

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**ASOCIACIÓN DE UN MARCADOR GENÉTICO DEL FACTOR SIMILAR A LA
INSULINA- I (IGF-I) CON CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE
TERNERAS ABERDEEN ANGUS**

por

Pilar BASIGALUZ LATEULADE

Ana KAITAZOFF LAGO

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2012

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. Ana Inés Trujillo

Ing. Agr. Jorge Urioste

Fecha: 09 de noviembre de 2012.

Autor: -----

María del Pilar Basigaluz Lateulade

Ana Kaitazoff Lago

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecerles a nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional que recibimos durante la carrera y a nuestros tutores Ing. Agr. (MSC) Ana Inés Trujillo e Ing. Agr. (PhD) Jorge Urioste por el tiempo dedicado en este proceso tan importante.

También queremos agradecerle a la Ing. Agr. Ana Carolina Espasandín por ayudarnos en la etapa inicial de la tesis y a Ariel Castro por permitirnos trabajar en el laboratorio de la EEMAC, donde recibimos la ayuda inmensa de la Lic. Pía Grignola. Agradecer a la Ing. Agr. (PhD) Mariana Carriqui, Dr. Alberto Casal e Ing. Agr. (MSc) Ana Laura Astesiano, por su ayuda inmensa tanto en el trabajo de laboratorio, como en la fase de escritura.

Queremos destacar un fuerte agradecimiento a las cabañas de Aberdeen Angus que nos permitieron trabajar con sus animales y poder realizar esta tesis, así como también a la Sociedad de Criadores de Aberdeen Angus del Uruguay por proporcionarnos los datos necesarios para la realización de la tesis.

Por último y no menos importante, agradecemos a nuestra Facultad de Agronomía por todos estos años de aprendizaje que fue mucho más que una formación profesional. Durante la carrera aprendimos, vivimos, crecimos y hoy nos vamos no solo con un título sino con algo mucho más valioso como son nuestros colegas amigos que van a quedar para todo la vida.

Gracias a Dios, la formación que recibimos hoy va a ser la mejor herramienta para nuestro futuro, por eso, muchas gracias a todos los involucrados.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. CARACTERIACIÓN DE LA RAZA ABERDEEN ANGUS.....	4
2.2. MARCADORES MOLECULARES.....	5
2.3. MARCADORES MOLECULARES Y SU IMPLICANCIA EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ENONÓMICA.....	6
2.3.1 <u>Tipos de marcadores moleculares</u>	6
2.3.1.1 Polimorfismo de base única (SNP´s).....	7
2.3.1.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de Restricción (RFLP).....	9
2.3.1.3 Microsatélites o Secuencias repetidas cortas (SSC).....	10
2.4. TÉCNICAS DE GENOTIPADO.....	11
2.4.1 <u>Reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)</u>	11
2.4.2 <u>Alta resolución de la temperatura de disociación (HRM)</u>	11
2.5. UTILIZACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS.....	13
2.5.1 <u>Selección asistida</u>	13
2.5.2 <u>Aplicación práctica de los marcadores</u>	15
2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO.....	17
2.6.1 <u>Edad de la madre</u>	18
2.6.2 <u>Alimentación durante el invierno</u>	18
2.7. FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO 1 (IGF-1).....	22
2.8. HIPÓTESIS.....	22

3.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
	3.1. MUESTREO DE ANIMALES.....	23
	3.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN).....	23
	3.2.1 <u>Extracción a través de folículo piloso</u>	23
	3.2.2 <u>Extracción a través de sangre</u>	24
	3.3. GENOTIPADO DE ADN.....	24
	3.3.1 <u>Genotipado de ADN extraído del folículo piloso</u>	24
	3.3.1.1 Amplificación.....	24
	3.3.1.2 Digestión.....	25
	3.3.1.3 Corrida electroforética.....	25
	3.3.2 <u>Genotipado del ADN extraído de sangre</u>	26
	3.3.3 <u>Datos fenotípicos y genéticos</u>	26
	3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
	3.4.1 <u>Análisis poblacional</u>	26
	3.4.2 <u>Equilibrio Hardy-Weinberg</u>	27
	3.4.3 <u>Modelo estadístico</u>	28
4.	<u>RESULTADOS</u>	30
	4.1 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	30
	4.2 ANÁLISIS DE LOS DEPPDC Y DEPP18C.....	31
	4.3 EFECTOS SOBRE LOS PDC Y P18C.....	31
	4.3.1 <u>Influencia del polimorfismo de polimorfismo de IGF-1 en PDC y P18C</u>	31
	4.3.2 <u>Influencia de las edades de las madres en los PDC y P18C</u>	32
	4.3.3 <u>Influencia del criador en la varianza total de los PDC y P18C</u>	33
5.	<u>DISCUSIÓN</u>	34
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	37
7.	<u>RESUMEN</u>	38
8.	<u>SUMMARY</u>	39
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	40

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Principales tipos de marcadores de ADN y métodos de detección.....	7
2.	Algunos marcadores utilizados a escala comercial.....	17
3.	Protocolo de amplificación.....	25
4.	Frecuencias genotípicas para los SNP's de IGF-1.....	30
5.	Frecuencias alélicas.....	30
6.	Efecto de la variabilidad genética en DEPPDC y DEP18C	31
7.	PDC y PD18C para los polimorfismos de IGF-1.....	31
8.	Efecto del criador en la varianza total.....	33
Figura No.		
1.	Polimorfismo de un solo nucleótido.....	8
2.	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.....	10
3.	Microsatélites.....	11
4.	Curva de normalización.....	12
5.	Genotipos presentes en curva de HRM normalizada.....	13
6.	Patrón de bandas visualizadas en corrida electroforética.....	26
7.	PDC y P18C según polimorfismo de IGF-1.....	32
8.	PDC y P18C según la edad de la madre.....	33

1 INTRODUCCIÓN

En Uruguay el sector agropecuario es uno de los sectores económicos más relevantes, representando el 8,2% del PBI total (URUGUAY. MGAP. OPYPA, 2011). Dentro del sector, la ganadería vacuna constituye un factor muy importante en la dinámica económica y social. Ocupa algo más de 13 de las 16 millones de hectáreas dedicadas a la producción agropecuaria y es la que genera más valor agregado, empleo y la que reúne la mayor cantidad de empresas. La cría de ganado bovino, se realiza mayormente mediante la forma de ganadería extensiva. El ganado vacuno tienen una participación muy significativa dentro del sector agropecuario debido a varias causas, entre ellas, presenta un crecimiento sostenido de su stock hasta el 2005, con fluctuaciones en los últimos 6 años que lo mantienen en el orden de los 11 millones de cabezas en el 2010 (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2011). La ocupación de los espacios disponibles debido a la marcada disminución de las existencias ovinas ha contribuido al aumento del stock vacuno.

La producción de carne ha mostrado una tendencia creciente sobreponiéndose a eventos negativos como la Fiebre Aftosa en abril de 2001. La superación de la crisis sanitaria permitió a su vez acceder a mercados de alto poder adquisitivos y comenzó una nueva etapa donde las exportaciones del sector crecieron considerablemente.

La producción de carne vacuna medida en números de cabezas (faenadas, exportadas en pie, y/o diferencias de inventario) ha mostrado un crecimiento del 67% en los últimos 15 años, siendo este incremento mayor para la faena que para los kilos en pie. En el censo agropecuario URUGUAY. MGAP.OPYPA (2011) se reportó una faena de 2471 mil cabezas de ganado y una exportación en pie de ganado vacuno de 161 mil cabezas para el período 2009-2010, donde la mayor proporción en el total de animales faenados, corresponde a hembras y animales jóvenes. Pero, analizando lo ocurrido más recientemente, hace 5 años que no crece la faena, ni el stock ni la extracción (SERAGRO, 2011).

Las crisis que ha registrado el sector, el incremento de la competitividad de otros rubros, los avances tecnológicos, las exigencias de los mercados, entre otras, han llevado a los productores a afinar los números buscando mejorar las eficiencias de los procesos de cría, crecimiento y terminación de los animales. Esto se traduciría en una mayor eficiencia económica logrando disminuir los costos de alimentación.

Las razas británicas y sus cruzas constituyen entre el 75-85% del ganado de carne nacional. Existen aproximadamente 26 razas carniceras registradas en la Asociación Rural del Uruguay. Si bien no hay registros oficiales de la proporción de cada una en el rodeo nacional, las sociedades de criadores de distintas razas consideran que el 70% del rodeo nacional corresponde a la raza Hereford, un 8% de Aberdeen Angus y un 7% de cruzas británicas.

Uruguay es un país con una larga tradición en el mejoramiento genético del ganado vacuno, en donde se ha avanzado significativamente en la información disponible para el productor.

La selección basada en valores de cría (DEP) ha sido muy exitosa en tanto se ha logrado obtener un importante progreso genético en las características de interés. Si bien algunos productores han concluido que las DEP serán innecesarias cuando se cuente con marcadores genéticos, ambas metodologías son complementarias y no excluyentes, siendo la combinación de las mismas la forma adecuada para calcular en forma precisa el mérito genético (Casas, 2007).

El avance de la tecnología molecular ha impulsado y desarrollado el uso de marcadores genéticos, para complementar dichos enfoques, sobre todo en condiciones de difícil medición. Por medio de los mismos se ha encontrado una alternativa con carácter predictivo que permite, como medida indirecta, seleccionar animales más eficientes (si los marcadores fueron validados en los mismos sistemas de producción).

Hoy en día al ser la producción ganadera uno de los rubros más importantes en nuestro país, el sector se ha focalizado en el mejoramiento genético para ser más eficientes en todo el proceso, disminuyendo los costos de producción y generando mayores ingresos netos al sector. Es por esto, que genes candidatos como el gen que codifica para el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I), asociado a la ganancia diaria sin incrementar el consumo, podría ser de gran utilidad en la selección de reproductores. Para que esto sea posible es imprescindible someter a este marcador a un proceso de validación para determinar si el mismo se asocia significativamente a dicha característica en nuestro sistema de producción.

El objetivo general de este trabajo es estudiar la asociación entre un SNP de IGF-I ubicado en la región promotora del gen que codifica para la síntesis de IGF-1 y características de crecimiento en terneras Angus.

Este trabajo presenta los siguientes objetivos específicos:

1. Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP de IGF-1 y determinar si se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W).
2. Estudiar la asociación entre las variantes alélicas (A y B) del gen que codifica para la síntesis de IGF-1 y los efectos genéticos aditivos (DEPs) y los efectos fenotípicos de PDC y P18C en terneras Aberdeen Angus para las condiciones de producción del Uruguay.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el presente trabajo se realiza una caracterización de la raza Aberdeen Angus que fue la utilizada en esta investigación y se revisa el concepto de marcador molecular y sus usos, particularmente referido a bovinos de carne. Se centra el enfoque en IGF-I y su posible vinculación con aspectos de crecimiento. Adicionalmente se señalan otros aspectos ambientales que pueden afectar el crecimiento en conjunto con otros efectos genéticos.

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA RAZA ABERDEEN ANGUS

Las razas británicas son consideradas razas precoces, es decir que dependiendo del nivel de alimentación, pueden alcanzar su punto de terminación a diferentes edades permitiendo su comercialización temprana.

Aberdeen Angus es una raza carnífera de origen escocés. Su carne se destaca por la ternura y el sabor debido a su característico marmoleado (grasa intramuscular). Las madres caracterizan a la raza por la facilidad de parto, fertilidad y longevidad. Son animales catalogados rústicos que se adaptan fácilmente a los diferentes climas, suelos y condiciones alimenticias. Es una raza que a su vez presenta menos susceptibilidad a enfermedades (Sociedad de Criadores de Angus del Uruguay, s.f.).

