



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Estudio de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5
del gen WNT10B en ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*)
mediante PCR-RFLP”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARÍA GUADALUPE CORTÉS LÓPEZ

ASESORES:

Dr. José Francisco Montiel Sosa

M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estudio de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) mediante PCR-RFLP.

Que presenta la pasante: **María Guadalupe Cortés López**
Con número de cuenta: **415026916** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. María Guadalupe López Franco	
2do. SUPLENTE	Dra. María Guadalupe López Palacios	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

Agradecimiento especial por el apoyo recibido de los programas PIAPI con clave PIAPI1837: “Aplicación de herramientas moleculares en el área agroalimentaria y diagnóstico de enfermedades mitocondriales” y PAPIIT No. IN226419: “Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana”; por el apoyo otorgado para el financiamiento de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi madre **Martha López Cruz**, por siempre creer en mí y estar conmigo en los triunfos y en las derrotas; a pesar de vivir lejos de casa. Me enseñaste a tener fe en mí misma y en Dios; no tengo como pagarte el haberme dado la oportunidad de vivir este sueño. Te amo infinitamente.

A ti hermana **Mariela Cortés López**, por tus consejos y las crudas verdades que eran necesarias, te admiro y eres una fuente de inspiración para mí.

A mi padre **Juan Arturo Cortés Ramos**, a pesar de todo, eres parte de este sueño, te quiero.

A mi abuelita **Betita†**, por enseñarme a ser valiente y a nunca rendirme ante las adversidades de la vida. Te extraño cada día, pero sé que estás conmigo.

A mis abuelitos **Ponciano†**, **Antonia†** y **Francisco†**, los echo de menos, gracias por todo su amor.

A **Ian, Gael y Lena**, por mostrarme que no debo olvidarme de mi niña interior, y ayudarme a cultivar mi creatividad, por hacerme sonreír y sus abrazos que son lo mejor del mundo, los amo.

A **Rocío e Iván**, por confiar en mí y alegrarse de mis triunfos.

A **Doña Gloria y Don Carlos** por sus cuidados y amor, ustedes son mi segunda familia. Los quiero mucho.

A mi mejor amigo **Rubén**, por estar para mí en los mejores y peores momentos, por recordarme que la amistad verdadera sí existe. Gracias por todo lo que vivimos en esta etapa y por lo que vendrá.

A mis mejores amigas **Mariana, Janet, Dhamar y Tania**, porque de ustedes he aprendido que siempre hay que tener una sonrisa aún en los peores momentos, las amo y admiro.

A **Lois** por ser una amiga incondicional y escucharme en las alegrías y tristezas, somos tan diferentes, pero nos entendemos bien. Te quiero.

A **Esteban, Isaac, Dafne y Sergio**, gracias por su amistad, sin ustedes la universidad no hubiese sido lo mismo, por las risas y los buenos recuerdos que construimos juntos.

A mi amiga **Karina**, por los gratos momentos que hemos pasado a lo largo de los años, eres muy especial para mí.

A los **amigos mientras estudié inglés**, gracias porque aprendí de ustedes a ser más extrovertida y por los momentos de diversión.

A mis **compañeros en los diferentes laboratorios y taller** de quienes aprendí a trabajar en equipo y a ser tolerante.

A los profesores que me inspiraron a ser mejor cada día y a salir de mi zona de confort: **I.A. José Jaime Flores Minutti, Dr. Ma. Olivia Noguez Córdoba, I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez, Libia Aurelia Martínez Galindo y Renato Noguera Sierra.**

A la profesora **I.A. Laura Cortázar**, más que una profesora es una gran amiga, por su calidad humana y motivación.

A mis **nuevos amigos que conocí en Canadá**, por los buenos momentos que pasamos juntos y las aventuras que siempre recordaré con cariño, los admiro y quiero.

A mi maestra **Susan**, por su carisma y por hacer mi estancia en Canadá una experiencia maravillosa, siempre en mi mente sus palabras: BE BRAVE, BE FEARLESS AND HAVE FUN!

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **FES Cuautitlán**, mi *Alma Máter*, gracias por la oportunidad de formarme como Ingeniera en Alimentos, por las enseñanzas, experiencias y conocimientos adquiridos. Orgullosa de pertenecer a la mejor Universidad de México. **“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”. ¡GOYA!**

A el **Dr. Francisco Montiel Sosa**, por transmitirme el amor a la Bioquímica y Biología Molecular, por sus consejos y apoyarme en la realización de este trabajo.

A la **M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza**, por su asesoramiento en esta tesis, por su paciencia y apoyo en todo momento, ya que, gracias a sus clases de Bioquímica General despertó mi interés en esta área de investigación.

A la **I.A. Vaely Coronel Flores**, por sus sugerencias en este trabajo de investigación, por los buenos momentos en el taller de Biotecnología y enseñanzas.

A la **Dra. Josefina Moreno Lara**, por sus atenciones brindadas durante mi etapa experimental.

