



Universidad del Papaloapan

Terra Ubertima, Mens Aperta

TESIS

**ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL
POLIMORFISMO Q204X EN EL GEN GDF8 EN UNA MUESTRA
POBLACIONAL DE BOVINOS.**

Presenta:

KEYLA MAULEÓN TOLENTINO

Para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis:

DR. JOSÉ ABAD ZAVALETA

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2017.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 3 de Mayo del 2017 a las **12:00 hr**, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Q204X en el gen GDF8 en una muestra poblacional de bovinos** presentado por la alumna **Keyla Mauleón Tolentino**, con número de matrícula **11090016**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE** LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU **APROBACIÓN** PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 3 de Mayo del 2017.

ATENTAMENTE.
LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dr. José Abad Zavaleta
Profesor- Investigador

Presidente

Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo
Profesor- Investigador

Secretario

Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre
Profesor-Investigador

Vocal

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor- Investigador

AGRADECIMIENTOS

Amai, por ser todo para mí, mi guía y maestra de la vida, siempre sonriente y dispuesta para un nuevo día, agradezco tus palabras, abrazos y tanto amor que emana de tu ser, por tu ejemplo de resiliencia y lucha que me hacen creer que cada uno tiene un ángel, y a mí me tocó la mejor. Este esfuerzo lo logramos juntas mami.

Padre te agradezco por los buenos recuerdos que siempre habitaran mi corazón.

Hermanito gracias por enseñarme que para una pregunta siempre me tendrás una respuesta y que siempre creeré que es la correcta, por hacerme creer en mí y regalarme tantas alegrías.

Agradezco a mi tía Isabel, mi primo Manu y el Puchungo por la enseñanza de vida, por brindarme un hogar y tanta dicha, por las noches de risa, por la comida, palabras de aliento, porque siempre hubo alegría. Estaré eternamente agradecida.

A mi tía Carmen y su familia que siempre están dispuestos a ayudar, que la bendición se multiplique en gran medida.

A mis abuelitos Paula y Juan por ser bondad y enseñarme que es mejor dar que recibir, porque me brindaron días llenos de tanta sabiduría.

En especial deseo agradecer a mi asesor de tesis el Dr. Abad por la disposición, la paciencia y su valioso tiempo, por las palabras de aliento, gracias por permitirme unir a su equipo de trabajo en el que aprendí que juntos se logran grandes cosas.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Erick y Raquel por el apoyo brindado. A ti Luis por la enseñanza y la disposición que tuviste conmigo estoy muy agradecida.

Dr. Meza le agradezco su tiempo disposición y conocimiento, por las pláticas que siempre me inspiraran.

Dra. Blanca estoy segura que en todas sus clases nos regalaba más de lo que ya había planeado gracias por compartirnos su experiencia, conocimiento y alegría que siempre la acompañan.

Dr. Julián un día hizo un comentario que siempre llevaré presente, -escriban, así sea la carta a la novi@ pero que sean sus propias líneas. Gracias por la invitación a desarrollar y revolucionar nuestra mente.

Dra. Xóchitl gracias por ser un ejemplo a seguir, el que se ve reflejado en su dedicación y siempre en su sonrisa, en los pasillos, en el laboratorio, en el aula.

Gracias a mis amigos Citlalli, JJ, Apo y Paco siempre están en mi corazón, en mis días tristes y alegres.

A mis amigos con quienes compartí momentos que nunca olvidaré y formamos más que un equipo una hermandad... a **Toñito** gracias por ser mi amigo, compañero, mi confidente, siempre recordaré tu frase “nada es para siempre”, aunque mi amor por ti siempre lo será. **Rosita** gracias por la confianza y estar presente aun cuando había situaciones difíciles. **Alamsín** gracias por estar a lo largo de este camino, te agradezco tu ayuda intelectual, emocional, espiritual, por apoyarme, aunque mis decisiones no sean las correctas, deseo que nuestra amistad perdure por siempre, estoy en deuda contigo y a **Daniel** un ser humano fantástico no olvidaré que en mis días más tristes estabas solo tú, con tu música, aliviando mis días, gracias por hacerme sentir en paz cuando estoy a tu lado.

Oscar: Por estar presente en todos los momentos, porque este esfuerzo fue colectivo y tu mi pilar, las palabras que me impulsaron a seguir, por hacerte cargo de muchas cosas en mi vida y darme la oportunidad de seguir con mis metas sin tener que pensar en un problema más en mí vida. ¿Habrá una palabra más grande para decirte gracias? yo sólo espero que un día tu y yo nos vallamos de viaje, miremos todos esos amaneceres y lunas, te escriba un par de poemas más y quedemos un poco al corriente, aunque no creo, porque tu dulzura se hace cada día más grande. ¡Gracias Os!

DEDICATORIAS

A mis padres que me dieron la vida y me enseñaron que la educación es la base más importante para comprender y disfrutar del camino.

Dedico el esfuerzo a mi querido hermano Isaacs y a mi pequeña Daniela.

A mi familia adoptiva tía Isa, Manu y Puchu.

Para mis amigos que permanecieron a lo largo de todo este tiempo.

A mis profesores que me dieron más que asesoría intelectual una forma diferente de ver la vida.

Te dedico esto a ti: Oscar.

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alelo	Una de las formas alternativas de un gen en un locus particular en un cromosoma. En un individuo, una forma del alelo (dominante) puede ser expresado más que otra forma (recesivo). También puede considerarse como un segmento de una secuencia de nucleótidos, por lo cual, alelo se refiere a las posibles alternativas de nucleótidos en una posición específica en la secuencia.
Amplicón	Fragmento de ADN amplificado por PCR
ARN	Ácido ribonucleico
BTA2	Bos taurus, autosoma 2
FAM 6	FAM 6-Carboxil fluoresceína FIS
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
GDF-8	Factor de crecimiento y diferenciación 8 (Growth differentiation factor-8)
HRM	High Resolution Melt
MSTN	Miostatina
pb	Pares de bases(Nucleótidos)
qPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
SNP's	Polimorfismos de un solo Nucleótido
TGF-β	Factor de Crecimiento y Transformación-β (Transforming growth factor-β) x
μl	Microlitro
RFU	Unidades de fluorescencia relativas (Relative Fluorescence Units)
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena simple

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1 La Industria ganadera en México.....	14
2.2 Los marcadores moleculares como herramientas de diagnostico	15
2.3 Gen Miostatina.....	18
2.4 Técnicas para la detección de polimorfismos	23
2.4.1 PCR	23
2.4.2 Discriminación alélica	25
2.4.3 High Resolution Melt.....	25
III. ANTECEDENTES	26
V. JUSTIFICACIÓN.....	28
VI. HIPÓTESIS.....	29
VII. OBJETIVOS.....	30
7.1 Objetivo General.....	30
7.2 Objetivos Específicos.....	30
VIII. METODOLOGÍA	31
8.1 Clasificación de la muestra	31
8.2 Extracción de ADN	31
8.3 Electroforesis	32
8.4 Concentración de ADN	32
8.5 Diseño de positivos sintéticos.....	32
8.6 Diseño de oligonucleótidos	33
8.7 Parámetros optimizados.	33
8.8 Amplificación de las secuencias control.....	33
8.9 Amplificación de las muestras de ADN de Bovino	34
8.10 Análisis HRM (High-Resolution Melt Analysis)	36
8.11 Análisis estadístico	36
IX. RESULTADOS.....	37
9.1 Verificación de ADN de las muestras de bovinos.	37
9.2 Amplificación de las muestras y secuencias control	38

9.3 Análisis HRM para los controles.....	40
X. DISCUSIÓN.....	49
XI.CONCLUSIONES.....	52
XII. PERSPECTIVAS.....	54
XII. RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO.....	60

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se ha seleccionado el ganado con el objetivo de obtener características deseadas por los consumidores, entre las que incluyen calidad de leche y carne (suave, clara y magra). Esta selección ha ocurrido de forma tradicional, comenzando con la cruce de los más aptos, de fácil adaptación, mayor masa muscular, y bajo técnicas reproductivas que implican sincronización de celo, ovulación múltiple, inseminación artificial, sexado de semen, y la transferencia de embriones, apoyándose de herramientas moleculares. En la búsqueda de mejorar el ganado se han generaron estudios del genoma del ganado bovino, los cuales han revelado la existencia de secuencias que se repiten de generación en generación, y han facilitado información sobre la diversidad genética que asiste en la optimización de estrategias de conservación o modificación de las líneas genéticas de las diferentes razas de ganado. La tecnología del ADN ha sido empleada por los productores de carne bovina por años para la identificación de marcadores genéticos que proveen información de la diversidad de genes funcionales para caracteres importantes (Akey *et al.*, 2002). Con este conjunto de herramientas es posible mapear los genes o conjuntos de genes que influyen en *loci* de rasgos cuantitativos (QTL), lo que permite el uso de la información genómica en programas de crianza, sobre todo para rasgos de rendimiento, calidad, resistencia a enfermedades, entre otros (Guifen *et al.*, 2012). Los estudios confirman que existen genes encargados de la ganancia de peso del ganado como lo son marcadores moleculares del gen leptina (Cerón *et al.*, 2009), y que la búsqueda de marcadores es cada vez mayor, uno de estos marcadores se ubica en el camino de la selección donde ocurrió la aparición de individuos que se caracterizan por una ganancia de peso excepcional la cual ha sido reportada como doble musculatura en varias razas de ganado (Culley, 1807), La doble musculatura es una condición hereditaria en el ganado que da como resultado, principal un aumento en el número de fibras musculares (hiperplasia), en relación con el ganado normal (De la Rosa, 2003). Dicha hiperplasia afecta particularmente a la proporción de fibras blancas tipo IIb (o fibras rápidas de metabolismo glicolítico), frente a las rojas tipo I (o fibras lentas

oxidativas). Las fibras rápidas tipo IIb se caracterizan por su menor contenido en mioglobina, lo que confiere a esta carne su característico color rosa pálido (Vissac, 1972). Otra característica de la hiperplasia es el menor porcentaje de grasa de sus canales debido a que sus depósitos de grasa son más pequeños lo que resulta de una reducción del volumen de las células lipídicas más que de una disminución en el número de células (Bailey *et al.*, 1982)

Las ganancias en el índice de conversión, en calidad de la carne (magra), resultan ser benéficas, para el productor y el consumidor, lo que lleva a una selección sistemática de los animales con doble musculatura. (Hanset, 1991). Estas características están ligadas a genes que presentan variantes alélicas con mutaciones que son específicas, tal es el caso de la miostatina (GDF8) que desempeña un papel fundamental en el control del desarrollo muscular..(Fernández, 2004) El gen de la miostatina (MSTN) es un regulador extracelular negativo, que se expresa durante el desarrollo del músculo y en el tejido esquelético del animal adulto (McPherron *et al.*, 1997) Los músculos individuales de los animales con los polimorfismo pesan 2 a 3 veces más que los de los animales de tipo silvestre, y el aumento de la masa, parece ser el resultado de una combinación de células de músculo con hiperplasia e hipertrofia. Estos resultados permiten identificar al gen GDF-8 como un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético (McPherron *et al.*, 1997)

En razas como Beefmaster y Charolais, el gen GDF8 lleva una mutación (transición C>T) en el exón II, denominada alelo Q204X, que provoca la pérdida de función de la proteína.(Sifuentes *et al.*, 2007) donde hay un reemplazo de residuos de Glutamina (Q) por (X) aminoácido (Q204X) (Heather *et al.*, 2001). Las diferencias que se aprecian entre los individuos son ocasionadas por cambios en el ADN, diferencias que se deben a alteraciones en las bases nitrogenadas en algunas regiones cromosómicas, siempre y cuando la herencia se pueda rastrear se le denomina marcador molecular (FAO, 2008). La aplicación de técnicas para la detección de marcadores está basada en la búsqueda de estos polimorfismos, y

puesto que cada individuo tiene una secuencia única de bases, esta información puede ser explotada en estudios de diversidad (Valadez y Moctezuma, 2004). En la actualidad, se han descrito metodologías que permiten la detección de estos polimorfismos, como el ensayo de discriminación alélica. Esta metodología detecta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con un ensayo fluorogénico de nucleasa 5' que involucra la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en presencia de sondas marcadas (FAM y VIC), (Sifuentes *et al.*, 2007). El análisis de las temperaturas de disociación (T_m's) con oligonucleótidos específicos se utiliza para la detección de mutaciones y tiene como principales aplicaciones el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) y detección de productos no deseados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) Zipper *et al.*, (2004) reportó con la técnica BESS-T utilizada para la detección de SNP's en genes de mamíferos.

En la parte Noroeste de México se realizaron análisis con herramientas moleculares en razas Beefmaster y Charolais donde se reportaron polimorfismos que afectan directamente a la proteína, siendo el análisis de temperaturas la mejor en cuanto a tiempo y costos. (Moreno *et al.*, 2008) Sin embargo esta técnica no ha sido probado para razas de doble propósito, considerando de suma importancia para la detección oportuna de uno de los polimorfismos donde se abre la posibilidad de evaluar la técnica de medición de temperaturas de disociación (T_m's) como un método de tamizaje de rendimiento moderado, para la detección de genotipos mutados.

El objetivo de este trabajo es estimar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Q204X en el gen GDF8 en una muestra poblacional de bovinos mediante la técnica High Resolution Melt (HRM), y de ser posible generar recomendaciones para el seguimiento de una línea de ganado que contenga características de carácter productivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La Industria ganadera en México.

México tiene una extensión territorial de aproximadamente 2 millones de km², de la cual el 11% está destinada al uso de la agricultura, el 57 % para agostaderos y no cultivables, el 26 % a uso forestal y el 6 % restante se destina a otros usos (INDETEC, 2004).

