R. H., Zhou, H., Frampton, C. M., Hickford, J. G. H. 2013. Variation in exon 10 of the ovine calpain 3 gene (CAPN3) and its association with meat yield in New Zealand Romney sheep. *Meat science*, 94(3), 388-390.
- Fariello, M. I., Servin, B., Tosser-Klopp, G., Rupp, R., Moreno, C., San Cristobal, M., International Sheep Genomics Consortium. 2014. Selection signatures in worldwide sheep populations. *PLoS One*, 9(8).
- Fernandes, T. C. L. 2015. Genes da calpastatina e calpaína associados à qualidade da carne de ovinos pantaneiros.
- Fornal, A., Radko, A., Piestrzyńska-Kajtoch, A. 2013. Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4).
- Garza-Brenner, E., Sifuentes-Rincón, A. M., Rodríguez-Almeida, F. A., Parra-Bracamonte, G. M., Arellano-Vera, W. 2019. Efecto de tres marcadores genéticos sobre la eficiencia alimenticia de toretes en prueba de comportamiento. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18), 581-586.
- Giusti, J., Castan, E., Dal Pai, M., Arrigoni, M. D. B., Baldin, S. R., De Oliveira, H. N. 2013. Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in Nelore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) cattle. *Meat Science*, 94(2), 247-252.

- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiological reviews*, 83(3), 731-801.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Ouali, A. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 503-512. De Vries AG, Faucitano L, Sosnicki A, Plastow GS (2000). The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. *Food Chemistry*, 69(4), 397-405.
- Guerra, M.T.; Trujillo, B.E.; Cerón, M.M. 2005. Estimación de polimorfismos del gen de leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (3): 215-221.
- Henchion, M. M., McCarthy, M., Resconi, V. C. 2017. Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. *Meat science*, 128, 1-7.
- Hernández, D. Y., Terranova, A. M. P., Flórez, J. E. M. 2008. Detección de una mutación puntual en el gen receptor Ryanodina (Ryr 1) en cerdos criollos colombianos. *Acta Agronómica*, 57(4), 275-278.
- Hossner KL. Hormonal regulation of farm animal growth. Department of animal sciences. Colorado State University, Collins Colorado, USA. CABY book; 2005.
- Ilian, M. A., Morton, J. D., Kent, M. P., Le Couteur, C. E., Hickford, J., Cowley, R., Bickerstaffe, R. 2001. Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *Journal of Animal Science*, 79(1), 122-132.
- Jalali, S. M., Khaki, Z., Kazemi, B., Rahbari, S., Shayan, P., Bandehpour, M., Yasini, S. P. 2014. Molecular detection and identification of *Theileria* species by PCR-RFLP method in sheep from Ahvaz, Southern Iran. *Iranian journal of parasitology*, 9(1), 99.
- Jennings, T. D., Gonda, M. G., Underwood, K. R., Wertz-Lutz, A. E., Blair, A. D. 2016. The influence of maternal nutrition on expression of genes responsible for adipogenesis and myogenesis in the bovine fetus. *animal*, 10(10), 1697-1705.
- Kocwin-Podsiadla, M., Kuryl, J. 2003. The effect of interaction between genotypes at loci CAST, RYR1 and RN on pig carcass quality and pork traits-a review. In *The IV Conference on effect of genetic and non-genetic factors on carcass and meat quality of pigs*.
- Krenkova, L., Kuciel, J., Urban, T. 1999. Association of the RYR1, GH, LEP and TF genes with carcass and meat quality traits in pigs. *Czech Journal of Animal Science (Czech Republic)*.
- Lander, E. S., Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121(1), 185-199.
- Leal-Gutiérrez, J. D., Jiménez-Robayo, L. M., Ariza, M., Manrique, C., López, J., Martínez, C., Jiménez, A. 2015. Polimorfismos de los genes CAPN1, CAST, DES, PRKAG3 y RYR1 asociados a la capacidad de retención de agua en crudo y

- cocinado en carne de bovino en cruces *Bos indicus* y *Bos taurus* en Colombia. Archivos de zootecnia, 64(245), 29-35.
- Lenstra, J. A., Groeneveld, L. F., Eding, H., Kantanen, J., Williams, J. L., Taberlet, P., Garcia, J. F. 2012. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Animal Genetics*, 43(5), 483-502.
- Li, M., Tian, S., Jin, L., Zhou, G., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, J. 2013. Genomic analyses identify distinct patterns of selection in domesticated pigs and Tibetan wild boars. *Nature genetics*, 45(12), 1431.
- Marshall, K., Quiros-Campos, C., Van der Werf, J. H. J., Kinghorn, B. 2011. Marker-based selection within smallholder production systems in developing countries. *Livestock Science*, 136(1), 45-54.
- Martín, C. R. 2007. Introducción a la Nutrigenómica. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, (2), 22-29.
- Martínez-Quintana, J. A., Alarcón-Rojo, A. D., Ortega-Gutiérrez, J. A., Janacua-Vidales, H. 2006. Incidencia de los genes Halotano y Rendimiento Napole y su efecto en la calidad de la carne de cerdo. *Universidad y Ciencia*, 22(2), 131-139.
- Motter, M. M., Corva, P. M., Marrube, G., Miquel, M. C., Papaleo Mazzuco, J., Villarreal, E. L., Soria, L. A. 2013. Asociación de dos marcadores del gen de la calpastatina con variables productivas de novillos Brangus engordados en pasturas. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33(1), 21-29.
- Nassiry, M. R., Shahroudi, F. E., Tahmoorespur, M., Javadmanesh, A. 2007. Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10(7), 1062-1067.
- Negahdary, M., Hajihosseini, A., Ajdary, M. 2013. PCR-SSCP variation of IGF1 and PIT1 genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Makoei sheep. *Genetics research international*, 2013.
- Ordovas, J.M. 2006. Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical nutrition*, 83(2), 443S-446S.
- Ordovas, J.M., Corella, D. 2004. Nutritional genomics. *Annu. Rev Genomics Hum Genet*, 5, 71-118.
- Page, B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal Animal Science*, 80: 3077-3085.
- Pariset, L., Savarese, M. C., Cappuccio, I., Valentini, A. 2003. Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(6), 425-432.
- Pinheiro, I., Godinho, R., Alves, P. C., Ferrand, N., Santos Silva, J., de Produção Animal, E. E., Pires da Costa, J. 2007. Identification of genetic polymorphisms at RYR1,

- PRKAG3 and ESR loci in Portuguese autochthonous pig breeds. *Options Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens (CIHEAM)*.
- Qanbari, G.D., Hayes B., Schenkel F., Miller, S. 2011. Aplicación de enfoques basados en frecuencia de sitio y haplotipo para detectar firmas de selección en ganado. *BMC Genomics* 12: 318.
- Rendo, F., Iriondo, M., Jugo, B. M., Mazón, L. I., Aguirre, A., Vicario, A., Estonba, A. 2004. Tracking diversity and differentiation in six sheep breeds from the North Iberian Peninsula through DNA variation. *Small Ruminant Research*, 52(3), 195-202.
- Rochus, C. M., Tortereau, F., Plisson-Petit, F., Restoux, G., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Servin, B. 2018. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC genomics*, 19(1), 71.
- Rojas, L. E. L., Cadavid, L. P., Herrera, A. L., Zuluaga, J. J. E. 2017. Variabilidad genética en seis SNPs de los genes CAPN1, CAST y LEP de toros brahman en ganaderías del trópico bajo colombiano. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 12(2), 88-102.
- Roux, P. F., Boitard, S., Blum, Y., Parks, B., Montagner, A., Mouisel, E., Leroux, S. 2015. Combined QTL and selective sweep mappings with coding SNP annotation and cis-eQTL analysis revealed PARK2 and JAG2 as new candidate genes for adiposity regulation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(4), 517-529.
- Saccà, E., Corazzin, M., Pizzutti, N., Lippe, G., & Piasentier, E. 2015. Early post mortem expression of genes related to tenderization in two Italian Simmental young bulls' skeletal muscles differing in contractile type. *Animal Science Journal*, 86(12), 992-999.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H., Wilton, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of animal science*, 84(2), 291-299.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Sellier, P., Monin, G. 1994. Genetics of pig meat quality: a review. *Journal of muscle foods*, 5(2), 187-219.
- Silva-Jarquín, J. C., Andrade-Montemayor, H. M., Vera-Ávila, H. R., Durán-Aguilar, M., Román-Ponce, S. I., Landi, V., BioGoat, C. 2019. Diversidad y estructura genética de una población de cabras criollas negras de tres municipios del estado de Querétaro, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(4), 801-818.
- Smith, T. P. L., Casas, E., Rexroad Iii, C. E., Kappes, S. M., Keele, J. W. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of animal science*, 78(10), 2589-2594.

- Sosnicki, A., Wilson, E. R., Sheiss, E. B., de Vries, A. 1998. Is there a cost-effective way to produce high quality pork. In 51st Reciprocal Meat Conference, American Meat Science Association, Indianapolis (pp. 19-27).
- Torres-Rodríguez, P. V., Aranguren-Méndez, J. A., Portillo-Ríos, M. G., Rojas, I. M., Chango-Oduber, R. 2015. Estudio de los polimorfismos CAPN316, CAPN4751 y CAST2959: relación con la ternera de la carne en el ganado criollo limonero. *Revista Científica*, 25(3), 232-238.
- Uzcátegui-Bracho, S., Jerez-Timaure, N. 2008. Factores que afectan la actividad de las proteasas dependientes del calcio y su relación con el proceso de ablandamiento de la carne. *Archivos Latinoamericanos de producción animal*, 16(3), 166-174.
- Vance, J.F., Othmane K.M. 1998. Methods of genotyping. In: Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. eds. *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. Publication NY, 213-228.
- Vergara, D. M., Valencia, C. L., & Herrera, D. H. 2019. Polimorfismos de los genes calpaína y calpastatina en dos poblaciones de ovinos de pelo colombiano. *Revista MVZ Córdoba*, 7113-7118.
- Zhang, L., Mousel, M. R., Wu, X., Michal, J. J., Zhou, X., Ding, B., Jiang, Z. 2013. Genome-wide genetic diversity and differentially selected regions among Suffolk, Rambouillet, Columbia, Polypay, and Targhee sheep. *PloS one*, 8(6).
- Zhurina, N. V., Kovalchuk, M. A. 2011. Analysis of PRKAG3 gene polymorphism and performance of fattening stores of Belarusian meat breed of different genotypes on the gene studied. *Zootechnical Science of Belarus: collection of scientific papers*.

CHAPTER II. A NOVEL MODIFICATION TO THE CTAB METHOD FOR THE SUCCESSFUL EXTRACTION OF DNA FROM ANIMAL BLOOD BY ADDING BACTERIAL LYSOZYME

2.1 ABSTRACT

Objectives to develop an appropriate and reliable method for animal blood DNA extraction, useful for laboratories at a low cost.

Results A novel modification for sheep blood DNA extraction was implemented based on the hexadecyl trimethyl ammonium bromide (2% CTAB) protocol. The process consisted of two modifications. 1) The temperature changes to 96 °C during cell lysis, sodium acetate is put in after DNA precipitation (CTABM). 2) During the CTABM process, it is added the bacterial lysozyme (CTABML). The DNA concentration and absorbance of the $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ nm were improved for CTABML with values of 1.83 to 1.75 respectively. The DNA obtained with CTABML modification was used for PCR and sequencing for the constitutive Leptin and IGF-1 genes with successful results.

Conclusions CTABML generated a greater DNA concentration with optimum quality and integrity for its use in subsequent tests.

Keywords blood · CTAB · DNA extraction · lysozyme

2.2 INTRODUCTION

The DNA molecule, as a carrier of the genetic information of the living being, is the starting point for a broad and a great number of basic molecular studies, such as digestion enzymes, the polymerase chain reaction (PCR), genotyping, and detection of polymorphism, population genetics, up to sequencing of partial or whole genomes. To carry out these studies, the reasonable purity and quality of the DNA are required for successful use in the laboratory (Al-Shuhaib, 2017). Therefore, DNA is the core of the application to different technologies. PCR is one of the most important processes because it is used worldwide to amplify part of the genome, and also it is used to generate a library of DNA fragments in the process of the whole genome sequencing.

The information generated in the animal genome studies has aroused interest in research related to the biodiversity of individuals (Stoughton, 2005). The central points of this information focus on the use of molecular markers as a basic tool for the study of genes and productive characteristics through the characterization of general genetic diversity and breed differentiation (Ghaheer *et al.*, 2016). For this reason, DNA extraction methods are essential, making the use of commercial kits the most common tool for the process (Psifidi *et al.*, 2015). However, in most cases, its high cost limits its use compared to conventional methods such as CTAB and sodium acetate (Doyle and Doyle, 1987).

The CTAB emerges as an efficient method to obtain a genomic DNA which is used for the studies of populations in plants, bacteria, fungi, and animals. Nevertheless, with animal blood, there are variable results documented. These results are as well obtained with the use of commercial kits. Given this scenario, a modification of the 2% CTAB method could result in the production of an animal blood DNA with more quality.

Considering that only 1% of nucleated white cells contain the genetic information of the individual, it limits the availability of DNA in blood or tissue of animal samples (Otsubo *et al.* 2005). White cells are the most important resource for the extraction of DNA information. However, since the end of the twentieth century, there have been investigations to recover the free DNA that circulates in the blood known as cell-free DNA (cfDNA) (El Messaoudi *et al.*, 2013).