La suma de sus atributos ha llevado a que la raza Aberdeen Angus haya tomado relevancia a nivel mundial, tanto para la producción carne a partir de cruzamientos como para la producción de carne a partir de la raza pura, destacándose la producción en países como Canadá, Australia, Nueva Zelanda, EEUU, Argentina, Gran Bretaña, Irlanda y otros países con producción ganadera (Sociedad de Criadores de Angus del Uruguay, s.f.).

Desde principios de los años 90, se realizan evaluaciones genéticas para varias características de valor económico relevante en las principales razas de ganado de carne. Particularmente, la Sociedad de Criadores de la raza Aberdeen Angus (SCAA) de Uruguay comenzó su evaluación genética nacional en convenio con la Facultad de Agronomía en 1992: Sistema Nacional de Evaluación de Reproductores Aberdeen Angus. El trabajo de la ARU, Facultad de Agronomía, y posteriormente el INIA, en conjunto con la SCAA permitió el desarrollo de estas evaluaciones.

La evaluación genética de los reproductores se ha realizado mediante la metodología de los modelos mixtos, también conocida metodología B.L.U.P. (del inglés Best Linear Unbiased Predictor). Este método contempla simultáneamente

el efecto de factores ambientales y genéticos. De este modo se obtienen las mejores predicciones de los animales a partir de la información disponible. La evaluación genética poblacional consiste en la estimación del mérito genético perteneciente a una población considerando la información productiva y la genealogía de los animales. La mitad del valor genético estimado es igual a Diferencia Esperada en la Progenie (DEP) y es comparable entre todos los animales que integran la evaluación poblacional independientemente del sexo, edad, establecimiento o año de nacimiento. Son una predicción del mayor o menor desempeño medio esperado (“nivel genético” en una característica) de los futuros hijos de un reproductor respecto a otro, también presente en la misma evaluación genética poblacional. Generalmente se expresan en la misma unidad de medida de la característica (por ejemplo: kilos, centímetros, etc.) (Pravia et al., s.f.).

Actualmente, la información que nos brindan los DEP, son evaluaciones para las características: peso al nacer, habilidad lechera, peso al destete, peso a los 15 y 18 meses, circunferencia escrotal, área de ojo de bife, espesor de grasa subcutánea y marmoleo, todas estas, de gran importancia económica y productiva (Pravia et al., s.f.).

2.2 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son fragmentos específicos de ácido desoxirribonucleico (ADN), correspondiente a regiones expresadas o no de genoma, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Al ser heredables, permiten identificar la presencia o posición de un gen de interés o la herencia de una característica en particular. Conociendo su ubicación, permite identificar animales genéticamente superiores para la característica buscada, ya que en la descendencia las características de interés seguirán generalmente unidas a los marcadores moleculares. Por lo tanto, se podrían seleccionar individuos en los que el marcador esté presente ya que el mismo indica la presencia de la característica deseada.

Estos marcadores moleculares son válidos para la población y el ambiente donde se identificaron (por ejemplo sistemas en confinamiento vs. sistemas en pastoreo) y expresan una pequeña parte de la varianza genética. Pueden estar asociados indirectamente a otras características productivas y la magnitud de los efectos depende del trasfondo genético el cual puede variar entre razas (Corva, 2009).

2.3 MARCADORES MOLECULARES Y SU IMPLICANCIA EN CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN GANADO DE CARNE

Una de las herramientas fuertemente utilizadas en la biotecnología molecular son los marcadores genéticos, los cuales tienen diferentes aplicaciones potenciales, como por ejemplo, para el establecimiento de paternidades (Heaton et al. 2002, Salazar-Marroquín et al. 2004), para determinar si los progenitores son portadores de enfermedades genéticas, presentan algún defecto ó para establecer la presencia de características cualitativas como sería la presencia de cuernos ó color del pelaje.

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo, es decir, que existan distintas variantes o "alelos" del marcador dentro de la población bajo estudio. A su vez, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y confiable, (Cheng y Crittenden, 1994).

El principal objetivo de la aplicación de la biotecnología molecular en el mejoramiento genético animal ha sido la identificación, mapeo y análisis del polimorfismo de los genes involucrados en la principal vía metabólica relacionada al crecimiento animal y la distribución de los nutrientes en los diferentes tejidos (Schwerin et al., 1995). Estas investigaciones han permitido la verificación de asociaciones entre genotipos con la producción de carne y características que le confieren calidad.

El interés en el uso de los marcadores genéticos se ha concentrado en la precisión de la predicción del mérito genético de animales para características que son difíciles ó costosas de medir. Estas características incluyen la eficiencia alimenticia y eficiencia reproductiva, resistencia a enfermedades, y la composición de la canal (Thallman, 2004). El interés en la generación de marcadores genéticos para este tipo de características se debe a que el mejoramiento genético usando métodos convencionales, basados en las diferencias esperadas en la progenie, es un proceso lento. Con la incorporación de marcadores moleculares sería posible acelerar el proceso de mejoramiento genético.

2.3.1 Tipos de marcadores moleculares

Existen varios tipos de marcadores genéticos, que difieren entre sí en su estructura, distribución, estabilidad y forma de transmisión. Como

consecuencia de estas diferencias, se utilizan de manera complementaria, ya que aportan distintos tipos de información sobre el individuo.

La identificación de los diferentes alelos del gen y su seguimiento en la descendencia se puede realizar: directa o indirectamente. La selección directa consiste en identificar el polimorfismo responsable del cambio fenotípico, siendo el SNP el tipo de marcador más utilizado. La selección indirecta consiste en identificar un polimorfismo cercano al gen de interés (en este caso es muy importante la distancia entre el marcador y el gen de interés). Para este tipo de selección se cuenta con otro tipo de marcadores que son, entre otros, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuencias repetidas cortas (SSR o microsatélites).

Dentro de las distintas clasificaciones o agrupamientos que existen de los marcadores moleculares, a continuación (Cuadro 1) se muestran los marcadores que para su determinación se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuadro 1. Principales tipos de marcadores de ADN y métodos de detección

Tipo de Marcador	Acrónimo	Alias	Requiere
Polimorfismo de base única	SNP's		ADN clonado, secuencias, etc.
Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción	RFLP		ADN clonado usualmente
Secuencia Repetidas Cortas	SSR	Microsatélite	ADN clonado y secuencias

Fuente: adaptado de Dodgson et al. por Aranguren-Méndez et al. (2004).

2.3.1.1 Polimorfismo de base única (SNP's)

Un polimorfismo de un solo nucleótido es una variación en la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) que afecta a una sola base (Adenina, Timina, Citosina o Guanina) de la secuencia del genoma. En la Figura 1 se muestra cómo difieren la cadena de ADN1 a la cadena de ADN2 en un solo par de bases.

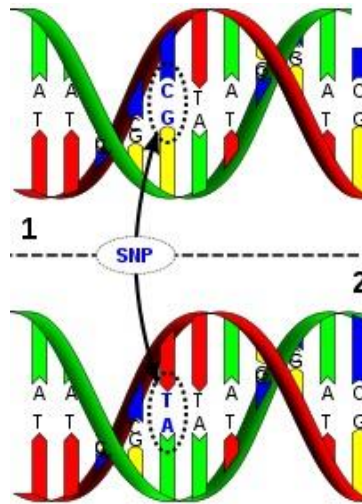


Figura 1. Polimorfismo de un solo nucleótido (Gibson y Muse, 2004).

Los SNP's son un tipo de polimorfismo que corresponde a la diferencia en la posición de un nucleótido, que puede estar explicado por una sustitución, una delección o inserción de un solo nucleótido. La mayoría de este tipo de polimorfismo presenta sólo dos tipos de alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos.

En la actualidad se disponen de paneles con 776 mil SNP (800k), siendo posible secuenciar por completo el genoma bovino. Su aplicación es posible en proyectos de investigación ya que es una herramienta costosa para usarlo a nivel comercial (Ravagnolo et al., 2010).

En algunas ocasiones estas regiones polimórficas se sitúan dentro de la secuencia codificante de un gen y cada uno de los alelos puede determinar una variante del producto del gen. En otros casos, su localización es en la región promotora, alterando la cantidad y calidad de expresión del gen. Pero también pueden localizarse en regiones no codificantes de tal modo que los distintos alelos no tienen traducción funcional alguna (al menos conocida). Un número importante de estas mutaciones que corresponden a sitios de genes codificantes, se han asociado a enfermedades u otra expresión fenotípica. Su alta frecuencia en el genoma y su baja tasa de mutación hacen que se constituyan como elementos deseables para la construcción de mapas genéticos (Aranguren-Méndez et al., 2004).

Cada individuo hereda de sus progenitores un conjunto único y exclusivo de alelos de estos polimorfismos genéticos. El resultado de la combinación es único y absolutamente diferente al de cualquier otro individuo.

Por eso, el análisis de los polimorfismos genéticos presentes en los individuos permite establecer un patrón genético individual para cada uno de ellos, una huella genética individual, que los caracteriza.

2.3.1.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular *in vitro* que permite la amplificación de una región específica del ADN, que se encuentra entre dos regiones de secuencia conocida del ADN, indicadas por los primers o cebadores, siendo éstos una molécula de ácidos nucleicos de una sola cadena que se usa para iniciar una reacción de PCR. Desde la aparición del PCR, el RFPL es una de las primeras técnicas descritas (Botsein et al., 1980) que consiste en visualizar las diferencias a nivel de la estructura del ADN, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios donde se encuentran una secuencia específica de nucleótidos.

Este método puede utilizar ADN genómico o el producto de la amplificación de un PCR. La identificación de los fragmentos (RFLPs) requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos que difieren en tamaño. Esta técnica tiene como limitaciones que únicamente identifica dos alelos por locus, por lo que la variabilidad obtenida es reducida. Otra limitación de esta metodología, particularmente para la búsqueda de polimorfismo en productos de PCR, es que no es 100% metodológicamente efectiva, ya que muchos SNPs potenciales podrían no cambiar un sitio de restricción, y por tanto no serían detectados en dicha técnica (Vance y Othmane, 1998).

En la Figura 2 se muestran dos situaciones: una donde la enzima de restricción reconoce el sitio de corte quedando dos fragmentos (27 y 13 pares de bases (pb)); y otra situación donde existe una mutación y por lo tanto la enzima no corta, obteniéndose así un único fragmento (40pb).

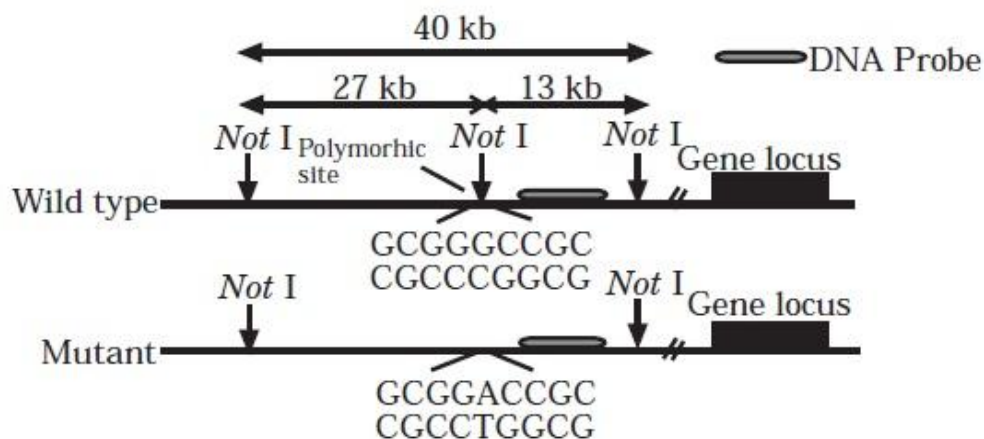


Figura 2. Polimorfismo de longitud de fragmentos de Restricción (adaptado de Beuzen et al., 2000).