Aproximadamente el 25 % del territorio mexicano cuenta con clima árido, el 20 % templado, el 15 % es tropical seco y el 12 % tropical húmedo por lo que las zonas ganaderas se derivan principalmente de la ecología de los lugares. Existen en el país alrededor de 197 millones de hectáreas, de las cuales la ganadería ocupa el 58 %, siendo esta actividad la que más ocupa el territorio (CONARGEN, 2009).

La cuenca del Papaloapan limita al Norte con el Estado de Veracruz y el Estado de Puebla; colinda al Este con la Region Cañada; al Oeste con el Estado de Veracruz y se encuentra al Sur con la Region Sierra Norte. Tiene una superficie de 8,678 km² integrada por dos distritos Choapan y Tuxtepec. En su clima predomina el cálido húmedo con lluvias todo el año. Su temperatura promedio, es la más alta en el estado de Oaxaca, va de 24 °C a 40 °C (Arellanes *et al.*, 2006).

México posee una gran diversidad de recursos genéticos pecuarios (RGP), comprendiendo un total de 45 razas de bovino, de las cuales 26 son Europeas, siete son cebuínas y 12 son sintéticas, producto de cruzamientos entre razas Europeas y cebuínas. Entre las más importantes se encuentran las razas puras Angus, Hereford, Charolais, Nelore, Pardo Suizo Europeo, Gyr, Angus, Simmental y Limousin. Las cruces de mayor presencia están representadas por Brahman, Indobrasil, Beefmaster y Brangus, entre otras (Financiera Rural, 2012). También se han desarrollado dos cruces adaptadas a los climas tropicales, Tripocarne y la Sardo Negra (doble propósito). Sin embargo, aún no se cuenta con datos de su aporte a la producción nacional ni el número de cabezas existentes.

El ganado doble propósito es un sistema tradicional del trópico en el cual se produce carne y leche simultáneamente utilizando como base vacas cebú/criollas o cruzadas con razas lecheras europeas, lo que generalmente va acompañado de la cría de terneros mediante amamantamiento (Figura 1). Hoy en día esta alternativa se está constituyendo para producir carne y leche sin la necesidad de una gran infraestructura para lograr tal fin (Camargo, 2000).



Figura 1 Ganado bovino de doble propósito de la Región del Papaloapan

2.2 Los marcadores moleculares como herramientas de diagnóstico

Las diferencias que se pueden apreciar en las características de los individuos son ocasionadas por cambios en el ADN, diferencias que se deben a alteraciones en las

bases nitrogenadas en algunas regiones cromosómicas. Las diferencias o polimorfismos en el ADN se denominan generalmente marcadores, los cuales son múltiples alelos de un gen entre una población, que normalmente se expresan como diferentes fenotipos. Este cambio debe estar presente en al menos uno por ciento de la población, si no, se considera una mutación (Syvänen *et al.*,2001).

Los marcadores moleculares a nivel de ADN permiten la determinación de la diversidad genética existente entre y dentro de las poblaciones además, de hacer posible la identificación de variantes génicas únicas. Estas poblaciones pueden servir como reservorios para el mejoramiento genético de poblaciones comerciales y su clasificación permite determinar que técnica es la más adecuada para la determinación de polimorfismos o mutación en los individuos (Pariset *et al.*, 2006).

Los polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP) se identifican usando enzimas de restricción que parten el ADN únicamente en «puntos o sitios de restricción precisos. Actualmente, el uso más frecuente de los RFLP es en combinación con la PCR (PCR-RFLP) para detectar alelos que difieren en secuencia en un sitio de restricción más específico.

Los microsatélites o SSR (Repeticiones de Secuencia Única) o STR (Repeticiones Simples en Tándem) consisten en la secuencia de ADN de unos cuantos nucleótidos de longitud de 2 a 6 pares de bases (pb) que se repiten varias veces en tándem ya que son de un tamaño relativamente pequeño. Pueden ser fácilmente amplificados con la PCR a partir de ADN y seguido de la amplificación, visualizándose en un gel secuenciador (Goldstein and Schlötterer, 1999; Jarne and Lagoda, 1996). Los microsatélites son hipervariables y que a menudo muestran decenas de alelos en un locus que difieren entre sí en el número de repeticiones.

Los minisatélites comparten las mismas características que los microsatélites, pero la longitud de las repeticiones es de entre diez y algunos centenares de pares de bases. Los micro y minisatélites también se denominan polimorfismos VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tándem). Los polimorfismos por ampliación

de la longitud del fragmento (AFPL) son una técnica de identificación del ADN que detecta fragmentos de restricción de ADN mediante amplificación con PCR (Vos *et al.*, 1995).

Los STS (Sitios con Marca de Secuencia) son secuencias de ADN que solo se dan una vez en un genoma, en una posición conocida. Finalmente, los SNP (Polimorfismo de nucleótido único) son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región, y son muy abundantes a lo largo de todo el genoma (Sachinandam *et al.*, 2001). La mayoría de SNP se localizan en las regiones no codificantes, y muchas veces tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo ya que algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), que inducen cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética funcional. (Nielsen y Signorovitch, 2003; Clark *et al.*, 2005).

2.3 Gen Miostatina

El gen de la miostatina (MSTN) bovina ha sido propuesto como el gen responsable del carácter de doble musculatura en varias razas de bovinos (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee 1997).

La MSTN (Genbank: AF_320998.1) (ver Anexo) fue descrita inicialmente por McPherron *et al.*, (1997) quienes reportaron un miembro de la Superfamilia de Factores de Crecimiento TGF- β causante principal del fenómeno de doble musculatura en organismos murinos y bovinos (De la Rosa, 2005). La secuencia de aminoácidos del sitio activo carboxilo-terminal de procesamiento proteolítico de MSTN tiene una homología del 100 % entre especies murinas, roedores, humanos, porcinos y aves (Heather *et al.*, 2001), lo cual sugiere una función común y altamente conservada.

Su proteína es principalmente sintetizada en el músculo esquelético como un propéptido de 376 aminoácidos, produciendo una proteína activa, procesada y madura de 15 kDa. El gen de la miostatina está situado en el cromosoma 2 y consta de 3 exones y 2 intrones (Figura 2). Se trata de un gen que se ha conservado en la evolución filogénica (Zamora *et al.*, 2008).

Fisiológicamente, la doble musculatura es ocasionada por la distrofia muscular (DM) responsable del incremento de masa muscular. Los individuos con doble músculo, desarrollan un mayor número de fibras musculares (hiperplasia celular) ocasionada por la hipertrofia del músculo mh (incremento del tamaño de las fibras musculares) (Figura 2) (Volk, 1997) que presentan ventajas, ya que los animales con distrofia muscular (DM) tienen más carne magra en comparación con un animal normal, mayor masa muscular con menos grasa, y generan incrementos de peso en condiciones de alimentación poco favorables (Puentes, 2006). Sin embargo, fisiológicamente es un patología, ya que se le asocia con la disminución de grasa de otros órganos, reducción de la fertilidad en las hembras, riesgo de enfermedad

respiratoria y cardiovascular, y además requiere la práctica de cesáreas debido a la alta incidencia de distocia, lo cual ha propiciado la selección negativa o positiva de dicho fenotipo para usos específicos en algunas razas y bajo estrategias de manejo (Heather *et al.*, 2001)

El alto polimorfismo del gen ha permitido detectar siete secuencias diferentes (alelos) para la región codificante del gen MSTN (Grobet *et al.*, 1998), 5 de ellas señalan cancelación y la casi eliminación de la función del gen, mientras que los dos restantes no tienen efecto fenotípico en los animales portadores (Heather *et al.*, 2001). No se han identificado otros polimorfismos relacionados con la doble musculatura que estén cerca de los ya identificados. La explicación del fenotipo de estos animales podría ser por la presencia de mutaciones fuera de las secuencias flanqueantes del gen de la MSTN.

Regiones importantes fuera de las codificantes son, por ejemplo, las regiones implicadas en el proceso de maduración por corte y empalme (splicing), es decir en las uniones intrón/exón y las dianas de procesamiento (Royo , 2003). Miranda *et al.*, (2001), revisaron estas regiones mediante protocolos de SSCP, y hasta ahora no se han encontrado mutaciones.

De las mutaciones encontradas en el gen de han identificado 7 mutaciones, (Figura 3) (Tabla 1), en la secuencia codificante de la miostatina en 10 razas europeas (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron, 1997; Grobet *et al.*, 1998; Cappuccio *et al.*, 1999), sin embargo, no se ha encontrado ninguna mutación que permita explicar la doble musculatura en las razas Limusin y Rubia de Aquitania (Grobet *et al.*, 1998). Estos resultados contradicen la tradicional hipótesis de que la doble musculatura del ganado bovino se habría originado por una mutación en el ganado Shorthorn y a partir de él se habría extendido al resto de razas vacunas europeas (Ménissier, 1982). Ciertas razas muestran una clara homogeneidad respecto a la mutación causante del fenotipo, como pueden ser la Blanco-Azul-Belga o la Asturiana de los Valles, sin embargo en otras existe más de un alelo de doble musculatura

segregado en la población, como en la raza Maine Anjou (Royo, 2003) y las razas Belgian Blue, Blonde d'Aquitaine, Limousine, Parthenaise y Asturiana (Figura 4).

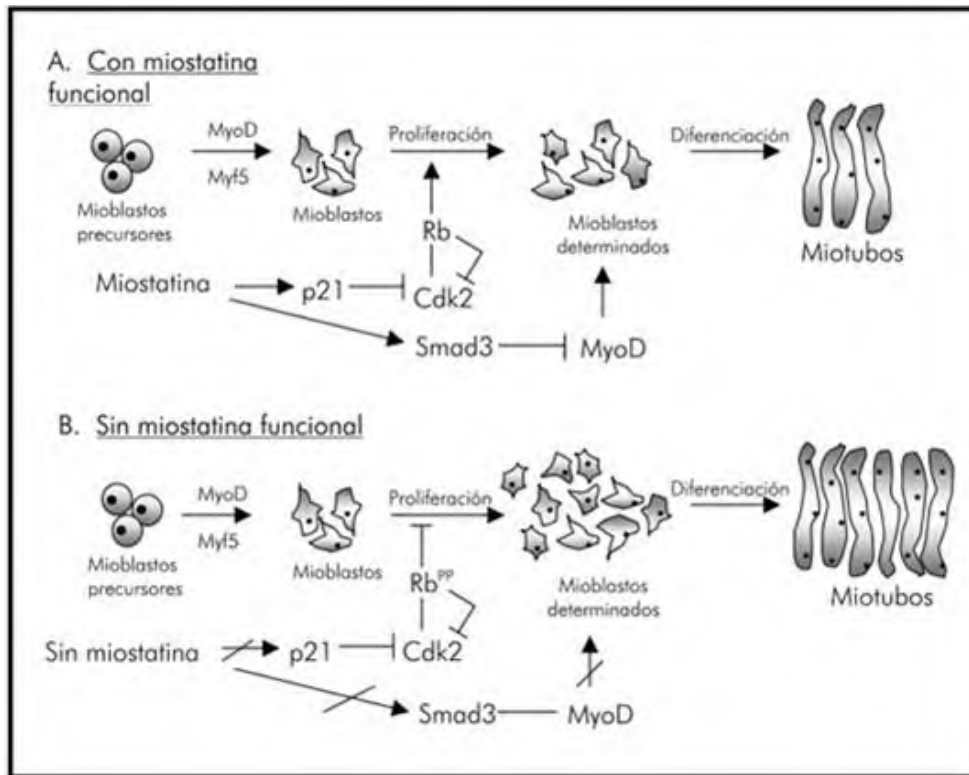


Figura 2. Modelo del papel de la miostatina en el crecimiento muscular (según Thomas *et al.*, 2000; Langley *et al.*, 2002)

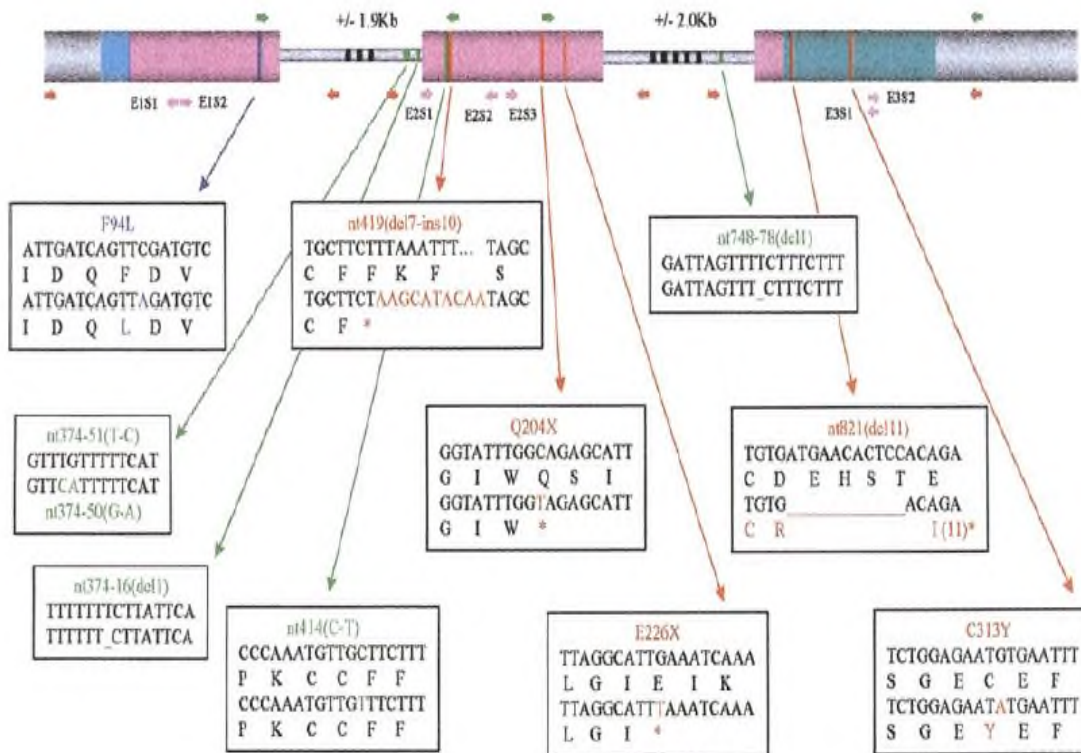


Figura 3. Representación esquemática del gen de la miostatina bovina con la posición de los polimorfismos encontrados (Grobet *et al.*, 1998). En gris se representa las regiones del ADN no traducidas. En azul corresponde al péptido señal para la secreción. En rojo el péptido latente aminoterminal y en verde la parte carboxiterminal bio-activa. Los polimorfismos encontrados en la secuencia están encuadrados: en rojo se representan los que provocan una miostatina no activa, en azul un polimorfismo, que por situarse en la zona del péptido latente, no parece estar asociado a una modificación de la actividad de la proteína normal, y en verde se representan los polimorfismos neutros. Cada polimorfismo se compara con la secuencia control de Holstein.