A mis demás sinodales: **Dra. Adriana Llorente Bousquets**, **M. en C. Tais Nopal Guerrero**, **I.A. María Guadalupe López Franco** y **Dra. María Guadalupe López Palacios**, por la revisión de esta tesis, por sus sugerencias, tiempo y dedicación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	4
1.1 La Carne	4
1.2 Carne de bovino	6
1.3 Aporte nutrimental de la carne de bovino	6
1.4 Carne de bovino en México y el mundo	8
1.4.1 Producción nacional de carne de bovino	8
1.4.2 Consumo nacional de carne de bovino	10
1.4.3 Comercio exterior de la carne de bovino.....	11
1.4.4 Producción internacional de ganado bovino.....	12
1.4.5 Consumo a nivel mundial de carne de bovino.....	14
1.5 Características de la carne vinculadas con la calidad.....	16
1.5.1 <i>Pre-rigor</i>	16
1.5.2 <i>Rigor mortis</i>	16
1.5.3 <i>Post-rigor</i>	17
1.5.4 Relación entre el sistema de producción y la calidad de la carne	18
1.6 Diferencias entre <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i>	19
CAPÍTULO 2 ASPECTOS GENÉTICOS	23
2.1 Exones e intrones	23
2.2 Polimorfismos genéticos	23

2.3 Tipos de polimorfismos.....	24
2.5 Reacción de la Cadena de la Polimerasa.....	26
2.5.1. Fundamento de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa	26
2.5.2 Componentes de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa	27
2.5.3 Etapas de la PCR	30
2.5.4 Ventajas y desventajas de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa	32
2.5.5 Aplicaciones de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa.....	33
2.6 Técnicas de detección de polimorfismos	34
2.6.1 RFLP Detección de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.....	34
2.6 Enzimas de restricción.....	35
2.7 Genes asociados con la calidad de la carne y crecimiento de <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	35
2.8 Presencia de polimorfismos de un solo nucleótido y su implicación con la canal	36
2.9 Gen WNT10B	38
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	40
3.1 Justificación.....	40
3.2 Cuadro metodológico	42
3.3 Objetivo general	43
3.4 Objetivos particulares.....	43
3.4.1 Objetivo particular 1	43
3.4.2 Objetivo particular 2.....	43
3.4.3 Objetivo particular 3.....	44
3.3.4 Objetivo particular 4.....	44
3.4.5 Objetivo particular 5.....	45
3.4.6 Hipótesis.....	45

3.5 Materiales y métodos empleados	46
3.5.1 Extracción del DNA	46
3.5.2 Cuantificación de ADN	49
3.5.3 Electroforesis.....	50
3.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa	52
3.5.5 RFLP.....	53
Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
Objetivo particular 1	55
Objetivo particular 2	56
Objetivo particular 3	59
Objetivo particular 4	63
Objetivo particular 5	66
Conclusiones	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS	78
Anexo 1 Diseño de primers.....	78
Anexo 2 Cálculo de la temperatura de hibridación	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización ultraestructural del músculo. Fuente: Chacón, 2014.	5
Figura 2. Producción de carne de bovino en México, 2007-2017 (Millones de toneladas). Fuente: FIRA, 2017.	8
Figura 3. Principales estados productores de carne de bovino (Millones de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.	9
Figura 4. Participación del volumen de producción de carne en canal por especie 2018 (Miles de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.....	9
Figura 5. Consumo de carne en México por tipo de proteína (Miles de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.	10
Figura 6. Comportamiento del índice de precios por tipo de carne: Res, Cerdo y Pollo. Fuente: FIRA, 2017.	11
Figura 7. Niveles de importaciones y exportaciones de carne de bovino (Toneladas)..	12
Figura 8. Producción mundial de carne de bovino, pollo y porcino, 2013-2018 (Millones de toneladas equivalente en canal). Fuente: COMECARNE, 2018.	13
Figura 9. Principales productores de carne de bovino 2018 (Miles de toneladas, equivalente en canal). Fuente: COMECARNE, 2018.	14
Figura 10. Principales consumidores de carne de bovino en 2018 (Miles de toneladas, equivalente en canal). Fuente: COMECARNE, 2018.	15
Figura 11. Consumo per cápita de carne de bovino en el mundo en kilogramos por persona, periodo 2013-2018. Fuente: COMECARNE, 2018.	15
Figura 12. Cambios bioquímicos pre y post-rigor de la carne. Fuente: Hui et al., 2006.	18
Figura 13. <i>Bos indicus</i> . Fuente: Lozano & Braña, 2013.....	19
Figura 14. <i>Bos taurus</i> . Fuente: Lozano & Braña, 2013.	19
Figura 15. Polimorfismo SNP representado por el cambio de una base por otra. Fuente: Gómez et al., 2013.	26
Figura 16. Componentes de la PCR. Fuente: Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2014.	29
Figura 17. Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos. Fuente: Serrato et al., 2014.	31

Figura 18. Pasos de un ciclo de la PCR. Fuente: Tamay et al., 2013.	31
Figura 19. Detección de los polimorfismos mediante PCR-RFLP .Fuente: Herráez, 2012.	34
Figura 20. Ubicación del gen WNT10B en el cromosoma 5 de <i>Bos taurus</i> . Fuente: NCBI, 2019a.....	38
Figura 21. Ubicación del gen WNT10B en el cromosoma 5 de <i>Bos indicus</i> . Fuente: NCBI, 2019b.	39
Figura 22. Esquema que muestra la metodología de la disgregación del tejido de la muestra.....	47
Figura 23. Diagrama que muestra cómo se lleva a cabo la extracción de proteínas y polisacáridos del DNA.....	48
Figura 24. Diagrama de la precipitación del DNA.....	48
Figura 25. Esquema que muestra los pasos para la cuantificación del DNA.	49
Figura 26. Diagrama que muestra los pasos para la preparación de un gel de agarosa..	50
Figura 27. Diagrama que muestra la carga y corrida del gel de agarosa.	51
Figura 28. Diagrama que muestra los pasos para la visualización del gel de agarosa tras la electroforesis	51
Figura 29. Esquema que muestra los pasos para realizar PCR.....	52
Figura 30. Gel de poliacrilamida al 12% para evaluar RFLP.....	53
Figura 31. Sitios de corte de la enzima Apa I simulados en Custom Digest New England Biolabs.	54
Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la amplificación de ADN de bovino a diferentes temperaturas. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco.	57
Figura 33. Programa de PCR <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	57
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para comprobar la especificidad de los primers utilizados. MP= Marcador de peso molecular 100 pb, B= Blanco, C+= Control positivo, Cer=Cerdo, Pes= Pescado, Co= Conejo, Tri= Trigo, So= Soya y Av= Avena.58	58
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de <i>Bos taurus</i> B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4 y B.T.5. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.....	60

Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de <i>Bos taurus</i> B.T.6, B.T.7, B.T.8, B.T.9 y B.T.10. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.	61
Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de <i>Bos taurus</i> B.T.6 y B.T.7.	61
Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de <i>Bos indicus</i> B.I.1, B.I.2, B.I.3, B.I.4 y B.I.5. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.....	62
Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de <i>Bos indicus</i> B.I.6, B.I.7, B.I.8, B.I.9 y B.I.10. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.....	62
Figura 40. Sitio de corte de la enzima <i>ApaI</i>	63
Figura 41. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de <i>Bos taurus</i> B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4 y B.T.5. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.....	64
Figura 42 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de <i>Bos taurus</i> B.T.6, B.T.7, B.T.8, B.T.9 y B.T.10. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.	64
Figura 43. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de <i>Bos indicus</i> B.I.1, B.I.2, B.I.3, B.I.4 y B.I.5. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.	65
Figura 44. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de <i>Bos indicus</i> B.I.6, B.I.7, B.I.8, B.I.9 y B.I.10. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis químico de la carne. Fuente: Badui, 2006.	6
Cuadro 2. Composición de diferentes tipos de carne por 100g. Fuente: (Wood, 2017). .	7
Cuadro 3. Porcentajes de importaciones y exportaciones de carne de bovino. Fuente: COMECARNE, 2018.	11
Cuadro 4. Características diferenciales entre <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> . Fuente: Gasque, 2008.	20
Cuadro 5. Razas de <i>Bos taurus</i> . Fuente: Gasque, 2008.....	21
Cuadro 6. Razas de <i>Bos indicus</i> . Fuente: Gasque, 2008.	22
Cuadro 7. Principales métodos de PCR, sus ventajas y limitaciones. Fuente: Walker-Daniels, 2012.	32
Cuadro 8. Cuadro de identificación de las muestras obtenidas de <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	46
Cuadro 9. Cantidades para la preparación de PCR.....	52
Cuadro 10. Componentes para preparar las reacciones para RFLP.	53
Cuadro 11. Primers utilizados en la experimentación.	55
Cuadro 12. Concentración y pureza del ADN extraído de bovino para la obtención del C+.....	56
Cuadro 13. Concentración y pureza del ADN extraído de especies filogenéticamente cercanas y lejanas para evaluar la especificidad de los primers.	58
Cuadro 14. Concentración y pureza del ADN concentrado extraído de <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	59
Cuadro 15. Concentración y pureza del ADN diluido extraído de <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	60
Cuadro 16 Resultados de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en <i>Bos taurus</i>	66
Cuadro 17 Resultados de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en <i>Bos indicus</i>	66
Cuadro 18. Comparación de las frecuencias alélicas en <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i> para el polimorfismo 3980G>T en el exon 5 del gen WNT10B.	67

RESUMEN

El mejoramiento genético utiliza la variación genética para mantener y mejorar cualitativa y cuantitativamente la producción animal, estudiando diversos genes asociados con el crecimiento, producción de carne y leche y prevención de enfermedades. Para ello se utilizan como marcadores los polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN.

Uno de los genes que ha sido estudiado es el gen WNT10B; el cual se ha vinculado a que puede afectar el desarrollo del tejido adiposo *in vivo*, en cerdos es candidato funcional para los rasgos de deposición de grasa; sin embargo, en bovinos se relaciona con rasgos de crecimiento (altura del cuerpo, longitud del cuerpo, peso corporal y circunferencia del pecho)

En este proyecto de investigación se evaluó la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B en dos especies de ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*); se utilizaron 20 muestras de tejido de ganado bovino hembras provenientes de Tehuacán y Ajalpan; Puebla: 10 muestras de la raza *Bos indicus* y 10 de *Bos indicus*. A partir de las muestras biológicas se extrajo el material genético y se amplificaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y posteriormente se sometieron a una digestión enzimática conocida como Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

Los resultados mostraron que este polimorfismo no tiene presencia diferente en ambas especies: *Bos taurus* y *Bos indicus*; dado que, ninguno de los individuos analizadas presentó el polimorfismo. Sin embargo, para tener un resultado concluyente sería recomendable analizar una población mayor, con ejemplares de diversos puntos del país.

INTRODUCCIÓN

El Codex Alimentarius define a la carne como todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin (FAO, 2015).

Entre los diferentes tipos de carne destaca la de res, siendo la tercera más consumida en nuestro país, por su sabor y contenido nutricional pues aporta proteínas (16-22%), lípidos (1.5 a 13%), vitaminas del complejo B y minerales como hierro, zinc y fósforo a la dieta diaria; con una producción anual de 1.88 millones de toneladas de carne en canal al año (FIRA, 2017).

La calidad de la carne es un término complejo, dependiendo del consumidor, ya que, puede estar asociado para algunos consumidores a la cantidad de grasa presente en el corte; sin embargo, el término va más allá de la grasa, comprende aspectos nutricionales, sensoriales, tecnológicos y sanitarios; siendo principalmente de interés, las características organolépticas de aroma, color, sabor, jugosidad y terneza, que son las de mayor influencia en los compradores (Lozano & Braña, 2013). Es importante mencionar que factores externos relacionados con el sistema de producción son igual de importantes como: el sexo, la raza, edad del animal a la matanza, nivel de alimentación y los asociados al procesamiento, el transporte al rastro, a los métodos de sacrificio, al manejo del frío y el tiempo de maduración de la carne, entre otros (Vilaboa, Díaz, Ruíz, Platas, & Juárez, 2009).