2.3.1.3 Microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSC)

Desde su descubrimiento en 1989 (Litt y Luty 1989, Tautz 1989, Weber y May 1989), el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. Se definen como segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten un número variable de veces y de forma aleatoria, una a continuación de la otra, siendo ese número el elemento diferenciador entre alelos. La secuencia de las regiones flanqueantes a ambos lados son iguales en el genoma de los seres vivos, como se observa en la Figura 3, la cual es un ejemplo de un di-nucleótido A-C(n) (Aranguren-Méndez et al., 2004).

Los mismos son considerados como una poderosa herramienta para estudios genéticos, ya que son de herencia mendeliana simple, presentan un elevado grado de polimorfismo, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100%, y son repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein y Schlotterer, 1999).



Figura 3. Microsatélites (Aranguren-Méndez et al., 2004).

2.4 TÉCNICAS DE GENOTIPADO

Las diferentes técnicas (una o combinaciones) se han desarrollado específicamente para genotipar los diferentes tipos de marcadores y muchas veces el nombre de la técnica de genotipado coincide con el nombre del tipo de marcador.

2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Mediante esta técnica los fragmentos amplificados en el PCR son luego sometidos a un ensayo de enzimas de restricción. Dicho ensayo tiene como objetivo cortar el ADN en regiones donde reconoce la secuencia específica de nucleótidos para luego con una corrida de electroforesis detectar los diferentes polimorfismos mediante la diferencia en el tamaño de los fragmentos de restricción.

2.4.2 Alta resolución de la temperatura de disociación (HRM)

El análisis de las curvas de disociación de ADN obtenidas con dispositivo HRM (por su sigla en inglés High Resolution Melting), es un método post-PCR simple, rápido y efectivo, recientemente desarrollado para el genotipado de SNPs. Este método con excelente sensibilidad y especificidad permite discriminar las variantes alélicas homocigotas por sus temperaturas de disociación, temperatura en la cual el 50% de las moléculas se encuentran disociadas (T_m). Esta temperatura está afectada por el tamaño del amplicón (fragmentos amplificados) y la composición en bases nucleotídicas. Por ejemplo, amplicones con altas proporciones de combinaciones C-G (unión que presenta 3 puentes de hidrógeno) requieren una mayor temperatura para su desnaturalización, mientras que amplicones con alta proporción de uniones A-T

(unión que presenta 2 puentes de hidrógeno) la temperatura requerida para su disociación es menor. Las variantes alélicas heterocigotas se diferencian de las homocigotas por la forma de la curva de disociación (Liew et al., 2004).

En la fase exponencial del proceso de amplificación existe una correlación entre el producto amplificado y el ADN presente en la muestra, donde el nivel de fluorescencia es proporcional al producto amplificado en cada ciclo.

La señal fluorescente es generada por el intercalado de sondas fluorescentes en los productos de ADN de doble cadena. Luego de los ciclos de PCR, el fragmento a analizar ya ha sido amplificado y por lo tanto una gran fluorescencia se encuentra en el estado de hibridación. Los niveles de fluorescencia bajan levemente hasta la temperatura cercana a la T_m , como se puede observar en la Figura 4, produciendo un decrecimiento drástico en la fluorescencia. Esto es monitoreado por el PCR-HRM mostrando lo que ocurre en el amplicón con los cambios de temperatura en la transición de la doble hebra de ADN a simple hebra (Herrmann et al., 2006).

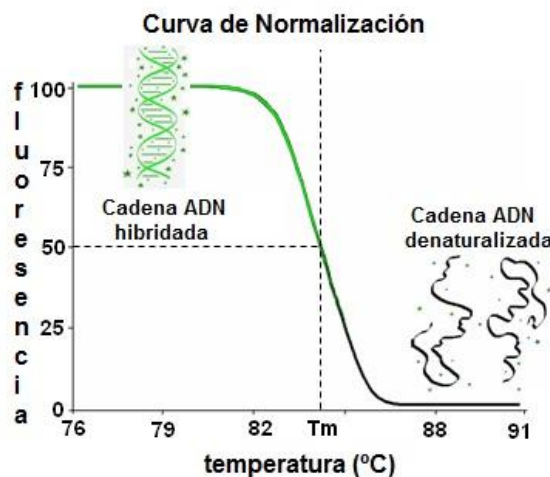


Figura 4. Curva de Normalización (adaptado de High-resolution... 2008).

Una muestra homocigota comprende un único homoduplex, mientras que los heterocigotas presentan cuatro diferentes moléculas, dos heteroduplex, y dos homoduplex. En la Figura 5 puede observar que cuando se realiza la disociación, cada homoduplex exhibe una curva con diferente temperatura (AA y GG) y el heteroduplex exhibe una única curva (AG) acorde con la temperatura de la mezcla de los 4 duplex (Liew et al., 2004).

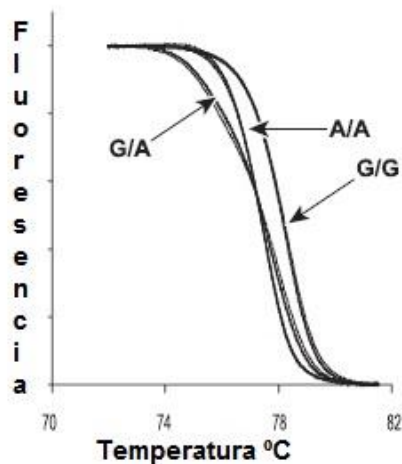


Figura 5. Genotipos presentes en curva de HRM normalizada (adaptado de Liew et al., 2004).

2.5 UTILIZACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Desde hace ya algún tiempo, se ha planteado que los marcadores genéticos cambiarán la forma en que se selecciona a los animales (Casas, 2007).

A partir de los marcadores moleculares es posible identificar distintos alelos de un gen candidato que puede o no tener un efecto fenotípico sobre una característica particular, definir cuál es el genotipo más favorable y rastrearlos en la descendencia (McPeake, 2003).

La metodología adecuada para calcular en forma precisa el mérito genético de un animal, podría ser combinando la información fenotípica medida en el animal (DEP), con la información de los marcadores genéticos. De esta manera las DEP son ajustadas por el efecto que el marcador genético tenga para ese locus de una característica o rasgo cuantitativo (Quantitative trait loci, QTL). Esta es la forma más eficiente de usar la información de los marcadores genéticos en el proceso de selección para una característica cuantitativa (Casas, 2007).

2.5.1 Selección asistida

La utilidad de los QTL es de gran importancia, dado que estas secuencias pueden utilizarse para llevar a cabo el genotipado de individuos en las distintas poblaciones de especies animales. A este tipo de selección se le ha

denominado selección asistida por marcadores (SAM), utilizando un marcador cercano al QTL y selección asistida por genes (SAG), usando el propio QTL como marcador (Dekkers et al., 2004).

La SAM y la SAG son dos herramientas poderosas en el mejoramiento de plantas y animales (Vienne et al. 2003, Dekkers et al. 2004, Makker et al. 2005).

La SAM brinda potenciales beneficios a aquellos caracteres que tengan baja heredabilidad (por ejemplo, fertilidad), sean difíciles o costosos de medir (resistencia a enfermedades), que no pueden medirse hasta que el animal haya contribuido a la siguiente generación (por ejemplo, características de carcasa), que no son seleccionadas en el presente porque no son medidas rutinarias (por ejemplo, ternera), o características que están genéticamente correlacionadas con alguna característica que no se quiera incrementar (Parret, 2005).

Según Casas (2007), actualmente la selección de animales se basa en su mérito genético, el cual se evalúa a través de las DEP. La implementación de la selección asistida por marcadores ha permitido potenciar los programas de mejoramiento genético (Dekkers y Hospital 2002, Ron y Weller 2007, Neuner et al. 2009). Estos programas de selección basados en información de DEPs en combinación con la SAM, permiten mejorar la productividad, seleccionar los mejores progenitores en base a su genotipo y seleccionar las características deseadas de manera confiable en etapas tempranas del desarrollo.

Con la implementación de programas de selección asistida con marcadores en ganado bovino, se esperaría que las frecuencias alélicas de esta especie experimenten cambios significativos con consecuencias que pudieran afectar a las poblaciones bovinas.

De acuerdo a Van Eenennaam (2006), las siguientes características serán las que obtendrán mayor grado de beneficio de la selección asistida por marcadores: resistencia a enfermedades, calidad-cantidad y rendimiento de canal y atributos de palatabilidad, fertilidad y eficiencia reproductiva, producción lechera y habilidad materna y por último características de crecimiento.

La información basada en biología molecular hace mucho tiempo sostiene que es posible mejorar la predicción de los animales usando primero las características fenotípicas, en segundo lugar con marcadores moleculares, y más recientemente con SNP (Garrick et al., 2011). Una variante de la SAM es la llamada selección genómica, propuesta por Meuwissen et al. (2001), en dicha selección es posible analizar miles de SNPs a lo largo de todo el genoma e

identificar conjuntos de ellos como forma de predicción genómica. Las características principales de este método son que se utilizan la totalidad de marcadores del genoma de modo que toda, o gran parte, de la variación genética se explique por los mismos, y minimizar los efectos de QTL (Goddard y Hayes, 2007).

La principal limitación de la aplicación de la selección genómica ha sido el gran número de marcadores necesarios y el costo del genotipado de los mismos. Recientemente ambas limitaciones han sido superadas en la mayoría de las especies debido a la secuenciación de los genomas, disponibilidad de miles de SNP, y los avances en la tecnología de genotipado que han disminuído los costos (Goddard y Hayes, 2007).

2.5.2 Aplicación práctica de los marcadores

En un mercado competitivo, los animales candidato (por encima del promedio) son aquellos que mejoran la satisfacción del consumidor, influyendo en la calidad de la alimentación inmediata, el costo de compra, las consecuencias del consumo en la salud a largo plazo, el cuidado del medio ambiente en la producción y procesamiento de la carne de vacuno; y el bienestar de los animales. Los consumidores satisfechos demandan y pagan más por el producto que desean y bajo condiciones de competencia perfecta esta voluntad se refleja a lo largo de la cadena de producción por el aumento de precios en la explotación de los productores de vacas y terneros (Garrick, 2011).

Es por esto que en lo que refiere a la cría de ganado vacuno, tanto instituciones privadas como públicas han validado el uso de algunos marcadores moleculares en diferentes características de manera de mejorar la eficiencia productiva.

Con respecto al uso de SNPs específicos asociados a indicadores reproductivos, el sistema IGF-1 y la insulina afectan tanto el crecimiento y el desarrollo como la sobrevivencia de los folículos (Lucy 2000, Web et al. 2004). Varios estudios apoyan la hipótesis de que los niveles circulantes de IGF-1 en el periparto son buenos indicadores de la capacidad de retorno a la ciclicidad ovárica, o sea, del largo del anestro post parto (Roberts et al. 1997, Beam y Butler 1998, Meikle et al. 2004).

Se han utilizado marcadores moleculares para estimar el consumo residual de alimento (CRA). Evidencias recientes (Moor et al. 2003, Schenkel et al. 2005, Nkrumah et al. 2007) han demostrado que las concentraciones en sangre de IGF-1 y de leptina estarían asociadas a características productivas

como crecimiento, características y calidad de carcasa, consumo de materia seca y CRA. Es así que, conjuntamente con la hormona de crecimiento (GH del inglés: growth hormone), reguladora de la síntesis de IGF-1, son potencialmente buenos genes candidato para el estudio de marcadores genéticos (Carriquiry y Meikle, 2008). Más recientemente, un SNP en el gen ghrelina tendió a mostrar efectos en el CRA, conversión alimenticia y eficiencia de crecimiento parcial (Sherman et al., 2008). Estos trabajos han sido generados en Norteamérica, Europa y/o Australia, pero no se han encontrado reportes al respecto en nuestra región.