Tabla 1 Mutaciones del gen de la miostatina.

Mutación	Nombre del Polimorfismo	Descripción
Mutaciones que provocan la aparición de un codón de paro prematuro.	nt821 (del11)	Delección de 11 pares de bases en la posición 821 después del codón de iniciación (Belgan Blue y Austriana de los valles).
	nt419(del7-ins10)	Delección/inserción en la posición 419 a partir del codón de iniciación, donde se reemplazan 7 bases por un grupo de 10 bases (Maine-Anjou).
	Q204X	Transición C-T en el segundo exón en la posición 610 (Charolais).
	E226X	Transversión G-T, en el segundo exón en la posición 676 (Maine Anjou).
Mutaciones que afectan a la estructura secundaria de la proteína	C313Y	Una transición G-A en la posición 938 que supone la sustitución de una cisteína por una tirosina. (Piamontesa y Gascona).
Mutaciones que no afectan la función de la proteína	F94L	Transversión C-A en la posición 282, que conlleva a una sustitución conservativa de una fenilalanina a leucina en el primer exón en la posición aminoacídica 94 (Limusin).
	Nt414 (C-T)	Transición silenciosa C-T, que tiene lugar en la tercera posición del codón 138 (citosina) en el tercer exón. (Charolais).



Figura 4. Fenotipos de doble musculatura en raza a) Limousin, b) Charolais, c) Belgan blue, d) Gascona.

2.4 Técnicas para la detección de polimorfismos

2.4.1 PCR

La técnica de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN. Este fragmento está determinado por secuencias introducidas en la reacción, denominadas “cebadores” o “primers” y a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa, realiza la síntesis exponencial. Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión (Corvalán, 2002). Los inicios de la PCR se remontan a 1971. En un artículo publicado por Kleppe y colaboradores en el describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro* (Bolívar *et al.*, 2014). Debido a que la PCR es flexible, es posible hacer modificaciones de la misma entre

las que destacan el desarrollo de PCR múltiples (multiplex-PCR o mPCR), y RT-PCR)

La estabilidad térmica de un producto de PCR es determinada por su contenido de GC, secuencia de longitud, y la estructura primaria (Ririe y Rasmussen 1996). Esta estabilidad se utiliza en el análisis de curva de fusión, en el que los productos específicos de la PCR se desnaturalizan bajo condiciones controladas (Hjelmsø *et al.*, 2014). Para la determinación cuantitativa de la expresión de un producto se desarrolló la técnica PCR cuantitativa (qPCR), donde es posible identificar los productos de PCR no específicos. Para examinar los productos de q-PCR con mayor detalle, se desarrolló la técnica HRM (Hjelmsø *et al.*, 2014).

Existen métodos específicos y no específicos para monitorear los productos amplificados. Dentro de los específicos, el más usado es el fluoróforo reportero SYBR Green, una molécula intercalante que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidado generan una señal fluorescente. Los métodos específicos siguen el principio conocido como, transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para generar la señal, tal como; las pruebas por hibridación con Sondas Taqman que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos, uno en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia, (denominada en inglés quencher) esta sonda marcada, hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener y cuando se lleva a cabo la PCR, la sonda híbrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. (Livak *et al.*, 1995)

2.4.2 Discriminación alélica

La discriminación alélica es un ensayo basado en qPCR que permite detectar en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. Los SNP's (Polimorfismos de Nucleótido Único) son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica de dos individuos. (Rodríguez, 2014)

2.4.3 High Resolution Melt

El análisis de alta resolución de fusión (HRM), es una técnica que se fundamenta en el estudio y comparación de curvas de fusión de las cadenas de ADN. La técnica requiere un intercalante o fluoróforo (Wittwer *et al.*, 2003). Algunos fluoróforos ocupados en la técnica son SYBR Green, Eva Green, LC green, SYTO Dye o Chromofy entre otros, que se intercalan en la doble hebra de ADN. El ensayo se realiza después de la amplificación, el producto se somete a rangos de temperatura que van desde los 65°C hasta los 95°C con un incremento de temperatura desde ~0.1 °C/seg, lo que ocasiona la desnaturalización del producto de qPCR, permitiendo con esto la detección de cambios de bases de alelos homocigotos o heterocigotos localizadas en un punto de inflexión donde hay una disminución drástica de fluorescencia (Reed *et al.*, 2007). HRM implica una monitorización precisa del cambio en la fluorescencia causada por la liberación de un colorante intercalante de ADN de un dúplex de ADN.

Las diferencias de RFU (Relative Fluorescence Units) de los productos de qPCR de fragmentos de ADN de interés se comparan con un control tomado como referencia para detectar las variaciones de temperatura de desnaturalización en las secuencias de ADN ubicadas en el punto de inflexión, basado en esto la tecnología se ha utilizado para estudiar los polimorfismos (SNP's) y para identificar los genotipos y la presencia de heterocigotos, u homocigotos en los individuos. (Rouleau *et al.*, 2009).

III. ANTECEDENTES

La investigación que se ha desarrollado en relación con las características de importancia en la ganancia de peso en ganado bovino fue reportada por primera vez por Culley (1807) en donde se demostró la característica de doble musculatura en la raza Belgan Blue (1807). En consecuencia se han realizado múltiples trabajos que se enlistan en la Tabla 2, por ejemplo Hanset *et al.*, (1997) donde se demuestra el efecto de las mutaciones y la importancia que tienen en la codificación de la proteína y en el efecto sobre el fenotipo y genotipo del ganado en las distintas razas Europeas (Asturiana de los Valles, Pirenaica) belgas (Blanco Azul), italianas (Piamontesa, Marchigiana) o francesas (Charolais, Limousine), y Royo (2003) determinó siete variantes nucleotídicas dentro de la región codificante, que fueron ubicadas en las mismas razas del trabajo anterior.

Dentro del uso de las herramientas moleculares utilizadas para detectar los polimorfismos de la miostatina existe variabilidad por ejemplo, Salazar (2002) manejó metodologías de PCR analizando los productos en un secuenciador de tipo LI-COR en dicho trabajo se lograron obtener condiciones óptimas para el establecimiento de un método semi-automatizado altamente específico para la caracterización genética de individuos provenientes de hatos de la región norte del estado de Tamaulipas y pertenecientes a las razas Beefmaster y Charolais.

En 2007 se utilizaron Sondas Taqman, usando PCR con Fluoróforo FAM y VIC. (Sifuentes, Rincón *et al.*, 2007); Para 2010 se utilizó la técnica BESST-T (*Allais et al.*, 2010) quien permitió establecer individuos con genotipo normal, mutado o heterocigoto, la cual fue contrastada con el análisis de temperaturas, y fue donde se obtuvieron mejores resultados. Se concluye que es un método rápido para la detección de variaciones nucleotídicas y puede ser aplicable para el análisis de genes que presentan variantes alélicas conocidas que requieran ser monitoreadas en un gran número de muestras en menor tiempo y menor costo que el requerido por otras metodologías que tienen como base la PCR (Moreno *et al.*, 2008). Los estudios han sido realizados generalmente en razas de tipo europea e italianas,

sin embargo, los hatos que se analizaron en la Región del Papaloapan son de doble propósito y son cruza principalmente de razas Cebuínas y Europeas.

Tabla 2. Antecedentes en la detección de polimorfismos de la MSTN

Cita	Tema del trabajo Realizado	Lugar
(Dunner <i>et al.</i> ,2001)	Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas	Reino Unido
(Tobergte and Curtis, 2013)	Variación genotípica en el gen de la miostatina bovina y sus efectos sobre la musculatura	Australia
(Salazar, 2002)	Evaluación de nuevos marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino	México
(De la Rosa Xóchitl, 2003)	Evaluación de regiones asociadas a la ganancia de peso en raza Beef Master	México
(Sifuentes, Rincón <i>et al.</i> , 2007)	Frecuencia del alelo Q204X del gen miostatina, en hatos de ganado Charolais de la región noreste de México	México
(Moreno <i>et al.</i> , 2008)	Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster	México

En la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, existe un equipo de trabajo en el laboratorio de Biotecnología animal, que se enfoca principalmente el estudio de animales predominantes en la región del Papaloapan como lo es el ganado bovino y ovino en el que se analizan muestras tomadas de la misma con el interés de mejorar la calidad, y cantidad de producción de la carne y la leche, así como la reproducción de los mismos.

V. JUSTIFICACIÓN

En la Universidad del Papaloapan existe un equipo de trabajo que ha desarrollado investigación en la mejora de la calidad de la leche y carne bovina especialmente en ganado de doble propósito ya que es el que predomina en la región debido a la ubicación geográfica y a las condiciones climatológicas. En esta búsqueda de genes con características fenotípicas de importancia económica se emplean los uno de los más buscados es la Miostatina, polimorfismos del gen GDF8, que otorgan un fenotipo de doble musculatura. La identificación de estas regiones polimórficas en razas de la región es de gran interés, porque representa una opción que podría ser usada como selección de animales genéticamente superiores en estructura molecular, lo cual a futuro permitirá generar recomendaciones técnicas reproductivas y de manejo, con el propósito de obtener hatos de ganado con mayor contenido de carne y menor contenido de grasa es decir carne magra. En la búsqueda se propone el uso de una técnica relativamente nueva que es el High Resolution Melt ya que se reportado como una herramienta efectiva, eficaz y costeable para la detección de polimorfismos de SNP.

VI. HIPÓTESIS

En la Región del Papaloapan existe ganado de doble propósito portadores del polimorfismo Q204x en el gen GDF8 ligado a la doble musculatura, debido a los antecedentes en ganado bovino presente en México y debido a la cruce desmesurada que ocurre para obtener ganado con características fenotípicas específicas.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Identificar el polimorfismo Q204X del gen GDF8 que está asociado a la doble musculatura de bovinos de doble propósito en la región del Papaloapan.

7.2 Objetivos Específicos

- Identificar mediante herramientas moleculares bovinos portadores del gen GDF8 ligado a la doble musculatura.
- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas en ganado bovino.
- Determinar si existe equilibrio de Hardy-Weinberg

VIII. METODOLOGÍA

8.1 Clasificación de la muestra

El presente trabajo de investigación se desarrolló a partir de muestras de sangre de 280 bovinos que fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología animal de la Universidad del Papaloapan que también han sido utilizadas en trabajos previos del 2016. Estas muestras se clasificaron de acuerdo a integridad y concentración para su uso posterior.

8.2 Extracción de ADN

Se utilizó el Kit comercial de Extracción de ADN Sanguíneo Quick-g DNA Blood MiniPrep bajo el siguiente protocolo:

Se colocaron 100 µl de sangre de bovino en un tubo para centrifugado y se le adicionaron 400 µl de Genomic Lysis Buffer, los cuales fueron homogeneizados durante 5s en vórtex y se dejaron reposar durante 10 minutos. A continuación la muestra se transfirió a una columna que contenía un nuevo tubo de colección y se llevó a centrifugar a 10,000 xg durante un minuto y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se transfirió a la columna con un nuevo tubo de colección en donde se le agregaron 200 µl de ADN Pre-Wash Buffer. Sin dejar reposar se llevó a centrifugar a 10000 xg durante un minuto, a la misma columna se le agregaron los 500 µl de g-DNA Wash Buffer y se llevó a centrifugar a 10,000 xg durante un minuto. Inmediatamente la columna se colocó en un tubo nuevo en el que se le adicionaron 50 µl de Elution Buffer y se dejó incubar durante 5 minutos. Para concluir con el proceso se centrifugó a 5000 g durante un minuto y se colocó a una temperatura entre 4 °C y -20 °C.

8.3 Electroforesis

Se verificaron las concentraciones del ADN en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) se verificó la integridad mediante electroforesis, cargando 2 µl de ADN más 1 µl de buffer de carga en gel de agarosa al 0.8 % con buffer TAE 1X y corriendo por 30min a 90 Volts. Las bandas se visualizaron por tinción con Bromuro de Etidio y visualización de bandas propias de ADN genómico en un sistema de fotodocumentación.

8.4 Concentración de ADN

Se ajustaron las concentraciones de todas las muestras de ADN a 5 ng/ µl bajo la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, utilizando el búfer de elución.

8.5 Diseño de positivos sintéticos.

Se localizó el gen MSTN [*Bos taurus* (cattle) ID: 281187 en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se diseñaron las secuencias control de la región específica Exón II para el polimorfismo Q204X posición 610 donde se ubica la transición C>T. La tabla 3 muestra las secuencias control sintéticas donde el color rosa representa la zona que hibrida el oligonucleótido directo, la zona sombreada en color amarillo indica la mutación, mientras que la zona en color verde representa la región sin cambio en la secuencia, y la región en color azul, la zona que hibrida el oligonucleótido reverso.