La carne de res es obtenida de los bovinos o bóvidos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), que son animales vertebrados, mamíferos y ungulados, presentando estas diferencias en cuando a su origen, disposición de grasa corporal, capacidad de adaptación (Financiera Rural, 2009), entre otras. Actualmente se estudian esas diferencias mediante herramientas genéticas, estudiando la función o posición de los genes en el genoma. Uno de los genes más estudiados en bovino es CAPN1 localizado en el cromosoma 29, las calpaínas son proteasas que hidrolizan enlaces contiguos a la cisteína, identificándose para las dos especies antes mencionadas numerosos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP); que están implicadas en el proceso de maduración y enternecimiento de la carne (López, Patiño, López, & Echeverri, 2017).

Los polimorfismos SNP, o de un solo nucleótido, son responsables de una gran parte de la diversidad de las especies, y en bovino el interés no sólo es el producto final como en el caso de la terneza de la carne, sino que también son importantes por las implicaciones que pueden tener rasgos como la producción de leche, el rendimiento de grasa, y la tasa de crecimiento, la ingesta de alimento, siendo utilizados como herramientas de selección genómica o de genoma completo en el ganado; para estimar la reproducción de los candidatos (Dekkers, 2012). Uno de los SNP relacionados con el crecimiento del ganado bovino es el polimorfismo 3980G> T en el exón 5 asociado al gen 10B (WNT10B), que confiere al ganado bovino rasgos de crecimiento (altura del cuerpo, longitud del cuerpo, peso corporal y circunferencia del pecho) (Zhao *et al.*, 2012).

En este trabajo se evaluó la presencia de dicho polimorfismo por su implicación en el desarrollo de tejido adiposo en vivo y por ende en su crecimiento en dos especies de bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* (Zhao *et al.*, 2012) debido a la relación entre la genética y las diferencias corporales de estos animales, siendo de gran importancia para futuras aplicaciones asociadas con este polimorfismo.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 La Carne

La ganadería es la domesticación de los animales como cerdos, vacas, pollos, borregos, etc., siendo esta una actividad del sector primario, que incluye el cuidado y alimentación, orientada básicamente a generar alimentos para consumo humano (SAGARPA, 2018).

Uno de los alimentos más importantes obtenido de la actividad ganadera es la carne, generalmente definida como la parte blanda entre piel y huesos (principalmente músculos) y las vísceras (por ejemplo, hígado y riñones) de animales (mamíferos, reptiles y anfibios) y aves (particularmente pollo). La carne algunas veces se subdivide en carne roja (vacunos, cabras, ovejas, cerdos, etc.) y carne blanca (en especial, aves de corral) (Latham, 2002).

De acuerdo con la normatividad en México, la carne es definida como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas (NOM-194-SSA1, 2004).

Es de gran importancia, el conocimiento de la estructura del músculo de los animales, ya que sirve para entender las relaciones entre sus propiedades y su empleo como carne. Existen tres tipos de músculo: el musculo estriado voluntario o esquelético, músculo estriado involuntario o cardiaco y musculo liso o involuntario, teniendo mayor importancia el músculo esquelético ya que comprende alrededor del 40% del peso corporal y es el principal componente de la carne (Price, Schweigert, & Fuente, 1994).

En términos generales, el músculo esquelético se encuentra conformado por células alargadas y estrechas llamadas fibras las cuales se disponen en forma paralela unas con respecto a las otras. Las fibras se encuentran encerradas en una delicada membrana plasmática integrada por lipoproteínas, mucopolisacáridos y tejido conectivo denominada sarcolema. Rodeando al sarcolema y separando cada fibra de las demás, se localiza una fina

capa de tejido conectivo denominada endomisio. Las fibras integran conjuntos denominados haces, los cuales se encuentran a su vez rodeados por una capa ligeramente más gruesa de tejido conectivo denominada perimisio. De manera homóloga a las fibras, los haces de fibras musculares se agrupan para formar el músculo encontrándose rodeadas de una capa gruesa de tejido conectivo llamada epimisio (Chacón, 2014).

Las microfibrillas son un arreglo entrecruzado de filamentos gruesos de miosina y delgados de actina. Estos arreglos se encuentran agrupados en unidades básicas secuenciales denominadas sarcómeros (Figura 1), que fueron designados bandas A e I, línea Z y zona H, dependiendo de su ubicación. Los sarcómeros conforman la unidad contráctil básica del músculo, y tiene por ello una gran importancia en los procesos que determina dureza final de la carne (Price *et al.*, 1994).

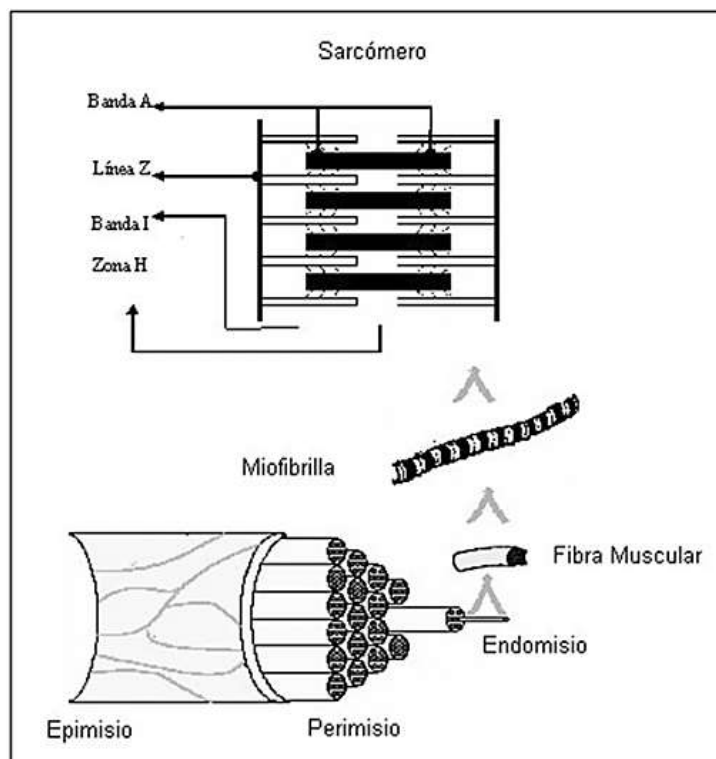


Figura 1. Organización ultraestructural del músculo. Fuente: Chacón, 2014.