Respecto a la calidad de la carne se han estudiado los genes que codifican para las enzimas Calpastatina y Calpaina así como la identificación de algunas variantes en estos genes que proporcionan mayor o menor terniza a la carne (Casas et al., 2006). Estas enzimas, con actividad antagónica, están presentes normalmente en los músculos y actúan coordinadamente sobre los procesos de maduración “post mortem”, fragmentando las proteínas de las células musculares en unidades más pequeñas, lo que confiere mayor terniza (Fernández, 2005). Se han identificado marcadores para los genes que codifican para ambas enzimas (Johnston y Graser, 2010).

Otra determinante de la calidad del producto es el marmolado o veteado de la carne, el cual es difícil de medir y seleccionar por los métodos clásicos. Es una característica cuantitativa afectada por muchos genes y existe una gran variación entre individuos y razas (Casas et al., 2007). Por este motivo la detección de marcadores moleculares asociados a esta característica puede asistir en la selección de reproductores. Grisart et al. (2004) identificaron un polimorfismo en el gen bovino DGAT1 que genera dos variantes alélicas para la enzima diacil-glicerol acetil transferasa: alelo A (alanina) y alelo K (lisina). El alelo K hace que la enzima sintetice más triglicéridos en menos tiempo que el alelo A, generando más grasa intramuscular. El polimorfismo responsable del cambio aminoacídico es la sustitución de dos nucleótidos (AA por GC) en el exón VIII de DGAT1 (Winter et al. 2002, Thaller et al. 2003). Por otro lado, el gen TG codifica para la tiroglobulina, también asociada con los niveles de deposición de grasa intramuscular. Este gen presenta un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que ha sido asociado a variaciones en los niveles del veteado en ganado vacuno y se incluye en pruebas comerciales de ADN. Una sustitución de una citosina por una timina da lugar a dos alelos: C y T. Los animales heterocigotas u homocigotas para el alelo T (CT o TT) presentan mayores registros de veteado que los homocigotas para el alelo C (Barendse et al. 2004, Casas et al. 2005, Van Eenennaam et al. 2007).

El gen de la leptina (LEP) que está involucrado en el metabolismo lipídico, entre otros, afecta la deposición de grasa en la carne y por tanto puede estar asociado también a variaciones del veteado. Existe una sustitución de citosina por timina en el exón 2 del gen que genera un cambio aminoacídico de arginina por cisteína en la proteína resultante, estando el alelo T asociado a un mayor contenido de grasa (Buchanan et al. 2002, Soria y Corva 2004, Schenkel et al. 2005).

En el Cuadro 2 se muestran algunos marcadores utilizados comercialmente tanto para bovinos como para ovinos.

Cuadro 2. Algunos marcadores utilizados a escala comercial

Locus/Gen/QTL	Nombre/Función	Característica afectada
Especie Bovina		
DGAT1	Diacilglicerol acetiltransferasa	Composición de la leche
CAPN1	u-calpaína	Terneza de la carne
CAST	Calpastatina	Terneza de la carne
LEP	Leptina	Engrasamiento de la canal
TG	Tiroglobulina	Engrasamiento intramuscular
MSTN	Miostatina	Doble musculatura
IFNG	Interferón gama	Resistencia a nematodos
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento	Peso al destete y canal
Especie Ovina		
PRNP	Proteína prión	Resistencia/susceptibilidad de scrapie
CLPG	Gen Callipyge	producción de músculo/carne
BOF	Gen Boroola	Fecundidad/prolificidad
FGFR3	Síndrome de patas de araña	Anormalidad esquelética
IFNG	Interferón gama	Resistencia a nematodos

Fuente: adaptado de Cokett et al. (1999), Switoiski et al. (2002), Casas et al. (2003), Tupac-Yupanqui et al. (2004), Charon (2005), Wimmers et al. (2005), Casas (2006), López-Zavala et al. (2007)

2.6 FACTORES QUE INFLUYEN EN CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO

Existen muchos factores que influyen en las características de crecimiento, pero se hará referencia a dos: Edad de la madre y alimentación durante el invierno.

2.6.1 Edad de la madre

La edad de la madre puede tener influencia en el peso de los terneros al nacer y en su posterior crecimiento. Madres de menor edad, primíparas de 2-3 años, no han culminado su crecimiento y desarrollo, por lo que este factor puede ir en desmedro del peso al nacer de los terneros. Lo mismo ocurre con la producción de leche, las madres jóvenes destinan energía y nutrientes al crecimiento, por lo que la partición para la producción de leche es menor que madres de mayor edad. Según Vaccaro et al. (1995), las vacas más jóvenes mostraron claras desventajas en comparación con las adultas en el peso al nacer de los terneros. Vacas madres de 7 y 3 años de edad parieron terneros más pesados al nacer que otras madres (William et al., 2002).

2.6.2 Alimentación durante el invierno

En el invierno la oferta de forraje del campo natural es significativamente menor en comparación con las estaciones de primavera, verano y otoño. Esto genera una restricción en la alimentación del animal en dicha estación, con consecuentes pérdidas de peso.

Generalmente el destete de terneros se realiza a los 6 meses de edad, por lo tanto, terneros paridos en primavera serían destetados en otoño, por lo que el primer pastoreo posdestete lo realizarían en una estación crítica de oferta de forraje. Dicha restricción afecta el peso y edad con que los animales alcanzan la pubertad, la cual va a variar según el manejo que se realice durante el invierno con los terneros destetados (Strauman et al., 2008).

Estudios de Strauman et al. (2008), muestran que dichas pérdidas pueden ser compensadas cuando mejoran las condiciones de alimentación, pero el tiempo que requiera un animal para su recuperación, depende de la severidad de dicha restricción. Esta respuesta compensatoria puede durar hasta un año, pero las altas tasas de ganancia durante primavera y verano, en algunos casos no son suficientes para revertir dicho efecto. Esto coincide por lo reportado por Barreto et al. (2008), quienes concluyen que la tasa de ganancia invernal fue el factor más importante en determinar el porcentaje de animales púberes en dicho estudio.

2.7 FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-I (IGF-I)

La IGF-I es un polipéptido constituido por 70 aminoácidos con un peso molecular 7,5 kDa (Daughaday y Rotwein, 1989). Su secuencia aminoacídica, es idéntica tanto en humanos, perros, ganado, como en cerdos (Nixon et al.,

1999). Forma parte de un grupo de factores de crecimiento similares a la insulina (Te Pas et al., 2004), que provocan respuestas biológicas a través de una amplia distribución de receptores (IGFR-I) que son distintos al receptor de insulina (Wood et al., 2005).

El sitio primario de síntesis de la IGF-I es el hígado siendo el principal regulador e integrador del estatus metabólico de los animales (Wang et al., 2003), actuando a nivel local en órganos específicos o globalmente a través de IGF-I circulante (Werner et al., 1994). La síntesis de esta hormona se da en respuesta a una serie de estímulos fisiológicos que regulan la liberación en la adenohipófisis de la GH, la cual debe unirse a su receptor (GHR), para poder cumplir sus funciones. Dicha hormona actúa sobre las fluctuaciones en las concentraciones en sangre de glucagón, insulina, IGF-I y hormonas estrogénicas (Enrigh et al., 1993). El eje GH-IGF, es uno de los factores propuestos como mediadores entre los efectos metabólicos nutricionales, el desarrollo fetal y el potencial crecimiento de las crías (Höppener et al., 1985).

La GH o Somatotrofina, es la principal reguladora del crecimiento somático, estimulando procesos anabólicos como la división celular, crecimiento óseo y síntesis proteica tanto en la etapa fetal como en la posnatal (Renaville et al., 2010). La GH actúa directamente sobre los tejidos adiposo, muscular y hepático. Muchas veces regula en forma indirecta los procesos anabólicos, estimulando otras glándulas para que produzcan las sustancias que se encargan de regular el crecimiento (Te Pas et al., 2004). Gran parte de las acciones de la GH están mediadas a través del hígado por IGF-I (Le Roith et al. 2001, Wood et al. 2005).

En el ganado vacuno, el gen que codifica para la hormona IGF-I se localiza en el cromosoma 5 (Miller et al. 1991), y es sintetizado por la mayoría de los tejidos del cuerpo (Wang et al., 2003). Es conocida como una hormona anabólica y sus acciones biológicas son: por un lado, aumentar el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas en el tejido muscular, promover la absorción y utilización de glucosa en el tejido adiposo y promover la mineralización del tejido óseo. Además de la acción anabólica, dicha hormona está genéticamente correlacionada con el crecimiento, con características de la canal de ganado de carne (Johnston et al. 2002, Davis et al. 2003, Moore et al. 2005) y con la eficiencia de la alimentación (Johnston et al. 2002, Moore et al. 2005) presentando un vínculo importante entre la regulación de ingesta de nutrientes y su utilización. Dado estas características, el gen que codifica la síntesis de IGF-I es un candidato potencial como marcador para la tasa de crecimiento y características de producción de carne de interés comercial (Siadkowska et al., 2006).

Con respecto a la heredabilidad de IGF-I en sangre, estudios de selección en ganado Angus, demostraron una alta heredabilidad ($0,48 \pm 0,13$) para niveles séricos medios de IGF-I durante el período posdestete, lo que sugiere un fuerte control genético aditivo de este factor de crecimiento (Davis y Simmen, 1997). Al día del destete, 28d, 42d y 56d posdestete, las mismas presentaron valores de 0.44 ± 0.07 , 0.51 ± 0.08 , 0.42 ± 0.07 y 0.52 ± 0.08 , respectivamente. Resultados de estudios anteriores también proveen evidencia de que la heredabilidad para la concentración de IGF-I en sangre, son moderadas a altas para el ganado vacuno.

Los niveles de concentración séricos de IGF-I se asocian con las características de crecimiento en muchas especies de ganado (Anderson et al. 1988, Graml et al. 1994). Varios autores (Davis y Simmen 1997, Ge et al. 2001) han verificado la existencia de una correlación genética negativa entre el peso corporal y ganancia de peso posdestete, con la concentración en sangre de IGF-1 en ganado de carne Angus. A su vez, dicha correlación, está asociada a un genotipo determinado.

En los estudios de Ge et al. (2001) y de Curi et al. (2005) se ha observado la presencia de dos variantes génicas, alelo A (nucleótido Timina) y alelo B (nucleótido Citosina) para el polimorfismo IGF-I localizado en la región promotora), siendo este polimorfismo reconocido por la enzima de restricción SnaB1 (IGF-I/SnaB1) por la técnica RFLP de genotipado. El genotipo AA es caracterizado por la presencia de dos fragmentos de restricción de 226 y 23 pb, mientras que el genotipo BB, fue determinado por la presencia de un único fragmento de 249 pb. En el caso de los individuos con genotipo AB, están representados por los tres fragmentos de 249, 226 y 23 pb. Curi et al. (2005) evaluaron, entre otras razas, animales $\frac{1}{2}$ Angus y observaron que presentaron los grupos genéticos AB y BB, con una frecuencia de 0,641 y 0,359 respectivamente, con ausencia del genotipo AA. Ge et al. (2001) encontraron también los alelos A y B, apareciendo el alelo B en mayor frecuencia pero a diferencia de Curi et al. (2005), fueron encontrados los tres genotipos: AA, AB y BB.