Tabla 3. Secuencias control utilizadas para el análisis HRM.

Nombre	Secuencia	pb
Q204XCP	AC TTGACATGAACCCAGGCACTGG TATTTGG T AG AGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAG	61
Q204XCN	AC TTGACATGAACCCAGGCACTGG TATTTGG C AG AGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAG	61

8.6 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se estableció para la técnica de Qpcr. Las condiciones que se tomaron en cuenta fueron, relación Guanina-Citosina de 40-60% respectivamente, el tamaño de los oligonucleótidos entre 20 y 25 pb, temperatura de 50-60 °C, con un tamaño de amplificación no > 150 pb de la región específica en el Exón II donde se localiza la transición. Posteriormente se mandaron a sintetizar a la empresa T4X en Cuernavaca, Morelos.

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la amplificación del polimorfismo Q204X

Nombre	Secuencia	pb	% CG	Tm°C
Forward	TTG ACA TGA ACC CAG GCA CTG G	22	55	57
Reverse	GCA ACA CTG TCT TCA CAT CAA TGC	24	46	56

8.7 Parámetros optimizados.

La optimización de la reacción de q-PCR se llevó a cabo controlando los parámetros críticos, tiempo, temperatura de alineamiento y número de ciclos y se realizaron las curvas para la concentración optima de oligonucleótidos y la muestra. (Hecker and Roux, 1996)

8.8 Amplificación de las secuencias control

Se realizaron diluciones (1:10 ,1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) por duplicado de las secuencias control Q204XCN Y Q204XCP para determinar la concentración óptima a utilizar. Para la dilución 1:10, se agregaron, 10 µl del control (10pM) en un tubo y se adicionaron 90 µl de H2O. Para la dilución 1:100, se agregaron en un tubo, 10 µl de la dilución 1:10 y 90 µl de H2O y así sucesivamente. Las diluciones control

estándar se amplificaron mediante qPCR en el termociclador en tiempo real IQ5 (modelo Biorad) del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

8.9 Amplificación de las muestras de ADN de Bovino

Se amplificó el Gen MSTN a partir de ADN genómico extraído de sangre, por medio de la reacción en cadena de la qPCR con los oligonucleótidos sintetizados. La mezcla de reacción obtenida de acuerdo a la optimización de los parámetros se llevó a cabo de acuerdo al protocolo SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific®)

A partir de ADN genómico extraído de sangre, se amplificó el polimorfismo Q204X por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando los oligonucleótidos ya descritos, así como también de las secuencias de las muestras control mediante los protocolos en la Tabla 5 y 6. Posteriormente se llevó a un análisis HRM por medio del protocolo descrito en la Tabla 7.

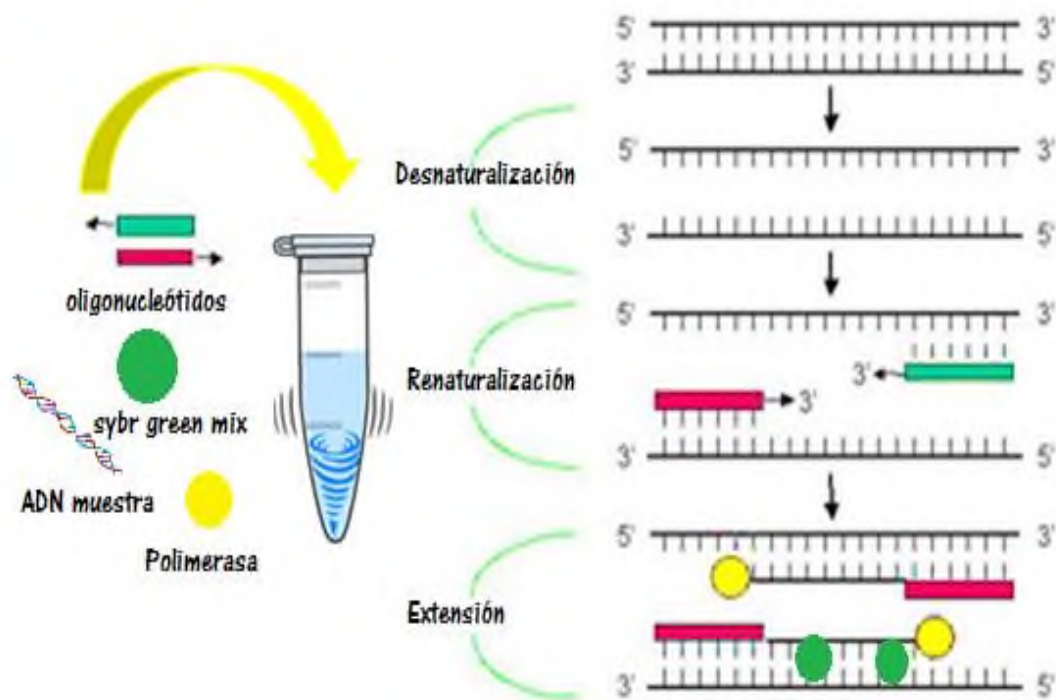


Figura 5. Ciclos de qPCR

Tabla 5 Protocolo de la mezcla de reacción SYBR Green qPCR Master Mix

Reactivos	Cantidad
Master Mix	12.5µL
Oligonucleótido F(Forward)	1µl(1µM)
Oligonucleótido R(Reverse)	1µl(1µM)
ADN genómico	3 µL (≤500ng)
Agua libre de nucleasas	7.5µL
Volumen final	25µL

Se utilizaron controles, positivo, negativo y heterocigoto.

Tabla 6 Protocolo termociclador

Pasos	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Pre calentamiento	50	2 minutos	1
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1
Desnaturalización	95	15s	40
Alineación/extension	60	60s	

Tabla 7 Análisis HRM

Temperatura de inicio	65 °C
Temperatura final	90 °C
Tiempo de espera	00:01mm:ss
Incremento de temperatura	0.04 °C

8.10 Análisis HRM (High-Resolution Melt Analysis)

Se realizó un ensayo HRM, en el termociclador Pico Real Tm de 24 posillos utilizando el fluoróforo SYBR Green que permitió el análisis post PCR para detectar variantes alélicas en la secuencia de interés. Se realizó una curva de fusión (Melting curve) con un incremento de temperatura de 0.04 °C dentro de un rango de 70 °C a 90 °C como se indica en la tabla 7. Se analizaron las diferencias alélicas mediante el software HRM y se compararon las curvas de disociación detectando los cambios de fluorescencia entre cada una de las muestras.

8.11 Análisis estadístico

Para el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen GDF8 se utilizó la prueba de X^2 (Chi cuadrada), empleando la ecuación de Hardy-Weinberg:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

donde:

p^2 = frecuencia de *AA* (homocigoto dominante) con un polimorfismo *n*

$2pq$ = frecuencia de *AB* (heterocigoto)

q^2 = frecuencia de *BB* (homocigoto recesivo) con un polimorfismo

IX. RESULTADOS

9.1 Verificación de ADN de las muestras de bovinos.

La integridad del ADN extraído a partir de las muestras de sangre se observa en la Figura 6 presentando bandas propias del ADN genómico en el gel de agarosa.

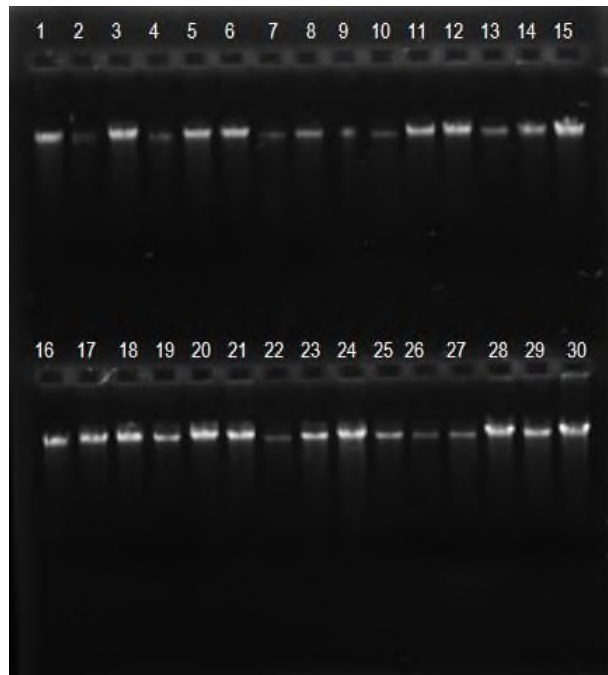


Figura 6. Verificación de ADN. Carril 1-30: ADN genómico de sangre de bovino. Ilustración representativa del total de las muestras.

La concentración ajustada a partir de las diluciones fue de $\sim 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Se obtuvo una relación de absorción A_{260}/A_{280} con una pureza en un rango de 1.8-2, indicativo de pureza adecuada para posteriores análisis.

9.2 Amplificación de las muestras y secuencias de control sintéticas

Las amplificaciones de las muestras y secuencias de control sintéticas tuvieron un rango de fluorescencia de 1500 a 2000 RFU como se muestra en la Figura 7 y Figura 8. La especificidad de los oligonucleótidos se demostró con la amplificación de los controles sintéticos del gen GDF9 y las muestras procesadas.

De las diferentes concentraciones de control se obtuvieron rangos de fluorescencia desde 1000 a 2500 RFU con RFU de 2500 se encuentra la dilución 1:100000, en 1800, 1:10000, 1700 1:1000 1200 RFU 1:1000 como se muestra en la Figura 7 y se consideró a utilizar la dilución 1:100000 que coincidía con el ciclo y RFU donde las muestras comienzan a amplificar.

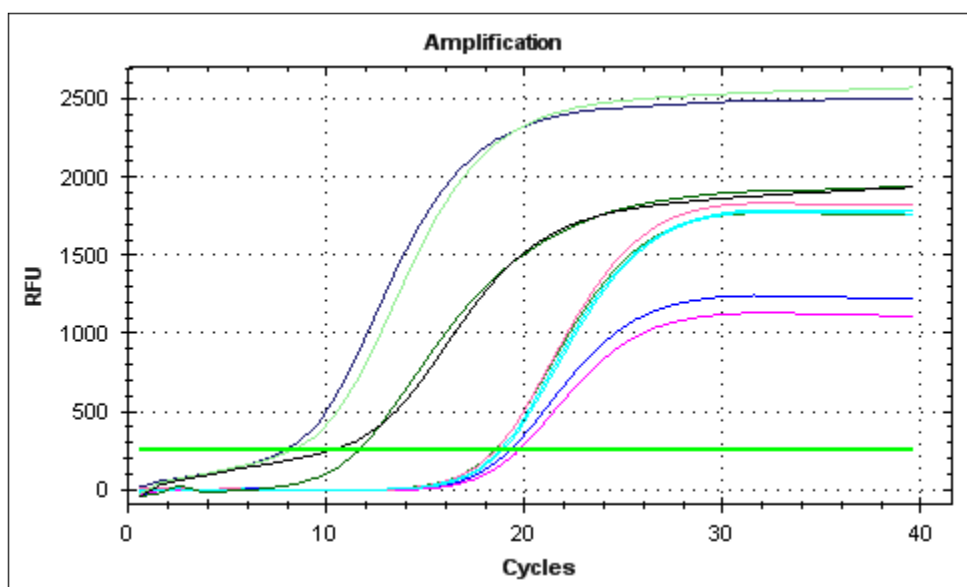
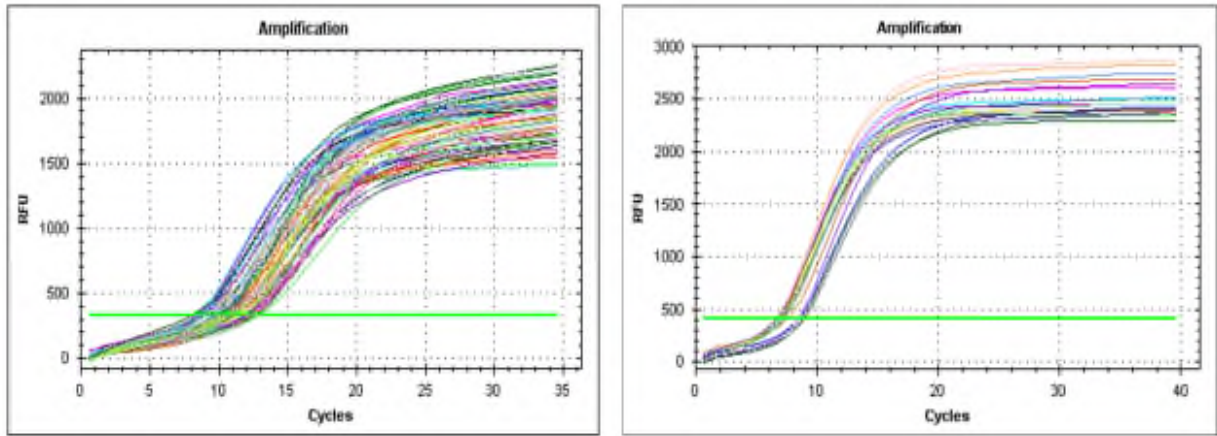


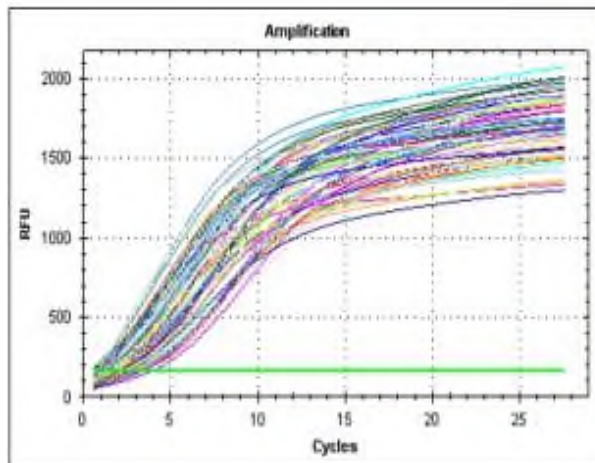
Figura 7. Amplificación de control para GDF8 mediante qPCR.