1.2 Carne de bovino

Es importante señalar que la ganadería bovina está referida a la crianza y domesticación del toro y la vaca, de donde deriva la producción de alimentos para consumo humano y otros artículos; siendo la carne el principal producto que se extrae del ganado bovino (SAGARPA, 2015).

La carne de bovino en pie se refiere al animal vivo para su venta, ya sea para engorda o para ser sacrificado. Por otra parte, la carne de bovino en canal es la parte del cuerpo de los animales sacrificados, después de retirárseles la piel, cabeza, las vísceras con sus contenidos, la sangre y la parte distal de los miembros, es decir, es la carne sin estar congelada. La carne en canal representa aproximadamente un 50% del peso del animal en pie. No obstante, el proceso de crianza del ganado bovino finaliza con la engorda de las vaquillas o becerros que son destinados al mercado. Posteriormente, el proceso de transformación se lleva a cabo en donde se realiza el sacrificio obteniendo así la carne en canal (Financiera Rural, 2009).

1.3 Aporte nutrimental de la carne de bovino

La carne es una fuente útil para la obtención de proteína de excelente calidad, conteniendo entre un 19-20% de proteína. La cantidad de grasa varía dependiendo del tipo de animal y el tipo de corte, contiene un número importante de ácidos grasos y colesterol; además de vitaminas y minerales. La composición típica de la carne se muestra en el Cuadro 1 (Badui, 2006).

Cuadro 1. Análisis químico de la carne. Fuente: Badui, 2006.

Componente	%
Agua	70
Proteínas	20
Grasas	6
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1.5
Hidratos de carbono y sustancias no nitrogenadas	1.5
Sales	0.7

La carne de vacuno, dada su composición, es un alimento altamente nutritivo, sin embargo, existen diferencias, dependiendo del tipo de corte y de la edad del animal de donde se obtenga la carne. Es una carne con un elevado porcentaje de proteínas de alto valor biológico; fuente importante de minerales tales como yodo, manganeso, zinc, selenio y hierro. Entre las vitaminas más importantes que contiene están las del grupo B (Eroski Consumer, 2009).

En el Cuadro 2 se puede observar que la carne de bovino contiene valores similares de proteína que la carne de pollo y de pavo; esta última tiene menor contenido de grasa con tan solo 1.6 g, no obstante, la carne de bovino tiene un menor contenido de colesterol.

Cuadro 2. Composición de diferentes tipos de carne por 100g. Fuente: (Wood, 2017).

	Bovino	Oveja	Puerco	Pollo	Pavo
Agua (g)	71.9	70.6	74.0	75.1	75.3
Proteína (g)	22.5	20.2	21.8	22.3	22.6
Grasa (g)	4.3	8.0	4.0	2.1	1.6
Energía (kJ)	542	639	519	457	443
Colesterol (mg)	58	74	63	90	70

1.4 Carne de bovino en México y el mundo

1.4.1 Producción nacional de carne de bovino

En México se explotan alrededor de treinta razas bovinas que son destinadas para uso cárnico, entre las más importantes se encuentran: Angus, Hereford, Charolais, Nelore, Pardo Suizo Europeo y Angus (SAGARPA, 2015).

Con respecto a esta década, la producción nacional de carne de bovino ha presentado un continuo crecimiento, con excepción de 2013 como se puede observar en la Figura 2. Asimismo, entre 2007 y 2016, creció a una tasa media anual de 1.6 por ciento, para ubicarse en 1.88 millones de toneladas de carne en canal y en 2017 se obtuvo un crecimiento de aproximadamente de 1.93 millones de toneladas, representando un máximo histórico de producción de carne de res (FIRA, 2017).

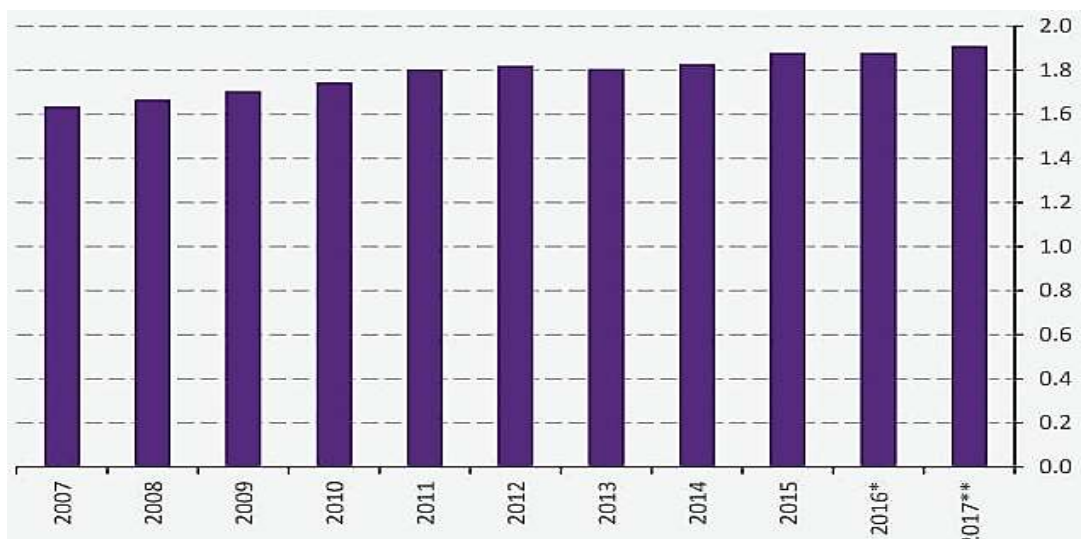


Figura 2. Producción de carne de bovino en México, 2007-2017 (Millones de toneladas). Fuente: FIRA, 2017.

