

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN FLANQUEANTE
5' DEL GEN *IGF-1* Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES DE ARNm,
PROTEÍNA Y GANANCIA DE PESO EN CORDEROS**

POR:

M. V. Z. LUIS ÁNGEL FLORES ENCINAS

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN
REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ANIMAL**



Búsqueda de polimorfismos en la región flanqueante 5' del gen IGF-1 y su asociación con los niveles de ARNm, proteína y ganancia de peso en corderos. Tesis presentada por Luis Ángel Flores Encinas como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobado y aceptada por:

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

D.Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph.D. Iván Adrián García Galicia
Coordinador Académico

Dr. José Alfredo Martínez Quintana
Presidente

22 OCTUBRE 2019

Fecha

Comité:

Dr. Francisco Joel Jahuey Martínez

Ph.D. Felipe Alonso Rodríguez

Almeida

Dra. Monserrath Félix Portillo

© Derechos Reservados
AUTOR. LUIS ÁNGEL
FLORES ENCINAS
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO
FRANCISCO R. ALMADA
KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453
OCTUBRE 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. José Alfredo Martínez Quintana por permitirme formar parte de sus investigaciones y por sus valiosas enseñanzas, tiempo y paciencia que depositó en mí para poder culminar con el presente trabajo. A la Dra. Monserrath Félix Portillo, por su motivación para ser un mejor alumno y persona, así como sus recomendaciones y apoyo incondicional. Al Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida por proporcionar el material genético y la información que se analizó en este trabajo, por sus valiosos comentarios y recomendaciones.

Al comité de grado: Dr. José Alfredo Martínez Quintana, Dr. Francisco Joel Jahuey Martínez, Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida, Dra. Monserrath Félix Portillo por apoyarme en cada etapa de mi formación profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 626396 que me brindó para el financiamiento de mis estudios de maestría y a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua por la excelente formación recibida.

DEDICATORIA

A mis padres José María Flores Tolano y Sofía Encinas Esquer, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros entre los que se incluye éste, se los debo a ustedes. Les agradezco que me formaran con amor, reglas, principios y libertades, además les estoy agradecido porque me motivan constantemente para alcanzar mis anhelos.

Gracias Madre y Padre.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 5 de Mayo de 1992 en la Ciudad de Obregón, Sonora, México.

2011-2016	Estudios de Licenciatura en el Instituto Tecnológico de Sonora. Obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista. Cd. Obregón, Son.
-----------	---

2017-2019	Estudiante graduado del programa de Maestría en Ciencias con área de especialización en Reproducción y Genética de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.
-----------	---

RESUMEN

BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN FLANQUEANTE 5' DEL GEN *IGF-1* Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES DE ARNm, PROTEÍNA Y GANANCIA DE PESO EN CORDEROS

POR:

M.V.Z. Luis Ángel Flores Encinas

Maestría en Ciencias

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. José Alfredo Martínez Quintana

El gen *factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)* codifica para la proteína IGF-1, que desempeña un papel clave en el crecimiento y desarrollo muscular de los animales tanto en la etapa pre-natal como pos-natal. Por ello, se ha descrito en varios estudios a *IGF-1* como un gen marcador candidato para rasgos de crecimiento. El objetivo de este estudio fue investigar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la región flanqueante 5' del gen *IGF-1* y su asociación con los niveles de expresión del gen, niveles de hormona IGF-1 circulante en sangre, ganancia diaria de peso (GDP) y ganancia total de peso (GTP) en corderos. El estudio se realizó en tres fases. En la Fase 1, se realizó una búsqueda de SNPs por PCR y secuenciación en una región de 265 pb corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *IGF-1*; 22 corderos fueron genotipificados por PCR-RFLPs para la variante aquí reportada y se les midió concentración de IGF-1, GDP y GTP. Los dos alelos obtenidos fueron

denominados A y B, generándose los genotipos AA, BB y AB que representan animales homocigotos para la variante, homocigotos silvestres y heterocigotos, respectivamente. En la Fase 2 se analizó por qPCR la expresión génica en 12 hembras Dorper seleccionadas aleatoriamente con diferente genotipo. En la Fase 3 se genotipificaron 81 hembras Dorper a las que se midió GDP y GTP. El análisis estadístico en todas las fases se realizó en el programa SAS. Fase 1: el análisis de secuencias reveló un cambio de guanina a citosina en la posición 85 y de guanina a adenina en la posición 87. La frecuencia del alelo A fue de 0.66 y del alelo B de 0.34. Las frecuencias genotípicas fueron 0.50, 0.32 y 0.18 para AA, AB y BB, respectivamente. Se encontró que la GTP fue menor ($P < 0.05$) en los animales portadores de la variante (22.16 ± 1.07 kg) que en los no portadores (26.75 ± 1.2 kg). La concentración de IGF-1 fue menor ($P < 0.05$) en los corderos portadores comparados con los no portadores a los 14 d (168.76 ± 15.01 vs 229.95 ± 16.78 ng mL⁻¹), 42 d (191.02 ± 38.28 vs 324.50 ± 42.80 ng mL⁻¹) y 70 d (209.18 ± 30.63 vs 375.87 ± 34.2 ng mL⁻¹) de medición. Fase 2: la expresión génica fue menor ($P < 0.05$) 2.7 veces en los animales portadores comparados con los no portadores. La GDP y GTP no resultaron diferentes ($P > 0.05$) en la Fase 3. Los animales portadores de la variante del gen *IGF-1* aquí reportada presentan niveles más bajos de expresión génica de *IGF-1* y de concentración de proteína IGF-1 en suero comparados con los no portadores. Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para relacionarse con características fenotípicas, como los rasgos de la canal, diámetro y densidad de fibras musculares.

ABSTRACT

SEARCH OF POLYMORPHISMS IN THE 5' FLANKING REGION OF THE *IGF-1* GENE AND THEIR ASSOCIATION WITH ARNm LEVELS, PROTEIN AND WEIGHT GAIN IN LAMBS

BY:

Luis Ángel Flores Encinas

The insulin-like growth factor 1 gene (*IGF-1*) encodes the IGF-1 protein, which in turn plays a key role in muscle development in both, the pre-natal and post-natal stages of animals. Thus, it has been described in several studies as a candidate marker gene for growth traits. The objective of this study was to investigate the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5' flanking region of *IGF-1* and its association with gene expression levels, blood circulating IGF-1 hormone, daily weight gain (GDP) and total gain of weight (GTP) in lambs. The study was executed in three phases. In Phase 1, a search of SNPs was performed by PCR and sequencing of a 265 bp region upstream the transcription start site of the *IGF-1* gene. Then, 22 lambs were genotyped by PCR-RFLPs for the variant herein reported and IGF-1 concentration, GDP and GTP were measure. The two alleles obtained were called A and B, generating the genotypes AA, BB and AB, for homozygous for the variant, homozygous wild type and heterozygous, respectively. In Phase 2, the gene expression of 12 Dorper females with different genotypes randomly selected was analyzed by qPCR. In Phase 3, 81 Dorper females were genotyped and GDP and GTP were measured. The statistical analysis in all phases was performed in SAS program. In Phase 1

the sequence analysis revealed changes from guanine to cytosine at position 85 and from guanine to adenine at position 87. The frequency of allele A was 0.66 while for allele B was 0.34. The genotypic frequencies were 0.50, 0.32 and 0.18 for the AA, AB and BB, respectively. GTP was lower ($P < 0.05$) in carrier animals (22.16 ± 1.07 kg) compared with the non-carrier ones (26.75 ± 1.2 kg). IGF-1 concentration was lower ($P < 0.05$) in carrier animals compared with non-carrier lambs at 14 d (168.76 ± 15.01 vs 229.95 ± 16.78 ng mL⁻¹), 42 d (191.02 ± 38.28 vs 324.50 ± 42.80 ng mL⁻¹) and 70 d (209.18 ± 30.63 vs 375.87 ± 34.2 ng mL⁻¹) of feeding test. Phase 2: gene expression was 2.7-fold change lower ($P < 0.05$) in carrier than in the non-carrier ones. The GDP and GTP were not different ($P > 0.05$) in Phase 3. Animals carrying the IGF-1 gene variant herein reported had lower levels of *IGF-1* gene expression and IGF-1 protein concentration in serum compared to non-carriers. However, additional experiments are needed to relate to phenotypic characteristics, such as carcass traits, diameter and muscle fibers density.

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE GRÁFICAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
La ovinocultura en México	4
Programas de Mejoramiento Genético.....	5
Selección Asistida por Marcadores Moleculares	7
Genes Involucrados en el Crecimiento y Desarrollo de los Animales	8
<i>Ligando no canónico de notch1 similar a delta(DLK1)</i>	9
<i>Miostatina (MSTN)</i>	10
<i>Gen factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-2)</i> .11	
<i>Gen factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1(IGF-1)</i> . 12	
Características del Gen <i>IGF-1</i> en los Ovinos.....	12
Regulación de la Transcripción del Gen <i>IGF-1</i>	16
Mecanismo de Acción de la Proteína IGF-1.....	19
<i>IGF-1</i> como Marcador Molecular.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Área de Estudio y Manejo de los Animales.....	23
Extracción de ADN y Amplificación por PCR del Gen <i>IGF-1</i> Ovino	24
Secuenciación.....	26
Genotipificación.....	26
Búsqueda de Diferencias en los Sitios de Unión entre las Variantes...	27
Diseño de Oligonucleótidos para PCR Cuantitativa (qPCR)	27
Biopsias y Extracción de ARN Total.....	30
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

Fase 1	33
Búsqueda de polimorfismos.	33
Protocolo de genotipificación.	34
Frecuencias genotípicas y alélicas.....	36
Relación entre los SNPs del gen <i>IGF-1</i> y niveles de IGF-1 en suero.	39
Relación entre los SNPs del gen <i>IGF-1</i> y rasgos de crecimiento.	39
Fase 2	43
Sitios de unión entre las variantes determinadas <i>in sílico</i>	44
Análisis de expresión génica.	46
Fase 3	52
Genotipificación y relación entre SNPs del gen <i>IGF-1</i> con rasgos de crecimiento.	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
LITERATURA CITADA	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Oligonucleótidos utilizados para qPCR.....	29
2	Frecuencias genotípicas y alélicas.....	38
3	Características de crecimiento en corderos portadores y no portadores de la variante.....	41
4	Diferencias en los sitios de unión entre ambas variantes.....	45
5	Medias de los cuadrados mínimos y contrastes ortogonales de la expresión génica de <i>IGF-1</i> relativa a β -actina en animales portadores y no portadores de las variantes reportadas.	47
6	Medias para características de crecimiento en animales portadores y no portadores	53

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Concentración de IGF-1 a los 14, 42 y 72 d de la prueba de alimentación en corderos portadores y no portadores de la variante génica.....	40
2	Expresión de los transcritos de <i>IGF-1</i> provenientes del promotor 1 en animales portadores y no portadores de la variante génica.	49
3	Expresión de los transcritos de <i>IGF-1</i> provenientes del promotor 2 en animales portadores y no portadores de la variante génica.	50
4	Expresión de los transcritos de <i>IGF-1</i> provenientes del promotor 1 y 2 en animales portadores y no portadores de la variante génica.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diferentes tipos de ARNm de <i>IGF-1</i>	14
2	Rutas de señalización para la transcripción del gen <i>IGF1</i>	17
3	Rutas de señalización de IGF-1.....	20
4	Secuencia de <i>IGF-1</i> donde se muestra la transversión de G a C en la posición 85 y la transición de una G a A en la posición 87. A) Genotipo silvestre (AA); B) Homocigoto (BB).....	35
5	Diferentes genotipos y tipos de bandeo en gel de agarosa al 2.5%.....	37

INTRODUCCIÓN

México se encuentra en la quinta posición de población mundial de ovinos con una total de 8,575,908 cabezas (SAGARPA, 2016a). El consumo de carne ovina anual en México es de 74,494 ton de las cuales se importa aproximadamente el 15 % debido a que la producción interna no alcanza a cubrir la demanda del mercado (Bazan, 2018; Martínez *et al.*, 2010).

Los kilogramos de corderos comercializados por borrega por año es usualmente considerada la característica más importante en la industria ovina, debido a que la mayor parte de los ingresos de la unidad de producción se da por la venta de los corderos (Hogue, 1987).

Aunque el peso al destete y final de los corderos son de las características que más influyen en la rentabilidad de la producción ovina, se realiza muy poca selección asistida por marcadores moleculares para estos rasgos de crecimiento, lo que hace que el mejoramiento genético basado en datos fenotípicos sea relativamente lento (Thomas *et al.*, 2016). A este respecto, actualmente el estudio genético del rendimiento animal se ha logrado mediante enfoques cuantitativos que utilizan las tecnologías moleculares para identificar genes de rasgos productivos importantes y polimorfismos en los genes cuyos productos son enzimas clave en las rutas metabólicas de importantes procesos fisiológicos y bioquímicos que están relacionados con el fenotipo (Khederzadeh *et al.*, 2013).