Las muestras amplificadas en equipo iQ5 tuvieron un rango de fluorescencia de 2000 a 2800 RFU como se muestra, amplificando alrededor del ciclo 10, como se muestra en la Figura 8 a y b. En la Figura c de la misma amplificó alrededor del ciclo

5. La especificidad de los oligonucleótidos se demostró con la amplificación correcta de las muestras procesadas y los controles que se encuentran en la Figura 7.



a) b)



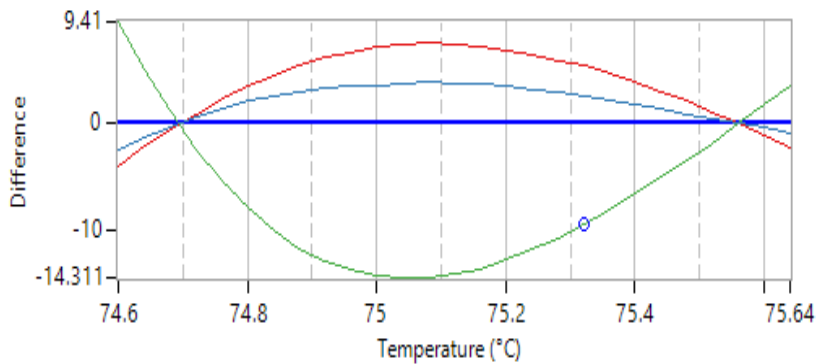
c)

Figura 8. Amplificación de las muestras del gen GDF8 mediante Qpcr, en la figura a) se muestra el primer amplificado del experimento en donde se amplificaron un total de 96 muestras alrededor del ciclo 10, en la figura b) se muestra el amplificado de las muestras y en la figura c) fue el último experimento de 96 muestras que se amplificaron en el equipo de Qpcr iQ5.

9.3 Análisis HRM para los controles.

El análisis HRM se llevó a cabo en el termociclador Pico Real [™] analizando un total de 198 muestras, de donde se obtuvieron gráficas iniciales para los controles, AA, AB, y BB que se puede observar en la Figura 9 a) donde se muestra la adecuada identificación de los controles sintéticos que están representados en verde para el homocigoto dominante, en rojo para el homocigoto recesivo, y en azul para el control heterocigoto en la Figura 9 b) se muestran las tres diferentes temperaturas y curvas de fusión correspondientes a los tres genotipos posibles respecto a los controles.

a)



b)

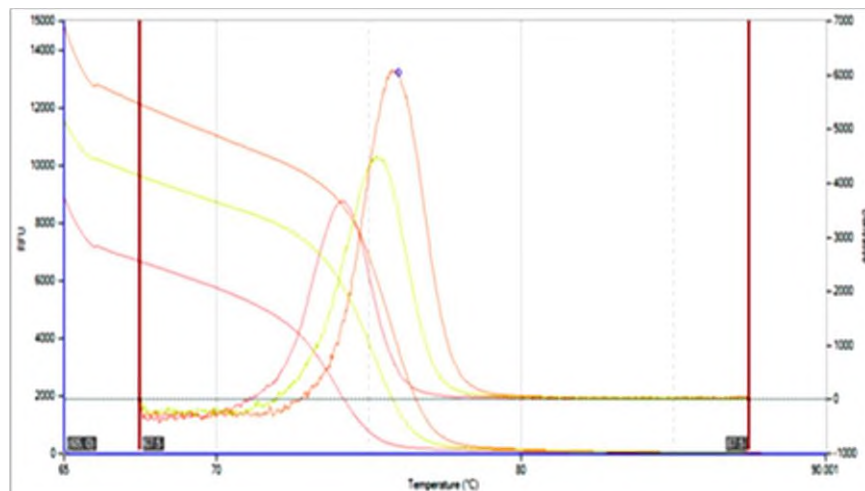


Figura 9. a) Análisis HRM de los controles, azul AA, rojo BB, verde AB que tienen una Temperatura entre 74.4 y 75.64 **b)** Curvas de disociación de los productos de qPCR para los controles sintéticos.

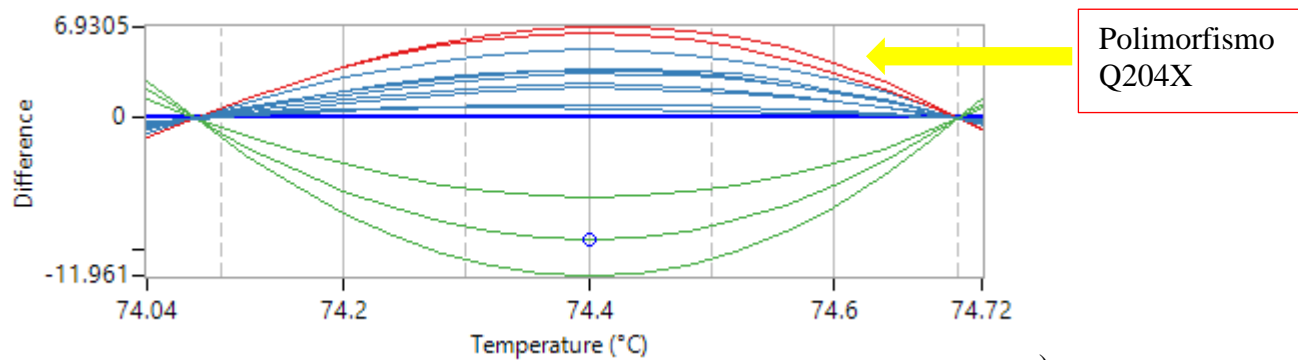
9.3.2 Análisis HRM para el polimorfismo Q204X

Mediante el análisis HRM se examinaron las muestras en el que se observó la asociación respectiva a los controles que realiza el equipo para los diferentes genotipos, que son descritos para el homocigoto recesivo en rojo, heterocigoto en azul y en verde el genotipo homocigoto recesivo que se ocuparon como control, en las gráficas que representan la Figura 10 puede observarse como las muestras se separaron mediante los controles y la variación que demostraron acoplándose mayoritariamente al control heterocigoto para el alelo Q204X. Cabe destacar que las muestras no se acoplan fuertemente debido principalmente a que las muestras obtenidas de la extracción de sangre contienen grupos hemos que probablemente sean los que difieren en la amplificación a los controles y por ende estar por debajo o arriba del mismo, sin embargo, el programa los asocia debido también al tamaño y posición del pico en el análisis de Melting que se le realizó a la par a los controles y a las muestras que dieron como positivo para el polimorfismo.

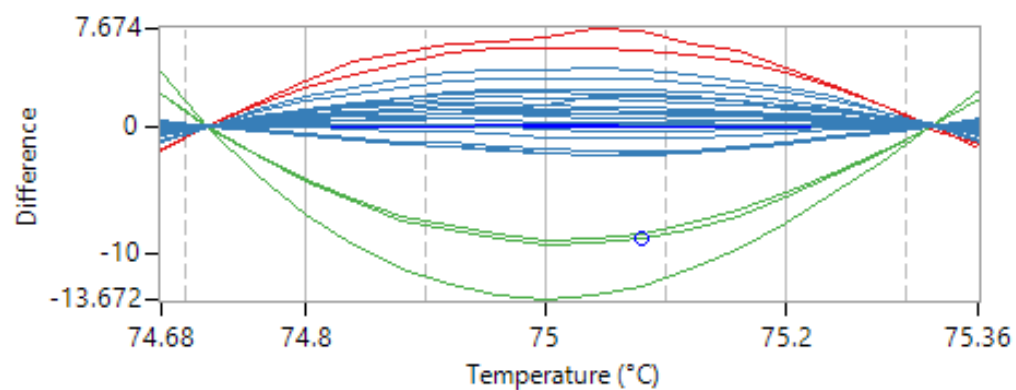
Para encontrar la distinción en los controles se estandarizó el intervalo de la temperatura de disociación, se homogeneizaron los datos de todos los análisis el cual resultó estar entre 74.1-74.9.

En la Figura 10 se muestran las gráficas correspondientes al análisis HRM para la detección del polimorfismo, donde se puede observar en el inciso a) y b) c) y d) en color rojo un acoplamiento al control homocigoto recesivo que indica que existe el polimorfismo Q204X en la muestra, así como también un acoplamiento a control heterocigoto y homocigoto dominante. Los otros incisos e), f,) y g) son muestras que solo se acoplaron con el control heterocigoto para el color verde y homocigoto

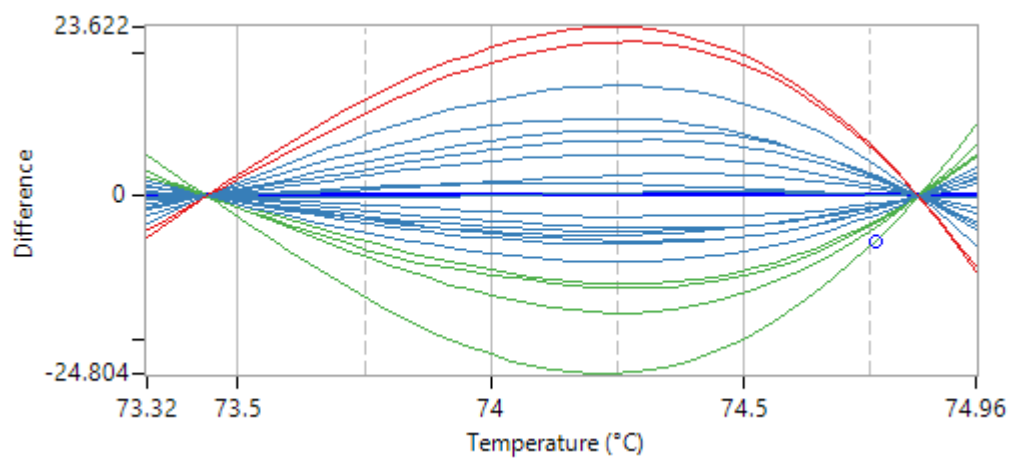
dominante para la curva en color azul. La figura no representa la totalidad de todas las muestras.



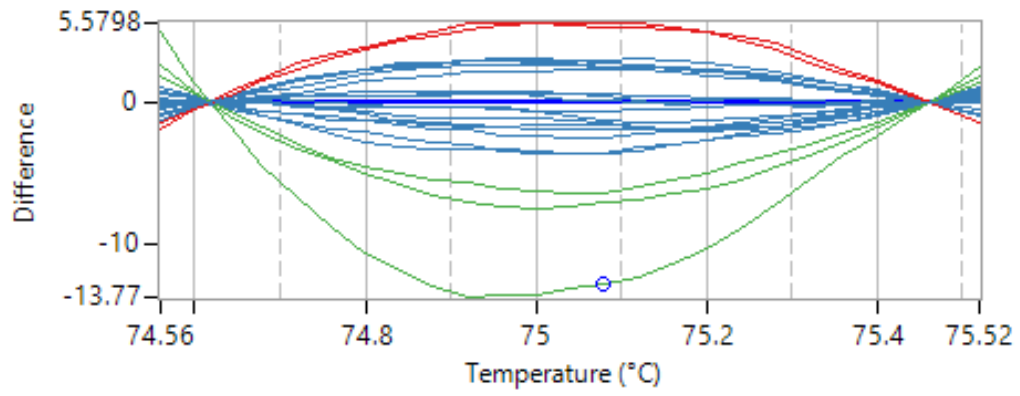
a)



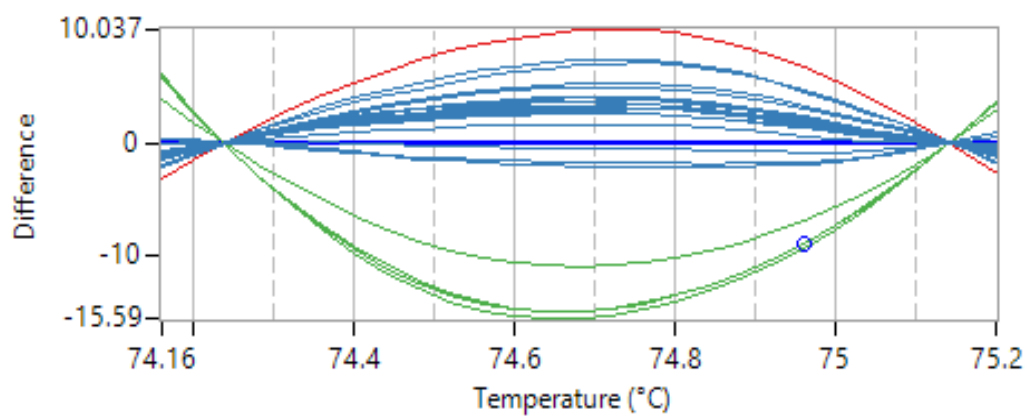
b)