The DNA extraction procedure consists of detergent or chelating agent action application that directly affects the stability of the membrane, exposing the DNA of the cell, allowing

the total recovery of the genetic material. This extraction process is difficult in nucleated white cells due to the structure and composition of its immunological and phagocytic membrane activity, which makes the cell highly resistant and stable (Derde *et al.*, 2013). The process of DNA extraction also involves the elimination of proteins and carbohydrates that constitute the highest percentage of DNA contamination (Svec *et al.*, 2013). Reagents used in unconventional extraction methods degrade the DNA contaminants, besides, they can even damage their structure (Chacon-Cortes and Griffiths, 2014). Bacterial lysozyme arises as a biological alternative because it allows the extraction of DNA caused by the rupture of the cell membrane and periplasm space (Tokunaga *et al.*, 2013), and consequently makes available the genetic material (Gravato-Nobre *et al.*, 2016). These attributes facilitate the action of the lysozyme to obtain the DNA from the nucleus of white blood cells.

Therefore, the objective of the present study was to develop a new protocol based on the 2% CTAB method for DNA extraction with the addition of the bacterial lysozyme to improve the DNA quality of animal blood samples.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Sampling

Twenty blood samples of 18-month-old sheep from different breed and sex were venepuncture in the jugular. The vacutainer technique with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes were used in the process. The samples were stored in a cryogenic thermos at 4 °C for their transfer to the laboratory for subsequent analyses.

The handling of animals was carried out according to the ethics and the biosafety norms of the Council of International Organizations in Medical Sciences (<https://cioms.ch/shop/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/>) in compliance with the Mexican law for the use of animal experimentation (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf).

2.3.2 Modifications to the 2% CTAB protocol

The samples were taken by duplicate, then processed for DNA extraction modifying the 2% CTAB protocol. This process consisted of 1) The change of the temperature to 96 °C during the lysis process, then sodium acetate was put in after DNA precipitation (CTABM). 2) Before DNA extraction, the bacterial lysozyme (CTABML) was added to the blood samples.

2.3.3 DNA extraction

Two modifications to the 2% CTAB protocol were made, denominated CTABM and CTABML. In each case, 400 µl of blood was deposited in 2 ml Eppendorf tubes, and then, metal pellets were added (CTABM). Subsequently, 50 ng of bacterial lysozyme was diluted in 1 ml of HPLC water and stirred by manual inversion for 3 min. Then, 50 µl of the lysozyme solution was added to the tubes containing the sheep's blood (CTABML), which were incubated in bath water at 45 °C for 60 min. They were shaken by inversion for 10 min intervals.

Once the samples were incubated, 1 ml of the CTAB lysis solutions pre-heated at 65 °C was added (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na₂ EDTA₂ H₂O pH 8.0, 2% CTAB, and 1.4 M NaCl). The tubes were placed in bath water at 96 °C for 1 h and were shake by inversion with 15 min intervals. The samples were cooled to room temperature and centrifuged at 11,150 x g for 15 min. The aqueous phase was transferred to 2 ml tubes, to which 950 µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v) was added, and stirred by inversion for 15 min. The samples were then centrifuged at 11,150 x g for 15 min again. The upper aqueous phase was transferred to a new tube with 750 µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v) and stirred by inversion for 15 min. After, it was centrifuged again at 8,500 x g for 15 min, then, the aqueous phase was transferred to 1.5 ml tubes. To precipitate the DNA, 950 ml of 100% ethanol previously cooled, was added to the tubes, which were gently mixed. Afterward, the tubes were centrifuged at 11,150 x g for 30 min, to obtain a white or semi-transparent pellet at the bottom of the tube. The pellet was re-suspended in 400 µl of HPLC water and incubated in bath water at 65 °C for 15 min. Next, 34 µl of sodium acetate (NaOAC 3M) and 1 ml of 95% ethanol was cooled, then maintained at -20 °C for 1 h. Later, the tubes were centrifuged at 11,150 x g for 10 min for the supernatant decantation. The pellets obtained were washed with 600 µl of 70% isopropanol, then centrifuged for

10 min at 11,150 x g. This process was repeated twice. The pellets were dried to room temperature for 2 h. Finally, the DNA was suspended in 40 µl of HPLC water, later, stored at -20 °C until the downstream use.

2.3.4 Absorbance, quality, and DNA quantification

The amount of 1.5 µL of the total DNA per sample was placed in a Nanodrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) to evaluate the DNA quality. This process measures the $A_{260/280}$ nm ratio that determines the quality and purity of the DNA. The $A_{260/230}$ nm ratio is associated with the protein contaminants and macromolecules during the extraction process.

The DNA quantification for the sample was performed by an absorbance measurement near 260 nanograms (ng) per microliter (µl). Higher absorbance values suggest a higher concentration of DNA presented in the samples. The integrity of the DNA was verified on a 1.5% Seakem LE agarose (Lonza, USA) in a horizontal electrophoresis gel in a chamber (Bio-Rad, Sub Cell GT, USA). For this, 3 µl of the total DNA of each sample previously diluted to 20 ng/µl were mixed with 2 µl of Blue-Orange 6x, loading buffer (Promega, USA) supplemented with 1 µl/ml of GelRed (Biotium, USA). The DNA bands were visualised in an Infinity 3016 transilluminator (Vilbert Lourmat Corporation, Cedex, Germany) with the Infinity Cap software (Fig. 2).

2.3.5 PCR and sequencing

The PCRs were performed using the DNA samples extracted with CTABM and CTABML methods. Fragments of two constitutive genes that correspond to the productive and reproductive stage in the animals were amplified. The Leptin and Insulin-like Growth Factor (IGF-1) genes yield a band of 270 to 250 bp respectively. The Leptin gene is located in exon 3 with the primer Lep275 forward (5'-GCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCC-3') and Lep275 reverse (5'-TGTCCTGTAGAGACCCTGTAGCCG-3'). The IGF-1 gene is located in exon 3 and 4, IGF-1 forward (5'-ATTACAGCTGCCTGCCCTT-3') and IGF-1 reverse (5'-CACATCTGCTTACACCTTACCCG-3') (Najafi *et al.*, 2014).

The PCR master mix consisted of 15 µl, which contained GoTaq DNA polymerase buffer, dNTP's, primers, Go Taq polymerase and HPLC water. The PCR reactions were performed in a c1000 Touch Thermal Cycler thermocycler (Bio-Rad, CA, USA). For the Leptin gene, the amplification programme consisted of an initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s denaturation, 59 °C for 30 s alignment, and 72 °C for 1 min extension, and ending with an extension at 72 °C for 5 min. For the IGF-1 gene, the amplification programme consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 15 s, 10 s at 62 °C, 20 s at 72 °C, ending with an extension at 72 °C for 3 min. The electrophoresis of the PCR products was performed on a 1.5% agarose gel (Seakem, USA), using the 6x orange/blue (Promega, USA) as loading dye, employing a molecular marker of 1 kb (Promega, USA). Amplicons were visualised in an Infinity transilluminator (Vilbert Lourmat Corporation, Cedex, Germany) and analysed using the Infinity Cap software of the same equipment as it was mentioned previously (Fig. 3).

For sequencing, the PCR products were cleaned with ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) to digest the remaining primers and to deactivate the free dNTPs, in a thermal cycler c1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA), with cycles which consisted in a cycle of 37 °C for 15 min, and another one of 80 °C for 15 min to finish at 4 °C.

For sequencing, a MicroAmp Optical 96-well reaction plate was used with the Big Dye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, USA) according to the instruction given by the manufacturer. Later, the plate was washed with the EDTA/Ethanol precipitation protocol. Sequences were obtained for each strand in a Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, USA) at Postgraduate College facilities in Mexico.

Sequences of each sample were assembled using Geneious v11.1.4 (Biomatters, New Zealand) software to create a consensus sequence. Later, they were subject to the BLAST comparison in the GenBank platform of the National Centre for Biotechnology Information database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to determine the maximum identity percentage with sequences deposited previously.

2.3.6 Statistical analyses

Statistical analyses was performed to compare the absorbance ratios values and the concentration obtained with the two DNA extraction modification methods. Each sheep blood sample represented an experimental unit. The CTABM and CTABML values were analysed through the independent means test (T-student) using PROC TTEST including in SAS/STAT version 9.4 (https://www.sas.com/en_us/software/sas9.html).

2.4 RESULTS

2.4.1 Measurement of DNA absorbance

The absorbance ($A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ nm) ratio determined by spectrophotometry for all DNA samples obtained from sheep blood, showed the quality and purity of the DNA for two CTAB modification methods. In the case of the CTABM method, the values obtained for two ratios varied among 1.377 ± 0.182 and 0.56 ± 0.071 nm. For the CTABML method, its absorbance was 1.83 ± 0.091 and 1.75 ± 0.242 nm (Table 1).

Table 1 The optical density OD_{260} values^a of sheep blood DNA samples^b

| Absorbance | CTABM | CTABML | Pr>F |
|---------------|-------------------|-------------------|--------|
| | mg/ μ L | mg/ μ L | |
| $A_{260/280}$ | 1.377 ± 0.182 | 1.830 ± 0.091 | >.0001 |
| $A_{260/230}$ | 0.567 ± 0.071 | 1.750 ± 0.242 | 0.0122 |

^a A DNA concentration of 50 ng/ μ l in a Nanodrop (Thermo Scientific, USA) is given by an Optical Density (OD) of 1 at 260nm

^b Four-hundred microliter of sheep blood in the 2% CTAB modified methods. CTABM: modified method without the addition of bacterial lysozyme. CTABML: modified method with the addition of bacterial lysozyme

2.4.2 The concentration of total DNA

The values adjusted for the CTABM extraction method was 73.75 ± 2.05 ng/ μ l, while for the modification of CTABML was 284.43 ± 3.6 ng/ μ l. The square R showed 0.9248 in the purity value $A_{230/260}$, which means that the data adjusted to the linear regression model, and therefore, the DNA, the quality results are better. The concentration of DNA (ng/ μ l) with modifications of CTABM and CTABML to a 2% CTAB extraction method are shown in Fig. 1.

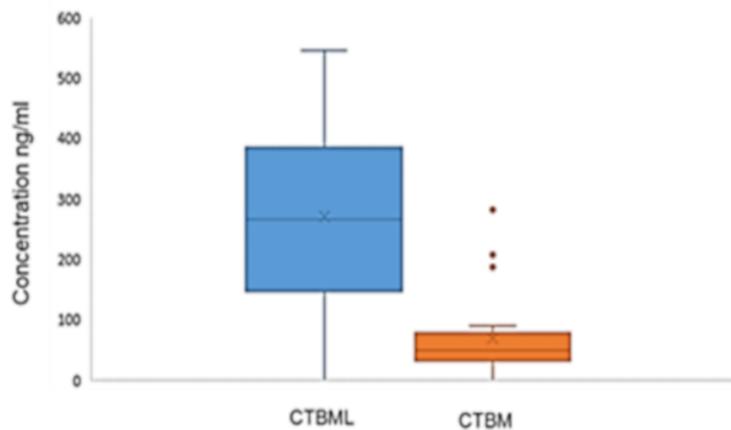


Figure 1 Concentration of the total DNA obtained from sheep blood (ng/ μ l) by the 2% CTAB methods modified by the addition of the bacterial lysozyme (CTABML), and without enzyme addition (CTABM).

The total DNA samples were visualised on a 1.5% agarose gel, finding bands of different intensities for both modifications, CTABM and CTABML methods. In the CTABML extraction method, a higher concentration of DNA was observed in comparison with the CTABM. All DNA bands showed the integrity of the DNA, which indicated that they were not degraded or fragmented (Fig. 2).

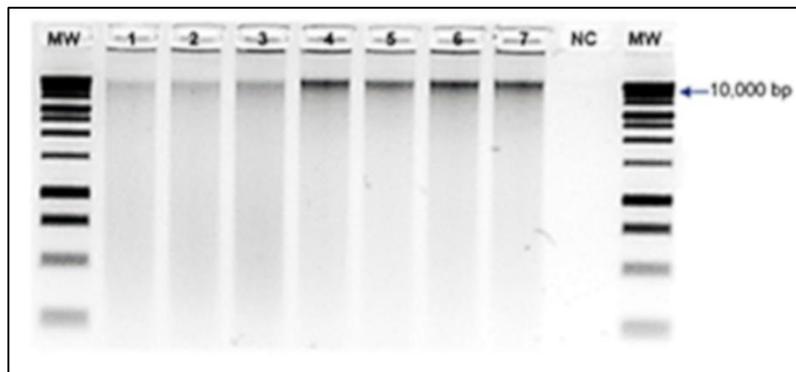


Figure 2 The sheep blood DNA of a high molecular weight visualised in the 1.5% agarose gel. Lanes 1-3 correspond to the CTABM and lanes 4-7 correspond to the CTABML. All wells were loaded with 60 ng/ μ l of the total DNA. NC, negative control. MW, molecular.

2.4.3 PCR and sequencing

The PCR products for Leptin and IGF-1 partial genes amplified showed a band according to the expectations. In each case, only one band was observed, indicating that the DNA obtained with two the 2% CTAB modified methods were able to recognise complementary sequences target. Furthermore, ghost bands were not observed during the separation of amplified fragments in the agarose gel electrophoresis (Fig. 3).