El desarrollo de los animales en cuanto a ganancia de peso está determinado por el aumento en la masa muscular (Trukhachev *et al.*, 2016) y en varias especies ha sido un tema importante de investigación científica durante

muchos años (Xing *et al.*, 2014). El desarrollo del músculo esquelético se encuentra regulado por un gran grupo de genes, entre los que destacan: el *DLK1* (*ligando no canonico de notch1 similar a delta*), el cual desempeña un papel importante en el desarrollo fetal y postnatal regulando el destino de las células miogénicas (Su *et al.*, 2014); *MSTN* (*miostatina*), que actúa como un regulador negativo del desarrollo muscular cuya inactivación fetal o posnatal no afecta el número de fibras, pero da como resultado hipertrofia de las fibras musculares (Xing *et al.*, 2014); *IGF-2* (*factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2*), involucrado en el desarrollo embrionario, así como en la ganancia de masa muscular en el desarrollo postnatal; e *IGF-1* (*factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1*) cuyo producto proteico hormonal es central a una de las principales vías por las que la hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) regula el crecimiento de los tejidos en mamíferos.

La expresión del gen *IGF-1* es controlada por diferentes cascadas de señalización, en las que la GH juega un papel crucial para la activación de la vía que involucra el factor de transcripción *STAT5b* (Rotwein, 2017a).

Algunas variantes alélicas en estos genes pueden dar resultados diferentes en las características de producción, generando variedad de fenotipos. Tal es el caso del gen *IGF-1*, para el cual se han reportado variantes alélicas producidas por cambios en la secuencia en diferentes regiones del gen. Algunas de estas variantes, han sido relacionadas con características de importancia productiva tales como: menor peso de vellón limpio en ovejas Barki (Darwish *et al.*, 2017), mayor número de crías nacidas en ovejas Malabary (Thomas *et al.*, 2016), y mayor ganancia de peso en ovejas Makooei (Negahdary *et al.*, 2013).

Una variación en la secuencia de nucleótidos de la región promotora o reguladora de un gen puede tener un papel determinante en la unión de los factores de transcripción; por lo que estas variaciones pueden asociarse significativamente con los niveles de expresión de dicho gen y consecuentemente con los niveles de la proteína (Yilmaz *et al.*, 2005; Honarvar *et al.*, 2012).

El gen *IGF-1* cuenta con dos promotores que controlan el inicio de la transcripción en diferente sitio (Ouni *et al.*, 2015). Además, mecanismos de corte y empalme alternativo de los exones 5 y 6 generan seis transcritos diferentes (Rotwein, 2017a). Independientemente del tipo de transcrito, los seis codifican para la misma proteína madura de 70 aminoácidos (Oberbauer, 2013).

La detección de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) es importante debido a que un cambio de bases en regiones como los sitios de unión de factores de transcripción puede cambiar la cantidad de ARNm y, por lo tanto, la expresión génica y el nivel de proteína, afectando directamente características fenotípicas de importancia económica (Yilmaz, 2005).

Por lo antes mencionado, el objetivo del presente estudio fue identificar polimorfismos genéticos en la región flanqueante 5' del gen *IGF-1* de ovinos y evaluar su asociación con los niveles de ARNm, la cantidad de hormona en sangre y la ganancia de peso.

REVISIÓN DE LITERATURA

La ovinocultura en México

La población ovina del mundo tiene un bajo crecimiento con tendencias diferentes entre continentes o regiones. De un inventario de 1,080,444,334 de ovinos en 2004, se aumentó a 1,209,908,142 en 2014, equivalente al 11.98 % de crecimiento en este periodo. África y Asia tienen más del 70 % de la población ovina, siendo China el país con la mayor población de ovinos, seguido de Australia, India e Irán. América es el continente en el que se concentra la menor cantidad de ovinos, con alrededor de 87 millones de cabezas, que representan un 7.2 % de la población mundial. El país que contiene el mayor número de ovejas es Brasil con 17,614,454 cabezas, seguido de Argentina, Perú, Bolivia y en la quinta posición se encuentra México con una población de 8,575,908 cabezas (SAGARPA, 2016b).

En México el consumo de carne ovina anual es de 74,494 ton, que comparado con otros países es un consumo bajo; sin embargo, la producción es insuficiente para cubrir la demanda interna, por lo que es necesaria la importación de una gran cantidad de carne en canal, así como de borrego en pie (Bazan, 2018; Hernández *et al.*, 2014). México importa las toneladas faltantes para abastecer la demanda del mercado, aproximadamente 15 %, que son suplidas por países como Nueva Zelanda, Chile y Australia, ya que estos países cuentan con subsidio a la producción y con grandes extensiones forrajeras muy superiores en cantidad y calidad a las mexicanas (Bazan, 2018; Martínez *et al.*, 2010).

La producción de carne ovina en México es la actividad productiva más diseminada en el medio rural, ésta se lleva a cabo sin excepción en todas las regiones ecológicas del país, aun cuando se realice en condiciones climáticas adversas que no permiten la práctica de otras actividades productivas (Góngora-Pérez *et al.*, 2010).

Actualmente en México, la producción de borregos de engorda en corral y en praderas cultivadas ha incrementado considerablemente con la finalidad de satisfacer la creciente demanda de carne en el país, además es una fuente importante de ingresos para los productores y sus familias (Espejel *et al.*, 2015).

Dado el dinamismo y cambios en la producción ovina, no todos los ovinocultores cuentan con el mismo sistema de producción, tecnificación e innovación, por lo que la transferencia de información y tecnología hacia los ovinocultores debe realizarse de manera eficiente, partiendo del supuesto que no son unidades de producción homogéneas y el objetivo es lograr el mayor nivel de rendimiento y ganancias posibles (Espejel *et al.*, 2015; Góngora-Pérez *et al.*, 2010). Debido a que el mercado es cada vez más exigente en cuanto a características de calidad y homogeneidad de productos y subproductos ovinos, es necesario implementar programas de manejo sanitario, reproductivo, de alimentación y de mejoramiento genético de los rebaños (Candelaria-Martínez *et al.*, 2015; Espejel *et al.*, 2015).

Programas de Mejoramiento Genético

Una gran variedad de métodos de mejoramiento genético han sido utilizados para mejorar el mérito genético de los animales domésticos. La mayoría de los programas han utilizado la selección convencional que se basa

principalmente en el fenotipo del animal y apareamiento selectivo (Van, 2017). Sin embargo, la eficiencia de este método depende de la identificación de los individuos con un alto mérito genético de características de importancia socioeconómica (Bhat *et al.*, 2017; Jenko *et al.*, 2015).

Para el desarrollo de un programa de mejoramiento genético primeramente es necesario definir el objetivo de la producción para seleccionar el tipo o raza dependiendo de lo que se desea producir, basándose directamente en los rasgos con mayor impacto en la gestión de las explotaciones y en el rendimiento económico (Theodoridis *et al.*, 2017). Algunas de las características importantes que contribuyen directamente a los ingresos y costos en la producción de corderos son: el número de corderos destetados, los kilogramos vendidos de cordero, peso de vellón limpio, promedio del diámetro de fibra muscular y peso corporal adulto (Darwish *et al.*, 2017).

El mejoramiento genético dirigido a incrementar el rendimiento animal se ha logrado mediante enfoques cuantitativos, los cuales se basan en tecnologías moleculares para identificar polimorfismos en genes, cuyos productos son proteínas clave en las rutas metabólicas de procesos fisiológicos relacionados con el fenotipo del animal (Khederzadeh y Yazdanpanah, 2013).

Actualmente, en la evaluación genética de animales para consumo humano se han incorporado ampliamente las tecnologías moleculares que van desde pruebas genéticas para genes individuales o grupos de genes, hasta pruebas genómicas en algunas especies (Bhat *et al.*, 2017).

El uso reciente de marcadores genómicos ha llevado a la implementación de la selección genómica, identificando caracteres cuantitativos a través de

asociaciones entre fenotipos y marcadores (Jenko *et al.*, 2015). Estas tecnologías tienen la ventaja de poder ser aplicadas a individuos desde el nacimiento, en consecuencia, los animales pueden ser seleccionados a una edad temprana logrando con ello desempeñar un papel importante en la elaboración de planes de cría para maximizar los beneficios genéticos a largo plazo (Bhat *et al.*, 2017).

Selección Asistida por Marcadores Moleculares

Anteriormente para mejorar la ganancia genética se utilizaban principalmente los pedigríes o los registros de la granja, pero existía cierta inexactitud en los datos que conducía a programas de selección ineficientes. Sin embargo, al complementar estos métodos con la selección basada en marcadores se pueden lograr resultados más precisos (Nazari *et al.*, 2016). Las estrategias de selección asistida por marcadores en ovejas son útiles para acelerar marcadamente la ganancia genética para las características de producción deseables (Su *et al.*, 2014).

La biología molecular involucra el uso de técnicas que son herramientas muy poderosas para la selección asistida por marcadores moleculares y permite mejorar características en los animales de granja tales como la tasa de crecimiento, la composición corporal y la calidad de la canal y de la carne, con el objetivo final de satisfacer las necesidades de mercado que cada vez son más variadas y exigentes (Xing *et al.*, 2014). En este sentido, Ge *et al.* (2001) han reportado que la selección asistida por marcadores moleculares puede aumentar anualmente la ganancia genética en el ganado de 15 a 30 %.

La expresión de locus de rasgos cuantitativos (eQTLs) son variantes genéticas que explican una fracción de los niveles de expresión génica. El

análisis estándar eQTL implica una prueba de asociación directa entre marcadores de variación genética con niveles de expresión génica típicamente medido en decenas o cientos de individuos. Este análisis de asociación puede ser realizado proximal o distalmente al gen. Una de las principales ventajas del mapeo eQTL usando el enfoque estudio de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) es que permite la identificación de nuevos loci funcionales sin requerir ningún conocimiento previo sobre regiones reguladoras cis o trans (Nica y Dermitzakis, 2013).

En diferentes especies animales destinadas para consumo humano, muchos genes que codifican para proteínas que juegan papeles importantes en diferentes rutas de procesos bioquímicos y fisiológicos han sido estudiados y analizados para la detección de polimorfismos que generen fenotipos diferentes para características de importancia económica (Khederzadeh y Yazdampanah, 2013). Así, con la identificación de marcadores podemos predecir la superioridad fenotípica de rasgos específicos en individuos de una población. En es el caso del gen del factor de diferenciación del crecimiento (*GDF9*), los animales heterocigotos tienen una mayor fertilidad, prolificidad y tasa ovulatoria (Luna y Alonso 2014). Sin embargo, la detección de genes candidatos o marcadores responsables de la variación fenotípica sigue siendo un desafío importante en los programas de mejora genética (Thomas *et al.*, 2017).

Genes Involucrados en el Crecimiento y Desarrollo de los Animales

La mayoría de los rasgos de producción en especies animales son complejos e incluyen contribuciones de un gran número de variantes genéticas aditivas, cada una de efectos pequeños, interacciones entre genes e influencias

ambientales (Tellam *et al.*, 2012). A continuación, se presentan las características de algunos genes cuya expresión se relaciona positiva o negativamente con el crecimiento y estructura de las fibras musculares.

Ligando no canónico de notch1 similar a delta (DLK1). Este gen participa en la regulación del desarrollo fetal y postnatal además de regular el destino de las células madre musculares (Su *et al.*, 2014). El aumento de la expresión de *DLK1* es la responsable de la hipertrofia muscular en ovejas, dando origen al fenotipo *callipyge* (del griego: *calli*, hermoso, *pyge*, glúteos) que exhiben un sobrecrecimiento en los músculos y adiposidad reducida (White *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2014).

DLK1 codifica para un miembro de la familia de receptores Notch-Delta / ligandos de membrana, implicados en la adipogénesis, la hematopoyesis, la neurogénesis y en la adaptación a la vida independiente (Xu *et al.*, 2015).

El patrón de herencia del fenotipo *callipyge* en ovejas reveló que sólo es evidente cuando se transmite desde el padre (White *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2006). El mapeo de ligamiento del alelo *callipyge* mostró que estaba localizado en el extremo distal del cromosoma 18 ovino (White *et al.*, 2007). Recientemente se identificó la mutación intergénica como un cambio de una base adenina (A) a una guanina (G), en los dos genes *DLK1* y *gen maternalmente expresado 3 (MEG3)* que dan lugar al fenotipo *callipyge* (Magee *et al.*, 2010).