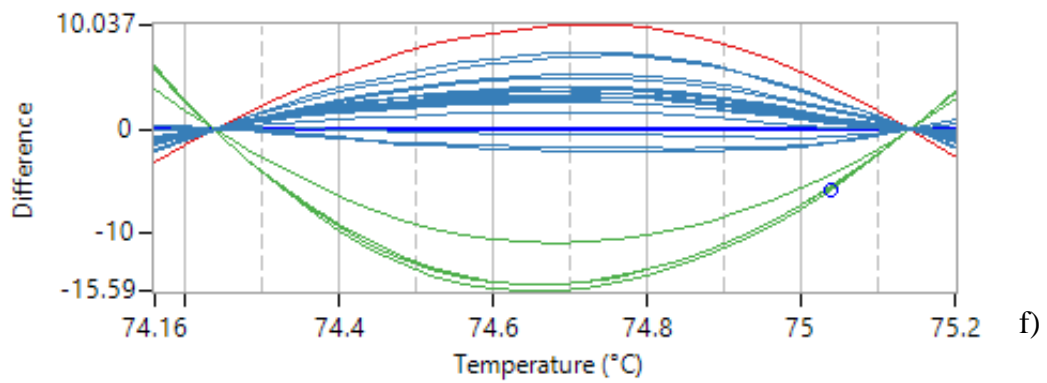
c)



d)



e)



f)

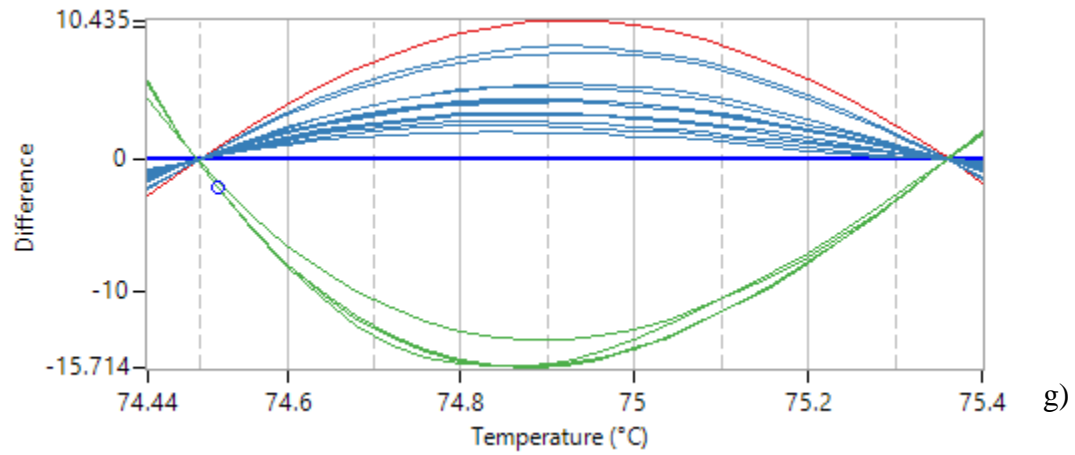


Figura 10 Gráficas del equipo Piko Real 2.0 en el que se muestran la asociación de las muestras con los controles sintéticos a, b, c, d, e, f, en rojo el genotipo homocigoto recesivo en verde para el heterocigoto y azul para el genotipo homocigoto dominante.

9.4 Análisis estadístico

En este estudio se evaluó la variación genético-molecular en poblaciones de bovinos de doble propósito de diferentes ranchos de la cuenca del Papaloapan, usando muestras que fueron ocupadas para otros estudios relacionados con la calidad de la leche en la Universidad del Papaloapan. Utilizando la técnica High Resolution Melt se obtuvieron datos genotípicos que permitieron definir el grado de variación genética en la población representativa.

Para la identificación de polimorfismo Q204X en el gen GDF8 se observó que de una población (n=250) se obtuvieron los siguientes porcentajes de genotipos para el alelo Q204X 20 %, para el homocigoto dominante 77 %, para el heterocigoto y 3 % para el homocigoto recesivo (Tabla 8). En cuanto al ensayo no se analizó el total de las muestras ya que no contaban con las condiciones para realizarles el análisis HRM ya que estas no amplificaron.

En la tabla 8 se observa que la frecuencia del genotipo para el homocigoto AA fue de 0.03 para el heterocigoto AB de 0.77 y para el homocigoto BB de 0.2 en el ganado bovino respecto a la identificación de la mutación Q204X, mientras que la frecuencia de los alelos A y B (Figura 13) fueron de 41 % y 59 % respectivamente, siendo el alelo AB el más predominante como se observa en la Figura 11.

Se observó un porcentaje mayor de animales que los esperados para el polimorfismo para el genotipo AA mostrado en la Figura 12. Asimismo, se observó que la heterocigocidad media fue de 0.32 en el que se obtuvo un valor de $X^2_{obs} = 39.5355$ que se comparó con el valor obtenido de tablas que fue igual a $X^2_{teórica} = 5.99$ con 2 grados de libertad y un grado de confianza igual a 0.05. Como $X^2_{obs} > X^2_{teórica}$, la diferencia es significativa, lo que indica que p^2-q^2 es diferente de lo observado y que en la población no cumple con el equilibrio Hardy Weinberg. Esto significa que en la composición genética actúa la selección natural y con ello cambios mutacionales.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de muestras de bovinos para el polimorfismo Q204X

	Genotipos			Frecuencias alélicas		
	AA	AB	BB	Total	A	B
Número de individuos observados	41	153	4	198	0.41	0.59
Frecuencia genotípica observada	0.20	0.77	0.03	1		
Número de individuos esperados	70	95	33	198		
Frecuencia genotípica esperada	0.35	0.5	0.16	1		

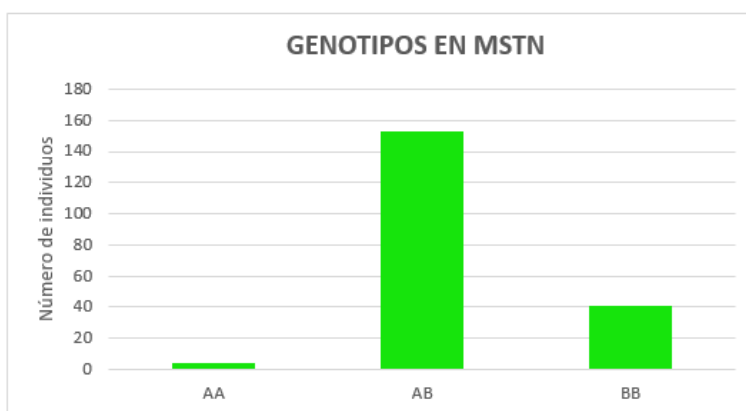


Figura 11. Genotipos observados en la población para el polimorfismo Q204X

Tabla 9. Muestras y respectivos alelos, determinados por HRM

Muestra	Alelo	Muestra	Alelo	Muestra	Alelo	Muestra	Alelo	Muestra	Alelo
Control	A	39	AB	80	AB	121	A	162	A
Control	B	40	AB	81	AB	122	AB	163	AB
Control	AB	41	AB	82	A	123	A	164	AB
1	AB	42	A	83	AB	124	AB	165	A
2	A	43	A	84	AB	125	AB	166	AB
3	AB	44	A	85	A	126	AB	167	AB
4	AB	45	AB	86	AB	127	A	168	AB
5	AB	46	A	87	B	128	A	169	AB
6	AB	47	A	88	AB	129	AB	170	AB
7	AB	48	A	89	AB	130	AB	171	AB
8	AB	49	A	90	AB	131	AB	172	AB
9	AB	50	A	91	AB	132	A	173	AB
10	AB	51	A	92	AB	133	AB	174	AB
11	AB	52	AB	93	AB	134	AB	175	AB
12	AB	53	AB	94	AB	135	AB	176	AB
13	AB	54	A	95	AB	136	AB	177	B
14	AB	55	A	96	AB	137	AB	178	AB
15	AB	56	A	97	AB	138	AB	179	AB
16	A	57	A	98	A	139	AB	180	AB
17	AB	58	A	99	AB	140	AB	181	AB
18	AB	59	A	100	AB	141	AB	182	A
19	AB	60	AB	101	A	142	AB	183	AB
20	AB	61	AB	102	AB	143	AB	184	AB
21	AB	62	AB	103	AB	144	AB	185	AB
22	A	63	A	104	B	145	AB	186	AB
23	A	64	AB	105	AB	146	AB	187	AB
24	AB	65	A	106	A	147	AB	188	AB
25	AB	66	A	107	AB	148	A	189	AB
26	AB	67	AB	108	AB	149	AB	190	AB
27	AB	68	AB	109	AB	150	B	191	AB
28	AB	69	AB	110	AB	151	AB	192	AB
29	AB	70	AB	111	AB	152	AB	193	AB
30	AB	71	AB	112	AB	153	AB	194	AB
31	AB	72	AB	113	AB	154	A	195	AB
32	AB	73	A	114	AB	155	AB	196	AB
33	AB	74	AB	115	AB	156	AB	197	AB
34	AB	75	AB	116	B	157	AB	198	AB
35	AB	76	A	117	AB	158	AB		
36	A	77	AB	118	AB	159	AB		
37	AB	78	AB	119	AB	160	AB		
38	AB	79	AB	120	AB	161	AB		

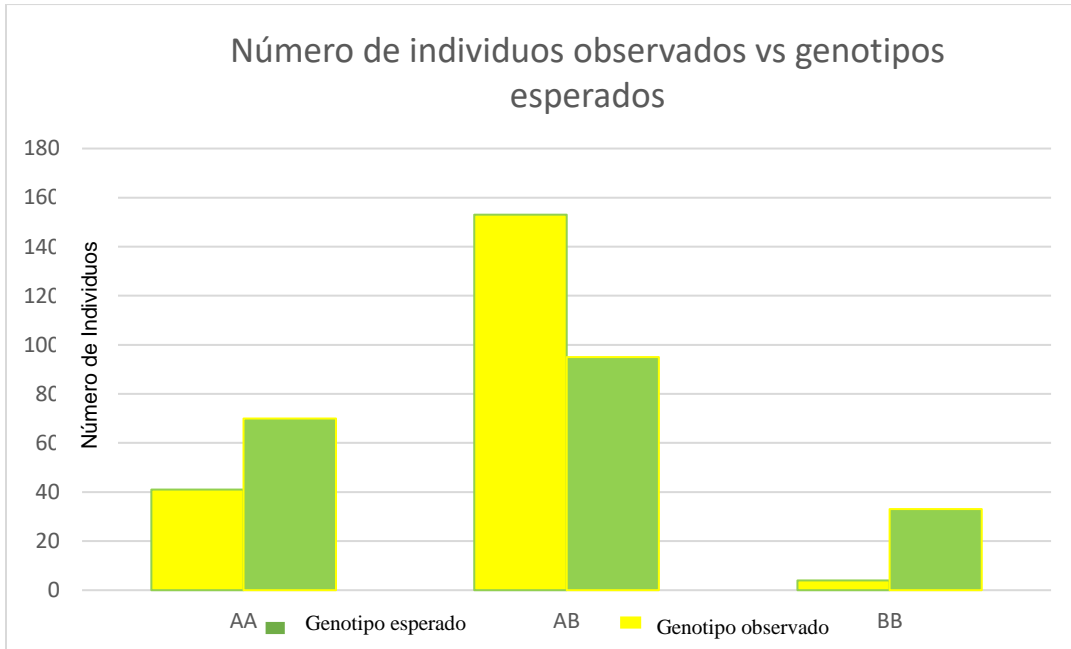


Figura 12. Genotipos observados vs genotipos esperados.

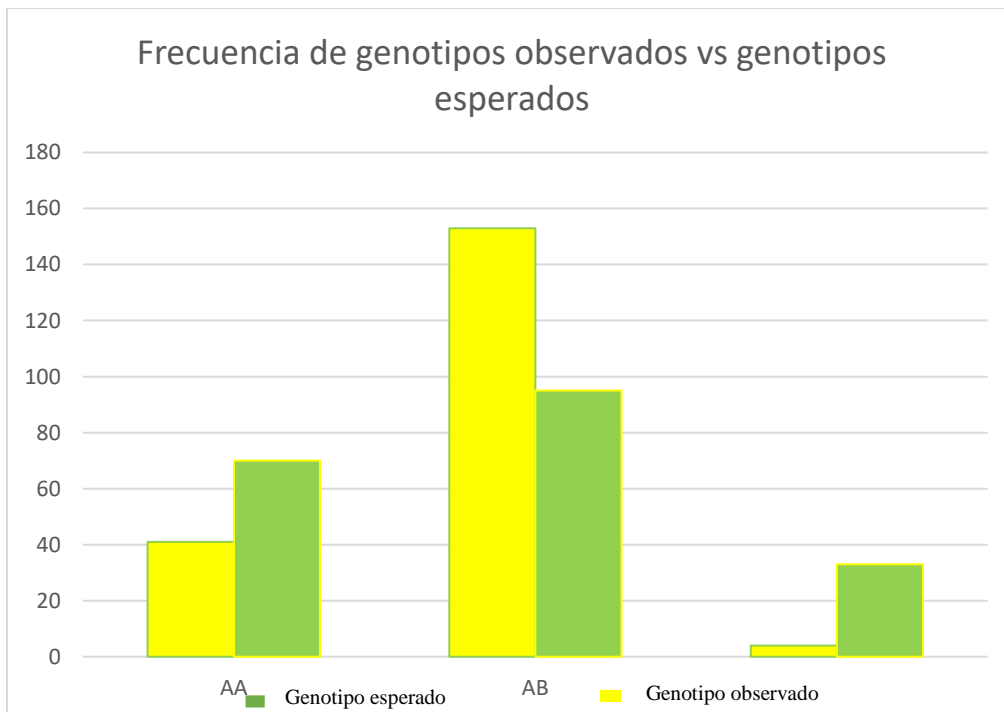


Figura 13. Frecuencia de genotipos observados vs genotipos esperados

X DISCUSIÓN

Dado que la detección de polimorfismos asociados a una característica económica requiere del monitoreo de un gran número de individuos, es necesario el uso de técnicas a gran escala. Las técnicas de detección basadas en fluorescencia ofrecen ventajas sobre las técnicas tradicionales basadas en PCR (Secuenciación, PCR RFLPs, SSCP), como son la rapidez y costo de la prueba (Wittwer *et al.*, 2003). Una de estas pruebas es HRM técnica que permite hacer la detección de polimorfismos de un solo nucleótido SNPs. El análisis HRM resultó ser una herramienta de diagnóstico molecular con un alto potencial que permitió detectar mutaciones en cambios significativos de fluorescencia con alta sensibilidad, especificidad y rapidez.