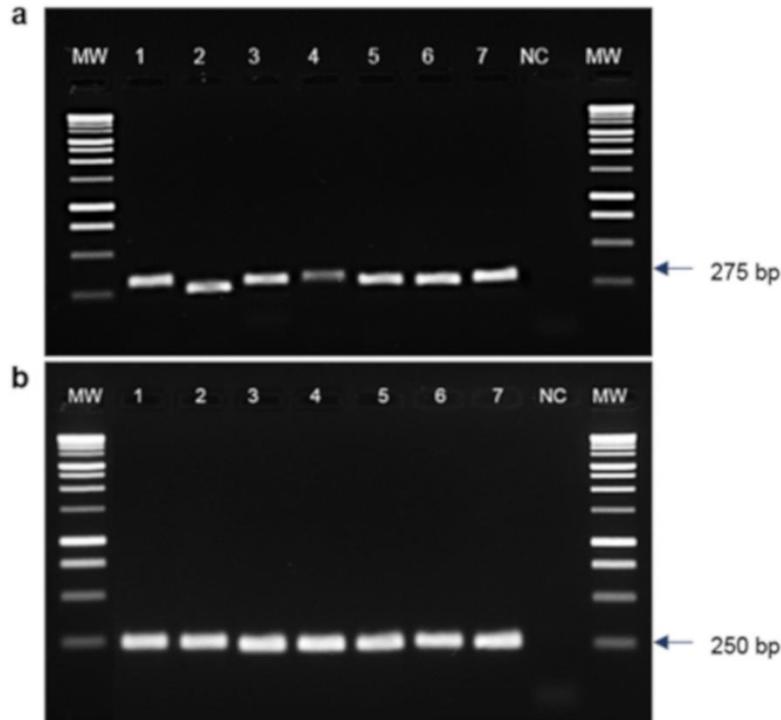


Figure 3 Amplification of the Leptin 275 and Insulin-like Growth Factor (IGF-1) partial genes resolved in the 1.5% agarose gel using the 2% CTAB protocol. a Lanes 1-3 correspond to the amplification of the Leptin 275 with the DNA obtained by the CTABM modification method. Lanes 7-11 correspond to the amplification of the Leptin 275 with the DNA obtained by the CTABML modification method. b Lanes 1-3 correspond to the amplification of the IGF-1 with the DNA recovered by the CTABM modification method. Lanes 7-11 correspond to the amplification of the IGF-1 using the DNA obtained by the CTABML modification method. In all cases, a unique

The partial genes sequence of Leptin (Fig. 4) and IGF-1 (Fig. 5) that were amplified with the DNA obtained by the CTABM method, did not provide a reliable sequence. The resulting quality of the DNA suggests interference with the reagents used in the PCR. Unlike the sequences generated by the CTABM, the CTABML method did not produce reading errors. The sequences readings for both genes with the CTABML treatment

showed no changes in the nitrogenous bases in comparison with the sequences previously deposited in the NCBI database.

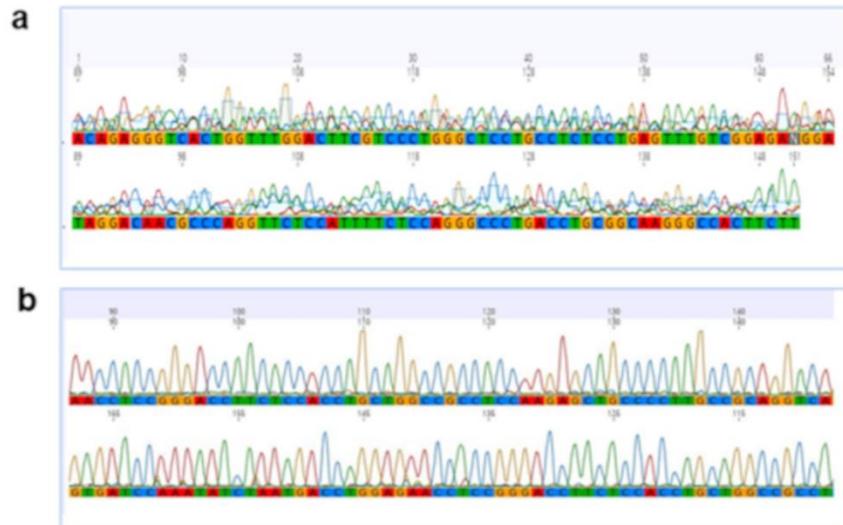


Figure 4 The electropherograms that depict the results of Leptin 275 sequences quality. **a** Sequences obtained with the CTABM DNA extraction method showing the presence of the contaminants. **b** Sequences showing well-defined peaks obtained with the CTABML (bacterial lysozyme addition) by the DNA extraction method. All samples were resolved by a direct sequencing process.

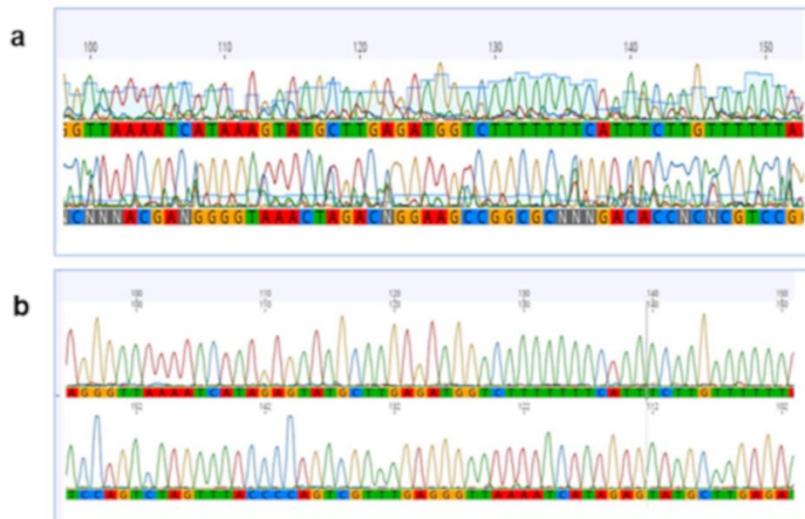


Figure 5 The electropherograms that depict the results obtained by the direct sequencing of the Insulin-like Growth Factor (IGF-1). **a** Sequences showing noise obtained with the CTABM method. **b** Sequences demonstrating well-defined peaks obtained with the CTABML (bacterial lysozyme addition) by the DNA extraction method.

2.5 DISCUSSION

Research in molecular biology requires DNA with high quality and integrity, although perplex studies have been realised to develop efficient methodologies to obtain a good quality of the DNA. These methods are focus on the development of kits for human medicine (Mardan-Nik *et al.*, 2019; Londero *et al.*, 2019) and also for automatised sophisticated protocols using chips or magnetic pearls for the DNA extraction (Brassard *et al.*, 2019; Rausch *et al.*, 2019). Reliable protocols to obtain animal blood DNA at a low cost which can be useful for laboratories with low budgets are very limited (Talebi *et al.*, 2019). The use of technologies and protocols that utilise organic and non-polluting eco-friendly products at an economic cost and environmental-friendly, is desirable for DNA extraction (Chacon-Cortes and Griffiths, 2014; Ghaheri *et al.*, 2016). DNA extraction methods such as the 2% CTAB has been shown efficient in tissue plants, fungi or non-marine molluscs (Porebski *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2020).

Furthermore, the CTABML method based on the use of the modified CTAB with the addition of bacterial lysozyme can represent an alternative to get DNA with excellent quality for molecular studies.

The $A_{260/280}$ nm ratio found by the CTABML method was higher than 1.8, which is considered a standard for pure DNA (Dauphin *et al.*, 2011). While the $A_{260/230}$ nm ratio showed a relation equal to or greater than 1.7. The last value is extremely important because it is related to the DNA contaminants, which in most cases are not reported. However, the value of this relation should be considered in any analyses of molecular biology, because of its determination influences directly to the quality of the sequence and the readings of the nitrogenous bases. Given the complexity and difficulty of obtaining blood DNA free of contaminants, it is difficult to achieve good results by conventional methods.

The $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ ratios are the indicators in the evaluation of the purity of the extracted DNA (Kasem *et al.*, 2008). For example, the $A_{260/280}$ nm ratio that values below 1.5, it indicates the contamination by proteins, phenolic sample compounds, and polysaccharides that could inhibit the PCR or the sequencing reaction (Kong *et al.*, 2006). For the $A_{260/230}$ nm ratio that values lower than 1.5, it indicates protein contamination caused by some sophisticated methods. The use of silica columns or magnetic beads that accumulates complex molecules is mostly a contaminant to DNA (Salonen *et al.*, 2010). The $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ values with the CTABML method have shown results between 1.7 and 2, which are recommended to obtain DNA quality. The modification of CTABML does not generate toxic or harmful residues for the environment.

Nucleospin Blood and XL kits extraction DNA protocols, do not provide a pure suitable DNA for sequencing analyses or microarrays technology (Psifidi *et al.*, 2015; Mardan-Nik *et al.*, 2019). These methods require at least 6 ml of blood, which limits its use when the amount of blood available for experimenting is lower. The CTABML method presents an advantage because it only requires 400 μ l of blood per processed sample. This is fifteen times less the amount of blood used in other processes. The results found in our study show that using bacterial lysozyme improves the extraction and quality of DNA in sheep blood, averaging 280 ng/ μ l, which is described here, was up to 200% differentiating with other authors (Psifidi *et al.*, 2015; Koshy *et al.*, 2017; Guha *et al.*, 2018). The principal

aspect reported by other authors is that the DNA concentration varied between 25 ng/ μ l and 80 ng/ μ l in human blood. Those results were obtained using the conventional DNA extraction methods based on the availability of the DNA released by the lysis effect with the use of re-suspended cell pellets.

The extraction of DNA from animal blood is more complicated than animal tissue (Yue *et al.*, 2005) because nucleated cells represent only 1% of the blood components. Therefore, obtaining a higher concentration of DNA in the blood is difficult due that the use and separation of white blood cells require a prior process for extraction, being another alternative for well-implemented laboratories (Mardan-Nik *et al.*, 2019).

The use of bacterial lysozyme is limited only to the extraction of DNA from Gram-positive bacteria. The structure of this cell membrane limits the availability of DNA when using conventional extraction methods are executed (Oliver and Wells, 2015). As far as we know, there are no reports of the extraction protocols recently applied that facilitate the extraction of DNA in animal tissue and blood (Cheung *et al.*, 1993).

The CTABM and CTABML methods described in the present investigation let get a relatively good DNA for PCR amplification and sequencing, as they can be observed with Leptin and IGF-1 partial genes. However, CTABML resulted to be an excellent method for PCR amplification and sequencing. All bases were resolved and ready to be used for mutation detection and phylogenetic reconstruction without any doubt.

2.6 CONCLUSIONS

Using the modified 2% hexadecyltrimethylammonium bromide extraction method with the addition of bacterial lysozyme (CTABML), promotes efficiency on DNA extraction in sheep blood samples, and can be used as a model for general study and applied to other animal species or tissues. The DNA must have quality and a high concentration for molecular biology studies, although, for this, it requires the use of kits and complex extraction methods. The results of this study suggest that the CTABML extraction method can be an alternative to DNA extraction since it can be adapted to basic molecular biology laboratories without compromising the results of tests such as PCR or sequencing.

Additionally, it is important to consider that the CTABML extraction protocol and the reagents used are friendly to the environment and viable for its use worldwide.

Acknowledgements We thank to The National Council of Science and Technology for the support provided to the first author and also to the Laboratory of Seed Biotechnology an Plant Pathology at the Postgraduate College at Montecillo Campus though project PS 18-4008 for partial financial support to this research.

Author contributions FT and OH conceived and designed the experiments. FT, HS, and MC performed the experiments. FT, HS, and OH analysed the data and wrote the paper. All reviewed the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

2.7 REFERENCES

- Al-Shuhaib M.B. 2017. A universal, rapid, and inexpensive method for genomic DNA isolation from the whole blood of mammals and birds. *Journal Genetics* 96:171–176.
- Brassard D., Geissler M., Descarreaux M., Tremblay D., Daoud J., Clime L., Mounier M., Charlebois D., Veres T. 2019. Extraction of nucleic acids from blood: unveiling the potential of active pneumatic pumping in centrifugal microfluidics for integration and automation of sample preparation processes. *Lab on a Chip* 9:1941–1952.
- Chacon-Cortes D., Griffiths L.R. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 4:1–9.
- Chakraborty S., Saha A., Neelavar Ananthram A. 2020. Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits?. *3 Biotech* 10:69.
- Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *Genome Research* 3:69–70.
- Dauphin L.A., Walker R.E., Petersen J.M., Michael D.B. 2011. Comparative evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for detection of *Francisella tularensis* DNA from suspensions and spiked swabs by real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 3:299–306.
- Derde M., Lechevalier V., Guérin-Dubiard C., Cochet M.F., Jan S., Baron F., Gautier M., Vie V., Nau F. 2013. Hen egg white lysozyme permeabilizes *Escherichia coli* outer and inner membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:9922–9929.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11–15
- El Messaoudi S., Rolet F., Mouliere F., Thierry A.R. 2013. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta* 424:222–230.
- Ghaehri M., Kahrizi D., Yari K., Babaie A., Suthar R.S., Kazemi E. 2016. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cellular and Molecular Biology* 62:120–124.
- Gravato-Nobre M.J., Vaz F., Filipe S., Chalmers R., Hodgkin J. 2016. The invertebrate lysozyme effector ILYS-3 is systemically activated in response to danger signals and confers antimicrobial protection in *C. elegans*. *PLoS pathogens* 12(8):e1005826.
- Guha P., Das A., Dutta S., Chaudhuri T.K. 2018. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *Journal of Clinical of Laboratory Analysis* 32:e22181.