A su vez, los autores mencionados anteriormente, verifican la existencia de una asociación significativa de los genotipos BB y AB con las ganancias de peso en ganado Angus, especialmente los primeros 20 días posdestete, donde se observó un efecto de dominancia del alelo B sobre el alelo A. En estudios realizados por los mismos autores, el genotipo BB fue superior al genotipo AA pero no se encontraron diferencias significativas entre el genotipo BB y el AB. Ge et al. (2001) proponen que el alelo B puede estar asociado a una menor

actividad transcripcional del gen IGF-I, donde el genotipo BB se identificaría con menores concentraciones séricas del gen IGF-I, y consecuentemente, mayores pesos corporales de los individuos BB respecto a los AA.

Curi et al. (2005) encontraron asociaciones significativas entre los dos genotipos y las características de producción, siendo más favorable el genotipo homocigoto BB para todas las características evaluadas: ganancia diaria, peso de la canal caliente, rendimiento de la carcasa, área del músculo Longissimus dorsi y espesor de grasa dorsal. Dichas características fueron evaluadas posdestete en condiciones de confinamiento. El genotipo BB fue superior al genotipo AA pero no se encontraron diferencias significativas entre el genotipo BB y el AB.

Por otro lado, Herd et al. (2002) encontraron una relación negativa entre la concentración de IGF-1 en sangre medido al final del período posdestete, y el efecto materno en el peso al nacimiento y al destete, lo que indica que la selección contra la concentración de IGF-1, debe conducir a una mejor nutrición de la madre al ternero previo al destete.

Estos resultados también coinciden con Davis y Simmen (1997), Moore et al. (2005), quienes verificaron la existencia de una correlación genética negativa entre el peso corporal y ganancia de peso posdestete, con la concentración en sangre de IGF-I en ganado de carne.

Según Siadkowska et al. (2006) se encontraron diferencias significativas entre la asociación de IGF-I y los distintos genotipos, para tasa de crecimiento, consumo y eficiencia de conversión del alimento durante los 7-8 meses de vida. Tanto toritos como vaquillonas que presentaban el genotipo BB, consumieron menor cantidad de alimento por kg de peso ganando (expresado como proteína cruda y materia seca), que aquellos individuos con genotipo AB. La tasa de crecimiento para animales con genotipo BB fue mayor que para los otros genotipos, pero la diferencia en la ganancia media diaria de pesos vivo fue significativamente diferente entre el genotipo BB y el AB ($p=0,001$).

De manera contraria, Weekes (1996) reporta que en los linajes de ovejas seleccionadas para alto peso al destete con elevadas concentraciones en plasma de IGF-I, se obtienen mayores canales con mayor deposición muscular.

En el caso de ganado lechero, se encontraron altos niveles de IGF-I en sangre en ganado Simmental y en vacas lecheras Holstein, mostrando una asociación positiva entre el nivel sérico y la tasa de crecimiento (Schlee et al.

1994, Sirotkin et al. 2000). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros estudios (Istasse et al. 1990, Yelich et al. 1996), pero se contradice con lo mencionado por los autores descritos para ganado Angus, entre otras razas carniceras.

Es posible que el gen IGF-I tenga efectos diferentes en diferentes etapas de crecimiento, ya que la expresión del gen IGF-I es desarrollado y fisiológicamente regulado (Werner et al., 1994). Sin embargo, el genotipo BB (homocigota para el alelo C) se encuentra asociado con mayor peso al destete (Li et al., 2004).

2.8 HIPÓTESIS

En base a los antecedentes desarrollados y al rol que tiene la IGF-I en la regulación de la proliferación celular y el crecimiento animal, el gen que codifica para la síntesis de IGF-I podría ser considerado gen candidato y por lo tanto un marcador potencial para la tasa de crecimiento y características de producción de carne.

Existe una asociación positiva entre el SNP de IGF-I ubicado en la región promotora (particularmente la variante alélica B), con características de crecimiento en terneras Angus.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTREO DE ANIMALES

Se tomaron muestras de sangre en 937 terneras nacidas en la primavera 2009, provenientes de varias cabañas representativas de la población Aberdeen Angus, con alta incidencia en los rodeos comerciales.

Se les extrajo sangre por punción de la vena caudal mediante tubos Vacutainer®, con anticoagulante formado por solución balanceada de sales sódicas y potásicas de EDTA, pH 7,2, logrando obtener 10ml de sangre y por duplicado para conservar un respaldo. Los tubos fueron refrigerados en conservadoras con refrigerantes hasta la llegada de las muestras al laboratorio.

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Se aplicaron 2 técnicas para la realización de la extracción de ADN, las cuales se describen a continuación.

3.2.1 Extracción a través del folículo piloso

El ADN analizado fue extraído del folículo piloso según el protocolo de extracción con la resina Chelex. Esta resina quelatante ha sido utilizada para la extracción de ADN de diversos tejidos para su uso con el PCR. Se trata de un proceso rápido, económico y sencillo. El protocolo implementado fue el siguiente:

- Separar entre 10 y 12 pelos y cortar con tijera lo más cerca del folículo posible.
- Colocar los folículos en un eppendorf y agregar 200µL de solución CHELEX 5%.
- Incubar en estufa a 50°C durante 24 hrs. o toda la noche.
- Finalizado el período de incubación, centrifugar levemente las muestras (**spin**).
- Colocar los tubos en agua en franca ebullición y hervir durante 8 minutos
- Centrifugar.
- Conservar a 4°C.

3.2.2 Extracción a través de sangre

El ADN genómico analizado fue extraído de sangre entera según protocolo de extracción “salting out” (modificado de Miller et al., 1988).

La concentración de ADN total se determinó mediante absorbancia a 260 nm. La calidad e integridad del ADN aislado se evaluó con las relaciones de absorbancia 260/280, resultando muestras puras (sin proteínas), si sus valores se encontraban entre 1.8 – 2.0. Las relaciones de absorbancia 260/230 menores a 1.6 indican contaminación del disolvente y productos químicos orgánicos (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Miller et al., 1991).

3.3 GENOTIPADO DE ADN

3.3.1 Genotipado del ADN extraído de folículo piloso

La identificación del SNP ubicado en la región promotora del gen bovino de IGF-I se realizó mediante RFLP utilizando SnaBI como enzima de restricción. Este SNP es una sustitución de nucleótido T (alelo A) por nucleótido C (alelo B) identificada en la posición 512 5' del primer codón del primer exón (Ge et al., 2001).

Los animales fueron genotipados para la variante alélica C o T del SNP del gen IGF-I mediante la técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Se utilizaron 3 controles (cc tt y ct) confirmados por genotipado por HRM y por secuenciación (Trujillo et al., 2012).

3.3.1.1 Amplificación

Para la amplificación del fragmento del gen IGF-I se utilizó un conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de la reacción de PCR (lo cual denominamos amplicón), de 249pb, con el uso del siguiente par de cebadores: IGF677F 5'-ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3' localización (a) 1,427–1,446 y reverso IGF897R 5'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATA CGT-3' (a) 1,676–1,648 (Dickson et al., 1991).

El contenido de cada uno de los eppendorf se detalla en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Protocolo de Amplificación

PCR	VOL 20µL
BUFFER 10X	2µL
MgCl ₂ 25 uM	1.2µL
dNTPs	0.4µl
Primer Fower (10uM)	0.6µL
Primer Reverse (10uM)	0.6µl
TAQ polimerasa	0.3µl
ADN de cada ternera	3µl
H2O	11.9µl

El producto resultante fue sometido a PCR, con el siguiente programa: 4 minutos a 94°C, 31 ciclos de 1 minuto a 94°C, 60 segundos a 64°C y 1 minuto a 72°C. Luego de culminados los 31 ciclos, 4 minutos a 72°C (Siadkowska et al., 2006).

Para verificar la amplificación de la región de interés, el producto de PCR obtenido fue corrido en geles de agarosa, el cual será detallado posteriormente.

3.3.1.2 Digestión

Para el ensayo de restricción se utilizó la enzima *Sna*BI (bioron) la cual reconoce el sitio 5'- TAC/GTA 3'.

Se colocaron 10µL del producto de PCR amplificado y 10uL del mix (0.5µL *Sna*BI, 2µL Buffer y 7.5µL agua). Se sometió luego a 3hrs a 37°C constante (Siadkowska et al., 2006).

3.3.1.3 Corrida electroforética

El producto que se obtuvo de la digestión fue sometido a una corrida electroforética.

Se realizó la corrida en gel de agarosa al 2%, a 100V por aproximadamente 60 minutos. Luego, debido al carácter fluorescente del agente intercalante, bromuro de etidio, se visualiza el gel en un transluminador de rayos UV. En la Figura 6 se muestran el patrón de bandas posibles a ser visualizadas:

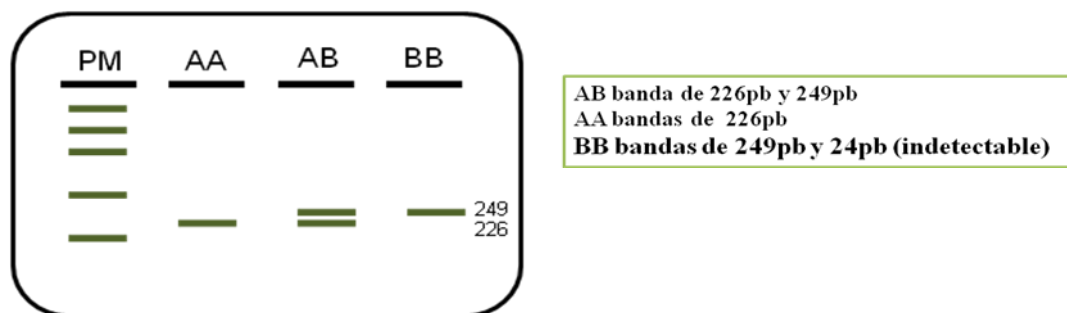


Figura 6. Patrón de bandas visualizadas en corrida electroforética

Esta técnica no se pudo optimizar para ADN extraído a partir del folículo piloso.

3.3.2 Genotipado del ADN extraído de sangre

La información de los genotipos (variantes alélicas) de estos animales fueron proporcionados por el proyecto FPTA 263, siguiendo la técnica como se describe en Trujillo et al. (2012).

3.3.3 Datos fenotípicos y genéticos

La información de los datos tanto fenotípicos como genéticos de las animales bajo estudio fueron aportados por la Sociedad de Criadores Aberdeen Angus del Uruguay.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.4.1 Análisis poblacional

Para la realización del análisis poblacional, fue necesaria una depuración de datos, descartando aquellas cabañas que no tenían información de los 3 genotipos posibles (AA, AB o BB). Tampoco fueron consideradas

aquellas terneras que carecían de los siguientes datos: peso al nacer, peso al destete o peso a los 18 meses. El archivo final incluyó la información de 368 terneras.

3.4.2 Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)

La composición genética de una población analizada, se describe mediante la determinación de los alelos presentes y de sus frecuencias alélicas. Se cuantificó la variabilidad a través de la proporción de un alelo particular entre todas las copias del gen en la población y la ocurrencia de cierto genotipo en la población (frecuencia genotípica). La misma se determinó en base al recuento directo de los alelos presentes del SNP.

El estudio se realizó mediante un análisis poblacional para el SNP IGF-I determinando las frecuencias genotípicas y alélicas. También se realizó el estudio sobre las poblaciones extremo, definidas como aquellas por encima o por debajo de la media poblacional (311,4 Kg) \pm 0,5 desvíos estándar (66,9/2). El extremo superior incluyó a todos aquellos animales que quedaron por encima de 344,89 kg de peso vivo (PV) a los 18 meses de edad. El extremo inferior quedó compuesto por aquellos animales por debajo de 277,99 kg de PV a los 18 meses de edad. Para ambos extremos se realizó la prueba de equilibrio de H-W.