El alelo Q204X de MSTN representa un marcador potencial de selección para la calidad de carne es por ello el interés en la detección del mismo. Sin embargo, existen pocos estudios poblacionales evaluando su frecuencia. Entre los estudios que reporta la literatura se encuentra la detección del alelo para polimorfismos basados en el uso de PCR-RFLP's (Antoniou and Grosz, 1999). Se puede decir que la detección por RFLP's no pudo aplicarse en esta metodología por no encontrar una enzima de restricción que corte en la región que se requiere para detectar el polimorfismo.

De los resultados obtenidos en este estudio, se encontró que del total de la población 41 individuos fueron homocigotos dominantes para el alelo Q204X del gen MSTN y mientras que 153 animales fueron portadores heterocigotos para dicho alelo y solo 4 individuos fueron homocigotos recesivos y que expresan la característica del alelo Q204X.

Los individuos que expresaron la característica, representan solo un 3 % del total de los animales en estudio. Estos resultados no son tan distantes de lo encontrado por Sifuentes *et al.*, (2007) en donde reportan una frecuencia del 5.2 % de animales

portadores en ganado Charolais, en animales de la región norte del país. Así mismo, Dvorak *et al.*, (2002) reportaron una frecuencia de dicho alelo de 1.2 y 10 % en dos hatos de ganado Charolais de países de Europa del este; Por su parte Dunner *et al.*, (2001) encontraron una frecuencia del 60 % de un haplotipo del gen miostatina que incluye la presencia del alelo Q204X, un porcentaje significativo ya que se evaluó la mayoría de los polimorfismos posibles en el gen, lo que condujo a una mayor presencia.

De la presencia del polimorfismo en raza Charolais, cabe mencionar que es la principal portadora del polimorfismo Q204X, mientras que en este estudio se usaron animales denominados doble propósito utilizados principalmente para producir carne y leche en el trópico mexicano. Sin embargo, en estos trabajos citados, no se evalúa el impacto positivo del alelo Q204X para la producción de carne, sino más bien, desde el punto de vista reproductivo y los problemas que conlleva en los partos distócicos en las hembras, cabe destacar que el polimorfismo también está asociado con la ganancia de peso de los animales para verlo desde un punto de vista productivo, permitiendo, al ser enfocado en un esquema de cruza en campo, un potencial en los animales de la región para expresar el alelo Q204X.

Por medio de la selección fenotípica de individuos heterocigotos para el alelo Q204X, se esperaría que algunos sean superiores en musculatura que sus contrapartes normales, expresando el fenotipo característico de la doble musculatura. La evaluación del alelo Q204X en hatos de doble propósito permitirá establecer el manejo de su presencia, y enfocar estrategias para aprovechar las ventajas que ofrece la presencia de doble musculatura. En otros países con aplicación de la biotecnología animal, la evaluación con marcadores genéticos empieza a ser un requisito para la inclusión de animales en pruebas de desempeño para características como calidad de carne.

En México, los análisis moleculares pueden servir para generar información que permita establecer cómo cada forma alélica de los genes de interés productivo

(como es el caso del gen MSTN) pueden ser incluidos para la generación de una línea de interés ya que estos se han ido disseminando entre los hatos de acuerdo al mal manejo fenotípico y empírico.

Evaluar este gen en diferentes poblaciones permite deducir el nivel de manejo fenotípico de la doble musculatura desde su introducción a México y establecer las bases para el mejoramiento genético asistido aprovechando la ventaja que ofrece la presencia de la doble musculatura en esta raza. Cabe mencionar que el presente trabajo junto con el trabajo de Sifuentes *et al* (2007) son los primeros reportes en evaluar al alelo Q204X bajo la técnica HRM en hatos mexicanos. Se requiere continuar con esta línea de investigación adicionando datos productivos para establecer la asociación de este gen con características económicamente importantes, como la frecuencia de partos distócicos, pesos al nacimiento, destete y finalización, así como con las características del producto en canal.

XI CONCLUSIONES

Mediante un análisis de la diversidad genético-molecular de la población que se realizó por medio de la técnica High Resolution Melt para el alelo Q204X del gen MSTN, se logró analizar el material genético de poblaciones de ganado de doble propósito que se desarrollan en la cuenca del Papaloapan, el material seleccionado representó una fuente importante de información que permitirá en un futuro evaluar las interacciones genotipo-fenotipo y medio ambiente.

Se lograron obtener secuencias positivas y negativas como control y oligonucleótidos que resultaron tener las características adecuadas para la amplificación por q-PCR, así como para el análisis HMR, así como también resultaron ser específicos y eficaces para la obtención de resultados confiables

La técnica High Resolution Melt resultó ser eficaz y rentable en comparación con otras técnicas que requieren además del ensayo una secuenciación, la herramienta analizar el material genético de poblaciones de ganado de doble propósito que se desarrollan en la cuenca del Papaloapan para detectar en al menos 4 bovinos positivos para el polimorfismo y 153 animales portadores, como también se muestran bovinos que no contienen a la mutación.

Se concluye que en el total de la población reportada se encontraron las frecuencias para el alelo BB con un 3 % que representa la presencia del polimorfismo Q204X siendo el alelo AB el más predominante que se observó, con un porcentaje del 77% para el portador heterocigoto AB, el cual representa un porcentaje positivo para próximas cruces, y un 20 % que indica no contener al polimorfismo.

La población no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg y esto puede ser debido a que no se cumplen las condiciones, ya sea por el flujo genético el tamaño de la población entre otras, lo que conlleva a que las frecuencias de los alelos en la población no sean estables.

La hipótesis de la que partió el trabajo se aceptó aseverando que existen en la región del Papaloapan Bovinos con presencia y portadores del polimorfismo Q204X de acuerdo al análisis pertinente.

Las recomendaciones generadas para los productores aún no resultan ser concretas ya que se requiere de más de un análisis para determinar tanto genética como fenotípicamente a los bovinos, tomando muestras de hatos que contengan un registro genealógico, así como la selección de hembras y machos de la población.

El establecimiento de la presencia del alelo Q204X en el gen MSTN del ganado de doble propósito, abre la posibilidad de implementar estrategias experimentales enfocadas a determinar su papel y uso potencial en la selección de animales con mayor mérito genético.

XII. PERSPECTIVAS

- Realizar un control desde la toma de muestra ubicando a los individuos para su posterior análisis (control genealógico, fenotipo, genotipo)
- Realizar un análisis completo del gen de la miostatina en el que participen todos los alelos reportados para la inhibición de la proteína.

XII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la presencia del alelo Q204X del gen MSTN en diferentes poblaciones en bovinos de doble propósito para implementar estrategias experimentales enfocadas a evaluar su papel y uso potencial en la selección de animales con mayor mérito genético.
- Establecer diseños que permitan la formación de líneas genéticas en las poblaciones de doble propósito en la región del Papaloapan.
- En un futuro se sugiere analizar un índice mayor de población de bovinos, analizando previamente su fenotipo ya que en este trabajo se desconoce el índice de heredabilidad, así como la expresión génica. Se establece la necesidad de continuar con este tipo de trabajos incluyendo registros genealógicos y productivos para relacionar la genética con características de importancia económica.

BIBLIOGRAFÍA

- Akey, J.M ; Zhang, G., Zhang, K., Jin, L. y Shriver, M.D. (2002) Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, (12)
- Allais, S., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Renand, G. (2010). The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *Journal of Animal Science*,(2)
- Antoniou, E., y M.D. Grosz (1999) PCR based detection of bovine myostatin Q204x mutation. *Anim. Genet.* (30)
- Arellanes M., Anselmo; De la Cruz Pérez Víctor, López J. Emilio (2006). *Historia Geografía de Oaxaca*
- Bailey, A.J., Enser, M.B., Dransfield, e., Restall, D.J., Avery N.C. (1982). "Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fibre diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties". In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol.16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol). *Avan Biomed.*, 3(1)
- Boon, H., Sjögren, R. J. O., Massart, J., Egan, B., Kostovski, E., Iversen, P. O., Zierath, J. R. (2015). MicroRNA-208b progressively declines after spinal cord injury in humans and is inversely related to myostatin expression. *Physiological Reports*,(3)
- Camargo, M. (2000). *Sistemas de vacunos doble propósito X Congreso Venezolano de Zootecnia. UNELLEZ-Guanare, Venezuela.*
- Cerón M., Montoya A., Trujillo .,Ramírez E.,Monsalve Z. (2009) Marcadores del gen leptina en bovinos cruzados con Angus, Cebú, Romosinuano y Blanco Orejinegro. *Revista científica*, vol. Xix.
- Clark, A.G., Hubisz, M.J., Bustamante, C.D., Williamson, S.H. y Nielsen, R. (2005) Ascertainment bias in studies of human genome-wide polymorphism. *Genome Research*, (15)
- CONARGEN. Programa Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios (2009) 1:1

- Corvalán, A. (2002). Biología molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y metodologías. Rev Chil Infect, 19(1)
- Culley G (1807) Observations of Livestock, 4th ed. (London: G. Woodfall)
- De la Rosa X. T. (2005). Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza beefmaster
- Di Nocera P.P. y Sakaki Y. (1990). LINEs: a superfamily of retrotransposable ubiquitous elements. Trends in Genetics (6)
- Dunner, S., Miranda, M. E., Amigues, Y., Cañón, J., Georges, M., Hanset, R., Ménissier, F. (2001) Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. Genetics, Selection, Evolution : GSE, 35(1)
- FAO. (2008). Marcadores moleculares : una herramienta para explorar la diversidad genética. Sección C
- Fernández, C.(2004) Comportamiento “in vitro” de alelos recombinantes del gen de la miostatina para su aplicación en producción animal
- Financiera Rural.; (2012) Monografía de Carne de Bovino
- Goldstein, D.B. y Schlötterer, C.(1999) Microsatellites: evolution and applications. Nueva York, EE.UU. Oxford University Press.
- Guifen, L., Xiaomu, L., & Fachun, W. (2012). Use of a bovine genome chip to identify new biological pathways for beef quality in cattle.
- Hanset, R., Williams, J., & Dunner, S. (1997). Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovina europeas
- Hawkins G, L Hoffman. (1977). Base excision sequence scanning: a new method for rapid sequence scanning and mutation detection. Nat Biotechnol (15)
- Heather, A., M. A. Della-Fera, y C. A. Baile. (2001). Review of myostatin history, physiology and applications. Int. Arch. Biosci.
- Herlinda Elisea Puentes Montiel. (2006). Biodiversidad genética de la raza charolais en diferentes regiones agroecológicas de México
- Hjelmsø, M. H., Hansen, L. H., Bælum, J., Feld, L., Holben, W. E., & Jacobsen, C. S. (2014). High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. Applied and Environmental Microbiology
- INEGI, (2015) <http://www.inegi.gob.mx>
- INDETEC. Sector Agropecuario Nacional Diagnóstico y Propuestas Estructurales. Mexico, (2004) (32)

- Jarne, P. y Lagoda, P.J.L.(1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* (11)
- Martin S.L. (1991). LINEs. *Current Opinion in Genetics and Development* (1)
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., & Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*.
- Miranda M.E., Cañón J., Ménissier F., Hanset R., Williams J., Dunner S. (2001). Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas europeas. *ITEA*, 22 Volumen extra, Tomo I:39
- Moreno, V. R., Sifuentes, A. M., De La Rosa, X. F., & Pereyra, B. (2008). Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster. *Archivos de Medicina Veterinaria* (40)
- Nielsen, R. y Signorovitch, J. (2003). Correcting for ascertainment biases when analyzing SNP data: applications to the estimation of linkage disequilibrium. *Theoretical Population Biology* (63)
- O'Brien, S. J., Menotti, R. M., Murphy, W. J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E. and Marshall, G. J. A. (1999) *The Promise of Comparative Genomics in Mammals*.
- Okada N. (1991). SINEs. *Current Opinion in Genetics and Development* (1)
- Pariset, L., Cappuccio, I., Joost, S., D'Andrea, M.S., Marletta, D., Ajmone Marsan, P., Valentini A. y ECONOGENE Consortium (2006). Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as an evidence of selection. *Animal Genetics*, (37)
- Rouleau, E., Lefol, C., Bourdon, V., Coulet, F., Noguchi, T., Soubrier, F., Lidereau, R. (2009). Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: Application to MLH1 germline mutations in lynch syndrome. *Human Mutation*, (30)
- Royo Martín, L. J. (2003). Secuenciación y análisis del gen de la miostatina Bovina.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. y Altshuler, D.; International SNP Map Working Group.(2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.

Nature, (409)

Salazar, E. (2002). Evaluación de nuevos marcadores microsatelites para la genotipificación de ganado bovino.

Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2015). Sistema integral de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [en línea] <http://www-siea.sagarpa.gob.mx/> (2015). Panorama Agroalimentario del Maíz.

Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA, Coordinación general de ganadería (2014) Presente y futuro de la ganadería en México, Jalisco México,

Sifuentes, Rincón, A. M., Puentes, H. E., Víctor, M., Medina, R. M., Fabiola, X., Rosa, D., ... Moreno, V. R. (2007). Frecuencia del alelo Q204X del gen miostatina, en hatos de ganado Charolais de la región noreste de México

Syvänen, A.C. (2001). Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* (2)

Tobergte, D. R., y Curtis, S. (2013). *Journal of Chemical Information and Modeling*, (53)

Valadez-Moctezuma, E. (2004) Aplicaciones de técnicas moleculares en agronomía.