- Kasem S., Rice N., Henry R.J. 2018. DNA Extraction from Plant Tissue. *Plant genotyping II: SNP Technology* 219.
- Kong W.J., Wang Y., Wang Q., Han Y.C., Hu Y.J. 2006. Comparison of three methods for isolation of nucleic acids from membranate inner ear tissue of rats. *Chinese Medical Journal* 119:986–990.
- Koshy L., Anju A.L., Harikrishnan S., Kutty V.R., Jissa V.T., Kurikesu I., Jayachandran P., Jayachandran A., Gangappasad A., Nair G.M., Sudhakaran P.R. 2017. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Molecular Biology Reports* 44:97–108.
- Kumar R.M. 2009. The widely used diagnostics DNA microarray – a review. *American Journal of Infectious Disease* 5:207–218
- Londero D., Stampalija T., Bolzicco D., Castro Silva E., Candolini M., Cortivo C., Dreossi C., Fantasia I., Pecile V., De Angelis V. 2019. Fetal RHD detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma: validation of a diagnostic kit using automatic extraction and frozen DNA. *Transfusion Medicine* 29:408–414.
- Mardan-Nik M., Soflaei S.S., Biabangard-Zak A., Ashari M., Saljoughian S., Tajbakhsh A., Meshkat Z., Ferns G.A., Pasdar A., Ghayour-Mobarhan M. 2019. A method for improving the efficiency of DNA extraction from clotted blood samples. *Journal Clinical of Laboratory Analysis* 33:e22892.
- Najafi M., Rahimi-Mianji G., Ansari-Pirsaraei Z. 2014. Effect of allelic polymorphism in exon 3 of leptin gene on production traits in naeinian sheep breed. *Iran Journal of Applied Animal Science* 44:131–139.
- Oliver W.T., Wells J.E. 2015. Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *Journal of Animal Science Biotechnology* 6:34–40.
- Otsubo H., Kaito K., Asal O., Usui N., Kobayashi, Hoshi M.Y. 2005. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clinical and Laboratory Haematology* 27:242–246.
- Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:8–15.
- Psifidi A., Dovas C.I., Bramis G., Lazou T., Russel C.L., Arsenos G. 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *Plos One* 10:e0115960.
- Rausch S., Hasinger O., König T., Schlegel A., Weiss G. 2019. An automated high throughput solution for DNA extraction and bisulfite-conversion from high volume liquid biopsy specimens: sample preparation for epigenetic analysis. *BMC Research Notes* 12:551

- Salonen A., Nikkila J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen O., Rajilic-Stojanovic M. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal Microbiological Methods* 81:127–134.
- Stoughton R.B. 2005. Applications of DNA microarrays in biology. *Annual Review of Biochemistry* 74:53–82.
- Svec D., Andersson D., Pekny M., Sjöback R., Kubista M., Ståhlberg A. 2013. Direct cell lysis for single-cell gene expression profiling. *Front. Oncology* 3:274.
- Talebi R., Seighalani R., Qanbari S. 2019. A handmade DNA extraction kit using laundry powder; insights on simplicity, cost-efficiency, rapidity, safety and the quality of purified DNA. *Animal Biotechnology*.
- Tokunaga Y., Sakakibara Y., Kamada Y., Watanabe K.I., Sugimoto Y. 2013. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. *International Journal of Biological Science* 9:219–227.
- Yue G.H, Orban L. 2005. A simple and affordable method for highthroughput DNA extraction from animal tissues for polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 26:3081–3083.
- Zhang Y.J., Zhang S., Liu X.Z., Wen H.A., Wang M. 2010. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters Applied Microbiology* 51:114–118.

CAPÍTULO III. POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPAÍNA Y CALPASTATINA EN OVINOS SUFFOLK-DORSET UTILIZANDO PCR-SSCP

3.1 RESUMEN

La genotipificación de los genes de Calpastatina (CAST1) y Calpaína (CAPN316) es de mucha importancia productiva por su relación con la modulación del crecimiento muscular y calidad de la carne. Se genotipificó una población de ovinos Suffolk-Dorset mediante la técnica de PCR-SSCP. La identificación de los genes CAST1 y CAPN316 se realizó utilizando marcadores moleculares, para verificar la presencia de dos alelos (A y B) y la existencia de tres genotipos (AA, AB y BB). Se determinaron las frecuencias genotípicas de la población. Para el gen CAST1 los genotipos AA, AB y BB se distribuyeron en 24, 58 y 18%, y la frecuencia alélica para el alelo A y B se distribuyeron en 53 y 47%, respectivamente. Se encontró que para el gen CAPN316 en la población, los genotipos AA, AB y BB se distribuyeron en 39, 53 y 8% respectivamente, y la frecuencia alélica se distribuyó para el alelo A en 66 y para el alelo B en 34%. De acuerdo al equilibrio de Hardy Weinberg, la población estudiada de ovinos se encuentra sin cambios genéticos aparentes. La PCR-SSCP facilitó la genotipificación de la población de ovinos para su selección productiva.

Palabras clave: Gen, PCR-SSCP, polimorfismo, alelo, calpaína, calpastatina.

3.2 INTRODUCCIÓN

La selección genética se origina por cruzamientos absorbentes, donde el valor híbrido de cada raza ovina altamente productiva es de vital importancia, con la desventaja de ser prolongado e ineficiente (Ocampo *et al.*, 2017). Es evidente, que la selección genética se ha convertido en una herramienta primordial para la ganadería, ya que ha sido capaz de relacionar el fenotipo del animal con su genotipo, lo que ha permitido identificar inclusive las rutas metabólicas capaces de modificar la calidad de la carne. A este respecto, se han identificado genes cuya relación genética-productiva es estrecha, genes como el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF1), Leptina (LEP), Calpastatina (CAST), Calpaína (CAPN) y Miostatina (MSTN), relacionados con el incremento de tamaño de fibras musculares y una mejor tasa de conversión alimenticia (Coria *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2015). En ovinos, la genotipificación de individuos y la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), son herramientas útiles para seleccionar animales con potencial para producir carne de mejor calidad (Eftekhari-Shahroudi *et al.*, 2006). La mayor parte de los SNP están asociados a los polimorfismos en los genes calpastatina y calpaína en ovinos, los que a su vez se relacionan con la síntesis de proteasas reguladoras del proceso de ablandamiento de la carne. Lo anterior quedó demostrado que los sistemas alélicos de variantes polimórficas AB y BA para el gen calpastatina (CAST) están asociados con una mayor ganancia diaria de peso de los animales, y que para el caso de la variante polimórfica AA y AB en el gen CAST presentó una diferencia entre calidad de la carne y tamaño de individuo (Chung *et al.*, 2001; Tahmoorespur *et al.*, 2006). También se ha reportado que bovinos con la variante polimórfica EE, portadores del gen recesivo CAST, fueron capaces de producir carne más suave y con mayor rendimiento de grasa (Vergara *et al.*, 2019; Schenkel *et al.*, 2006). De manera que la presencia del gen calpaína en diferentes especies tiene una estrecha relación entre expresión génica y suavidad de la carne (Vergara *et al.*, 2019). En México las razas Dorset y Suffolk destacan por su alto valor productivo y doble propósito, siendo utilizadas en cruzamientos terminales. En la actualidad se desconoce la existencia de factores genéticos relacionados con su producción, de manera que los avances en la ciencia donde la identificación del genotipo con su producción es limitada. Por lo tanto, el objetivo de estudio fue identificar la presencia de los polimorfismos de los

genes CAST1 y CAPN316 para su genotipificación en ovinos Suffolk-Dorset mediante la técnica PCR-SSCP.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Extracción de DNA

Se muestrearon 140 ovinos Suffolk x Dorset previo al destete, machos (n=35) y hembras (m=105), con edad y peso promedio de 8 semanas y 18 kg, respectivamente. Se obtuvieron muestras de sangre de cada individuo mediante la técnica de vacutainer por venopunción, las cuales se colectaron en tubos con anticoagulante (EDTA 7.2 mg). La extracción del DNA se realizó mediante el método de CTAB al 2% modificado con adición de lisozima bacteriana (Torres-Lemus *et al.*, 2020). La calidad del DNA se evaluó utilizando un NanoDrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific).

3.3.2 Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

La PCR se llevó a cabo en una solución con volumen total de 15µL, que consistió en 4µL de DNA total (120 ng de DNA), y 11 µL de master mix compuesta por 3.0 µL buffer de carga, 7.86 µL agua HPLC, 0.6 µL dntp's, 0.18 µL primer's forward y reverse y 0.18 µL GoTaq polimerasa. Los marcadores utilizados se describen en el Cuadro 1. Las condiciones de la PCR para la amplificación de los genes CAST1 y CAPN316, consistieron en una temperatura inicial de 95 °C durante 5 min, seguida de 95 °C durante 30 s, posteriormente 32 ciclos de 30 s con una temperatura de alineación a 63.1 °C para el gen CAST1 y 59 °C para el gen CAPN316, y una temperatura de finalización de 30 s a 72 °C, con una extensión de 10 min a 72 °C. Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2% mediante la técnica de electroforesis (Figuras 1 y 2).

Cuadro 1 Secuencias de iniciadores requeridos para la amplificación de los genes Calpaína (CAPN316) y Calpastatina (CAST1).

| Gen | Tamaño del producto de PCR | Secuencia de iniciadores |
|---------|----------------------------|--|
| CAST1 | 1552 | F: 5'-GGGCCAGATGGTGAACCTGA-3' R: 3'-TTGCGGAACCTCTGGCTCTT-5' |
| CAPN316 | 739 | F: 5'-AGCAGCCACCATCAGAGAAA-3' R: 3'-TCAGCTGGTTCGGCAGAT-5' |

Page *et al.*, 2004; Alireza *et al.*, 2009.

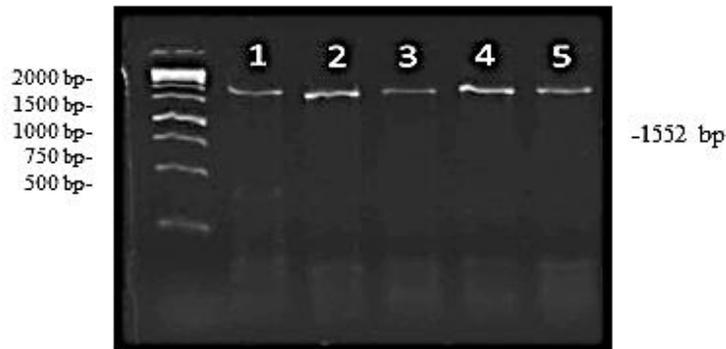


Figura 1 PCR CAST1, electroforesis en el gel de agarosa al 2% (1552 pb).

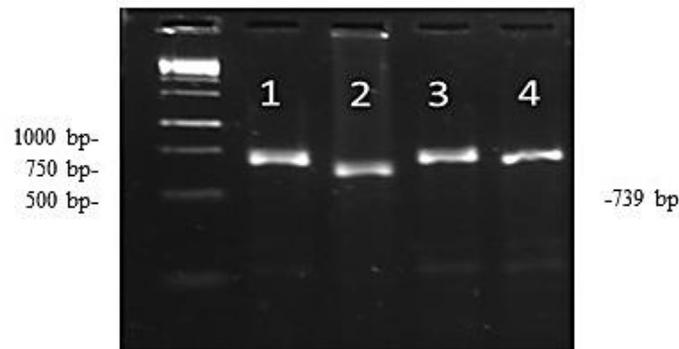


Figura 24 PCR CAPN316, electroforesis en el ge de agarosa al 2% (739 pb).

3.3.3 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)

Para la identificación de los genotipos del locus CAST1 y CAPN316, se utilizaron 5 μ L de producto de PCR, el cual se diluyó en 10 μ L de DNA stop sequencing, que consistió en 80% de formamida, azul de bromofenol al 1%, xilencianol al 1%, EDTA 0,5 M y NaOH 10 M. Esta mezcla de reacción se sometió a una desnaturalización a 95 °C durante 10 min, transfiriéndose inmediatamente a hielo durante un lapso de 20min, con lo cual se generó un choque térmico con la finalidad de separar las hebras que conforman el DNA. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 10% con una relación de 35:1 utilizando 250 Volts, donde el tiempo de electroforesis para los genes CAST1 y CAPN316 fue de 13 y 7 h, respectivamente. La temperatura se controló por flujo circundante de agua a 4 °C. Posteriormente, los fragmentos de los genes CAST1 y CAPN316 se develaron a través de la técnica de tinción de plata al 1%, y finalmente se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3016, Vilbert Lourmat Corporation, Cedex, Germany) (Figuras 3 y 4). Se realizó un análisis de población obteniendo la frecuencia genotípica y alélica, heterocigocidad esperada (H_e) y observada (H_o), además se determinó el equilibrio Hardy Weinberg (EHW) mediante un análisis de χ^2 (SAS, 2015).



Figura 3 Gel de acrilamida, genotipos del gen CAST1. Carril 1: identificación del genotipo AA. Carril 2 y 3: identificación del genotipo AB.