Miostatina (MSTN). Entre los posibles marcadores genéticos para mejorar la producción de carne, un candidato importante es el gen de la miostatina (Trukhachev *et al.*, 2016). Debido a que este gen es el principal regulador de la miogénesis, actuando como un regulador negativo del desarrollo muscular (Xing *et al.*, 2014).

La miostatina, también conocida como factor de crecimiento y diferenciación 8 (*GDF8*), es un miembro de la súper-familia de los factores de crecimiento transformante beta (Xing *et al.*, 2014). Esta súper familia abarca una gran cantidad de factores de crecimiento y diferenciación que desempeñan un papel fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en animales adultos (Grochowska *et al.*, 2018; Hickford *et al.*, 2009).

La inactivación fetal o posnatal de *MSTN* no afecta el número de fibras, pero da como resultado hipertrofia de las fibras musculares (Xing *et al.*, 2014).

Se sabe que en ovinos, bovinos, ratón, perros y humanos existen polimorfismos en la región codificante del gen de la miostatina que están relacionados con la pérdida de la función del producto de este gen, afectando así directamente el fenotipo del individuo, logrando un incremento en la masa muscular (Grochowska *et al.*, 2018; Boman *et al.*, 2009). Estas mutaciones en algunas razas de bovinos (Belgian Blue y Piedmontese) son las responsables de dar origen al fenotipo denominado doble musculatura (Dowidar *et al.*, 2018). En ovejas blancas Noruegas (Boman *et al.*, 2009), Texel y Charolais (Trukhachev *et al.*, 2018) se ha reportado que polimorfismos en la región codificante del gen de

la miostatina causan hipertrofia muscular caracterizada por una canal con excelente conformación y baja en grasas.

Gen factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-2). El gen *IGF-2* en ovinos contiene 10 exones y se localiza en el cromosoma 21. Es un mitógeno fetal esencial durante el desarrollo embrionario en mamíferos, influyendo en la división y diferenciación de las células fetales y, posiblemente, en la regulación metabólica (Ma *et al.*, 2018) así como en la ganancia de masa muscular y en el desarrollo postnatal (Su *et al.*, 2014).

Transcrito desde diferentes promotores, IGF2 se expresa en diversos tejidos. La eliminación o sobreexpresión de IGF-2 en ratones genera una deficiencia en el crecimiento (Xiang *et al.*, 2018). En ovejas merino se encontraron diferencias significativas en la intensidad de expresión génica de *IGF-2* entre animales con pesos altos y bajos, mostrando un peso mayor en los animales con niveles de expresión del gen *IGF-2* más altos (Trukhachev *et al.*, 2016).

Gen factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). El gen *IGF-1* ovino está ubicado en el cromosoma 3, tiene 6 exones (Darwish *et al.*, 2017) tiene funciones en el crecimiento prenatal y postnatal en varias especies de ganado (Thomas *et al.*, 2017; Tahmoorespur *et al.*, 2009). En *Ovis aries*, el producto del gen *IGF-1* es la proteína IGF-1 la cual promueve el crecimiento de órganos fetales, glándulas endocrinas y la maduración esquelética mejorando la captación de glucosa y aminoácidos por el feto (Nazari *et al.*, 2016). También se encuentra involucrado con características reproductivas, ya que se expresa en órganos asociados a la reproducción tales como el hipotálamo, pituitaria anterior, ovarios, oviductos y útero (Thomas *et al.*, 2016).

En la vida postnatal, IGF-1 es un componente clave en el crecimiento de los animales, crecimiento del hueso, el crecimiento del cartílago y el crecimiento muscular (Nazari *et al.*, 2016). Además, está relacionado con proteínas que son de suma importancia en la diferenciación celular, embriogénesis, crecimiento y regulación del metabolismo (Tahmoorespur *et al.*, 2009).

Características del Gen *IGF-1* en los Ovinos

Conociendo la importancia y las diversas funciones críticas del gen *IGF-1* en el crecimiento prenatal y postnatal, un cambio de nucleótidos en su secuencia codificante podría ocasionar cambios en la secuencia, estructura y función de la proteína, impactando de manera crucial en las características de crecimiento (Darwish *et al.*, 2017). Un polimorfismo representa una oportunidad de mejora genética cuando los individuos tengan mejor aptitud biológica en determinadas condiciones ambientales (Checa, 2007). Por otra parte, la presencia de SNPs en regiones reguladoras como los sitios de unión de factores de transcripción en el

genoma pueden alterar el nivel de expresión génica, afectando así los niveles de proteína (Darwish *et al.*, 2017; Honarvar *et al.*, 2012). En diferentes especies animales destinadas para consumo humano como los ovinos (Darwish *et al.*, 2017) y bovinos (Honarvar *et al.*, 2012), los polimorfismos en el gen *IGF-1* se asocian con concentraciones circulantes de proteína IGF-1, rasgos de crecimiento y otras características fenotípicas (Yilmaz *et al.*, 2005).

El gen *IGF-1* tiene dos promotores que controlan el inicio de la transcripción en diferente sitio (Ouni *et al.*, 2015). Además, mecanismos de corte y empalme alternativo de los exones 5 y 6 generan seis transcritos diferentes (Rotwein, 2017a). Los exones 3 y 4 codifican a la proteína IGF-1madura a pesar del corte y empalme alternativo, todos los transcritos provenientes de ambos promotores incluyen el exón 3 y 4, de tal forma que, independientemente del tipo de transcrito (Figura 1), los seis codifican para la misma proteína madura de 70 aminoácidos (Oberbauer, 2013).

Como se puede observar en la Figura 1, los ARN mensajeros (ARNm) tipo 1 contienen el exón 1 y se transcriben a partir del promotor 1 y los ARNm tipo 2 contienen el exón 2 transcribiéndose a partir del promotor 2 (Rotwein, 2017a; Honarvar *et al.*, 2012). En cerdos (Xiao *et al.*, 2009) y en bovinos (Wang *et al.*, 2003; Siadkowska *et al.*, 2006) encontraron que el ARNm 1 era más abundante que el ARNm 2 en diferentes tejidos, incluidos corazón, hígado, músculo esquelético, cerebro, ovario y útero.

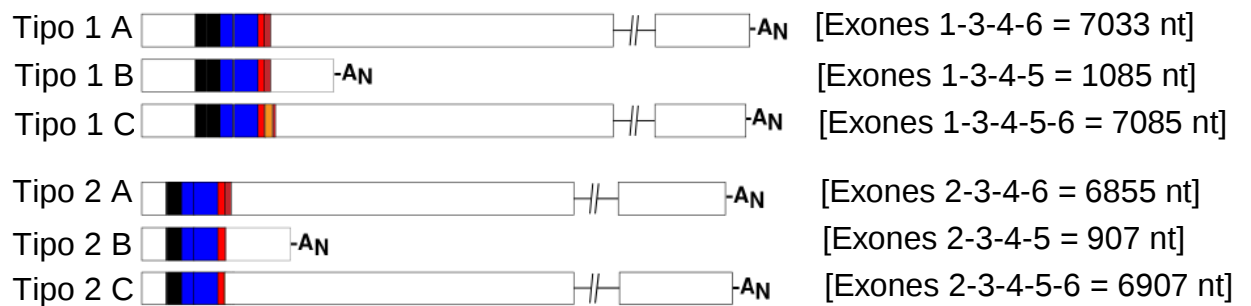


Figura 1. Diferentes tipos de ARNm del gen *IGF-1*. En el lado izquierdo se encuentra el nombre dado a cada transcrito, en la parte derecha se especifica los exones presentes en cada transcrito y su tamaño en número de pares de bases, los rectángulos a color representan la región que codifica para la proteína precursora. Adaptada de Rotwein (2017a).

Aunque en el gen *IGF-1* no existen elementos en *cis* que típicamente se encuentran en el sitio de inicio de la transcripción en diferentes genes, la región no traducida 5' (UTR 5') está altamente conservada cuando se compara con el genoma de humano, rata, ratón, oveja y de ganado bovino. En estas especies se tiene actividad promotora basal para el exón 1 en los primeros 412 pares de bases de la región flanqueante 5', y elementos reguladores negativos en las siguientes pb corriente arriba (Oberbauer, 2013).

Debido a la estrecha relación de este gen con características productivas importantes, se han estudiado diferentes regiones para identificar SNPs que mejoren los parámetros productivos en animales y que sean candidatos a marcadores moleculares para los programas de selección asistida. Darwish *et al.* (2017) analizaron la región flanqueante 5' en ovejas Barki y encontraron dos SNPs, un cambio de guanina a citosina en la posición 85 y de guanina a adenina en la posición 87, que mostraban un efecto significativo para peso del vellón limpio y mayor rendimiento de lana. Por otro lado, Thomas *et al.* (2016) relacionaron dos polimorfismos encontrados en la región flanqueante 5', una transversión de adenina a guanina en la posición 224 y de Guanina a Timina en la posición 227, con el tamaño de camada en cabras Attappady black y Malabari. En un estudio posterior (Thomas *et al.*, 2017) estudiaron los exones 1, 2, 3 y 4 en estas razas de cabras y encontraron un polimorfismo en el exón 2 que se relaciona con una mayor longitud corporal, mayor circunferencia de tórax y mayor índice de talla corporal. En ovinos también se han relacionado polimorfismos en la región flanqueante 5' con características de ganancia diaria de peso, peso corporal y crecimiento (Moradian *et al.*, 2013), así como de ganancia de peso

desde el nacimiento al destete (Negahdary *et al.*, 2013) y peso al nacimiento (Nazari *et al.*, 2016).

Regulación de la Transcripción del Gen *IGF-1*

La hormona del crecimiento (GH) también llamada somatotropina, como su nombre lo indica, es la encargada de la regulación del crecimiento, principalmente por la vía de estimulación de la transcripción del gen *IGF-1* al unirse a su receptor (GHR), presente en la membrana de células diana de diferentes tejidos como: hígado, músculo esquelético, grasa y glándula mamaria (Jiang y Ge, 2014), siendo el hígado donde se encuentran los niveles más altos de transcritos para GHR (Hewitt *et al.*, 2019).

La manera en que la GH regula la transcripción del gen *IGF-1* en hígado es mediante dos rutas de señalización, una directa y otra indirecta que se ilustran en la Figura 2 (Jiang y Ge, 2014). La señalización directa sucede cuando la GH se une a GHR y activa a la Cinasa Janus 2 (JAK2) la cual, se fosforila a sí misma y al factor activador de la transcripción y transductor de señales 5 (STAT5). La STAT5 fosforilada forma homodímeros que se translocan al núcleo y se unen a múltiples sitios de unión a STAT5 intrónicos y 5' distales en el gen de *IGF-1* (Dettori *et al.*, 2018). Es importante mencionar que el promotor *IGF-1* no contiene un sitio de unión a STAT5. Sin embargo, en la ruta de señalización indirecta, la GH estimula la transcripción del gen factor nuclear hepatocito 3γ (HNF-3γ) a través de la señalización por STAT5, y a su vez HNF-3γ se une al promotor de *IGF-1* promoviendo su transcripción.

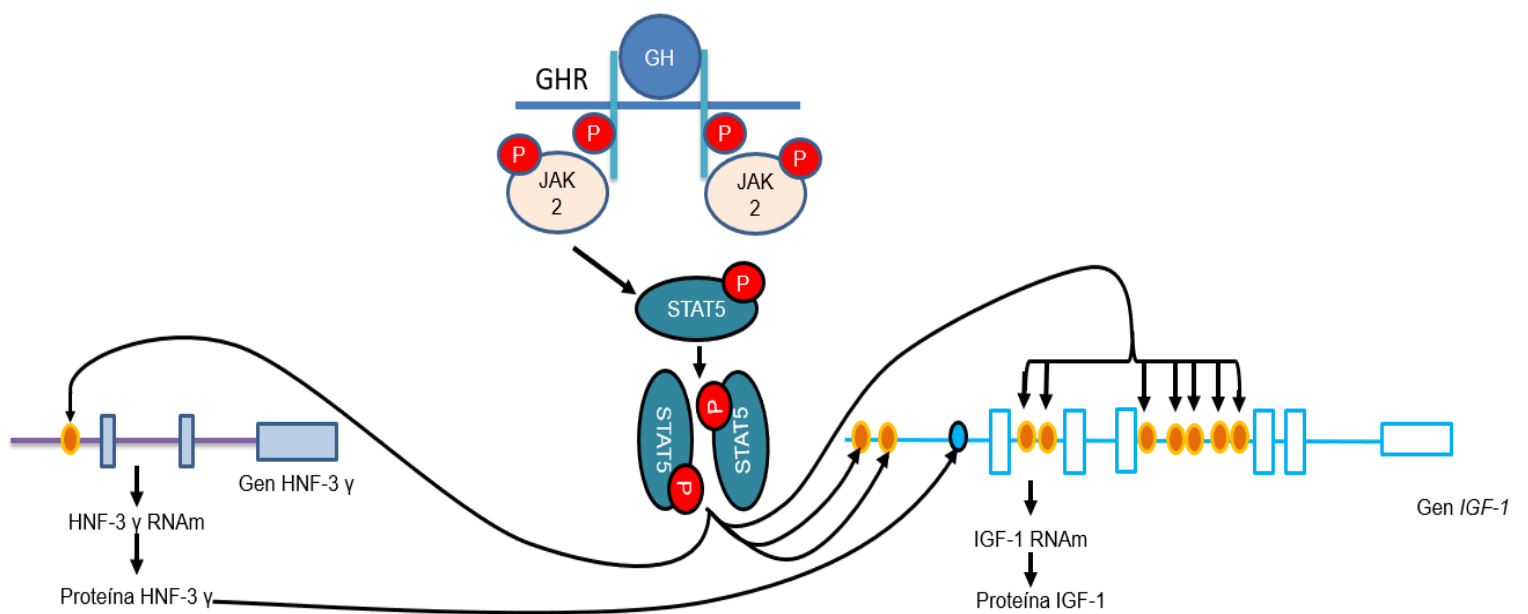


Figura 2. Rutas de señalización para la transcripción del gen *IGF-1*. Adaptada de Jiang y Ge (2014).