Vissac B. (1972) "L'hypertrophie musculaire d'origine génétique ou caractère culard". *Ann. Génét. Sél. Anim.* (4)

Volk, E. (1997). The Myostatin Gene. (<http://www.mesomorphosis.com/articles/volk/myostatin.htm>). Consultado el 10 de Junio de 2016

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, (23)

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, (49)

Zamora, E., Galán, A., & Simó, R. (2008). Papel de la miostatina en la afectación muscular asociada a las enfermedades crónicas. *Medicina Clínica*, 131(15)

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, (32)

ANEXO

Secuencia de la miostatina en *Bos taurus* (GDF8) gen, completo cds.

GenBank: AF320998.1 en amarillo control positivo, en rojo la base C que cambia por T.

>AF320998.1 *Bos taurus* myostatin (GDF8) gene, complete cds.

```
CTTGGGAATACAGTATAAAAAGATTCACTGGTGTGGCAAGTTGTCTCTCAGACTGGGCAGGCATTAACGTTT
GGCTTGGCGTTACTCAAAAAGCAAAAAGAAAAGTAAAAGGAAGAAGTAAGAACAAGGGAAAAGATTGTATTG
ATTTTAAAACCATGCAAAAAGTCAAAATCTCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCTGGCCC
AGTGGATCTGAATGAGAACAGCGGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTTTG
TGGAGGGAAAAACTACATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATCCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTGG
AAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATCAGACAACCTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCTGGAAC
GATTGATCAGTTCGATGTCCAGAGAGATGCCAGCAGTGACGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTACCACGCC
AGGACGGAAACGGTCATTACCATGCCCACGGAGTGTGAGTAGTCCTGCTGGTGCAGAGCAACGACTCTGC
TGACTGCTGTTCTAGTGTTCATGAGAAACCGATCTATTTTCAGGCTCTTTTAAACAAGCTGCTGGCTTGTA
TGTAAGGAGGAGGGGAAAAGAGCTTTTTTCAAGATTTTCATGAGAAAATAGACCAATGAGACTGAAAGCTGCT
ACTTTATTTGTTTCTTAGAGAGCTAAAAAGCTAAAAATCAAAAATGAAATGCTTGCATAGCATTTCATGT
TATATAGTTTAGTATGACAACATAACATGTTTATGTTTTTACAGCTTAATGCTACCAAGGTAAAGGAT
TGGGAGACAGTATCAGCAATGTGAAAAATTACATCAAATTTTCTAATTGCATTTGGTTGCCTGAAATATG
CATTTAAAATAACAGGGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTCATTAATAAAAAGAGAAAAGGAAAGAAATCTG
TAGAGGTTGAAGCCTATTTGGGCGTTTGCTGAACACTTAGAATGACTTCTGTTATTCAAACTATTTTTCT
CATAGGGTTTTTATGGTCTTACAGAGTATCTAATTTTTGAAAGCTATTAGAGTGGAAAGGATAAAAAGAAT
ATTCTTAATAAACTTAATGTATTAGTAAGAGCAATAAGGAAGTAAACACAGCATAATGAAAAATCATGAG
CTAATCAGCAGAAAATTCTAAGAAATAAACATTTTAATTACAAAGTTCCACTTATAACCTGACCATGGTA
CTATTGTTGAGAGTACCTGGTCTGCACATATCTAGGAGGCACATGCTTAATAACCTTCTAAAATATTATT
GTATTCCTCATAGGAGGGGAGAACTATTACCTATATGTAGTACCTATGTTGTTTCTGAAAGATAATATGTT
TCATATATTTCTGTTGCAGTCAGTTCAAACCTATACTCAAGGAAAGGGAGACAGGCACCTCAACAGAGAA
GGCATGACCAGAAAGAGTTTTGTGCCATGTGTCTGCGATCTTGCTTTTATACAGGGCTCTACCCACTTTAA
ACTGGACTCAAAAACAGTTTCAAAAATACTGCTTTTTTCTTATTAAGTAACTAGTTTATAAGGCAACAAATAA
ATTTCTTTAAGACTGTGCTATCAGATAATCCTGGAATAGATTTGCCTTACTTATAAAACAATCTTGAGAA
AACAAAAGGCAAGAAATTGCTAAGTGCTTCTGCTTACAATGACAGCCTGGCCCTAAAGACAATGTTTTT
TAAGTTTTGAAACAGCTTGAATACAACATCTAAGTTTTGGTGCTAATTACCTGCTAGTTTTTTTTATTTTT
TTCCTTTAAAAGGCTGTCCCAGCGTCTAACATAACAGATGCACTATATTTTCTGCTAATTTCCCGAGGCT
CAGTTAGTTGCTCACTGTGTCTTGTCCCCAGGTAATTCAGGCCTGGGGGAAGGGTTCCTTCCCTCCAGACT
GATTGGTACAGTCTCAGTCAGTCAAGTGAACCACTCAGATTTCCCAAAGAATTCTAAGTGGATGTTCTTCCAC
AGTGTCTCTTGTCTCTAATCATCATCATTTTTAAAATTTTCATCCACTTTTCATTCTTAATAGAATTT
TCCTTAGTCCACAGTTCTCTGAAAAGGAAGTAGGCTTCTCATAACAGCTGAAAAAACATATACCTAAAAG
ATTCTGAAAAGCTGTAATAACTGTTATACTTGATATTTTGCTGTTATGAATGAAATGCTACATATTTTTTC
CATTTTAAAAGACTAAATATGCACACATTATTCCAATTAAAAAATGTTTCATAGATTGATATGGAGGTGTT
CGTTCATTTTTTATAAAAATGATCTTAGTAACTTTTTTTCTTATTATTATAGCTGATCTTCTAACGCA
AGTGAAGGAAAACCCAAATGTTGTTTCTTTAAATTTAGCTCTAAGATAACAATAAACTAGTAAAG
GCCCACTGTGGATATATCTGAGGCCTGTCAAGACTCCTGCGACAGTGTGTTGTGCAAATCCTGAGACTCA
TCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCAC
TGGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTGTCAGAACTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTTA
GGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGCCATGATCTTGCTGTAACCTTCCCAGAACCAGGAGAAG
ATGGACTGGTAAGTGATTACTGAAAAATAACATGCTAAAAACCTTGTTATGTGTTTTATTTCATAATGTGAAT
```

GAATAGTAGTGAAAAATAACTACCAGTTTCCTGTGCTTATAAGCCAGACAAAGGCACCTTACCCCAGTGG
TAGCCCTGTACTCAATAAAAGTAGGTGTCCCATTTTACATCCTATGAAACACTCTCTTGATACTTTGACT
TTGCATGAGGATTTAAAAGAAAAAAGTTATACCATGGTCCTTAAGTTTTTAGGGAATTTCTTTGGAATTG
AGAATGAAATATAAAATGCTTTCCGTTGATGTGCTACATGATTATATAAAATAAAAACATGAAGTCTTCAC
AGTGGATTCTAGTACTCACCAACAACACATTTTTTCCCCAGAAAGAGTGACCAATTTGTTAAAAATCTT
TTGCTTAATAAGGCAGAAAAATGAACTCTACAAGTTATAATTAATAATAAAATGCTTTTACTTATTGAAAT
TAACTATATATATGTTTCCAGGTTTATATACTATTAAATATACTATATTTAAGATCTCTCATGATAAATATG
TTCCTTGTTTTTATAGACTATTGATGCACTGATGTATATGTGGATTACTTTGTGAATTACCCCTGGTAAAA
TTAAAAATTTTCCAGGCTAGTTAACTTGTACTACTTAGCTATTTTTCTGAACTGTCTTACTGTTCTTTAACAG
GAGTTAACTTAGGTAATGTCAACTAATTTAATATAAAGTCAAACAGAAAAATAATGCCTTATATATTATAA
AAATTAATAAAAAACCATTTTAAAAATCTAGTATAAGTTTAGAGCTACTCACTCTTCTGGCTTATCTATGC
TTGTATTTACTTCTGTTTTCAAAAAATTTTTAATGTGACCATAACCTTTTATTTCCAGTTATTGATATAA
TTTACAACAAAAGATTATACTTGCAAGCTTTTATAGTTTTTAAATGGTCTTATTTGTAGTGAATATCATAT
CTAAATGATATCTAAATGTAAAGTAAATCATACCTAAATGAAAAACATATTCTTTAAGTCATTATAAAAAAT
TTCCAGGTGATCAATTTTTCTTTAAATATACTACATAAAATGTTATTGACTCCCAAAATGATGTTATTTTT
GTATAATCTTAAATACCAATAATTACCAGGTCTATTTTTGGTTTTAGTGTAGGATAAAAAAGAATGTGTTT
TTTTTTCTAGGTAGCATTTTAAATGATCAAAGTTGGTGACGTGACAGAGGTCTTAAGTATTATTAACAGA
TGATTAATAAGATGTATTCTCAGACTTTTCCATATAAAAGGAAAAATGTCTCAAATTCATGAAAAGATT
GGTACAGGAGGAGGATTAGCAAATTGTAGTTTTAAATATCTGAATGGAAACACTTTTTAGTGAAAGAATAA
AGGGAATATCATTGTATCTTCTTCTGAGTCTGTGCCTCTCTCTCTTGGAGTTAGTCTTTCCAACCCATA
TACATTACCACTATCTTCATCCCTCTACCTTCTTTTTTCCATTACATCTGTGCAGTACTGGGTGGCAAC
TATTGTGTTTTCGGTGTTAATATCCAAGTTTTCCCTGAATAAGACCAAGTGAATGGAGGATGAATGAGTATA
CCTATCCCTCCAGGGGTCATCAGACATATTTAGCCACCATATTTAATCAATAAGCAGGAAGACATAAGCT
AGCCTTGTCCTTCTTCTTTCCCTCCCTGCTCCTTTCTTCTTCTTCCCCCTCTCCCTTTACTGTCATCCAT
CAGTATTTTCCAGAGCATCTATTATGTGTGAGGCATTAGATACTCAAACGGAGGAAAAACAAGAATAACA
AGACAAAGATCTGACCACAGGGGAATCCCTATGGCTACTGTAGACTTTTTGAGCCATAAAGGAAGAATCAA
GCCTAGTGTAATGAAAATTCCTTAATGCTGTGCAGTTTTAAAAAGAAATGTGACATAAGCAAAATGATTA
GTTTTCTTTCTTAATAATGAGTCCCTTGAGGTAGGAGTGTTTTTGGGATCTATTATTAACCTTCTTTCC
TTTTCCATACAGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCTAGGAGAGATTTTTGG
GCTTGATTGTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGTGCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGCT
TTTTGGATGGGATTGGATTATTGCACCTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTG
TATTTTTGCAAAAGTATCCTCATACCCATCTTGTGCACCAAGCAAACCCCAGAGGTTTCCAGCCGCCCTG
CTGTACTCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGCTATATTTAATGGCGAAGGACAAATAATATACGGG
AAGATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGTTTATGAGGTCTATATTTGGTTCATAGCTTCCCTCA
AACATGGAAGGTCTTCCCCTCAACAATTTTTGAACTGTGAAATTTATGTACCACAGGCTATAAGCCTAGAG
TATGCTACAGTCACTTAAGCACAAAGCTACAGTATATGAGCTAAAAAGAGAGAATATATGCAATGGTTGGC
ATTTAACCATCCAAACAAATCGTATAATAAAAAGTTTTATGATTTCCAGAGTTTTTGAAGTGGAGATCA
AATTCATTTATGTTGAAATATATTACAACACATGCAGGTGAATGAAAGCAATTCCTCCTTGTCTTCTGGT
GAATTAAGGAGTATGCTTTAAAAATCTATTTCTCTACAGTTTTCACTTAATATTTACAGAAAAATCTATAT
GTAGTATTGGTAAAATGCAGTATTGTTATATAACCATTATTTGAAACATCCTTAAACACTTGAATTTATAT
TGTATGATAGCATACTTGGTAAGATGAGATTCCACAAAGTAGGGATGGCACACCATACGCAGGTTACCAT
TCCTATACTGATTGATACAGTACATTAACAGTTTTTGCCAATGGTGCTAATACAATAGGCTGAATGGCTG
ATGTTATCAGGTTTATCAAGCAAAAAACATTCAGGAAAGTAATAAGTTTCTCCTTTCTTCCAGGTGCATTT
TCACACTCCTCCCTATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAAAGAAAACACTCATTTTCTAGAGGTCTACATT
CAATCTGTAGCACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAGGCAGTCAAAAAGTATTCAATTTTGGTCAAAATTT
TCAAAATTTATAGCCTGCCCTTGGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATAATGGAAATGACTGATTTCTATC
AATATTGTATAAAAAGATTTTGAATAGTTGCATTTATATAATATGTATACAATATTGTTTTGTAAATAA
ATGTCTCCTTTTTTATTTACTTGGTATATTTTTACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAA
AGACATGTCATGTAGGACATAAAAAGCAAAAAGCTTATATTTTTGGAGCAAATTAGTTGATTAAAATAGTGGTC
TTAAAACCTCATATGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATTTTTTTTACATTATTAGCA
TTCACTTATGGATTGATGATGGCTGTATAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCATTGTATTC
AAATCTCAACGTTCCATTATTTTAAACTTATAAATATTAAGCATACCAAAATGATTTAACTCTATTATC
TGAAATCAGAATAATAAACTGATGATATCTTACAAATTTGTTAATTTTTATTTTATAATTTGATAATGAATA
TATTTCTGCATATATTTACTACTATTTTTGTAAATCAGGATTTTGTAAATCAAATAAATTTGAACTTATGAT
TAAGTGAATTTATTTCTTACATCCAATGTGTAGAAACAATTTAAGTTATATTAAGTGTTTTTACCTTTT
TTGAAAGACAACAGTTTCATGTTATAATGATTAACTCTAGA