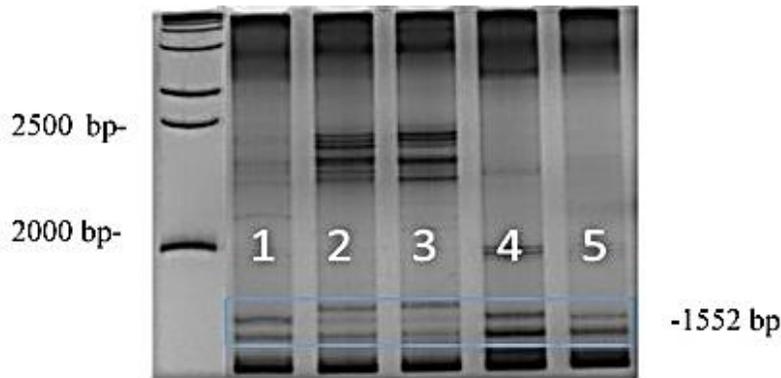


Figura 4 Gel de acrilamida, genotipos del gen CAPN316. Carriles 1,4,5: identificación del genotipo BB. Carriles 2 y 3: identificación del genotipo AB.

3.4 RESULTADOS

Mediante la utilización de los marcadores CAPN316 y CAST1 se identificaron tres genotipos (AA, AB y BB) mismos que se encontraron en diferentes proporciones en nuestra población de ovinos Suffolk × Dorset. Las frecuencias genotípicas fueron analizadas.

3.4.1 Análisis por sexo

Para el gen CAST1, se identificaron tres genotipos presentes en ambos sexos (AA, AB y BB), cuya distribución genotípica en el caso de los machos fue de 29, 43 y 26%, respectivamente; mientras que para las hembras la distribución fue 22, 14 y 66%, respectivamente.

Para el gen CAPN316, en los machos se identificaron únicamente dos genotipos, el AB con 41, y BB con 59%, respectivamente. Para el caso de las hembras, se identificaron tres genotipos (AA, AB y BB), con una presencia del 10, 57, y 33%, respectivamente (Cuadro 2).

3.4.2 Análisis poblacional

La distribución de los genotipos para el gen CAST1 fue AA con 24, AB con 58 y BB con 18%, respectivamente. La frecuencia alélica se representó para el alelo A con 53 y 47% para el alelo B, respectivamente (Cuadro 3).

La distribución genotípica del gen CAPN316 en la población de ovinos fue AA con 39, AB con 53 y BB con 8%, respectivamente. La frecuencia alélica de la población fue para A de 66 y para el alelo B con 34%, respectivamente (Cuadro 3).

Para el gen CAST1 la heterocigocidad observada (H_o) fue 57% y la heterocigocidad esperada (H_e) fue 54% (Cuadro 4). Para el gen CAPN316 la (H_o) fue 92% y la (H_e) de 44%, respectivamente.

Cuadro 2 Frecuencias genotípicas por SEXO para los locus CAST1 y CAPN316.

| | Locus CAPN316 | | | Locus CAST1 | | |
|---------|--------------------------|----|----|--------------------------|----|----|
| | Frecuencia Genotípica, % | | | Frecuencia Genotípica, % | | |
| | AA | AB | BB | AA | AB | BB |
| Machos | 0 | 41 | 59 | 29 | 43 | 26 |
| Hembras | 10 | 57 | 33 | 22 | 14 | 66 |

Locus CAPN316: marcador para CAPN316 de calpaína.

Locus CAST1: marcador para CAST1 de calpastatina.

Cuadro 3 Frecuencias alélicas y genotípicas POBLACIONAL de los locus CAST1 y CAPN316.

| Locus CAPN316 | | | | | Locus CAST1 | | | | |
|---------------|----|---------------|----|----|-------------|----|---------------|----|----|
| Frecuencia | | Frecuencia | | | Frecuencia | | Frecuencia | | |
| Alélica, % | | Genotípica, % | | | Alélica, % | | Genotípica, % | | |
| A | B | AA | AB | BB | A | B | AA | AB | BB |
| 66 | 34 | 39 | 53 | 8 | 53 | 47 | 24 | 58 | 18 |

Locus CAPN316: marcador para CAPN316 de calpaína.

Locus CAST1: marcador para CAST1 de calpastatina.

Cuadro 4 Heterocigocidad y prueba de equilibrio de Harding-Weiberg para los locus CAPN316 y CAST1.

| Locus CAPN316 | | | | Locus CAST1 | | | |
|---------------|------|--------|----------|-------------|-------|-------|----------|
| Ho | He | HWE | χ^2 | Ho | He | HWE | χ^2 |
| 53 | 44.5 | 3.1494 | 3.84 | 58 | 49.82 | 2.902 | 3.84 |

Ho: heterocigocidad observada. He: heterocigocidad esperada. HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg.

3.5 DISCUSIÓN

Los fragmentos de los genes CAPN316 y CAST1 fueron claramente identificados a nivel de sexo y población. Es interesante puntualizar que la dominancia del alelo A del gen CAST1 en nuestro rebaño de ovinos Suffolk x Dorset está ligado a la dominancia de animales provenientes de razas de origen europeo, cuya característica productiva en carne se debe a una mayor presencia de grasa intramuscular y factores *postmortem* que originan carne suave y tierna (Bunch *et al.*, 2004; Haddad *et al.*, 2005). La presencia del alelo B es una característica de preservación y evolución genética de animales de origen africano, cuya rusticidad y desarrollo muscular temprano, está relacionado a la adaptabilidad al medio ambiente. La distribución alélica que presenta nuestro rebaño, indica el valor híbrido de los animales, donde la introducción tanto de animales ascendientes de razas europeas (Suffolk, Dorset y Charollais) y africanas (Pelibuey, Dorper y Katahdin) han dado origen a híbridos con alta adaptabilidad y mayor aptitud productiva deseable. Los resultados de nuestro estudio coinciden con aquellos reportados por Elyasi-zaringhabaee *et al.* (2005), quienes encontraron la presencia de un alelo A en el gen CAST1 que se presenta con una dominancia de 48% a 69% en razas Ghezel, Arkhar-Merino y Ghezel-Merino, resultados similares a Palmer *et al.* (1999) quienes reportan que la frecuencia del alelo A se presentó en un 77% en ovejas de la raza Corriedale, indicando que estas razas tienen un origen europeo. En México existen antecedentes históricos de la introducción de animales europeos y africanos a la llegada de los españoles al nuevo continente, de manera que el animal introducido hace cientos de años y los nacidos en el país comparten rasgos genéticos, pero no existen estudios filogenéticos que comprueben tal aseveración. Ante este escenario, nuestro estudio sirve de base en la visualización del panorama general de la construcción de los ovinos híbridos actuales.

Si consideramos que la frecuencia genotípica AA para el gen CAST1 de nuestro rebaño, representó el 24% ésta relacionada con la dominancia y presencia de la calpastatina presente en la conformación y composición del tejido muscular de animales adultos, de tal manera que la variabilidad genética en individuos jóvenes tiene la capacidad de modificarse, respondiendo a variables medioambientales (Sheng *et al.*, 2018). A este

respecto, se han observado que ovejas adultas presentaron predominio para el alelo AA, concluyendo que éste se determinaba durante la madurez (Tahmoorespur *et al.*, 2006; Eftekhari-Shahroudi *et al.*, 2006; Gabor *et al.*, 2009). De igual manera, se analizaron 3 poblaciones de ovejas adultas de las razas Pantaneira, Suffolk e Il de France donde el dominio fue de 82%, lo cual podría indicar que el carácter hereditario tiene origen en la edad de los ovinos (Santos *et al.*, 2016). Por lo tanto, se hipotetiza que la dominancia de la frecuencia AA sobre cualquier otro genotipo es afectada por la edad de los ovinos y el entorno de desarrollo del mismo.

Los resultados de este estudio evidencian, desde el punto de vista molecular, que el manejo productivo y mejoramiento genético de nuestro rebaño no sugiere un desequilibrio en la población, lo que indica que se requiere una mayor presión genética para ocasionar un cambio, tal como sucede de manera natural durante la migración (Abdullah *et al.*, 2008). Al respecto, se demostró que la introducción de nuevo material biológico a una población está sujeto a factores externos e internos, y que, generalmente una elevada tasa de consanguinidad no modifica la estructura genética de la población (Vasconcellos *et al.*, 2003). En este sentido, una mayor proporción de heterocigotos presentes en los ovinos de nuestra población para los locus CAST1 y CAPN316 puede atribuirse a la falta de endogamia, debido a la introducción de nuevo material genético (Vergara *et al.*, 2019). En este mismo sentido, el equilibrio poblacional de Hardy-Weiberg expresado para el rebaño de ovinos de nuestro experimento indica que la población se encuentra definida, y que los alelos A y B son constantes a través de las generaciones. Por otra parte, la fijación de un solo alelo que sea favorable productiva y adaptativamente para los ovinos, puede llegar a ocasionar una contracción de la diversidad genética, lo que en un futuro podría reducir el tamaño de la población.

Los resultados de dominancia del gen CAPN316 de manera general presente en corderos, se atribuye a que este gen provee al músculo la capacidad de crecimiento y aumento de células musculares, función que se pierde con la madurez del ovino. Al respecto, se ha reportado que los ovinos adultos únicamente presentan genotipos definidos, ya sea dominantes (AA) o heterocigotos (AB); mostrando que la recesividad (BB) se presenta en coderos pre-púberes (Kumar *et al.*, 2015; Dehnavi *et al.*, 2012). La

presencia del genotipo (BB) está relacionada con animales que confieren ternera a la carne, cualidad que está definida en animales recién nacidos o bien en edad pre-púber, donde el desarrollo de fibras musculares no es completo. Por tanto, la presencia de individuos con el genotipo (BB) debe realizarse en edad adulta donde el genotipo está completo y definido, evitando con esto seleccionar animales jóvenes con amplia variabilidad genética.

La presencia de los polimorfismos en los genes CAPN316 y CAST1 identificados en los corderos de nuestro estudio, les permite adaptarse al medio ambiente confiriéndoles un pronto crecimiento y desarrollo muscular. A este respecto, se realizaron investigaciones en donde identificaron mutaciones de los genes CAPN316 y CAST1 asociándolas a características presentes en edad adulta, que en ocasiones son desarrolladas en edad temprana en ciertas razas de ovinos (Fang *et al.*, 2013; Mahrous *et al.*, 2016), lo que es parte de su historia evolutiva, siendo necesaria para la motricidad temprana y supervivencia (Abdullah *et al.*, 2008).

Finalmente, el manejo reproductivo de nuestro hato Suffolk x Dorset, contiene un alto valor genético y biológico, enriqueciendo con la introducción de nuevos animales. A su vez, es interesante puntualizar que esta riqueza en la biodiversidad, favorece la expresión de nuevos caracteres productivos, o bien acentúa la fijación de capacidad adaptativa de los ovinos a su entorno, esto debido a la alteración genética que constantemente evoluciona y se adapta (Mahrous *et al.*, 2016).

3.6 CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La técnica de PCR-SSCP es una herramienta viable para evaluar la variabilidad genética de los genes implicados en la producción cárnica, facilitando la genotipificación de una población e identificando aquéllos individuos con alto potencial productivo. Los resultados en esta investigación abren perspectivas para la selección asistida mediante marcadores moleculares de los genes calpaína (CAPN316) y calpastatina (CAST1), los cuales se han relacionado con la ternera de la carne.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos enormemente a CONACyT-México (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca otorgada al primer autor.

CONFLICTOS DE INTERES

Conflicto de intereses. Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

3.7 LITERATURA CITADA

- Abdullah, M. A. N., Noor, R. R., Handiwirawan, E. 2008. IDENTIFIKASI PENANDA GENETIK DAERAH D-LOOP PADA SAPI ACEH [Genetics Marker Identification of Aceh Cattle Using D-Loop Region Analysis]. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 33(1), 1-10.
- Alireza, M., Jothi, M. P., Awis, Q. S., Siti, S. S. 2009. Characterization of bovine calpastatin gene in Nelore cattle using polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphisms. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4(4), 92-94.
- Bunch, T. D., Evans, R. C., Wang, S., Brennand, C. P., Whittier, D. R., Taylor, B. J. 2004. Feed efficiency, growth rates, carcass evaluation, cholesterol level and sensory evaluation of lambs of various hair and wool sheep and their crosses. *Small Ruminant Research*, 52(3), 239-245.
- Chung, H., Davis, M., Hines, H. 2001. Relationship of two PCR-RFLP in the bovine calpastatin gene with calpastatin activity, meat tenderness and carcass traits. *International Society for Animal Genetics. Animal genetics*, 32, 40-53.
- Coria, M. S., Carranza, P. G., Palma, G. A. 2018. Calpain System in meat tenderization: A molecular approach. *Revista MVZ Córdoba*, 23(1), 6523-6536.
- Dehnavi, E., Ahani, A. M., Hasani, S., Nassiry, M. R., Mohajer, M., Khan, A. A. R. 2012. Genetic variability of calpastatin and calpain genes in Iranian Zel sheep using PCR-RFLP and PCR-SSCP methods; 136-139.
- Eftekhari Shahroudi, F., Nassiry, M. R., Valizadh, R., Heravi Moussavi, A., Tahmoores Pour, M., & Ghiasi, H. 2006. Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(2), 117-122.
- Eliasi, Z. G. G., Shoja, G. J., Nasir, M., Pir, A. O., Javanmard, A. (2005, January). Determination Of Ovine Calpastatin Gene Polymorphism Using Pcr-Rflp. *Proceedings Of National Biotechnology Congress Of Islamic Republic Of Iran*.
- Fang, Q., Forrest, R. H., Zhou, H., Frampton, C. M., & Hickford, J. G. H. 2013. Variation in exon 10 of the ovine calpain 3 gene (CAPN3) and its association with meat yield in New Zealand Romney sheep. *Meat science*, 94(3), 388-390.
- Gabor, M., TRAKOVICKÁ, A., & MILUCHOVÁ, M. 2009. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 42(2), 470-476.
- Georgieva, S., Hristova, D., Dimitrova, I., Stancheva, N., & Bozhilova-Sakova, M. 2015. Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 4(1).