Algunos componentes clave de las regiones no codificantes en los genes, son los potenciadores o “*enhancers*” (por su nombre en inglés), los cuales estimulan la expresión génica de una manera específica e independiente de la orientación o distancia del promotor (Zou *et al.*, 2018).

Análisis previos han demostrado que la inducción uterina de ARNm de *IGF-1* después del tratamiento con estradiol (E_2) en ratones se desencadena por un potenciador distal que contiene sitios de unión a receptores de estradiol alfa ($Er\alpha$). En un trabajo realizado por Hewitt *et al.* (2019), ellos concluyen que un potenciador distal es el responsable de conducir la inducción uterina del gen *IGF-1* dependiente de E_2 , y que el IGF-1 derivado del útero no es requerido para la preñez, pero es importante para el mantenimiento de la fertilidad.

La presencia de *enhancers* en un gen es importante para mejorar la eficiencia en la transcripción. Zou *et al.* (2018) señalaron que la modificación genética en ratón mediante la incorporación de un *enhancer* específico de músculo esquelético puede ser un método factible para regular la expresión génica induciendo hipertrofia muscular y obteniendo animales con rasgos deseables.

Los elementos de unión a *STAT5b* que se encuentran dispersos en la región flanqueante 5' e intrones, pero no cerca de los promotores, tienen las propiedades bioquímicas y fisiológicas de los potenciadores de la transcripción (Rotwein, 2017b).

En ovejas, en la región flanqueante 5' corriente arriba del gen *IGF-1* se encuentran elementos reguladores R8-9, R53, R58-59 y R 60-61 altamente conservados que incluyen sitios de unión para *STAT5b* (Rotwein, 2017a).

Mecanismo de Acción de la Proteína IGF-1

Una vez que la proteína IGF-1 ha sido sintetizada y alcanza sus células diana puede desencadenar diferentes vías de señalización (Figura 3). Tanto la ruta PI3K / AKT como MEK / ERK están implicadas en los efectos estimulantes de IGF-I sobre la proliferación celular y la síntesis de proteínas en células de músculo esquelético bovino. Además, la vía PI3K / AKT también controla el efecto inhibidor de IGF-I en la degradación de proteínas a través del factor de transcripción FOXO3A. (Jiang y Ge, 2014).

Rutas de acción PI3K/AKT y MEK/ERK

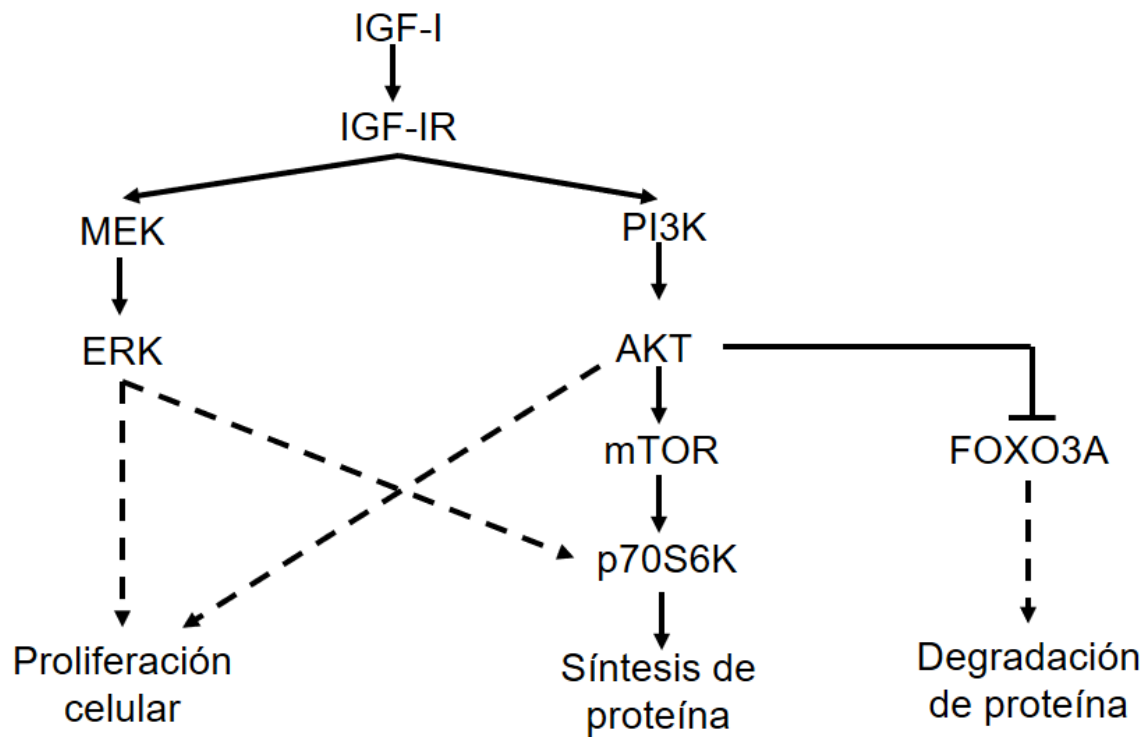


Figura 3. Rutas de señalización de IGF-1. Adaptada de Jiang y Ge (2014).

***IGF-1* como Marcador Molecular**

Grossi *et al.* (2015) Analizaron la asociación de marcadores de *IGF-1*, *GH* y *PIT1* con características reproductivas y de crecimiento (peso al nacer, peso al destete, peso a los 12 y 18 meses de edad, aumento de peso diario promedio antes del destete, edad y peso al primer parto, y circunferencia escrotal a los 12 y 18 meses de edad) sin encontrar una diferencia significativa en los rasgos en bovinos de la raza Canchim.

Con el mismo objetivo, Corona-Leyva *et al.* (2018) realizaron análisis asociativos entre genotipo y rasgos de fertilidad en vacas Holstein sometidas a estrés térmico utilizando un panel de SNPs con 179 etiquetas dentro de 44 genes de las vías PRL y GH / IGF-1. Los análisis indicaron que ocho SNPs dentro de los genes *IGF-1*, *IGF-1R*, *IGFBP5*, *PAPPA1*, *PMCH*, *PRLR*, *SOCS5* y *SSTR2* están asociados con servicios por concepción, mientras que cuatro SNPs en los genes *GHR*, *PAPPA2*, *PRLR* y *SOCS4* se asociaron con días abiertos. Lo anterior indica que SNPs dentro de los genes de las vías PRL y GH / IGF-1 son un factor predictivo de los fenotipos reproductivos en vacas Holstein sometidas a estrés térmico, por lo tanto, se proponen los SNPs encontrados como candidatos para un programa de selección asistida por marcadores que pretenden mejorar la fertilidad del ganado lechero criado en clima cálido.

Nicolini *et al.* (2013) encontraron una asociación significativa entre un SNP en el gen *IGF-1*/SnaBI y la actividad lútea en vacas lecheras Holstein Friesian, demostrando la importancia de *IGF-1* en la fertilidad de las vacas lecheras en lactancia temprana. Así, este SNP puede ser un marcador interesante para la mejora genética de la fertilidad en el ganado lechero. A partir de lo anterior *IGF-*

1 es un gen candidato cuya importancia debe ser estudiada en diferentes especies y en diferentes razas entre especies de producción animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio y Animales

Este estudio fue ejecutado en tres fases.

Fase 1. En la primera fase fueron considerados 22 ovinos hijos de padres de la raza Dorper (DP) y madres Pelibuey (PB) o Blackbelly (BB). Los animales provenían de la unidad de producción de ovinos y caprinos de la Facultad de Zootecnia y Ecología, perteneciente a la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada sobre el Periférico Francisco R. Almada, en el Km 1, en la ciudad de Chihuahua, Chih., México, a los 28° 38' de latitud norte y 106° 04' de longitud oeste, con una altitud de 1,440 msnm, una precipitación media anual de 336 mm y una temperatura media anual de 18.6 °C.

Fase 2. Para la segunda fase, 12 hembras de la raza Dorper previamente genotipificadas para las variantes del gen *IGF-1* aquí reportadas fueron utilizadas para los experimentos de expresión de *IGF-1*.

Fase 3. En la tercera fase, 81 hembras Dorper fueron genotipificadas para realizar análisis de asociación de genotipo con la ganancia diaria y ganancia total de peso. Los animales de la Fase 2 y 3 pertenecían al rancho Las Jaras localiza en el municipio de Bachíniva, Chihuahua, en el km 69.5 de la carretera Cd. Cuauhtémoc a Bachíniva, a 28° 49' 0.21" de latitud norte y 107° 11' 53.21" de longitud oeste y una altitud de 2020 msnm, con un clima semi-seco templado, una temperatura media entre 8 y 14 °C y un rango de precipitación promedio anual de 400 a 600 mm.

Manejo de los Animales y mediciones

Fase 1. La alimentación de los animales fue a base de maíz, alfalfa, grano de destilería, pasta de soya, grasa de sobrepaso, melaza, sal, ovino F250, harinolina y salvado. Los corderos fueron pesados cada 14 d y se evaluaron las variables de Conversión Alimenticia (CA), Ganancia Diaria de Peso (GDP) y Ganancia Total de Peso (GTP) como lo describe Jasso (2011). Además, se midieron concentraciones de IGF-1 en suero sanguíneo a los días 14, 42 y 72 (IGF-1¹⁴, IGF-1⁴² y IGF-1⁷², respectivamente) por la técnica radioinmunoensayo (RIA) descrita por Berrie *et al.* (1995) durante el trabajo realizado por Jasso (2011).

Tres animales con una alta concentración y tres animales con una baja concentración de proteína IGF-1 en suero fueron seleccionados para la búsqueda de SNPs en la región flanqueante 5' del gen *IGF-1* Ovino.

Fase 2. A Las 12 hembras utilizadas se les tomó una biopsia muscular (como se describe más abajo) en una sola ocasión.

Fase 3. Para realizar los análisis de asociación de genotipo con la ganancia diaria y ganancia total de peso se tomaron los registros mensuales de la granja.

Extracción de ADN y Amplificación por PCR del Gen *IGF-1* Ovino

Se obtuvieron muestras de ADN de cada animal en las diferentes fases del experimento a partir de sangre yugular. Se colectaron aproximadamente 3 mL de sangre en tubos con 7.2 mg de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Se extrajo el ADN genómico (ADNg) a partir de 50 µL de sangre, utilizando el kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic ADN Mini Kit, (Life

Technology), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADNg se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización en los experimentos de PCR.

Para la amplificación de la región flanqueante 5' se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos oIGF-1F (5' ATTACAAAGCTGCCTGCCCCCTT 3') y oIGF-1R (5' CACATCTGCTAATACACCTTACCCG 3') que flanquean un fragmento de 265 pares de bases (pb) corriente arriba del inicio de la transcripción, similares a los oligonucleótidos reportados por Darwish *et al.* (2017).

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µL conteniendo 5 µL de PCR buffer 5X, 0.5 µL de mezcla de dNTP's a 10 Mm cada uno, 1.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1.0 µL de cada primer a 10 µM, 0.125 µL de GoTaq® DNA polymerase (Promega), 25 ng de ADNg como templado y agua libre de nucleasas. La reacción fue llevada a cabo utilizando un termociclador (Mastercycler® Nexus, Eppendorf), programado para seguir las siguientes condiciones: desnaturalización por 5 min a una temperatura de 95° C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 95° C, 30 s a 59° C, 30 s a 72° C y con una extensión final de 5 min a 72° C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, usando buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X como buffer de corrida en una cámara de electroforesis (BIO-RAD PowerPac™ Basic Electrophoresis Power Supply) durante 50 min a 40 mA, los geles fueron visualizados y fotografiados bajo luz UV utilizando el

transiluminador BioDoc-It[™] Imaging System benchtop 2UV Transluminator (UVP Transluminator, model M-20, CA 91786 U.S.A.).