En la Figura 3 se puede observar que, en 2018, el 42 por ciento de la producción nacional de carne de bovino se concentró en cinco entidades Veracruz (13 por ciento), Jalisco (12 por ciento), San Luis Potosí (6 por ciento), Sinaloa (5 por ciento), y Chiapas (5 por ciento) (COMECARNE, 2018). Indudablemente, este incremento sería resultado del mayor peso al sacrificio, que compensaría la disminución del número de número cabezas sacrificadas.

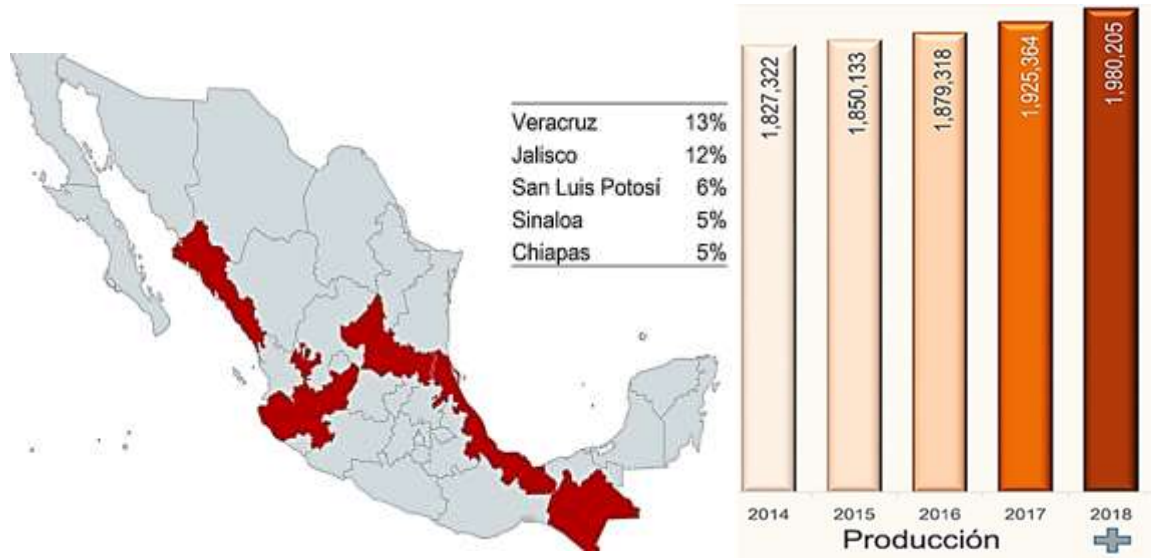


Figura 3. Principales estados productores de carne de bovino (Millones de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.

El Consejo Mexicano de la Carne en su compendio estadístico del año 2018 reporta que la carne de bovino ocupa el segundo lugar en cuando a participación nacional con un 28.6% del volumen de la producción total de ese año (6.911 miles de toneladas) como se muestra en la Figura 4 (COMECARNE, 2018).

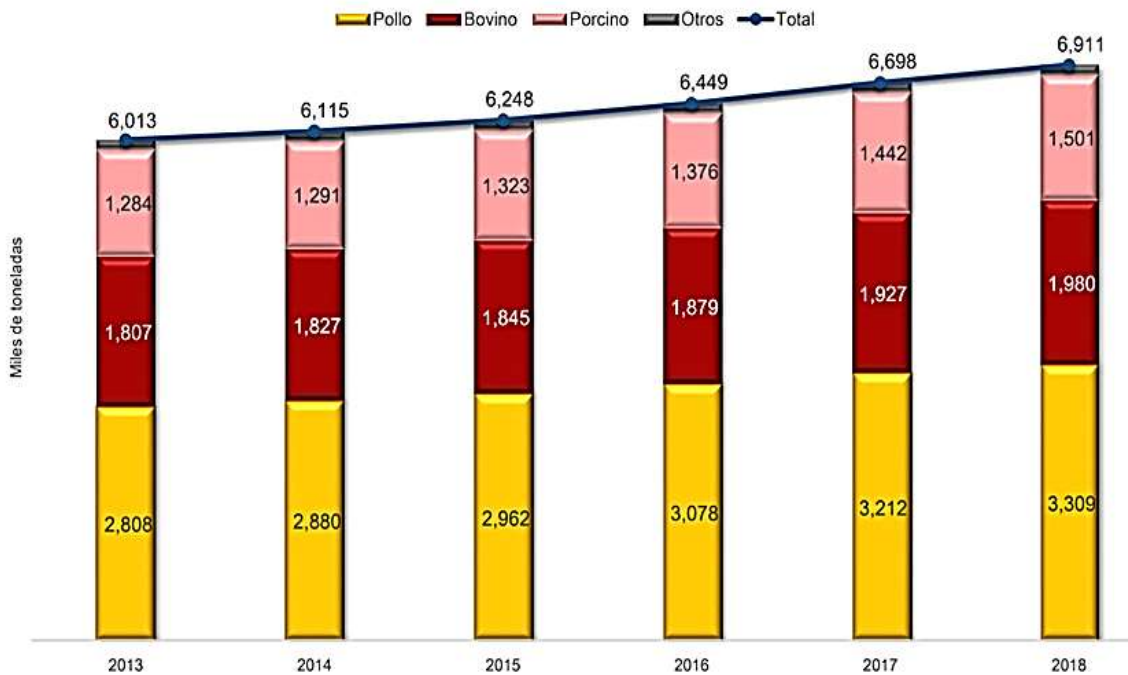


Figura 4. Participación del volumen de producción de carne en canal por especie 2018 (Miles de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.