- Haddad, S. G., Mahmoud, K. Z., Talfaha, H. A. 2005. Effect of varying levels of dietary undegradable protein on nutrient intake, digestibility and growth performance of Awassi lambs fed on high wheat straw diets. *Small Ruminant Research*, 58(3), 231-236.
- Mahrous, K. F., Hassanane, M. S., Shafey, H. I., Mordy, M. A., Rushdi, H. E. 2016. Association between single nucleotide polymorphism in ovine Calpain gene and growth performance in three Egyptian sheep breeds. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2), 233-240.
- Kumar, N., Jayashankar, M. R., Ramakrishnappa, N., Nagaraja, C. S., Fairoze, N., Satyanarayana, K. 2015. Genetic polymorphism of ovine calpain gene in Bandur sheep. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(3), 804-812.
- Ocampo, R., Martínez R., Rocha J., Cardona H. 2017. Genetic characterization of Colombian indigenous sheep. *Revista Colombiana Ciencia Animal*; 30(2), 116- 125.
- Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Dikeman, M. E. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of animal science*, 82(12), 3474-3481.
- Palmer, B. R., Roberts, N., Hickford, J. G., Bickerstaffe, R. 1998. Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *Journal Animal Science* 76(5), 1499-1500.
- Santos, C., Crispim, A., Seno, L., Vargas-Junior, F., & Grisolia, B. 2016. Polymorphisms in the CAST gene of shepp from mato grosso do Sul, Brazil. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8(1), 51-55.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H., Wilton, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of animal science*, 84(2), 291-299.
- Sheng, G. L., Barlow, A., Cooper, A., Hou, X. D., Ji, X. P., Jablonski, N. G., Wang, L. R. 2018. Ancient DNA from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) of south-western China reveals genetic diversity loss during the holocene. *Genes*, 9(4), 198.
- Statistical Analysis Software (SAS). SAS/STAT user's guide, Release 5.0 Cary, N.C. U.S.A. SAS Inst. Inc. 2015.
- Tahmoorespur, M., Nassiry, M.R., Javadmanesh, A. 2006. Calpastatin gene polymorphism in Baluchi and Kurdi sheep by SSCP. *Agriculture Biotechnology*. p.51.
- Torres-Lemus, F., Silva-Rojas, Hilda, V., Hernández-Mendo, Omar., Crosby-Galvan, Maria M. 2020. A novel method for DNA extraction from animal blood by adding bacterial lysozyme. *Afr J. Biotechnol* [in process].

- Vasconcellos, L. P. D. M. K., Tambasco-Talhari, D., Pereira, A. P., Coutinho, L. L., & Regitano, L. C. D. A. 2003. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26(2), 133-137.
- Vergara, D. M., Valencia, C. L., & Herrera, D. H. 2019. Polimorfismos de los genes calpaína y calpastatina en dos poblaciones de ovinos de pelo colombiano. *Revista MVZ Córdoba*, 7113-7118.

CAPITULO IV. VARIABILIDAD GENÉTICA DE SEIS RAZAS DE OVINOS PRODUCTORES DE CARNE GENETIC VARIABILITY OF SHEEP IN SIX MEAT BREEDS

4.1 RESUMEN

Las tecnologías de secuenciación del DNA, ayudan a la identificación de polimorfismos múltiples en poblaciones de ovinos, lo que facilita la selección dirigida. Este estudio revela la variabilidad genética en ovinos de carne mediante la utilización de marcadores moleculares para los genes IGF1 (Factor de crecimiento tipo insulínico tipo 1) y Leptina (Lep275-Lep471); estos genes se han asociado con la terneza y rendimiento de la carne, pero se carece de información acerca de su distribución y presencia en las diferentes razas de ovinos en México. Se analizaron muestras de DNA en ovinos, tomadas en el centro del país y distribuidas en los estados de Hidalgo, Morelos y Estado de México. Se analizaron con base a tres genes de importancia productiva cárnica (IGF1, lep275 y lep471). Se encontraron polimorfismos entre razas por cada uno de los genes. Los haplotipos de ovinos con el gen IGF1 eran similares a cuatro secuencias reportadas en USA, Egipto e India en la base de datos del GenBank, mostrando diferencia mínima (2-4 substituciones). El gen Lep275 no mostró diferencia genética entre razas, únicamente para el haplotipo de raza Dorper blanco, mostrando homogeneidad en las poblaciones. Para el gen Lep471 se agruparon las diferencias biológicas a un sólo haplotipo común, mostrando variaciones en las razas Dorset y Charollais provenientes de dos zonas geográficas en México. El gen Lep475 tiene variaciones en la especie *Ovis aries* extendida a nivel mundial. Análisis de redes de haplotipos de unión de medias y análisis de estimación de red filogenética utilizando parsimonia estadística (TCS), indicaron que los genes IGF1, Lep275 y Lep471 presentes en ovinos mexicanos comparten gran parte de su diversidad con ovinos de otros países. La diversificación y cruzamientos de razas han acentuado cambios que podrían explicar las diferencias fenotípicas productivas en carne, aunque no serían el único factor que determina su producción.

Palabras clave: *Gen, Leptina, IGF1, Polimorfismo, Red de haplotipos, DNA.*

4.2 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la diversidad genética de los ovinos se representa con un promedio de 450 razas a nivel mundial, las cuales comparten al menos dos ancestros en común: el Muflón asiático (*Ovis orientalis*) y el Muflón europeo (*Ovis musimon*) (Barbato *et al.*, 2017). Los estudios genéticos sitúan el origen del ancestro muflón asiático en regiones de Asia menor y el sur de Irán (Zeder, 2008, Dobney y Larson 2006), en tanto que el origen del muflón europeo se ha determinado según un estudio de genotipificación reciente (Kijas *et al.*, 2012) con aspectos similares a individuos de las islas de Córcega y Cerdeña, en el mar Mediterráneo. Estos hechos trascendieron en la presencia de ambas especies en el continente americano donde se cree que tienen un origen con la llegada de los españoles a México, aunque estudios histológicos, morfológicos y moleculares sugieren que hubo eventos independientes marcados durante el proceso de domesticación de los ovinos y bovinos a su llegada al nuevo continente (Martínez *et al.*, 2007). Estos sucesos determinan la historia del desarrollo del ovino en Latinoamérica, la cual se caracterizó por la utilización de razas especializadas y el asentamiento de explotaciones de ovinos con fines de producción altamente rentables (Quiroz *et al.*, 2007), y consecuentemente derivó en la disminución y pérdida de la biodiversidad genética. Ante este escenario, la generación y preservación de recursos genéticos y biológicos para los ovinos autóctonos y nativos de México se hace necesario dada la importancia en la recuperación de recursos genéticos. En este sentido, la utilización de técnicas moleculares como la secuenciación del DNA mitocondrial (mtDNA) y estudio del genoma se ha vuelto imprescindible en el estudio de la herencia y la recombinación de material genético en ovinos (San Primitivo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). En diversas investigaciones se ha sugerido la utilización de marcadores moleculares asociados a características productivas (Zhang *et al.*, 2012), de manera que las variaciones polimórficas de los genes constitutivos (Leptina e IGF) generen un impacto directo en la producción ovina, lo que implica una mayor producción (Kijas *et al.*, 2012; Fariello *et al.*, 2014), rentabilidad y preservación de la biodiversidad. La generación de conocimiento y recursos genéticos nos acercan al entendimiento de la relación de cambios moleculares que modifican las rutas metabólicas en los rumiantes (Lagonigro *et al.*, 2003; Rochus *et*

al., 2018), lo que ha generado una asociación génica y productiva (Boucher *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2014).

En México se han establecido ocho de las principales razas especializadas para la producción de carne ovina, dentro de las que destacan: Suffolk, Dorset, Hampshire, Charollais, Black-Belly, Pelibuey, Dorper y Katahdin, distribuidas en la mayoría de los estados (Hernández *et al.*, 2011). Por ello, es necesario establecer estudios genéticos poblacionales que permitan identificar regiones genómicas de baja diversidad genética (Boitard *et al.*, 2009), ya que son importantes en la selección de animales reproductores y facilitan la diferenciación entre haplotipos o regiones alélicas variables que determinan las diferencias genotípicas entre las razas (Bonhomme *et al.*, 2010; Fariello *et al.*, 2013).

En la actualidad los estudios científicos de población de ovinos en México son limitados, por lo que, a través de la utilización de marcadores moleculares relacionados a genes de carácter productivo, se pretende describir su diversidad genética y localizar variaciones polimórficas presentes en el mtDNA que tienen la capacidad de conferir rasgos altamente productivos y de mayor importancia económica.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Recurso animal

El estudio incluyó un total de 60 ovinos de seis razas puras registradas genealógicamente en la Unión Nacional de Ovinocultores (UNO). Se obtuvieron 60 muestras en total de animales pertenecientes a las razas de ovinos Pelibuey, Dorper blanco, Katahdin, Suffolk, Dorset, y Charollais. Las muestras de sangre de cada individuo mediante la técnica de vacutainer por venopunción, las cuales se colectaron en tubos con anticoagulante (EDTA 7.2 mg). Las diferentes razas de ovinos se encuentran distribuidas en tres de los estados pertenecientes a la zona centro del país (Hidalgo, Morelos y Estado de México).

4.3.2 Extracción del mtDNA, PCR y Secuenciación.

La extracción del mtDNA se realizó mediante el método de CTAB al 2% modificado con adición de lisozima bacteriana (Torres-Lemus *et al.*, 2020). El manejo de animales se realizó de acuerdo con las normas de ética y bioseguridad del Consejo de Organizaciones Internacionales en Ciencias Médicas (CIOMS, 2015), de conformidad con la ley mexicana (NOM-062-Z00-1999) para el uso de animales en experimentación (DOF, 2019). La amplificación (PCR) y secuenciación se realizó mediante los cebadores Lep275, Lep471 e IGF1 (Zhou *et al.*, 2009). Las condiciones de PCR para Lep275, Lep471 e IGF1 se modificaron y adaptaron a lo reportado por Zhou (2009). Las temperaturas del ciclo de PCR para Lep275 y Lep471 fueron: una temperatura inicial de 94 °C durante 2 min, seguida de 94 °C durante 30 s, posteriormente 35 ciclos de 1 min con una temperatura de alineación a 59 °C, y una temperatura de finalización de 30 s a 72 °C, con una extensión de 5 min a 72 °C. Para el caso del gen IGF1 las condiciones para su amplificación consistieron en una temperatura inicial de 95 °C durante 10 min, seguida de 95 °C durante 15 s, posteriormente 30 ciclos de 1 min con una temperatura de alineación a 62 °C, y una temperatura de finalización de 20 s a 72 °C, con una extensión de 3 min a 86 °C. Todos los productos de PCR se limpiaron con ExoSAP-It (Affymetrix) y se secuenciaron mediante el servicio de secuenciación MacroGen (Maryland, EE. UU).

Cuadro 1. Secuencias de primer´s requeridos para la amplificación de los genes Lep275, Lep471 e IGF1.

| Gen | Tamaño del producto de PCR | Secuencia de Primer´s |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| Lep275 | 275 | R-ATACGATTGAGAGACTTCAC |
| | | F- GTTATGAATTGCTTTCTACTC |
| Lep471 | 471 | R-CTTCAAGGCTTCAGCACC |
| | | F-AGGAAGCACCTCTACGCTC |
| IGF1 | 200 | R- CACATCTGCTTACACCTTACCCG |
| | | F-ATTACAGCTGCCTGCCCTT |

Zhou *et al.*, 2009

4.3.3 Red de haplotipos

El número de haplotipos se estimó utilizando el software DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017) y la red de haplotipos se construyó en el software PopART (Leigh y Bryant, 2015), utilizando 10 secuencias genéticas para cada marcador (Lep275, Lep471 e IGF1). Para la construcción de la red haplotípica se utilizó el método algorítmico TCS (Clement *et al.*, 2002). Esta red se utilizó para seleccionar diferentes haplotipos para el análisis filogenético multilocus.

4.3.4 Análisis filogenético multilocus

Las secuencias de consenso se obtuvieron utilizando el software Geneious v.11.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). Posteriormente, se realizaron múltiples alineaciones para cada gen / región en el servicio en línea MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) con parámetros predeterminados, y se concatenaron en el software Mesquite (Madison y Maddison, 2018).

La reconstrucción filogenética se realizó para la especie *Ovis aries* utilizando los marcadores previamente descritos en el Cuadro 1 (Lep275, Lep471 e IGF1). Posteriormente, se generó una red de unión mediana a través del algoritmo *median-joining* para las regiones estudiadas utilizando el software NETWORK 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd) que muestra las relaciones e interacciones haplotípicas de los ovinos. Mediante el uso del método “*statistical parsimony*” implementado con el programa TCS

versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) se creó una red de haplotipos y se comparó con los obtenidos con el software NETWORK.