Secuenciación

Las bandas de los fragmentos de PCR de 265 pb de los tres animales con alta concentración y de los tres animales con baja concentración de la hormona IGF-1 en suero fueron cortadas en un transiluminador (UVP Transluminator, modelo M-20, CA 91786U.S.A.) y se colocaron en un tubo de 1.5 mL para aislar el ADN utilizando el kit Wizard® Gel and PCR Clean-up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las seis muestras resultado de la purificación de ADN se enviaron a secuenciar en cadenas sentido y antisentido a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Chromas versión 2.6.5, y alineadas empleando la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para identificar cambios de bases al realizar la comparación con la secuencia de referencia (número de acceso X17229.1) del banco de genes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Genotipificación

Una vez encontradas las variantes génicas, se utilizó el programa SibEnzyme (<http://sibenzyme.com/products/restrictases>) para la búsqueda de una enzima de restricción que reconociera y cortara en la posición donde se encontraron los SNPs en la secuencia de referencia para implementar una técnica de genotipificación mediante un protocolo de PCR-RFLPs ya que este método es más económico que la secuenciación. El análisis de PCR-RFLPs se

llevó a cabo incubando una mezcla compuesta por: 10 µL de producto de PCR, 2 µL de amortiguador para la enzima, 17 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de enzima BfoI (Thermo Fisher Scientific) a 37° C por 20 min. Se cargaron 10 µL de la mezcla anterior en un gel de agarosa al 2.5% conteniendo 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se corrieron por electroforesis como se menciona arriba. Se identificaron diferentes patrones de bandeo (265 pb, 179 pb y 86 pb) dependiendo del genotipo de cada animal analizado. La enzima BfoI discrimina por igual si está presente cualquiera de los dos SNPs encontrados.

Los animales genotipificados fueron agrupados en: homocigotos silvestres (con dos copias de la secuencia utilizada como referencia, AA), homocigotos con la variante (con dos copias de la variante encontrada, BB) y heterocigotos (con una copia de la variante silvestre y una de la variante encontrada, AB).

Búsqueda de Diferencias en los Sitios de Unión entre las Variantes

Se utilizó la herramienta *Signal-Scan* (<http://gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/sigscan/sigscan.cgi>) del sitio *Gene-regulation* para predecir posibles factores de transcripción capaces de unirse a la secuencia nucleotídica silvestre o de la variante aquí reportada para identificar si existen diferentes factores de transcripción capaces de unirse a los diferentes alelos.

Diseño de Oligonucleótidos para PCR Cuantitativa (qPCR)

Los oligonucleótidos para el exón 1 (E1), exón 2 (E2) y para exón 3 y 4 (E3, 4) del gen *IGF-1* y los oligonucleótidos para el gen *Beta actina* (β -Act) fueron diseñados utilizando el programa *primer-BLAST* de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Cuadro 1), con base en la secuencias de referencia del banco de genes (X17229.1 y NM_001009784.3)

para los genes *IGF-1* y *β -Act*, respectivamente, donde el gen *β -Act* fue utilizado como gen de referencia para los experimentos de expresión génica relativa.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para qPCR

Primer	Secuencia del Primer (5' – 3')	Amplicón (pb)
oIGFI-E1F	CAACATCTCCCATCTCCCTGG	114
oIGFI-E1R	TTGGGTTGGAAGACTGCTGA	
oIGF1-E2F	AGCAGGTGAAGATGCCAGTC	83
oIGF1-E2R	AGAGCATCCACCAACTCAGC	
oIGF1-E3Y4F	TGTACTGTGCGCCTCTCAAG	127
oIGF1-E3Y4R	CTTCTGAGCCTTGGGCATGT	
B-act F	CAAGGCCAACCGTGAGAAGAT	99
B-act R	GAGGCGTACAGGGACAGCA	

Biopsias y Extracción de ARN Total

Para los ensayos de expresión génica se seleccionaron aleatoriamente 12 hembras con diferente genotipo y se sedaron con Procin®Equus (PISA) seguido de la administración de un anestésico local (1% Lidocaína). Se realizó la toma de biopsias de tejido muscular del bíceps femoral de aproximadamente 50 mg, usando el instrumento *biopsy punch* disposable 3 mm (Integra® Miltex®). Las muestras se depositaron individualmente en criotubos de 2 mL conteniendo 1 mL de TRI REAGENT® (Sigma-Aldrich) y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su próxima utilización para la extracción de ARN.

El ARN total fue extraído de las muestras de tejido muscular por el método del trizol siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN total fueron cuantificadas usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y la integridad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Síntesis de ADN Complementario (ADNc) y Cuantificación de Transcritos

La reacción de transcripción reversa (RT) fue realizada con el kit PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara), a partir de 1 µg de ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR fue llevada a cabo utilizando la mezcla powerUp™SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). La reacción de qPCR fue realizada en un termociclador (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time) en un volumen final de 10 µL conteniendo 5 µL de 2X powerUp™SYBR™Green Master Mix, 300 nM de los oligonucleótidos E1, o 500 nM de los oligonucleótidos E2, o 280 nM de los oligonucleótidos E3 y E4,

o 800 nM de los oligonucleótidos β -act y agua libre de nucleasas más 1 μ L de ADNc (proveniente de 25 ng de ARN total). Cada corrida de qPCR se acompañó de una curva estándar compuesta de cinco puntos con un rango dinámico de 25 a 25×10^{-4} ng correspondiente de ARN total y generada a partir de diluciones seriadas 1:10 del punto más concentrado. Los valores de R^2 en todas las corridas del experimento fueron de 0.99, con valores de eficiencia entre 90 y 110 % y una diferencia no mayor al 2 % entre los valores de la eficiencia del gen de referencia y el gen de interés, como se indica en Bustin *et al.* (2009).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 50 °C por 2 min (1 ciclo), 95 °C por 2 min (1 ciclo) y 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min con una única medición de la señal de fluorescencia en la etapa de extensión, y un programa de curva de disociación final que aumenta 0.5 °C en cada ciclo de 5 s desde 60 °C hasta 95 °C.

La expresión de *IGF-1* E1, E2 y E3, 4 se reporta en relación a la expresión de β -act de al menos cinco réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una, utilizando el método $2^{-\Delta Cq}$ de Schmittgen y Livak (2008).

Análisis Estadístico

Las frecuencias génicas y genotípicas se obtuvieron con la librería *genetics* del software estadístico R (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>).

La asociación de las variantes génicas con la concentración de IGF-1 en suero y las características fenotípicas ganancia diaria y ganancia total de peso obtenidas de la Fase 1 del experimento fue analizada únicamente en las hembras portadoras y no portadoras de los SNPs encontrados, ya que el número de

machos no fue suficiente, se decidió hacer el agrupamiento en portadoras y no portadoras debido a que la cantidad de individuos homocigotos para la variante génica fue muy reducida. La comparación entre grupos de portadoras y no portadores de la variante se realizó mediante una prueba de *t-student* con un valor de $\alpha \leq 0.05$ y $n = 5$, utilizando el paquete estadístico SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999).

En la Fase 2, para el análisis estadístico de la variable expresión génica, fue ajustado un modelo en el procedimiento PROC GLM de SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999) con las variables genotipo, exón y su interacción. Además, se realizó un contraste ortogonal para la expresión del transcrito proveniente del exón 1 contra los provenientes del exón 2 por genotipo y un segundo contraste para los transcritos provenientes del exón 1 y 2 contra los provenientes del exón 3 y 4, también por genotipo. Finalmente se realizaron pruebas de *t-student* para medir el efecto de la variable genotipo para cada exón de manera independiente.

Para la variable ganancia de peso en la Fase 3 se ajustó un modelo con el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999), el cual incluyó como efectos fijos al genotipo y tipo de parto, y semental dentro de rebaño como efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1

Búsqueda de polimorfismos. El amplicón generado por la PCR fue un fragmento de 265 pb. El análisis de las seis secuencias obtenidas reveló dos sitios de variación ubicados en las posiciones 85 y 87 de la secuencia con respecto a la secuencia de referencia X17229.1, estas variaciones están representadas por una transversión de guanina (G) a citosina (C) en la posición 85 y una transición de G a adenina (A) en la posición 87 como se observa en la Figura 4. Ambos cambios están presentes en las secuencias provenientes de animales con baja concentración de IGF-1 en suero, mientras que las secuencias provenientes de animales con alta concentración de IGF-1 en suero son idénticas a la de referencia.

Recientemente, Darwish *et al.* (2017) analizaron la región flanqueante 5' en ovejas Barki para producción de lana y encontraron dos SNPs, donde los animales silvestres tienen un mayor rendimiento, los cambios de bases fueron de guanina a citosina en la posición 85 y de guanina a adenina en la posición 87, que resultan ser las mismas encontradas en este trabajo en ovejas cruzadas para producción de carne.

Protocolo de genotipificación. El protocolo de genotipificación discrimina ambos o cualquiera de los dos SNPs encontrados. La digestión del producto de PCR del gen *IGF-1* producida por la enzima Bfo1 resulta en dos fragmentos de diferente tamaño. Para el genotipo silvestre (AA) se observaron fragmentos de 85 y 180 pares de bases (pb), en heterocigotos (AB) se observan tres fragmentos de 265, 85 y 180 pb y

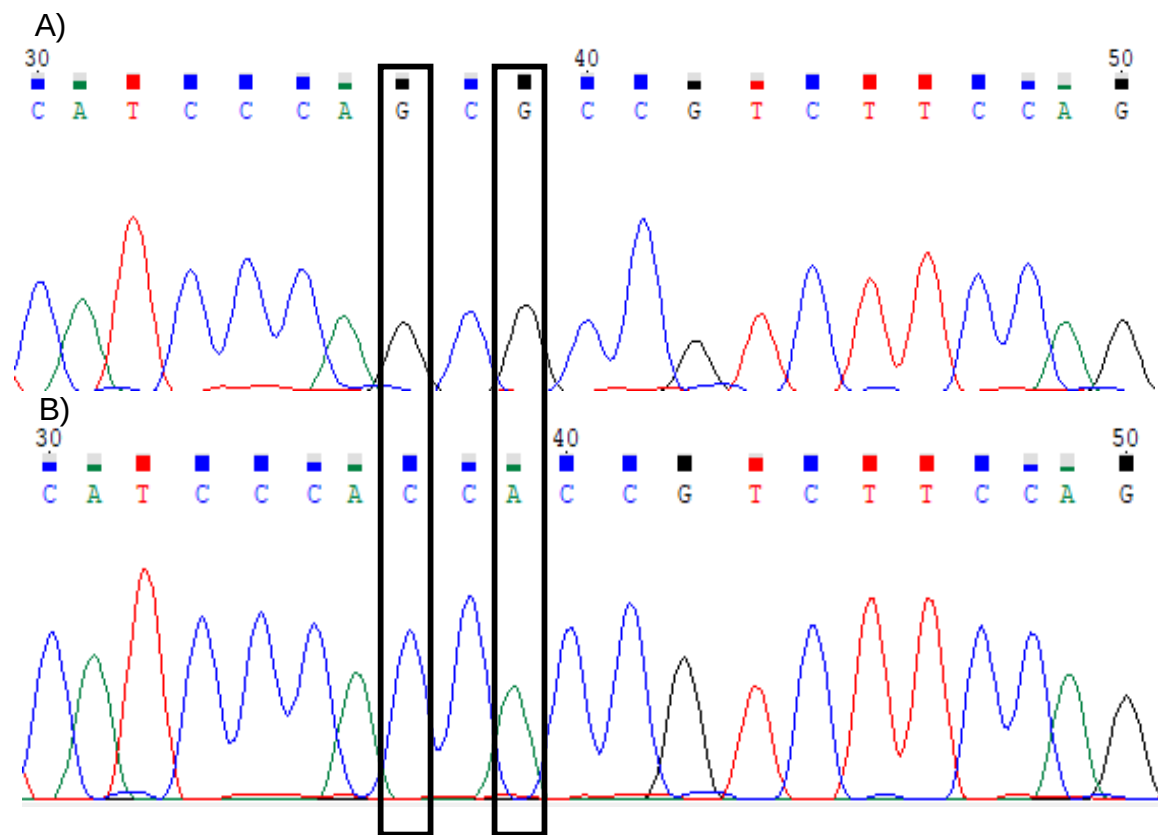


Figura 4. Secuencia de *IGF-1* donde se muestra la transversión de G a C en la posición 85 y la transición de una G a A en la posición 87. A) Genotipo silvestre (AA); B) Homocigoto (BB).

por último en animales homocigotos (BB) se observa un solo fragmento de 265 pb no digerido por la enzima (Figura 5).