1.4.2 Consumo nacional de carne de bovino

En relación con el consumo de carne de bovino en México, de acuerdo con el Consejo Mexicano de la Carne el consumo per cápita de carne de bovino equivale al 22%, con 1941 de toneladas de carne de res de un total de 8794 de toneladas como lo muestra la Figura 5, ocupando el tercer lugar en consumo después de la carne de pollo y cerdo. El consumo per cápita de este tipo de carne se ubicó en 14.8 kilogramos por persona, ocupando el tercer lugar a nivel nacional (COMECARNE, 2018).

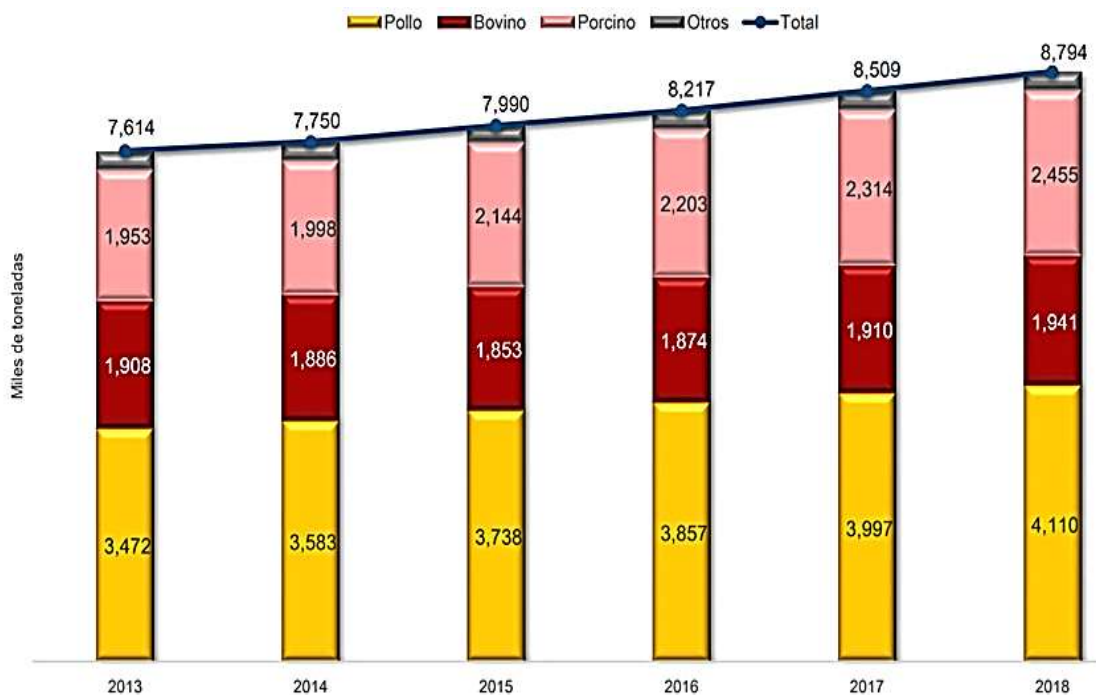


Figura 5. Consumo de carne en México por tipo de proteína (Miles de toneladas). Fuente: COMECARNE, 2018.

Sin embargo, por quinto año consecutivo el consumo nacional del cárnico sería menor que la producción, esto se debe a que en los últimos años el precio de la carne de res ha ido en aumento como lo muestra la Figura 6. Aun cuando los precios de la carne de res son mayores en comparación con otras fuentes de proteína de origen animal, los sectores de población de medianos y bajos ingresos han mantenido el consumo de bistec de carne de res, el cual es un corte de valor inferior en comparación con otro tipo de cortes. Asimismo, se estima que el consumo de cortes de mayor valor en el estrato de la población de mayores ingresos se mantenga estable (FIRA, 2017).