La frecuencia genotípica observada se obtuvo realizando el cociente entre el número de individuos de un determinado genotipo sobre el total de individuos de la población muestreada. En cambio, la frecuencia alélica observada se determinó como la mitad de frecuencia genotípica observada de heterocigotas más la frecuencia genotípica observada del respectivo genotipo homocigota.

El modelo Hardy-Weinberg considera qué sucede en una población ideal con características bien definidas. La ley se aplica en una población ideal con tamaño infinito, diploides, de reproducción sexuada, sin diferencias alélicas entre los sexos, asumiendo que ocurren apareamientos aleatorios en ausencia de mutación, migración y selección, permaneciendo constantes de generación en generación.

Bajo las condiciones antes estipuladas y luego de un ciclo de apareamientos al azar, cuando las frecuencias genotípicas de un locus individual se fijan en un valor de equilibrio particular, es decir, permanecen constantes, se dice que la población se encuentra en "equilibrio de Hardy-

Weinberg". Las frecuencias genotípicas esperadas están en función de las frecuencias alélicas (p y q).

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p y q son las frecuencias alélicas para el sistema bialélico considerado, p^2 y q^2 son las frecuencias de los genotipos homocigotas y 2pq la frecuencia genotípica del heterocigota.

Se realizó un análisis de Test de Chi cuadrado que permitió comparar las frecuencias genotípicas observadas con las que se esperan en equilibrio Hardy-Weinberg: $X_{cal}^2 = \sum \frac{(\text{número observado} - \text{número esperado})^2}{\text{número esperado}}$

El total de individuos esperados para cada genotipo se calculó como frecuencia genotípica esperada ponderada en el total de la población.

La hipótesis nula (H_0): afirma que las frecuencias alélicas en una población dada están en equilibrio de H-W, mientras que la hipótesis alterna (H_a): afirma que las frecuencias alélicas no están en equilibrio.

Si X^2 calculado $> X^2$ tabla, se rechaza H_0 . Desviaciones significativas de lo esperado según el modelo es indicio de que algo distinto, algo que no se ajusta a lo asumido por el modelo, está sucediendo en la población de estudio. Si por el contrario los valores observados y esperados no difieren significativamente (X^2 cal $\leq X^2$ tab se acepta H_0), se concluye que la población se encuentra en equilibrio para ese locus en ese momento particular (Ayala 1982, Hartl 1988).

X^2 tab, es el valor identificado en la tabla de Chi cuadrado para un nivel de significancia (α) = 0.01 y grado de libertad (gl) = 2, donde de los 3 genotipos posibles, 2 se fijan independientemente, mientras que el tercero es dependiente.

3.4.3 Modelo estadístico

Se estudió el efecto que los tratamientos, en este caso el genotipo, tiene sobre las variables de respuesta: DEP del peso al destete ajustado por edad (DEPPDC), DEP del peso a los 18 meses ajustado por edad (DEPP18C). El Peso al destete ajustado por edad (PDC) y peso a los 18 meses ajustado por edad (P18C), se estudió mediante modelo de análisis de varianza o regresión, que se describen a continuación.

Para el estudio del efecto de la sustitución alélica en la variación genética-aditiva total se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + n^{\circ} \text{ alelos } B_i + \epsilon_i$$

Y_i = DEP (PDC) o DEP (P18C)

μ = Media de las DEPPDC o DEPP18C

ϵ = Error experimental

Para el estudio del efecto de los genotipos en los fenotipos PDC y P18C se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + C_i + Em_j + G_k + PNC + \epsilon_{ijk}$$

Y_i = Peso al destete corregido

μ = Media poblacional (Kg.)

C_i = Cabaña (variable aleatoria)

Em_j = Edad de la madre (efecto fijo)

G_k = Genotipo (efecto fijo)

PNC = Peso al nacer corregido (covariable)

ϵ_{ijk} = Error

$$Y_i = \mu + C_i + Em_j + G_k + GPrD + \epsilon_{ijk}$$

Y_i = Peso a los 18 meses corregido

μ = Media poblacional (Kg.)

C_i = Cabaña (variable aleatoria)

Em_j = Edad de la madre (efecto fijo)

G_k = Genotipo (efecto fijo)

GPrD = Ganancia pre destete (covariable)

ϵ_{ijk} = Error

Por último se realizó el análisis del efecto de sustitución alélica en PDC y P18C, siguiendo el siguiente modelo:

El efecto de sustitución (A sustituido por B) es una regresión en el n° de alelos B que tiene el respectivo genotipo (AA=0, AB=1, BB=2)

$$Y_i = \mu + n^{\circ} \text{ alelos } B_i + \epsilon_i$$

Y_i = PDC o P18C

μ = Media de los PDC o P18C

ϵ = Error experimental

4 RESULTADOS

4.1 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

El Cuadro 4 presenta las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los tres genotipos presentes, tanto en la población total como en los extremos superior e inferior. El análisis de Chi-cuadrado no detectó diferencias significativas, por lo que se concluyó que la población se encuentra en equilibrio H-W. Sin embargo, se observó que los individuos del extremo inferior si bien se encontraron en equilibrio H-W, estuvieron más alejados del mismo.

Cuadro 4. Frecuencias Genotípicas para el SNP de IGF-1

	GENOTIPO								
	Población total ¹			Extremo superior ²			Extremo inferior ³		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Frecuencia Genotípica Obs.	0,291	0,5	0,209	0,22	0,55	0,23	0,36	0,52	0,13
Frecuencia Genotípica Esp.	0,292	0,497	0,211	0,24	0,5	0,26	0,38	0,48	0,15
x ² =	0,016			0,82			1,095		

¹Población total: n=368, ²Extremo superior: n=99, ³Extremo inferior: n=136.

Cuando se realizó el cálculo de las frecuencias alélicas de la población, se observó que en la población del extremo inferior presentó mayor proporción de alelos de A respecto al resto (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencias Alélicas

	ALELOS	
	A	B
Frec. población total ¹	0,541	0,459
Frec. extremo superior ²	0,495	0,505
Frec. extremo inferior ³	0,618	0,382

¹Población total: n=368, ²Extremo superior: n=99, ³Extremo inferior: n=136

4.2 ANÁLISIS DE LOS DEPPDC Y DEPP18C

En el Cuadro 6 se presenta la variabilidad genética aditiva explicada por el alelo B de IGF-1 en los DEPPDC y DEPP18C. El estimador que se muestra en el Cuadro 6, es el coeficiente de regresión del número de alelos B en los DEP, explicando la sustitución alélica, es decir qué sucede cuando cambio un alelo A por otro B, suponiendo una regresión donde el genotipo AA contiene cero alelo B, genotipo AB contiene un alelo B, y genotipo BB contiene dos alelos B.

Cuadro 6. Efecto de la variabilidad genética en DEPPDC y DEPP18C

Variable	Genotipo			Media (Kg.)	Estimador ³	Pr > F	R ²
	AA	AB	BB				
DEPPDC ¹	9,5±4,46	9,8±3,96	9,98±3,63	9,75±4,04	0,24	0,42	0,002
DEPP18C ²	13,99±6,93	14,31±7,52	15,66±6,53	14,5±7,16	0,79	0,14	0,006

¹Diferencia esperada en la progenie para peso al destete corregido en kg.,

²Diferencia esperada en la progenie para peso a los 18 meses corregido en kg.,

³Coefficiente de regresión de la sustitución alélica (A por B)

El R² explicó cuánto de la variación en los DEP puede estar explicada por los genotipos o por la sustitución alélica. En consecuencia, el grado de explicación de la variabilidad genética que se encontró es insignificante.

4.3 EFECTOS SOBRE LOS PDC Y P18C

4.3.1 Influencia del polimorfismo de IGF-1 en PDC y P18C

En el Cuadro 7 se muestran los PDC y P18C para los distintos polimorfismos de IGF-1 con sus respectivos valores de P y sus medias poblacionales. El desvío estándar (DE) es muy alto, más aún (el doble) en los P18C.

Cuadro 7. PDC y P18C para los polimorfismos de IGF-1

Variable	Polimorfismo de IGF-1			Valor P	Media (Kg.)
	AA	AB	BB		
PDC (Kg.) ¹	193,55±30,22	202,05±35,34	200,27±36,68	0,6718	199,2±33,9
P18C (Kg.) ²	297,91±65,22	313,48±69,70	325,37±59,3	0,687	311,44±66,9

¹Peso al destete corregido, ²Peso a los 18 meses corregido.

La Figura 7 representa lo expresado en el Cuadro 7, donde no existió un efecto significativo de los distintos polimorfismos de IGF-1 en PDC y P18C ($P=0,6718$ y $P=0,687$ respectivamente).

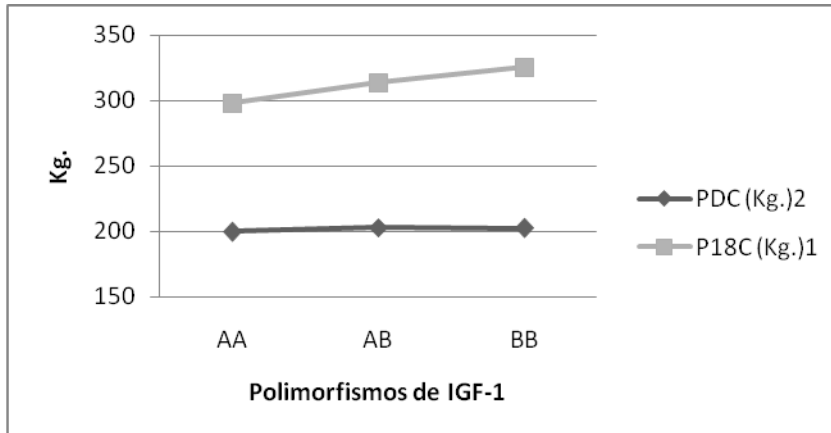


Figura 7. PDC y P18C según polimorfismo de IGF-1.

Si bien el polimorfismo de IGF-1 no tuvo efecto significativo en el PDC y en P18C, el peso al nacer usado como covariable, tuvo efecto en el PD ($P = 0,0286$): por cada incremento en 1kg de PN incrementó 1,0075kg el PD.

4.3.2 Influencia de las edades de las madres en los PDC y P18C

En la población en estudio, el 25% de las terneras son hijas de madres de 3 o menos años, el 18% hijas de madres de 4 años, el 11% hijas de madres de 5 años y el 47 % de las terneras son hijas de madres de 6 o más años.

Las edades de las madres tuvieron un efecto importante para las variables PDC y P18C ($P=0.0102$ y $P=0.0113$ respectivamente) como se muestra en la Figura 8.

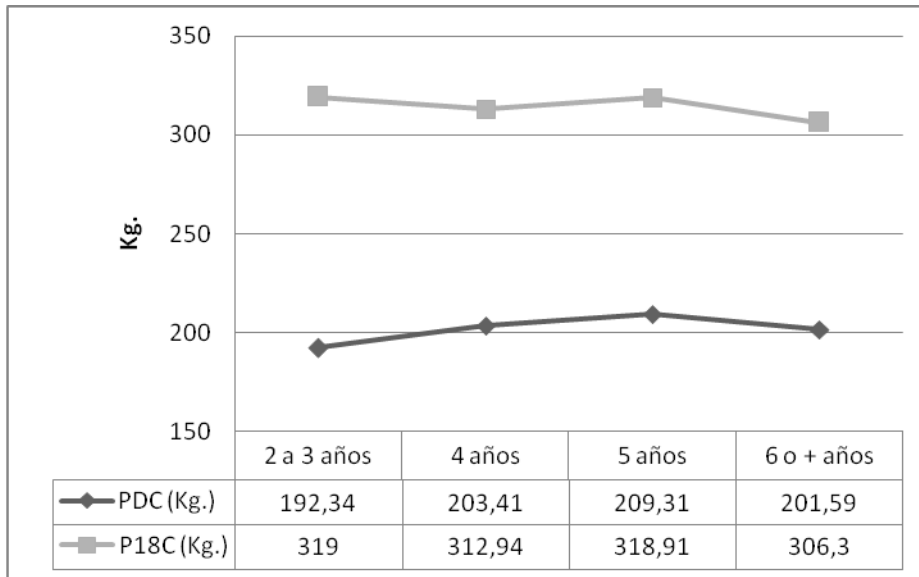


Figura 8. PDC y P18C según la edad de la madre.