La técnica de PCR-RFLPs ha sido ampliamente utilizada en protocolos de genotipificación por discriminación alélica (Yilmaz *et al.*, 2005; Darwish *et al.*, 2017). Para las variantes encontradas en esta investigación, resultó ser un buen método de genotipificación ya que es más económica que la secuenciación.

Frecuencias genotípicas y alélicas. Las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas se muestran en el Cuadro 2. Las frecuencias para el alelo A fueron de 0.66 y para el alelo B de 0.34; mientras que las frecuencias genotípicas fueron 0.50, 0.32 y 0.18 para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente. Los resultados encontrados son muy similares a los reportados por Darwish *et al.* (2017), quienes reportan tres genotipos (homocigoto, heterocigoto y homocigoto silvestre) y frecuencias para el alelo A y G de 0.46 y 0.54, respectivamente.

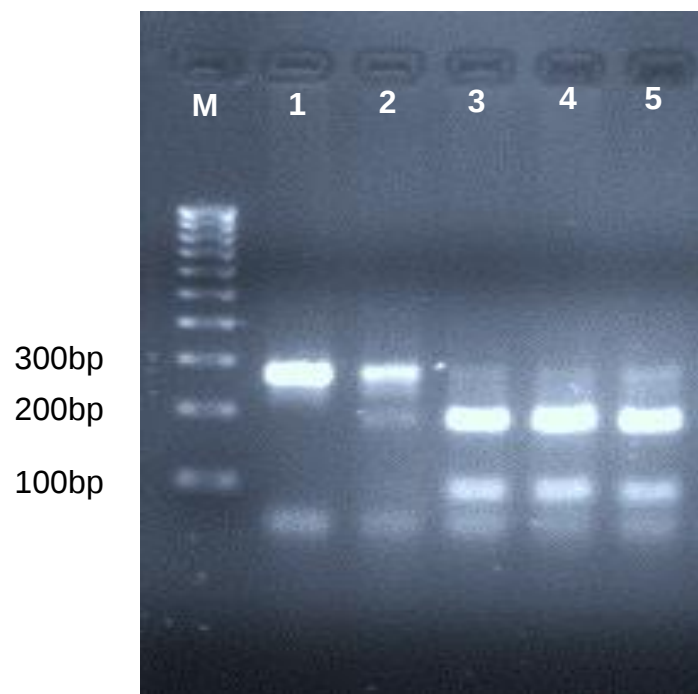


Figura 5. Fotografía de un gel de electroforesis representativo de la genotipificación. M: Marcador Molecular de ADN (Invitrogen™ 100 bp DNA ladder), carril 1: fragmento de 265 pb, genotipo homocigoto (BB); carril 2: fragmentos de 265, 85 y 180 pb genotipo heterocigoto (AB); carril 3, 4 y 5: fragmentos de longitud de 85 y 180 pb, genotipo Silvestre (AA).

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas para *IGF-1*

Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas	
AA	AB	BB	Total	A	B
0.50 (11)	0.32 (7)	0.18 (4)	22	0.66	0.34

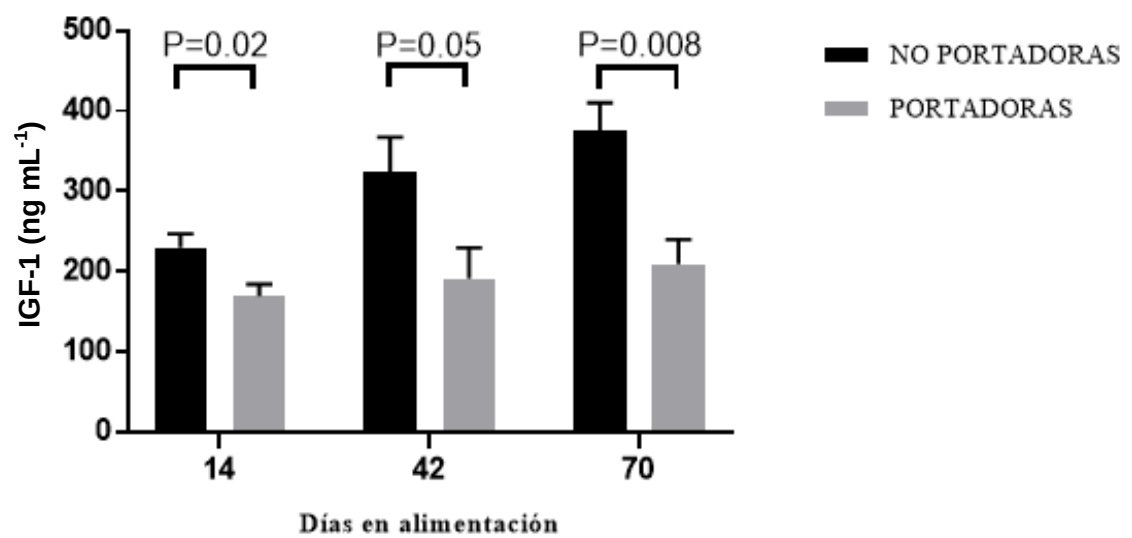
El número entre paréntesis es el número de animales correspondiente a cada genotipo.

Relación entre los SNPs del gen *IGF-1* y niveles de IGF-1 en suero.

Los genotipos de *IGF-1* se agruparon en hembras portadoras y no portadoras para medir la relación entre el genotipo y la concentración de la proteína. La concentración de IGF-1 fue menor ($P < 0.05$) en los tres momentos de medición en la prueba de comportamiento en los animales portadores de los SNPs aquí reportados (Gráfica 1). A los 14 d, la concentración fue de $168.76 \pm 15.01 \text{ ng mL}^{-1}$ vs $229.95 \pm 16.78 \text{ ng mL}^{-1}$, a los 42 d de $191.02 \pm 38.28 \text{ ng mL}^{-1}$ vs $324.50 \pm 42.80 \text{ ng mL}^{-1}$ y a los 70 d de $209.18 \pm 30.63 \text{ ng mL}^{-1}$ vs $375.87 \pm 34.2 \text{ ng mL}^{-1}$ para portadoras y no portadoras, respectivamente.

Relación entre los SNPs del gen *IGF-1* y rasgos de crecimiento. En el Cuadro 3 se muestran las medias para las tres características de crecimiento medidas durante la Fase 1 del trabajo. No hubo diferencias estadísticas ($P > 0.05$) para la característica de conversión alimenticia entre ambos grupos genéticos, pero si hay una tendencia ($P = 0.07$) en la característica de ganancia diaria de peso, siendo menor en los animales portadores comparada con los no portadores. Además, la ganancia de peso total fue significativamente menor en los animales portadores comparada con los no portadores ($P < 0.05$).

La concentración sérica de IGF-1 se asocia con características de crecimiento en los animales de granja (Ge *et al.*, 2001). Por ejemplo, algunos polimorfismos en el gen *IGF-1* están asociados con la concentración de IGF1 y con las características de crecimiento (Khederzadeh y Yazdanpanah, 2013; Darwish *et al.*, 2017).



Gráfica 1. Concentración de IGF-1 (medias $\pm$ E.E) a los 14, 42 y 72 d de la prueba de alimentación en corderos portadores y no portadores de la variante génica.

Cuadro 3. Medias ($\pm$ EE) para las características de crecimiento en animales portadores y no portadores

Característica	Genotipo		Valor de P
	Portadores	No portadores	
Conversión Alimenticia	5.63 $\pm$ 0.20	5.46 $\pm$ 0.23	0.59
Ganancia Diaria de Peso (kg)	0.22 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.06	0.07
Ganancia de peso total (kg)	22.16 $\pm$ 1.07	26.75 $\pm$ 1.2	0.02*

La hormona del crecimiento es la responsable de la expresión del gen *IGF-1*, y su transcripción de *IGF-1* es estimulada por: vía directa, JAK2-STAT5 factor de transcripción con múltiples sitios de unión *STAT5* localizados en intrones o en la región flanqueante 5' distal al sitio de inicio de la transcripción; o por vía indirecta, donde *STAT5* induce la expresión de HNF-3 γ en hígado incrementando los potenciadores o *enhancers* para la transcripción de *IGF-1*. Los cambios en los niveles séricos de IGF-1 pueden deberse a cambios en la expresión de dicho gen y, en consecuencia, en la producción de la proteína. En el Cuadro 3 se muestra que la asociación de IGF-1 no fue significativa en algunas de las características productivas medidas; sin embargo, se observó una menor ganancia de peso total en los animales portadores de la variante. Esto puede deberse a los bajos niveles de concentración de IGF-1 encontrados, ya que se sabe que existe una relación positiva entre las concentraciones de IGF-1 en sangre y el peso corporal (Jiang y Ge, 2014).

Variaciones en la secuencia de nucleótidos de la región promotora de un gen pueden tener un impacto crucial en la unión de los factores de transcripción, por lo que estos cambios pueden tener una asociación significativa con los niveles de expresión de dicho gen (Yilmaz *et al.*, 2005; Honarvar *et al.*, 2012).

En este estudio se observó que la variante encontrada afecta los niveles de IGF-1 y los rasgos de crecimiento. Existen informes de otros SNPs en el mismo gen, que están relacionados significativamente con la concentración sérica de IGF-1 alta y con una mayor ganancia de peso corporal en ganado Angus (Ge *et al.*, 2001). En ovinos se encontró que están significativamente relacionados con el aumento de peso del vellón limpio y el rendimiento de lana

(Darwish *et al.*, 2017) y el aumento de peso desde el nacimiento hasta el destete (Tahmoorespur *et al.*, 2009), mientras que otros investigadores (Nazari *et al.*, 2016) no encontraron diferencias significativas entre las diferentes variantes que reportaron, aunque los SNPs analizados en este último estudio son diferentes a los reportados en el presente trabajo.

Fase 2

Con base en los resultados obtenidos en la Fase 1, se planteó la hipótesis de que la relación encontrada entre el genotipo y la concentración de IGF-1 en suero es debida a que los SNPs encontrados son responsables de una disminución en el nivel de transcripción del gen. Un posible mecanismo que ocasione este decrecimiento transcripcional es que a través de un cambio en la secuencia nucleotídica se modifique o se pierda la afinidad de los factores de transcripción hacia su sitio de unión. Por lo anteriormente mencionado se decidió analizar *in silico* si había diferencias en la unión de factores de transcripción y determinar el grado de expresión génica en animales portadores y no portadores de la variante aquí reportada, obteniendo los resultados descritos a continuación.

Sitios de unión entre las variantes determinadas *in silico*. En el Cuadro 4 se muestran los sitios de unión en *cis* y los factores de transcripción del gen *IGF-1* que se encontraron a partir de análisis *in silico* en animales portadores y no portadores de la variante génica. En los animales homocigotos silvestres en la posición 87 se encontró un sitio de unión del factor de transcripción NF-W2, mientras que en los animales con la variante génica este sitio está ausente. NF-W2 actúa como factor de unión a un potenciador en secuencias de ADN y tiene la capacidad de eficientar o aumentar la transcripción de genes (Hoon *et al.*, 1999).

Cuadro 4. Diferencias en los sitios de unión entre ambas variantes

Genotipo	Nombre	Factor o sitio	Localización
Homocigoto silvestre	Box_1	sitio	85
	NF-W2	Factor	85
	Box_1	Sitio	85
	Desconocido	Sitio	85
	Desconocido	Sitio	86
	NF-W2	Factor	87
Homocigoto mutante	CAC-binding	factor	85
	CAC-binding	Factor	85
	NF-W2	factor	85
	BOX_1	Sitio	85
	Desconocido	Sitio	85
	Desconocido	sitio	85

Análisis de expresión génica. Se seleccionaron al azar 2 corderos homocigotos con la variante, 5 heterocigotos y 5 homocigotos silvestres para el análisis de la expresión génica por RT-qPCR de *IGF-1*. En el Cuadro 5 se muestran las medias de los cuadrados mínimos para la expresión génica en la interacción genotipo x exón. Se puede observar que el contraste que compara la expresión por genotipo del exón 1 contra el 2 no resulta estadísticamente significativo, es decir, que no existe diferencia significativa entre la expresión de los mensajes provenientes del promotor 1 y aquellos provenientes del promotor 2. Estos resultados difieren de otros en los que el ARNm de clase 1 provenientes del promotor 1 de IGF-1 pareció ser más abundante que el ARNm de clase 2 provenientes del promotor 2 de IGF-1 en diferentes tejidos evaluados (Ouni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2009). De acuerdo a Asperghis *et al.* (2009) los transcritos de IGF-1 de clase 2 tienen mayor estabilidad que los de clase 1, mientras que los transcritos de clase 1, a su vez, tienen un mayor rendimiento transcripcional / traduccional. Por otro lado, algunos estudios muestran que ambas clases de ARNm de IGF-1 se expresan al nivel más alto en el hígado y a niveles relativamente altos en grasa, glándula mamaria, intestino delgado, bazo y testículos (Ouni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2009).