Mediante el uso del programa MEGA 5.2.2 y la realización de modelos estimados con los métodos de “maximum likelihood” y “bayesiano”, se construyeron árboles filogenéticos para los genes Lep471 e IGF1 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias consenso obtenidas durante la investigación fueron reportadas al NCBI (National Center for Biotechnology Information) con los que se generó un registro con número de accesión para cada secuencia y haplotipo identificado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Registro y números de accesión al NCBI de los Genes Lep275, Lep471 e IGF1.

| Gen | Especie | Raza | N° de accesión | Lugar de origen |
|---------------|-------------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| Lep275 | <i>Ovis aries</i> | Katahdin | MK070498 | México |
| | | Katahdin | MK070499 | México |
| | | Pelibuey | MK070500 | México |
| | | Pelibuey | MK070501 | México |
| | | Suffolk | MK070502 | México |
| | | Suffolk | MK070503 | México |
| | | Dorset | MK070504 | México |
| | | Dorset | MK070505 | México |
| | | Charollais | MK070506 | México |
| Dorper Bco. | MK070507 | México | | |
| Lep471 | <i>Ovis aries</i> | Katahdin | MN974406 | México |
| | | Katahdin | MN974407 | México |
| | | Pelibuey | MN974408 | México |
| | | Pelibuey | MN974409 | México |

| | | | | |
|-------------|-------------------|-------------|----------|--------|
| | | Suffolk | MN974410 | México |
| | | Suffolk | MN974411 | México |
| | | Dorset | MN974412 | México |
| | | Dorset | MN974413 | México |
| | | Charollais | MN974414 | México |
| | | Katahdin | MK837013 | México |
| | | Katahdin | MK837014 | México |
| | | Pelibuey | MK844847 | México |
| | | Pelibuey | MK844848 | México |
| | | Suffolk | MK844849 | México |
| IGF1 | <i>Ovis aries</i> | Suffolk | MK844850 | México |
| | | Dorset | MK844851 | México |
| | | Dorset | MK844852 | México |
| | | Charollais | MK844853 | México |
| | | Dorper Bco. | MK844854 | México |

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Detección de la diversidad a través de la red de haplotipos

Se obtuvieron datos para los genes mitocondriales (Lep275, Lep471 e IGF1) de 30 individuos comprendidos principalmente en los estados de Hidalgo, Estado de México y Morelos. Los parámetros de diversidad estimados para los tres genes se dan en el Cuadro 3. La alineación de las secuencias mostró 275 bp (0.8 y 83%) sitios polimórficos en el LEP275 y gen LEP475 respectivamente. Para el gen IGF1 y LEP471 se identificaron sitios polimórficos los cuales se agruparon en haplotipos 9 y 3, respectivamente. La diversidad de haplotipos (h) fue mucho menor que la región Lep275 (0.00) (Figura 1),

para Lep471 (0.731) (Figura 2) e IGF1 (0.396) (Figura 3); la diversidad de nucleótidos (π) (0.00516 ± 0.133) para la región Lep471 y (0.00236 ± 0.159) para el gen IGF1.

Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética estimados de los genes Lep275, Lep471 e IGF1 de mtDNA en las seis razas de ovinos.

| | Tamaño del fragmento (bp) | Haplotipos | Diversidad Genética $h \pm SD$ | Diversidad Nucleótida $\pi \pm SD$ |
|---------------|---------------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Lep275 | 245 | 1 | 0.000 | 0.0000 \pm 0.000 |
| Lep471 | 432 | 7 | 0.731 | 0.00516 \pm 0.133 |
| IGF1 | 235 | 4 | 0.396 | 0.00236 \pm 0.159 |

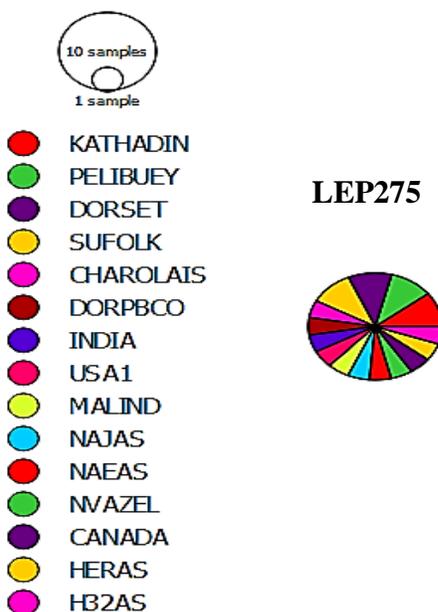


Figura 1 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen LEP275, generado a partir en 250 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas cercanas a secuencias reportadas en GenBank.

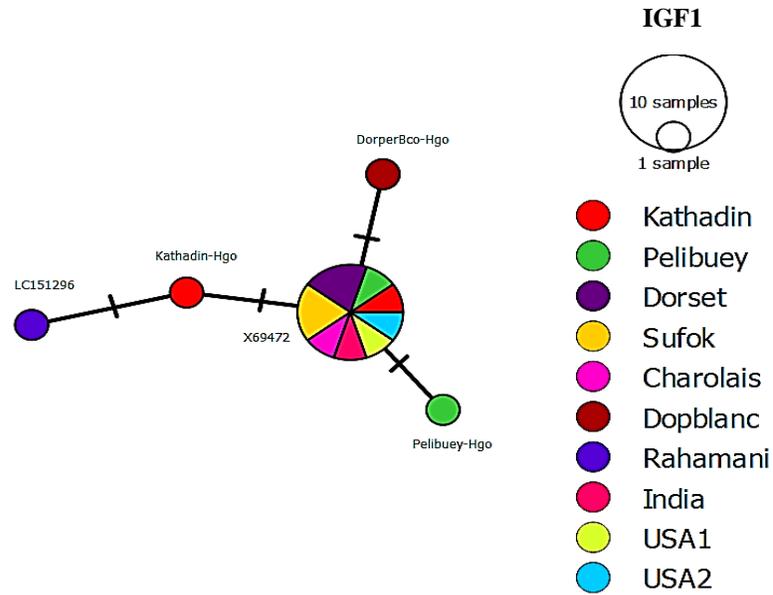


Figura 2 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen IGF1. Generado a partir en 250 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas (2-4 sustituciones) comparadas con genes de individuos reportados en GenBank.

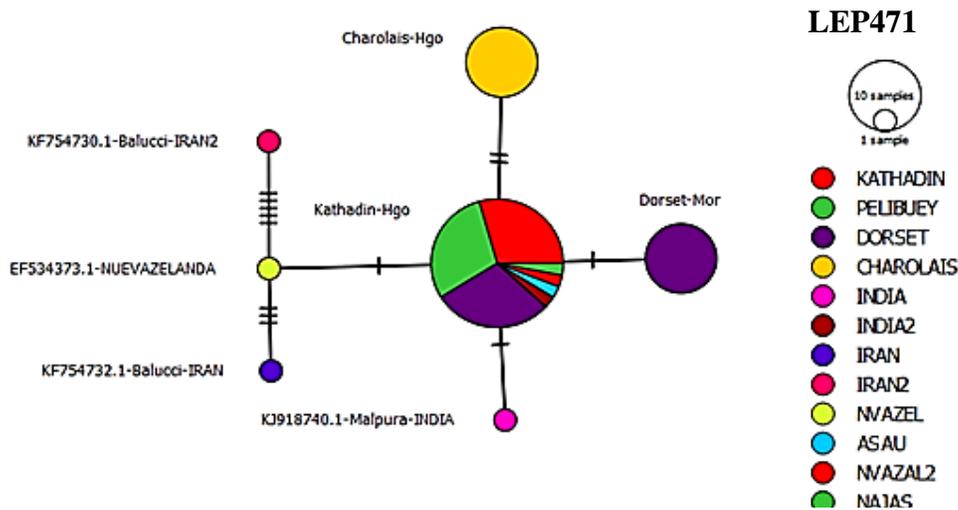


Figura 3 Red de haplotipos TCS para la probabilidad de parsimonia del gen LEP471. Generado a partir en 470 pares de bases, mostrando el linaje y las distancias evolutivas cercanas a secuencias reportadas en GenBank.

4.4.2 Análisis filogenético multilocus

La determinación de los genes IGF1 y Lep471 se realizó por separado en dos matrices de datos. Se realizó una búsqueda en el árbol ME utilizando el algoritmo de intercambio de vecinos cercanos (CNI) en un nivel de búsqueda de 1. Se utilizó el algoritmo de unión de vecinos para generar el árbol inicial. El análisis incluyó 14 (IGF1) y 13 (LEP471) secuencias de nucleótidos. La historia evolutiva se infiere utilizando el método de evolución mínima en la construcción de cada uno de los genes, los árboles muestran valores óptimos con una suma de la longitud de rama para IGF1= 0.01299178 y LEP475= 0.03048996. Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir ambos árboles filogenéticos (Figuras 4 y 5). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Tajima-Nei (1984) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^o + 2^o + 3^o + Sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de 233 (IGF1) y 432 (LEP471) posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

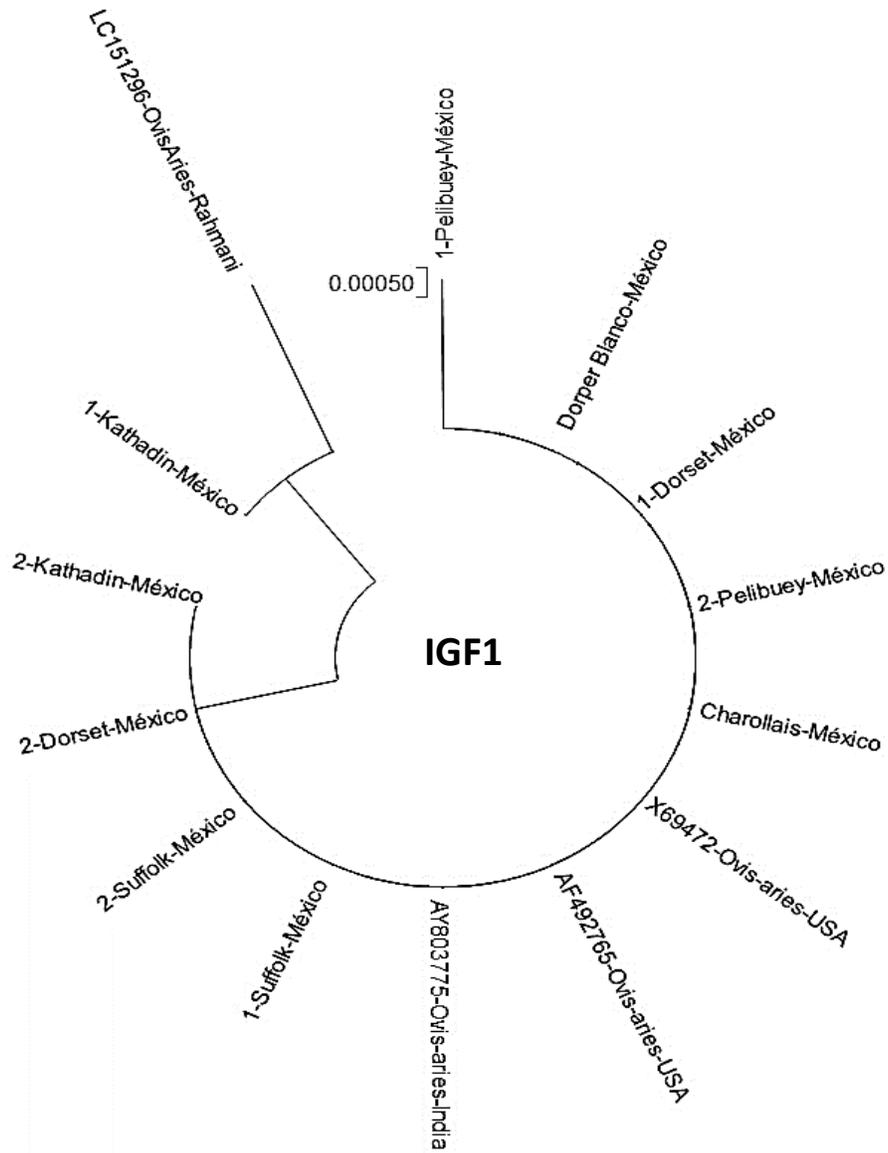


Figura 4 Árbol de población de máxima probabilidad de razas ovinas estimado utilizando el marcador de IGF1. Las razas de este conjunto de datos de estudio están identificadas con el nombre del país del que proceden.