4.3.3 Influencia del criador en la varianza total de los PDC y P18C

El efecto del criador, considerado como aleatorio (muestra de la población total de criadores de Aberdeen Angus participantes del Servicio de Evaluación de Reproductores), fue un componente importante en la varianza total en PDC y P18C, siendo mayor en este último (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del Criador en la varianza total

	Peso al destete corregido		Peso a los 18 meses corregido	
	Criador	Residual	Criador	Residual
Media	239,25	830,15	1945,69	938,25
% Varianza	22,37		67,5	

5 DISCUSIÓN

El uso y la investigación de marcadores moleculares asociados a características de crecimiento realizada por los autores citados en la bibliografía, reportan efectos del polimorfismo del gen IGF-1 en ganancias diarias, donde los animales se encuentran en iguales condiciones de alimentación y bajo condiciones controladas. Estas dos características son de suma importancia para poder observar la correcta expresión de dicho marcador, a diferencia del presente trabajo, el cual se realizó con ciertas limitantes.

La intención de este estudio fue validar un polimorfismo de IGF-1 como marcador relacionado a la selección por crecimiento. Se sabe que hay una selección positiva por mayores pesos (Urioste, 2010), pero las tasas de mejoras son menores a las esperadas. La hipótesis es que el alelo B podría estar relacionado a un mayor crecimiento (Davis y Simmen 1997, Ge et al. 2001, Curi et al. 2004, Li et al. 2004, Curi et al. 2005, Siadkowska et al. 2006), aunque esto no ha sido verificado con datos de campo. Para verificar la hipótesis, deberían observarse cambios en el equilibrio H-W, así como asociaciones entre los fenotipos medidos y los respectivos genotipos.

La población estudiada se encontró en equilibrio H-W, lo que supone que no hay una selección direccionada al menos para el polimorfismo de IGF-I. Sin embargo al analizar los extremos de la distribución poblacional según los pesos, se observó en el extremo inferior un cierto alejamiento del equilibrio, aunque no se pudo probar estadísticamente. Esto se vio reflejado en las frecuencias alélicas del extremo inferior, donde el alelo A se encontró en una mayor proporción que el alelo B (0,618 y 0,382 respectivamente), por lo que se pudo suponer que la mayor cantidad de alelos A encontrada, está relacionada a menores pesos de las terneras. Esto coincidió con lo reportado por Ge et al. (2001), Curi et al. (2005), Siadkowska et al. (2006). Como se observó en el Cuadro 4, la frecuencia poblacional presentó 0,541 de alelos A y 0,459 de alelos B, por otra parte en el extremo superior la frecuencia de los alelos A fue de 0,495 y los alelos B de 0,505.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el estudio de sustitución alélica (A por B) en los DEPPDC ni DEPP18C ($p=0,42$ y $p=0,14$ respectivamente). Cabe destacar que el valor R^2 es muy bajo: para DEPPDC 0,002 y DEPP18C 0,006, explicado por una dispersión de los valores muy grande, por lo que la característica en estudio explicada como: el cambio en el peso de los animales según el polimorfismo de IGF-1, está fuertemente afectado por el ambiente en que crecen los mismo, y/o por otros genes, por lo que un único polimorfismo no es suficiente para explicar el mejor comportamiento en las características productivas estudiadas.

Con respecto al análisis sobre la influencia que presentó el polimorfismo de IGF-1 para PDC y P18C, no se encontró diferencias significativas para ninguno de los polimorfismos, ya sea AA, AB o BB. Estos resultados no coinciden con lo reportado por todos los autores. De aquí la importancia de la validación de los marcadores moleculares en cada una de las condiciones a ser utilizadas (Corva, 2009). Es importante resaltar que los valores de DE resultaron elevados, acentuándose para P18C.

Estas diferencias pueden ser producto de varios factores. En primer lugar, la ganadería Uruguaya se desarrolla mayoritariamente en condiciones extensivas sobre campo natural, lo cual podría estar limitando la expresión del potencial genético de los animales, ya que según la zona en que se encuentren las cabañas, el aporte de forraje va a ser distinto. Por otra parte, se desconoce si las terneras recibieron un manejo diferencial en alguna etapa del ciclo o para sobrepasar el invierno, lo que pudo influenciar en el peso de las mismas. También la ocurrencia de eventos ambientales (sequías y fríos intensos) pudo afectar tanto los factores nutricionales como los factores no nutricionales.

Dichos factores van a influenciar en mayor o menor medida en el peso al destete y los 18 meses. Al destete la influencia de los factores ambientales es menor ya que se encuentra fuertemente influenciado por el efecto materno, encontrándose todas las terneras bajo una misma condición: la lactancia. Cuando el animal es destetado, el efecto materno disminuye paulatinamente y los efectos ambientales e individuales son los que explican en mayor medida el consumo de los animales y su peso. Por lo tanto, el manejo de las terneras postdestete afectó la variable medida (P18C), ya que no todas las terneras se encontraban en las mismas condiciones alimenticias. Es importante resaltar que los animales que sufren pérdidas de peso durante el invierno presentan un crecimiento compensatorio con el aumento de la oferta de forraje en primavera, pudiendo durar hasta un año para lograr nivelar su peso en comparación a otros que no sufrieron dichas restricciones durante el invierno (Straumann et al., 2009).

En lo que refiere al efecto materno, existió una respuesta significativa ($p= 0,0102$) en el peso al destete según las distintas edades de las madres. También el P18C fue afectado significativamente según las edades de las madres ($P=0,0112$), coincidiendo con lo reportado por Isea y Olson (1998). Las progenies de madres de mayor edad (hasta 5 años), presentaron mayores pesos al destete.

Como último factor a analizar y que probablemente presente gran influencia sobre las variables descritas anteriormente, es el efecto del criador, el

cual presentó porcentajes de varianza elevados y éstos fueron mayores aún en los P18C (67,5%), lo que explica dichas diferencias e incógnitas analizadas en el presente estudio. Dentro del efecto del criador se pueden sintetizar todos los efectos del manejo propio del establecimiento.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, bajo condiciones de campo, se afirma que el polimorfismo de IGF-1 no afectó la ganancia postdestete. Si bien el número de animales muestreado fue elevado (n=368), el cual se puede considerar como representativo de la población, las terneras pertenecientes a diferentes cabañas Angus (13 en total) se encontraban en distintas zonas de Uruguay, donde la oferta de forraje y el tipo productivo del mismo es diferente. Por otro lado, las terneras no estuvieron bajo un mismo manejo durante el período que transcurre entre el destete y los 18 meses de edad, el cual marca diferencias importantes en el crecimiento y desarrollo. Esto presenta como consecuencia que al estimar las medias de los pesos y características evaluadas, en las diferentes etapas bajo estudio, se subestimen o sobreestimen dichos datos, obteniendo resultados con un coeficiente de variación muy grande.

Se debería generar nueva información para validar este marcador en nuestras condiciones, evaluando a los animales bajo los mismos manejos. De ser validado el polimorfismo de IGF-1, se podría utilizar para complementar el uso de los DEP en las características evaluadas.

De todos modos, para mejorar la selección de características de interés productivo y económico, sería importante la búsqueda de marcadores en características de difícil medición como eficiencia, reproducción y carcasa, bajo condiciones de campo, siendo esta la principal forma de producción de la ganadería Uruguaya.

7 RESUMEN

El gen que codifica la síntesis del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo 1 (IGF-1), es considerado uno de los genes candidatos en selección asistida por marcadores para características de crecimiento, ya que cumple un rol muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo. Bajo la hipótesis que existe una asociación positiva entre un polimorfismo de una sola base nucleotídica (SNP) de la región promotora del gen IGF-1 y características de crecimiento, donde las variantes alélicas existentes son: AA, AB y BB, en el cual el alelo B está asociado con mayor crecimiento. El objetivo del trabajo fue estudiar la asociación entre el Factor Similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1) y la estimación de efectos genético-aditivos (DEPs) y fenotipos de los pesos al destete (PD) y a los 18 meses (P18) en terneras Aberdeen Angus. Se obtuvo información de 368 genotipos y de los DEPs y fenotipos de PD y P18 de terneras AA nacidas en 2009, criadas bajo pastoreo y provenientes de 13 cabañas. El modelo general incluyó como efectos fijos el genotipo y la edad de la madre y como aleatorio la cabaña de origen. El peso al nacer y la ganancia diaria pre-destete fueron usadas como covariable para PD y P18, respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron: AA=0.29, AB=0.50 y BB=0.21 y la población se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg. No se encontró una asociación significativa entre el genotipo y los DEPs para PD y P18 ni entre el genotipo y los fenotipos de PD y P18. La edad de la madre fue significativa para PD y P18 y la cabaña de origen explicó el 22 y 67% de la varianza total para PD y P18, respectivamente. Se concluye que, para las condiciones de campo del estudio, sujetas a importantes influencias ambientales, no pudieron ser demostradas las hipótesis iniciales que los alelos de IGF-1 estuvieran asociados a los DEPs o a los fenotipos de las características PD y P18. Diferencias en la alimentación y manejo de las madres y de las terneras durante el pos-destete entre las distintas cabañas posiblemente hayan influido más que el efecto del genotipo.

Palabras clave: Factor similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1); Marcador molecular; Ganancias postdestete

8 SUMMARY

Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) is synthesized by a gene, which is considered one of the candidate genes in marker-assisted selection for growth traits, due to its key role in growth regulation and development. Under the hypothesis that there is a positive association between a polymorphism of a single base nucleotide (SNP) in the promoter region of the IGF-1 gene and growth characteristics, where allelic variants are possible: AA AB and BB, and the B allele is associated with increased growth. The objective was to study the association between Insulin-Like Factor type 1 (IGF-1) and estimated additive genetic effects (EPDs) or phenotypes of weaning weight (PD) and 18 months weight (P18) in Aberdeen Angus calves . Information on genotypes, phenotypes and EPDs for PD and P18 was obtained from 368 AA female calves born in 2009, reared on pasture from 13 breeding herds. The general statistical model included calves' genotype and age of their dam as fixed effects, and the herd where the calves were born as a random effect. Birth weight and pre-weaning daily gain were used as a covariable for PD and P18, respectively. The genotype frequencies were: AA = 0.29, AB = BB = 0.50 and 0.21 and the population matched the Hardy-Weinberg equilibrium model. There was no significant association between genotype and EPDs for PD and P18 or between genotype and phenotype of PD and P18. The age of the dam was significant for both PD and P18 and the herd effect explained 22% and 67% of the total variance for PD and P18, respectively. We concluded that for the studied field conditions, subject to significant environmental influences, the initial hypotheses that alleles of IGF-1 were associated with EPDs or with PD or P18 phenotypes growth characteristics could not be demonstrated. Differences in feeding and management of cows and calves during the post-weaning among different herds may have more influence than the genotype effect.