De acuerdo al Cuadro 5 en el análisis de contrastes se puede observar claramente que existe una tendencia a tener un valor significativo cuando la expresión de los transcritos desde los promotores 1 y 2 fue comparado en su conjunto con la expresión de los exones 3 y 4 ($P = 0.12$). Además, el análisis

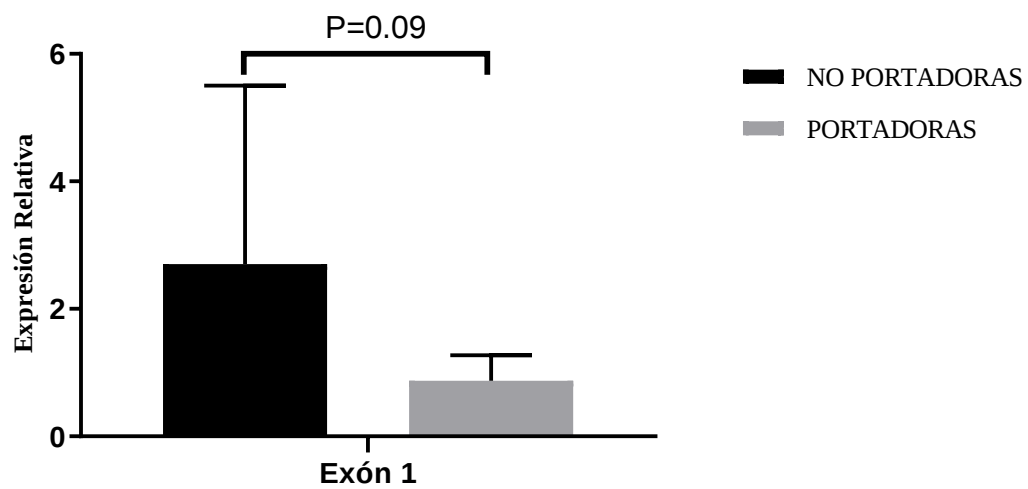
Cuadro 5. Medias de los cuadrados mínimos y contrastes ortogonales de la expresión génica de *IGF-1* relativa a β -actina en animales portadores y no portadores de las variantes reportadas

		Genotipo					
		Portadores			Silvestres		
Exón		1	2	3	1	2	3
Expresión		0.00087 ±	0.001 ±	0.0025 ± 0.00068	0.0027 ±	0.0034 ±	0.0067 ±
		0.00068	0.00068		0.00090	0.00090	0.00090
Contraste (Exón 1- Exón 2)				0.00010±0.00080 (P=0.89)			
Contraste ((Exón 1 +2)/2 – Exón 3)				0.0022±0.0013 (P=0.12)			

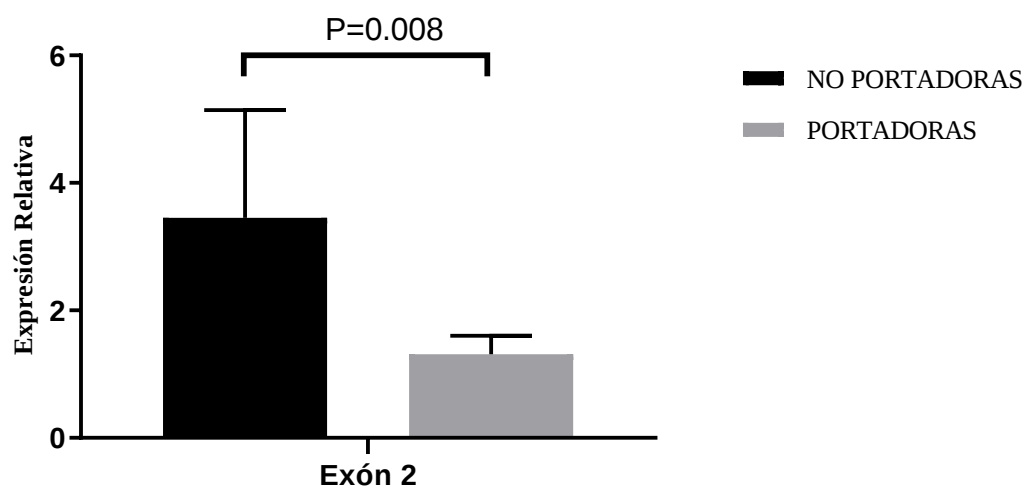
estadístico arrojó un efecto significativo de los factores genotipo y exón, con valores de P de 0.0002 y 0.008 respectivamente, por lo que se decidió analizar los efectos del genotipo en cada exón por separado.

En la Gráfica 2 se puede observar que no se encontró diferencia significativa en la expresión de los transcritos provenientes del promotor 1 entre los animales portadores y no portadores de la variante, sin embargo, la expresión media de los transcritos provenientes del promotor dos y del conjunto de promotores 1 y 2 (exones 3 y 4) sí resultó ser estadísticamente significativa, con una mayor expresión en los animales no portadores tienen una mayor expresión (veces de cambio = 2.7) en comparación con los animales portadores con valores de P de 0.008 y 0.02 para el exón 2 y exones 3 y 4, respectivamente (Gráficas 3 y 4).

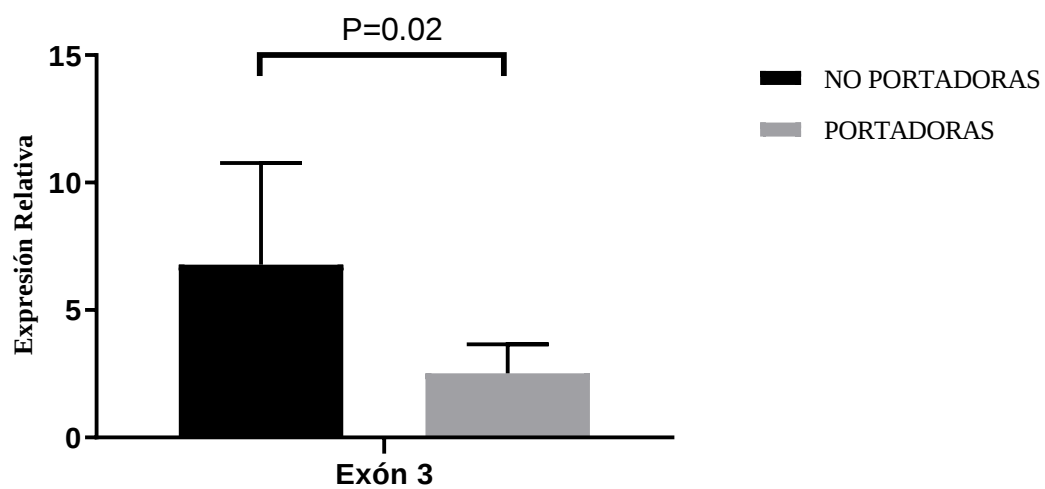
Algunos SNPs tienen la capacidad de alterar la expresión génica en función de su ubicación dentro de los potenciadores, promotores, u otros componentes regulatorios (Rotwein, 2017a). Los resultados obtenidos de expresión génica demuestran que existe una relación entre los niveles de ARNm obtenidos en esta fase del experimento y los niveles de hormona circulante en sangre medida en la Fase 1.



Gráfica 2. Expresión de los transcritos de *IGF-1* provenientes del promotor 1 en animales portadores y no portadores de la variante génica.



Gráfica 3. Expresión de los transcritos de *IGF-1* provenientes del promotor 2 en animales portadores y no portadores de la variante génica.



Gráfica 4. Expresión de los transcritos de *IGF-1* provenientes del promotor 1 y 2 en animales portadores y no portadores de la variante génica.

Fase 3

Genotipificación y relación entre SNPs del gen *IGF-1* con rasgos de crecimiento. Se genotipificaron 81 animales con el protocolo de genotipificación por RFLPs establecido en la Fase 1 del experimento, además, se midió ganancia diaria de peso y ganancia total de peso en todos los animales. No se encontraron diferencias significativas para las características medidas en los diferentes genotipos (Cuadro 6); sin embargo, en el análisis visual los animales con genotipo silvestre se observaban con una mejor conformación al compararlos con los animales de genotipo mutante, por lo que, quizás otras características no tomadas en cuenta en el presente estudio tales como, conformación o características de canal o fibras musculares, pudieran estar siendo influenciadas ya que la vida postnatal, *IGF-1* es un componente clave en el crecimiento de los animales, crecimiento del hueso, el crecimiento del cartílago y el crecimiento muscular Nazari *et al.* (2016).

Cuadro 6. Medias ($\pm$ E.E.) de los cuadrados mínimos para características de crecimiento en animales portadores y no portadores

Característica	Genotipo		Valor de P
	Portadores	No portadores	
Ganancia Diaria de Peso (kg)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.2
Ganancia de peso total (kg)	35.78 ± 1.67	38.37 ± 1.65	0.2

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que en la región flanqueante 5' del gen *IGF-1* en ovinos Dorper existe una variante génica (85 G > C y 87 G > A) relacionada con un menor nivel de transcritos de dicho gen y con una menor concentración de proteína en sangre. Estos niveles menores de la proteína IGF-1, parecen influir en características fenotípicas de crecimiento y conformación; sin embargo, es necesario realizar otros estudios para confirmar esto último ya que en el análisis de validación en 81 animales no se encontró una asociación significativa.

Se recomienda realizar una prueba de comportamiento con animales de diferente genotipo, en la que se midan un mayor número de variables como conformación ósea y muscular, características de fibras musculares y características de la canal; esto con la finalidad de confirmar la asociación de la variante en el gen y proponer a estos polimorfismos como candidatos a ser utilizados en programas de selección asistida por marcadores moleculares para mejorar los rasgos de crecimiento en corderos, considerando que estas características son de origen poligénico.

LITERATURA CITADA

- Alzhanov, D., A. Mukherjee y P. Rotwein. 2015. Identifying growth hormone-regulated enhancers in the *Igf1* locus. *Physiol Genomics*. 47:559-568.
- Aperghis, M., C. P. Velloso, M. Hameed, T. Brothwood, L. Bradley, P. M. G. Bouloux, S. D. R. Harridge y G. Goldspink. Serum IGF-I levels and IGF-1 gene splicing in muscle of healthy young males receiving rhGH. *ScienceDirect*. 19:61-67.
- Bazan, N. 2018. Compendio estadístico 2018. En <https://comecarne.org/estadisticas/> Consultado 11 Agosto 2019
- Berrie, R. A., D. M. Hallford y M. L. Galyean. 1993. Effects of zinc source and level on performance, carcass characteristics, and metabolic hormone concentration of growing and finishing lambs. *The Professional Animal Scientist*. 11:149-156.
- Bhat, S. A., A. A. Malik., S. M. Ahmad., R. A. Shah., N. A. Ganai., S. S. Shafi y N. Shabir. 2017. Advances in genome editing for improved animal breeding: a review. *Veterinary world*. 10:1361-1366.
- Boman, I. A., G. Klemetsdal, T. Blichfeldt, O. Nafstad y D. I. Vage. 2009. A frameshift mutation in the coding region of the *myostatin* gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in norwegian White sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics*. 40:418-422.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele y C. T. Wittwer. Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55:4.
- Candelaria-martínez, B., C. Flota-Bañuelos y J. Castillo-Sánchez. 2015. Caracterización de los agrosistemas con producción ovina en el oriente de Yucatán, México. *Agronomía mesoamericana*. 26:225-236.
- Checa, C. M. A. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 20:213-221.
- Cheng, H., X. Xu, T. Hadfield, N. Cockett, C. Charlier, M. Georges y H. Takeda. 2014. Experimental evaluation does not reveal a direct effect of microRNA from the *callipyge* locus on *DLK1* expression. *BMC Genomics*. 15:944.
- Corona-Leyva, J. C., J. R. Reyna-Granados, R. Zamorano-Algandar, M. A. Sanchez-Castro, M. G. Thomas, R. M. Enns, S. E. Speidel, J. F. Medrano, G. Rincón y P. Luna-Nevárez. 2018. Polymorphisms within the prolactin and growth hormone/insulin-like growth factor-1 functional pathways associated

with fertility traits in Holstein cows raised in a hot climate. *Tropical Animal Health and Production*. 50:1913-1920.