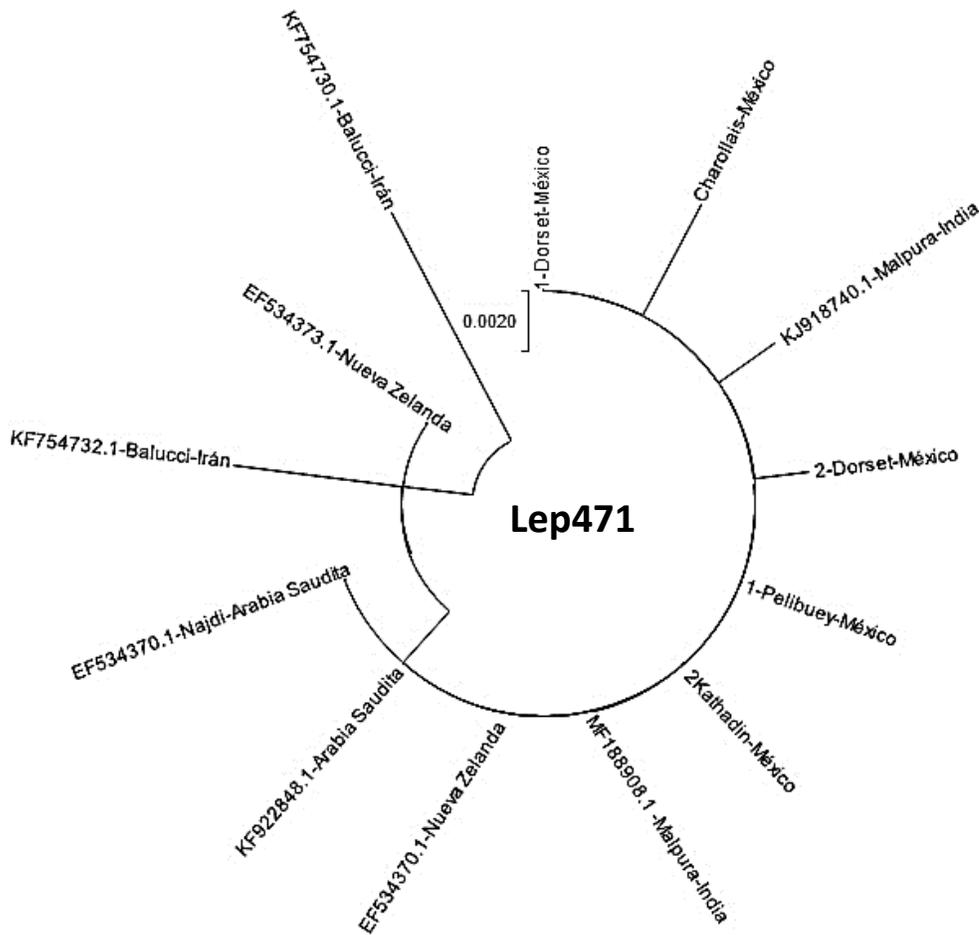


Figura 5 Árbol de población de máxima probabilidad de razas ovinas estimado utilizando el marcador de LEP471. Las razas de este conjunto de datos de estudio están identificadas con el nombre del país del que proceden.

4.5 DISCUSIÓN

Nuestro estudio descriptivo puntualizó las características genéticas que pueden ocasionar diferencias productivas entre las poblaciones de ovinos de diferentes razas, además de que se revelaron hallazgos importantes respecto a la conectividad de las razas de ovinos de pelo y lana entre su biodiversidad genética. La genotipificación mediante tres marcadores (Lep275, Lep471 e IGF1) sugieren similitudes genéticas asociadas a la especie, generando con ello la diversificación entre las diferentes razas.

4.5.1 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (Lep275)

Los dos métodos utilizados en la investigación mostraron una estructura única (Figura 1), donde la mayoría de las razas no se encuentran diferenciadas, proporcionando una imagen clara de la estructura genética que comparten los ovinos. Cabe mencionar que el gen Lep275 está involucrado en el equilibrio energético (Shojaei *et al.*, 2011), lo que indicaría que los ovinos a través de generaciones han mantenido intacta la variación genética para este gen. El posicionamiento en el árbol de las poblaciones presentes en México y las secuencias obtenidas del NCBI se vuelve confiable debido a la nula longitud de las ramas. Esta similitud podría deberse a que la mayoría de las cruces de razas ascienden de animales de lana, los cuales son altamente endogámicos y poco variables (Rochus *et al.*, 2020). A pesar de estos estudios recientes, el análisis multilocus para el gen leptina 275 muestra que hay un bajo nivel del polimorfismo en las ovejas muestreadas para esta investigación, ya que un estudio de genotipado de leptina (exón 3) en las importantes razas de ovejas iraníes muestra la versatilidad y mutación de otras fracciones del gen. Esto podría indicarnos dos cosas: la primera, que el gen leptina 275 al ser una región de variabilidad limitada, se limita exclusivamente a algunas razas de ovinos establecidas en zonas geográficas específicas; y dos, las razas de ovejas nativas podrían mostrar su variabilidad en el genoma, por lo que la recombinación genética entre todas las razas de manera artificial limita estas mutaciones y polimorfismos genéticos (Tahmures-Poor *et al.*, 2009).

4.5.2 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (Lep471)

Para el caso del gen Leptina (Lep471) los dos métodos mostraron una estructura diversa y con ramificaciones (Figura 3), donde encontramos una gran diversidad con la mayoría de las razas reportadas en el GenBank, de manera que su análisis proporcionó una imagen clara de diversidad genética y de la estructura que comparten entre si la mayoría de los ovinos. Comparando con los estudios previos (Zhou *et al.*, 2009 y Tahmures-Poor *et al.*, 2009) detectamos más polimorfismos en los fragmentos del gen de leptina

(Lep471). Estas variaciones que se han detectado podrían tener un impacto en el estudio de la leptina respecto a su actividad y función en la mayoría de las razas ovinas. Al respecto, Tahmures-poor et al. (2009) analizó el mismo exón con la misma metodología y cebadores, encontrando 3 patrones en las ovejas Baluchi (L1, L2 y L3), mientras que Zhou et al. (2009) mostraron cinco variantes (01, 02, 03, 04 y 05) resultados que se asemejan con a los de nuestra investigación, ya que se identificaron 3 patrones de mutación para el exón 3 de leptina, las cuales comparten gran similitud y variación entre razas de nueva Zelanda y las razas Charollais, Dorset y Katahdin establecidas en México. De manera que, estos estudios adquieren una mayor importancia tanto económica como productiva, ya que la asociación genética y la mutación del gen leptina (Lep471) está estudiada en otras especies, con lo que se ha demostrado que es altamente rentable al momento de su selección.

4.5.3 Indicador de parentesco entre las razas de ovinos (IGF1)

La implementación de métodos genéticos utilizados en la investigación mostró una diversidad en la estructura del gen en las diferentes razas de ovinos (Figura 2), donde las razas no se encuentran diferenciadas y aglomeradas en radiantes distantes, lo que proporciona una imagen de su estructura genética diferente entre las razas ovinas. Actualmente se acepta que la variabilidad genética en el gen IGF1 es alta en diferentes especies y razas de ovejas. El mantenimiento de una gran cantidad de razas de ovejas locales con condiciones de producción diversificadas ofrece resistencia a la tendencia a la reducción de la variabilidad genética (Flamant, 1991). Por lo tanto, es necesario evaluar la variabilidad dentro de cada raza. Usando el análisis filogenético multilocus y parsimonia (TCS), encontramos que hay un alto nivel de polimorfismo en las razas Dorset, Pelibuey y Katahdin. El análisis de secuencias y la identificación de polimorfismos en esta fracción del gen, ha sido altamente estudiada (He *et al.*, 2012), ya que como lo reportó Él-JN et al. (2012) este gen se encuentra altamente relacionado con la región reguladora la cual tiene un efecto en ovejas de origen asiático (Small Tail Han) que varían el número de individuos por camada o bien, mejorando el peso al nacimiento de los

corderos. De esta manera, el marcador IGF1 utilizado en este y otros estudios, podría usarse para mejorar y tamaño y rendimiento de las camadas en ovinos.

4.6 CONCLUSIONES

En este estudio se destaca la importancia de la utilización de marcadores moleculares durante la selección de individuos con material genético de alta variabilidad, ya que ofrece datos para la detección de SNP's relacionados con la calidad de la carne. Por lo tanto, es deseable una mejor precisión en la localización de genes dominantes o mutaciones causales de efectos productivos. Sin embargo, fue posible identificar que las mutaciones de nuestros haplotipos se encuentran en regiones no codificantes del genoma, lo que sugiere que los cambios genéticos son adaptaciones de naturaleza reguladora.

Los estudios futuros de selección pueden mejorarse con el uso de la secuenciación del genoma, ya que las secuencias podrían mostrar mutaciones adaptativas causales. Finalmente, la combinación de este conjunto de datos ofrece información para la predicción en la selección de genes deseables en animales domésticos altamente productivos.

4.7 REFERENCIAS

- Barbato, M., Hailer, F., Orozco-terWengel, P., Kijas, J., Mereu, P., Cabras, P., Bruford, M. W. 2017. Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Boitard, S., Boussaha, M., Capitan, A., Rocha, D., Servin, B. 2016. Uncovering adaptation from sequence data: lessons from genome resequencing of four cattle breeds. *Genetics*, 203(1), 433-450.
- Boitard, S., Schlötterer, C., Futschik, A. 2009. Detecting selective sweeps: a new approach based on hidden Markov models. *Genetics*, 181(4), 1567-1578.
- Bonhomme, M., Chevalet, C., Servin, B., Boitard, S., Abdallah, J., Blott, S., & SanCristobal, M. 2010. Detecting selection in population trees: the Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics*, 186(1), 241-262.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. In *Parallel and Distributed Processing Symposium, International 2: 0184-0184*.
- Dobney, K., & Larson, G. 2006. Genetics and animal domestication: new windows on an elusive process. *Journal of Zoology*, 269(2), 261-271.
- ÉI-JN, Zhang, B.Y., Chu, M.X., Wang, P.Q., Feng, T., Cao, G.L., Li, N. 2012. Polimorfismo del gen del factor de crecimiento similar a la insulina 1 y su asociación con el tamaño de la camada en ovejas Han de cola pequeña. *Informes de biología molecular*, 39 (10), 9801-9807.
- Fariello, M. I., Boitard, S., Naya, H., SanCristobal, M., & Servin, B. 2013. Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*, 193(3), 929-941.
- Fariello, M. I., Servin, B., Tosser-Klopp, G., Rupp, R., Moreno, C., San Cristobal, M., ... & International Sheep Genomics Consortium. 2014. Selection signatures in worldwide sheep populations. *PLoS One*, 9(8).
- Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J. F., Faraut, T., ... & Stanton, J. A. 2014. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science*, 344, 1168-1173.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Thierer, T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Neto, L. R. P., San Cristobal, M., Paiva, S. 2012. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS biology*, 10(2).

- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Leigh, J.W., Bryant, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Maddison, W.P. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. *Evolution*, 62, 1103-1118.
- Martínez, M.A., Quiroz, J., Delgado, J.V., Vega-Pla, J.L. 2007. Caracterización genética de la oveja canaria con microsatélites de ADN. *Archivos de Zootecnia*, 56(Su1), 421-424.
- Rochus, C.M., Jonas, E., Johansson, A.M. 2020. Population structure of five native sheep breeds of Sweden estimated with high density SNP genotypes. *BMC genetics*, 21(1), 1-9.
- Rochus, C.M., Tortereau, F., Plisson-Petit, F., Restoux, G., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Servin B. 2018. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC genomics*, 19(1), 71.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- He, J. N., Zhang, B. Y., Chu, M. X., Wang, P. Q., Feng, T., Cao, G. L., Li, N. 2012. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular biology reports*, 39(10), 9801-9807.
- Shojaei, M., Mohammad Abadi, M., Asadi Fozzi, M., Dayani, O., Khezri, A., & Akhondi, M. 2011. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(2), 67-73.
- Tajima, F., Nei, M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1:269-285.
- Zeder, M. A. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 105(33), 11597-11604.
- Zhang, H., Wang, Z., Wang, S., Li, H. 2012. Progress of genome wide association study in domestic animals. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 26.
- Zhang, L., Mousel, M. R., Wu, X., Michal, J. J., Zhou, X., Ding, B., Jiang, Z. 2013. Genome-wide genetic diversity and differentially selected regions among Suffolk, Rambouillet, Columbia, Polypay, and Targhee sheep. *PloS one*, 8(6).

Zhou, H., Hickford, J. G., & Gong, H. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular biotechnology*, 41(1), 22-25.

CONCLUSIÓN GENERAL

Implementar nuevas herramientas tecnológicas y genéticas nos ayudan a reducir el intervalo generacional de selección, generando una ganadería eficiente y productiva. Este proceso selectivo es ideal, ya que requiere menor tiempo en la producción de animales con alto potencial genético. En consecuencia, se incrementaría la producción de animales destinados a la producción dirigida y predecible, con lo que se evitaría la propagación de animales sin méritos genéticos. Además, esta nueva tecnología se aplicaría de manera indistinta tanto en machos y hembras altamente productivas, acortando el tiempo de selección. No obstante, estas herramientas biológicas (SNP's, SSCP, Microarreglos, QTLs, etc.) capaces de identificar mutaciones relacionadas a la expresión fenotípica del animal, están limitadas por el medio ambiente y la nutrición. Por lo tanto, es necesaria una mayor investigación que ayude a explicar los factores externos como la nutrición y el medio ambiente como moduladores de la expresión genética.

La utilización de marcadores moleculares de genes relacionados a características de calidad y composición de la carne en ovinos, permitió el estudio de diversidad genética, mostrando la diferencia racial en rebaños establecidos en la zona centro del país. Además, estos marcadores permitieron identificar mutaciones en individuos de un mismo rebaño, mostrando la diferencia de dominancia y heterocigocidad racial. Cabe aclarar que los marcadores de los genes que se utilizaron, se han empleado en mayor medida en la especie bovina, donde se han identificado animales que por su composición genética producen carne de una mejor calidad. Entonces, es necesario realizar investigaciones complementarias en un mayor índice de razas ovinas para determinar la diversificación y riqueza biológica, además de establecer la consanguinidad entre rebaños de una región.

Todo esto conlleva a la conclusión general que la diversificación genética y la utilización de marcadores moleculares permite identificar individuos sobresalientes en cada tipo de explotación, además de ayudar a seleccionar y predecir a temprana edad capacidades y rasgos genéticos deseables en la progenie.