Keywords: Insulin-like growth factor - I (IGF-1); Molecular marker; Gains post-weaning

8 BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, P. T.; BERGEN, W. G.; MERKEL, R. A.; ENRIGHT, W. J.; ZINN, S. A.; REFSAL, K. R.; HAWKINS, D. R. 1988. The relationship between composition of gain and circulating hormones in growing beef bulls fed three dietary crude protein levels. *J. Anim. Sci.* 66: 3059–3067.
2. CURI, R. A.; OLIVERA, H. N.; SILVEIRA, A. C.; LOPES, C. R. 2005. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest. Sci.* 94: 159-167.
3. CASAS, E.; SHEKELFORD S. D.; KEELE J. W.; KOOMARIE M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 2976-2983
4. _____.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHAKELFORD, S. D.; KOOMARIE M.; RILEY, D. G.; CHASE J. R.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and m-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520-525.
5. CHARON, M. K. 2004. Genes control lingre sistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Anim. Sci. Paip. Rep.* 22(1): 135-139.
6. COKETT, N. E.; SHAY ,T. L.; BEEVER, J. E.; NIELSEN, D.; ALBRETSEN, J.; GEORGES, M.; PETERSON, K.; STEPHENS, A.; VERNON, W.; TIMOFEEVSKATA, O.; SOUTH, S.; MORK, J.; MACILIUS, A.; BUNCH, T. D. 1999. Localization of the locus causing spider lamb syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. *Mamm. Gen.* 10: 35-38.
7. DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10:68.
8. DAVIS, M. E.; SIMMEN, R. C. M. 1997. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317–324.
9. DEKKERS, J.; HOSPITAL, F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature reviews. Genetics.* 3: 22-32.

10. GARRICK, D. J. 2011. The nature, scope and impact of genomic prediction in beef cattle in the United States. *Genet. Sel. Evol.* 43:17.
11. GE, W.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C. 1997. Two SSCP alleles identified in the 5'-flanking region of the bovine IGF1 gene. *J. Anim. Genet.* 28:155–156.
12. _____.; _____.; _____.; IRVIN, K. M.; SIMMEN, R. C. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79: 1757-1762.
13. GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. 2007. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 124:323-330.
14. GOLDSTEIN, B. D. C.; SCHLOTTERER. C. 1999. *Microsatellites evolution and applications.* New York, Oxford University Press. 352 p.
15. GRAML, R.; OLBRICH BLUDAU, A.; SCHWAB, M.; SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; PIRCHNER, F. 1994. Relationship between plasma hormone and metabolite levels and breeding values of bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 112: 313–326.
16. GUTIERREZ, J. P.; GOYACHE, F. 2005. A note on ENDOG; a computer program for analyzing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122:172-176.
17. HEATON, M. P.; HARHAY, G. P.; BENNETT, G. L.; SMITH, P. L.; CHITKO MCKOWN, C. G.; LAEGEID, W. W. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm. Genome.* 13:272-281.
18. HERD, R. M.; ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D. J. 2002. IGF1 is associated with genetic variation in key production traits in young Angus cattle. *Anim. Prod. Aust.* 24:313.
19. HERRMANN, M. G.; DURTSCHI, J. D.; BROMLEY, L. K.; WITTWER, C. T.; VOELKERDING, V. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping; cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin. Chem.* 52: 494-503.
20. High-resolution DNA Melting Analy. 2008. (en línea). Utah, The University of Utah. s.p. Consultado 12 jun. 2012. Disponible en <http://www.path.utah.edu/news/hi-res-dna-melting-analysis>.
21. ISEA, V. W.; OLSON, T. A. 1998. Breed effects of cow's sire and service sire on reproduction of crossbred dams and preweaning

- performance of their clones. *Rev. Científica (FCV-LUZ)*. 3(1): 53-62.
22. ISTASSE, L.; VAN EENAEME, C.; EVRARD, P.; GABRIEL, A.; BALDWIN, P.; MAGHUIN ROGISTER, G.; BIENFAIT, J. 1990. Animal performance, plasma hormones and metabolites in Holstein and Belgian blue growing-fattening bulls. *J. Anim. Sci.* 68: 2666-2673.
 23. JOHNSTON, D.J.; HERD, R.M.; KADEL, M.J.; GRASER, H.U.; ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A. 2002. Evidence of IGF-1 as a genetic predictor of feed efficiency traits in beef cattle. *In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (7th, 2002, Montpellier)*. Proceedings. Montpellier, INRA. pp. 1-4.
 24. LI, C.; BSARAB, J.; SNELLING, W.M.; BENKEL, B.; ET AL. 2004. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos Taurus*. *J. Anim. Sci.* 82:1-7.
 25. LIEW, M.; PRYOR, R.; PALAIS, R.; MEADOWS, C.; ERALI, M.; LYON, E.; WITTEWER, C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin. Chem.* 50(7): 1156–1164.
 26. LITT, M.; LUTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Anim. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
 27. LÓPEZ ZAVALA, R.; CANO CAMACHO, H.; CHASSIN NORIA, O.; ZAVALA PÁRAMO, M. G. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *Cienc. Nic.* 46:43-56.
 28. MCPEAKE, A. 2003. Marker assisted selection for beef palatability characteristics. *In: Beef Improvement Federation Meetings (2003, Lexington)*. Proceedings. Lexington, KY, MTG. pp. 67-71.
 29. MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.; GODDARS, M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics.* 157:1819-1829.
 30. MILLER, D.; NADATHUR G.; PFENNING F.; SCEDROV, A. 1991. Uniform proofs as a foundation for logic programming. *Ann. Pure Appl. Logic.* 51:125-157

31. MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3):1215
32. MOORE, K.L.; JOHNSTON, D.J.; GRASER, H.U.; HERD, R. 2005. Genetic and phenotypic relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and net feed intake, fat, and growth traits in Angus beef cattle. *Aust. J. Agr. Res.* 56:211-218.
33. MULLEN, M. P.; LYNCH, C. O.; WATERS, S. M.; HOWARD, D. J.; BOYLE, P. O.; KENNY, D. A.; BUCKLEY, F.; HORAN, B.; DISKIN, M. G. 2011. Single nucleotide polymorphism in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genet. Mol. Res.* 10(3):1819-1830.
34. NEUNER, S.; EDEL, C.; EMMERLING, R.; THALLER, G.; GÖTZ, K. 2009. Precision of genetic parameters and breeding values estimated in marker assisted BLUP genetic evaluation. *Genet. Sel. Evol.* 41: 26.
35. NIXON, K. C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics.* 15:407–414.
36. PEREZ, N.; GONZALES, C.; AGUILLERA, A. 2000. Crecimiento predestete de Brahaman, Senepón y F1 Senepón x Brahaman en el municipio Maturín. In: Congreso Venezolano de Zootecnia (10º, 2000, Guanare). Trabajos presentados. Guanare, UNELLEZ. p. 93.
37. PRAVIA, M.; RAVAGNOLO, O.; CIAPPESONI, G.; MONTOSI, F.; CALISTRO, A. DEP ó EPD: ¿Qué es y cómo interpretarlo?. Programa nacional de carne y lana – INIA. INIA/Facultad de Agronomía. Cartilla no. 1. s.p.
38. REYNA, X. F.; MONTOYA, H. M.; CASTRELLÓN, V. V.; RINCÓN, A. M. S.; BRACAMONTE, M. P.; VERA, W. A. 2010. Polymorphism in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet. Molec. Res.* 9(2):875-883.
39. RON, M.; WELLER, J. 2007. From QTL to QTN identification in livestock - winning by points rather than knock - out: a review. *Anim. Genet.* 38:429-439.
40. RUPRECHTER, G.; CARRIQUIRY, M.; RAMOS, J. M.; PEREIRA, I.; MEIKLE, A. 2011. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions; effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. (en línea). *Acta*

Veterinaria Scandinavica. 53:35. Consultado 5 may. 2012.
Disponible en <http://www.actavetscand.com/content/53/1/35>.

41. SALAZAR MARROQUIN, E. L.; ET AL. 2004. Evaluación de marcadores microsatélites para la verificación de parentesco en ganado Beefmaster y Charolais en el Noreste de México. *Tec. Pec. Mex.* 42: 429-435.
42. SCHLEE, P.; GRAML, R.; ROTTMANN, O.; PIRCHNER, F. 1994. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 111: 253–256.
43. SERAGRO. 2011. Ganadería; debate a fondo. (en línea). In: *Ciclo de Conferencias (8º., 2011, Montevideo). Políticas de estado; el agro en los tiempos que vienen.* Montevideo, IICA s.p. Consultado 12 set. 2012. Disponible en <http://www.iica.org.uy/images/stories/PDF/ganaderia.pdf>
44. SIADKOWSKA, E.; ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRZADEK, J.; STRZALKOWSKA, N. 2006. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 83: 2280-2288.
45. SIROTKIN, A. V.; MAKAREVICH, A. V.; GENIESER, H. G.; KOTWICA, J.; HETÉNYI, L. 2000. Effect of four cGMP analogues with different mechanisms of action on hormone release by porcine ovarian granulose cells in vitro. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 108: 214-219.
46. SOCIEDAD DE CRIADORES DE ANGUS DEL URUGUAY. s.f. Aprobación fenotípico carne Angus. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 19 ene. 2012. Disponible en <http://www.angusuruguay.com/aprobacion-fenotipo-carne-angus>
47. TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138.
48. TUPAC YUPANQUI, I.; BARO, J. A.; DUNNER, S. 2007. Effects of DGAT1 alleles in milk components traits in Spanish Holstein breed. *Arc. Zoot.* 53: 293-299.
49. URIOSTE, J. 2010. Programa de mejoramiento genético en Uruguay; logros y desafíos futuros. *Agrociencia (Montevideo).* 14(3): 3-10.
50. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2011. Encuesta ganadera. (en línea). Anuario Estadístico Agropecuario

2011: s.p. Consultado 23 abr. 2012. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU;E;41;1;MNU;>

51. _____. MINISTERIO DE GANADERIA AGRICULTURA Y PESCA. OPYPA. 2011. Comportamiento del sector carne vacuna en 2011 y perspectivas para 2012. (en línea). Anuario Estadístico 2011: s.p. Consultado 3 jun. 2012. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario2011/material/pdf/03.pdf>
52. VACCARO, L.; MEJIAS, H.; PEREZ, A. 1995. Factores genéticos y no genéticos que afectan la producción de bovinos doble propósito. In: Manejo de la ganadería mestiza de doble propósito. Maracaibo, Astro Data. pp. 105-107.
53. VAN EENENNAAM, A. 2006. DNA-based biotechnologies. In: Beef sire selection manual. Kansas, USA. NBCEC. pp. 66-73.
54. VILLASAMIL, W. I.; ONTIVEROS, Y. V. 2002. Peso al nacimiento de terneros cruzados Senepol en el estado Zulia. Rev. Científica (FCV-LUZ) 12(2): 121-126.
55. WANG, Y.; PRICE, S.E.; JIANG, H. 2003. Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor- 1 mRNAs. Domest. Anim. Endocrinol. 25(4): 315-328.
56. WEBER, J. L.; MAY, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Anim. J. Hum. Genet. 44: 388-396.
57. WERNER, H.; ADAMO, M.; ROBERTS, C. T.; LEROITH, D. 1994. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. Vitam. Horm. 48: 1-58.
58. WHIMMERS, K.; LIN, C. L.; THOLEN, E.; JENNEN, D. G. J.; SCHELLENDER, K.; PONSUKSILI, S. 2005. Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. Anim. Gen. 36: 152-155.
59. YELICH, J. V.; WETTEMANN, R. P.; MARSTON, T. T.; SPICER, L. J. 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. Domest. Anim. Endocrinol. 13: 325-338.