- Darwish, H. R., H. M. El-Shorbagy., A. M. Abou-Eisha., A. E. El-Din y I. M. Farag. 2017. New polymorphism in the 5' flanking region of *IGF-1* gene and its association with wool traits in Egyptian Barki sheep. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15:437–441.
- Dettori, M. L., M. Pazzola, P. Paschino, M. Amills y G. M. Vacca. 2018. Association between the *GHR*, *GHRHR*, AND *IGF1* gene polymorphisms and milk yield and quality traits in Sarda sheep. *Journal of Dairy Science*. 101:1-9.
- Dowidar, Y. A., M. A. El-Sayed, A. M. Elrefy y H. E. Shoura. 2018. Detection of *myostatin* gene *MSTN* in some goat breeds (*Capra hircus*). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16:507-512.
- Espejel-García, A., A. I. Barrera-Rodriguez, A. Rodríguez-Moreno y M. Santiago-Vargas. 2015. Caracterización de los reproductores y dinámica de adopción de innovación en municipio de victoria, estado de México. *Ra Ximhai*. 11:17-34.
- Ge, W., M. E. Davis, H. C. Hines, K. M. Irvin y R. C. Simmen. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 79:1757-1762.
- Góngora-Pérez, R. D., S. F. Góngora-González, M. A. Magaña-Magaña y P. E. Lara. 2010. Caracterización técnica y socioeconómica de la producción ovina en el estado de Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*. 21:131-144.
- Grochowska, E., B. Borys, D. Lisiak y S. Mroczkowski. 2018. Genotypic and allelic effects of the *myostatin* gene (*MSTN*) on carcass, meat quality, and biometric traits in colores polish Merino sheep. *Meat Science*. 151:4-17.
- Grossi, A. D., M. E. Buzanskas, N. V. Grupioni, C. C. P. de Paz, L. C. de Almeida Regitano, M. M. de Alencar, F. S. Schenkel y D. P. Munari. 2014. Effects of *IGF1*, *GH* and *PIT1* markers on the genetic parameters of growth and reproduction traits in Canchim cattle. *Molecular Biology Reports*. 42:245-251.
- Hernández, C. I., M. Rejón Ávila, E. Valencia Heredia y L. Araujo Andrade. 2014. Análisis de inversión para la producción de ovino en el municipio de Tzucacab, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 34:677-687.

- Hewitt, C. S., S. L. Lierz, M. Garcia, K. J. Hamilton, A. Gruzdev, S. A. Grimm, J. P. Lydon, F. J. Demayo y K. S. Korach. 2019. A distal super enhancer mediates estrogen-dependent mouse uterine-specific gene transcription of *insulin-like growth factor 1 (IGF1)*. *Journal of Biological Chemistry*. 1-27.
- Hickford, J. G. H., R. H. Forrest, H. Zhou, Q. Fang, J. Han, C. M. Frampton y A. L. Horrel. 2009. Polymorphisms in the ovine *myostatin* gene (*MSTN*) and their association with growth and carcass traits in new zeland Romney sheep. *Animal Genetics*. 41:64-72.
- Hogue, D. E. 1987. Frequent lambing systems. *New Techniques in Sheep Production*. En I. F. M. Marai y F. B. Owen, eds. Butterworth-Heinemann. Londres, Inglaterra.
- Honarvar, M., M. Sadeghi., H. Moradi-Shahrehabak., S. Behzadi., H. Mohammadi y A. Lavaf. 2012. Study of Polymorphisms in the 5' Flanking Region of the Ovine *IGF-I* Gene in Zel Sheep. *World Applied Sciences Journal*. 16:726-728.
- Hoon, C. J., S. H. Eom y J. Ahnn. 1999. Analysis of calsequestrin gene expression using green fluorescent protein in *caenorhabditis elegans*. *Molecules and cells*. 9:230-234.
- Jasso, G. 2011. Relacion de indicadores metabólicos séricos y composicion corporal con eficiencia alimenticia neta en corderos de cruza terminal. Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Chihuahua, Chihuahua, México.
- Jenko, J., G. Gorjanc, M. A. Cleveland, R. K. Varshney, C. B. Whitelaw, J. A. Woolliams y J. M. Hickey. 2015. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genetics selection solution*. 47:55-69.
- Jiang, H. y X. Ge. 2014. Mechanism of growth hormone stimulation of skeletal muscle growth in cattle. *Journal of Animal Science*. 92:21-29.
- Khederzadeh, S. y A. Yazdanpanah. 2013. Polymorphisms in the 5' Flanking Region and first exon of *Insulin-like Growth Factor 1* Gene in southern populations of buffalo. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 9:348-354.
- Luna, C. y Alonso, R. 2014. Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas. *Rev. mex. De cienc. Pecuarias*. 5:107-130.
- Ma, Y., Y. Chen, Z. Liu, M. Leong, F. Gao y W. Huang. 2018. Promotion of *insulin-like growth factor II* in cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 14:844-850.

- Magee, D. A., D. P. Berry, E. W. Berkowicz, K. M. Sikora, D. J. Howard, M. P. Mullen, R. D. Evans, C. Spillane y D. E. MacHugh. 2010. Single nucleotide polymorphisms within the bovine *DLKI-DIO3* imprinted domain are associated with economically important production traits in cattle. *Journal of Heredity*. 102:94-101.
- Martínez, S., J. Aguirre, A. Gómez, M. Ruíz, C. Lemus, H. Macias, L. Moreno, S. Salgado y M. Ramirez. 2010. Tecnologías para mejorar la producción ovina en México. *Revista Fuente*. 5:41-51.
- Moradian, C., G. Esmailnia y A. Hajihosseini. 2013. Polymorphism of *IGF-1* gene in Makoei Sheep using PCR-SSCP. *European Journal of Experimental Biology*. 3:490-494.
- Murphy, S. K., C. M. Nolan, Z. Huang, K. S. Kucera, B. A. Freking, T. P. L. Smith, K. A. Leymaster, J. R. Weidman y R. L. Jirtle. 2006. *Callipyge* mutation affects gene expression in *cis*: A potential role for chromatin structure. *Genome Research*. 16:340-346.
- Nazari, F., A. Noshary y B. Hemati. 2016. Association between *Insulin-Like Growth Factor I* Polymorphism and Early Growth Traits in Iranian Zandi Sheep, Found Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 6:665-669.
- Negahdary, M., A. Hajihosseini y M. Ajdary. 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*. 6.
- Nica, A. y E. Dermitzakis. 2013. Expression quantitative trait loci: present and future. *Royal Society*. 368.
- Nicolini, P., M. Carriquiry y A. Meikle. 2013. A polymorphism in the insulin-like growth factor 1 gene is associated with postpartum resumption of ovarian cyclicity in Holstein-Friesian cows under grazing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55:1-8.
- Oberbauer, A. M. 2013. The regulation of *IGF-1* gene transcription and splicing during development and aging. *Frontiers in Endocrinology*. 4:1-9.
- Ouni, M., Y. Gunes, M. Belot, A. Castell, D. Fradin y P. Bougnères. 2015. The *IGF-1* promoter is an epigenetic QLT for circulating IGF1 and human growth. *Clinical Epigenetics*. 7:1-22.

- Ouni, M., A. Castell, A. Rothenbuhler, A. Linglart y P. Bougnères. 2016. Higher methylation of the IGF1 P2 promoter is associated with idiopathic short stature. *Clinical Endocrinology*. 84:216-221.
- Pérez, L., J. B. Ortiz-Delgado y M. Manchado. 2016. Molecular characterization and transcriptional regulation by GH and GnRH of insulin-like growth factors I and II in white seabream (*Diplodus sargus*). *Gene*. 10:251-262.
- Rotwein, P. 2017a. Diversification of the *insulin-like growth factor 1* gene in mammals. *Plos One*. 1-26.
- Rotwein, P. 2017b. Variation in the *Insulin-Like Growth Factor 1* gene in primates. *Endocrinology*. 158: 804-814.
- SAGARPA. 2016a. Plan rector sistema producto ovinos (2015-2024). En: http://spo.uno.org.mx/wpcontent/uploads/2016/05/plan_rector_ovinos2016.pdf Consultado 4 Mayo 2019.
- SAGARPA. 2016b. Resumen Nacional Producción, precio, valor, animales sacrificados y peso 2016. En: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/ResumenNacional.do?sessionId=1265E9270DFBC4EA4C484CB7C5587070 Consultado 1 Agosto 2019.
- Schmittgen, T. D. y K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 3:1101-1108.
- Siadkowska, E., L. Zwierzchowski, J. Oprzadek, N. Strzalkowska, E. Bagnicka y J. Krzyzewski. 2006. Effect of polymorphism in *IGF-1* gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 24:225-237.
- Su, R., W. Sun, D. Li, Q. Z. Wang, X. Y. L, H. H. Musa, L. Chen, Y. F. Zhang y W. Z. Wu. 2014. Association between *DLK1* and *IGF-I* gene expression and meat quality in sheep. *Genetics and Molecular Research*. 13:10308-10319.
- Tahmoorepur, M., M. V. Valeh, M. R. Nassiry, A. H. Moussavi y M. Ansary. 2009. Association of the polymorphisms in the 5' flanking region of the ovine *IGF-I* gene with growth traits in the Baluchi sheep. 39:97101.
- Tellam, R. L., N. E. Cockett, T. Vuocolo y C. A. Bidwell. 2012. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. *Frontiers in Genetics*. 3:164
- Theodoridis, A., A. Ragkos, G. Rose, D. Roustemis y G. Arsenos. 2017. Defining the breeding goal for a sheep breed including production and functional traits using market data. *Animal*. 12:1508-1515.

- Thomas, N., T. Venkatachalapathy, T. Aravindakshan y K. Raghavan. 2016. Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5' flanking región of the goat *IGF1* Gene with prolificacy. *Animal Reproduction Science*. 167:8-15.
- Thomas, N., T. Venkatachalapathy, T. Aravindakshan, K. C. Raghavan, M. Mini y K. Shyama. 2017. Association of a novel single nucleotide polymorphism at the exon-2 of *Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1)* gene with phenotypic variants in goats. *VETERINARSKI ARHIV*. 87:457-472.
- Trukhachev, V., V. Skripkin, A. Kvochko, A. Kulichenko, D. Kovalev, S. Pisarenko, A. Volynkina, M. Selionova, M. Aybazov y A. Krivoruchko. 2016. Correlation between gene expression profiles in muscle and live weight in Dzhalginsky Merino sheep. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 29:188-198.
- Van, E. A. L. 2017. Genetic Modification of food animals. *Sciencedirect*. 44:27-34.
- White, D. J., T. Vuocolo, M. McDonagh, M. D. Grounds, G. S. Harper, N. E. Cockett y R. Tellam. 2007. Analysis of the *callipyge* phenotype through skeletal muscle development; association of *Dlk1* with muscle precursor cells. *Differentiation*. 76:283-298.
- Wang, Y. S. E. Price y H. Jiang. 2003. Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNAs. *ScienceDirect*. 25:315-328.
- Xiang, G., J. Ren, T. Hai, R. Fu, D. Yu, J. Wang, W. Li, H. Wang y Q. Zhou. 2018. Editing porcine *IGF2* regulatory element improved meat production in chinese bama pigs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75:4619-4628.
- Xiao, S., S. Li, J. Zhang, S. Zhang, L. Dai, Y. Bao, N. Jiang, Y. Gao, Z. Zhao, D. Mo, Y. Chen y Z. Zhao. 2009. Cloning and characterization of class 1 and class 2 *insulin-like growth factor-I* mRNA in Songliao black pig. *Molecular Biology Reports*. 36:415-421.
- Xing, H. J., Z. Y. Wang, B. S. Zhong, S. J. Ying, H. T. Nie, Z. R. Zhou, Y. X. Fan y F. Wang. 2014. Effects of different dietary intake on mRNA levels of *MSTN*, *IGF-I*, and *IGF-II* in the skeletal muscle of Dorper and Hu sheep hybrid F1 rams. *Genetics and Molecular Research*. 13:5258-5268.
- Xu, X., F. Ectors, E. E. Davis, D. Pirottin, H. Cheng, F. Farnir, T. Hadfield, N. Cockett, C. Charlier, M. Georges y H. Takeda. 2015. Ectopic expression of retrotransposon-derived *PEG11/RTL1* contributes to the *callipyge* muscular hypertrophy. *Plos One*. 1-17.

- Yilmaz, A., M. E. Davis, H. Ch. Hines y H. Chung. 2005. Detection of two nucleotide substitutions and putative promoters in the 5' flanking region of the ovine *IGF-I* gene. *Journal of Applied Genetics*. 46:307-309.
- Zou, Y., Y. Dong, Q. Meng, Y. Zhao y N. Li. 2018. Incorporation of a skeletal musclespecific enhancer in the regulatory region of *Igf1* upregulates IGF1 expression and induces skeletal muscle hypertrophy. *Scientific Reports*. 8:2781.