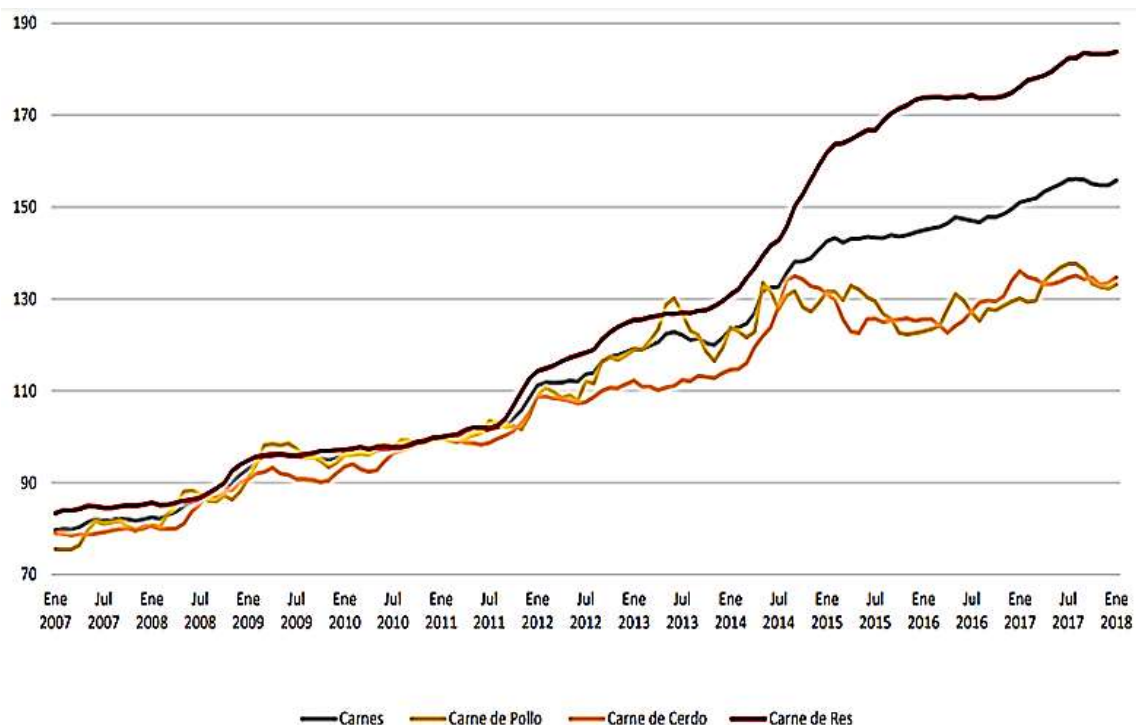


Figura 6. Comportamiento del índice de precios por tipo de carne: Res, Cerdo y Pollo. Fuente: FIRA, 2017.

1.4.3 Comercio exterior de la carne de bovino

Como se puede observar la Figura 7, en el periodo comprendido de enero a diciembre de 2018, México exportó 235 556 toneladas a países como Estados Unidos, Japón y Hong Kong e importó aproximadamente 197 mil toneladas, provenientes de Estados Unidos, Canadá y Nicaragua (Cuadro 3); indicando que el sector exportador mexicano impulsa el crecimiento económico en el sector agropecuario; que, además, ha crecido a un mayor ritmo que la economía nacional durante los últimos años (COMECARNE, 2018).

Cuadro 3. Porcentajes de importaciones y exportaciones de carne de bovino. Fuente: COMECARNE, 2018.

Exportación		Importación	
País de destino	Porcentaje total (%)	País de destino	Porcentaje total (%)
Estados Unidos	86	Estados Unidos	84
Japón	6	Canadá	8
Hong Kong	4	Nicaragua	6

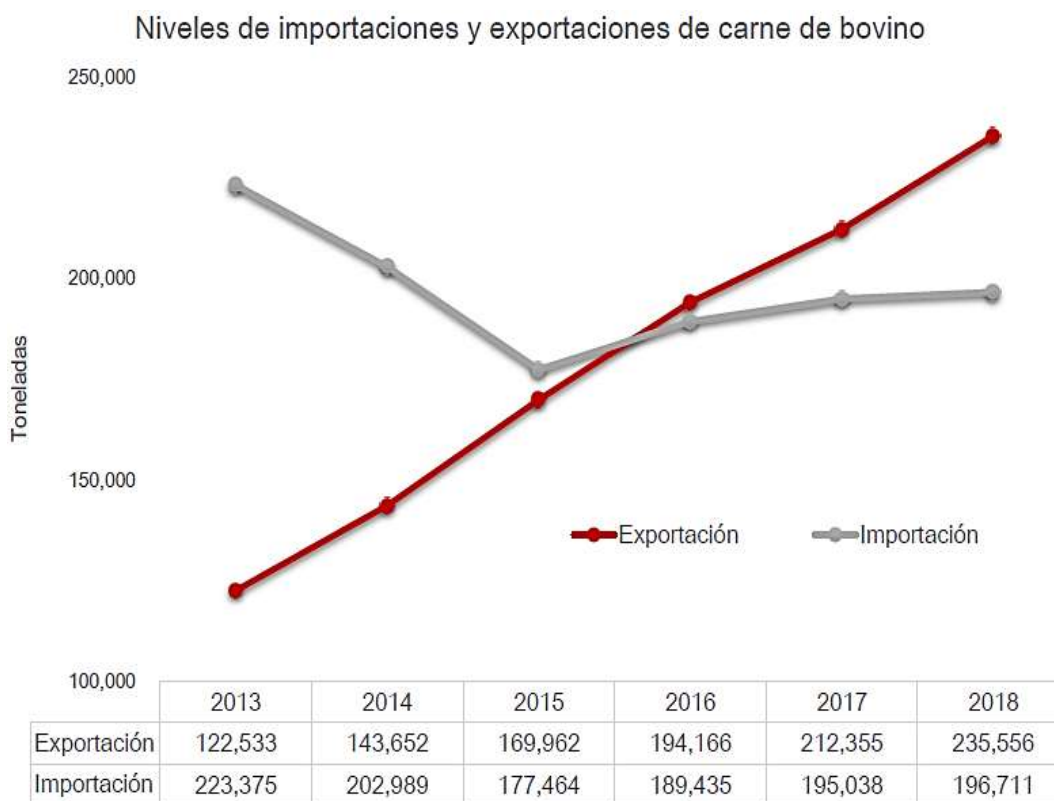


Figura 7. Niveles de importaciones y exportaciones de carne de bovino (Toneladas).
Fuente: COMECARNE, 2018.

1.4.4 Producción internacional de ganado bovino

La producción de carne de res a nivel internacional sigue la misma tendencia de crecimiento, que ha ido presentando a lo largo de esta década, registrando. Aunque, en 2017, se observaron tasas de decrecimiento en importantes países productores como Estados Unidos o la Unión Europea (FIRA, 2017); en el año 2018 la producción mundial alcanzó las 62 878 toneladas, estableciendo un récord a nivel mundial, ubicando a México como el séptimo productor de carne en el mundo, esto de acuerdo con datos del Consejo Mexicano de la Carne, como se puede ver en la Figura 8.

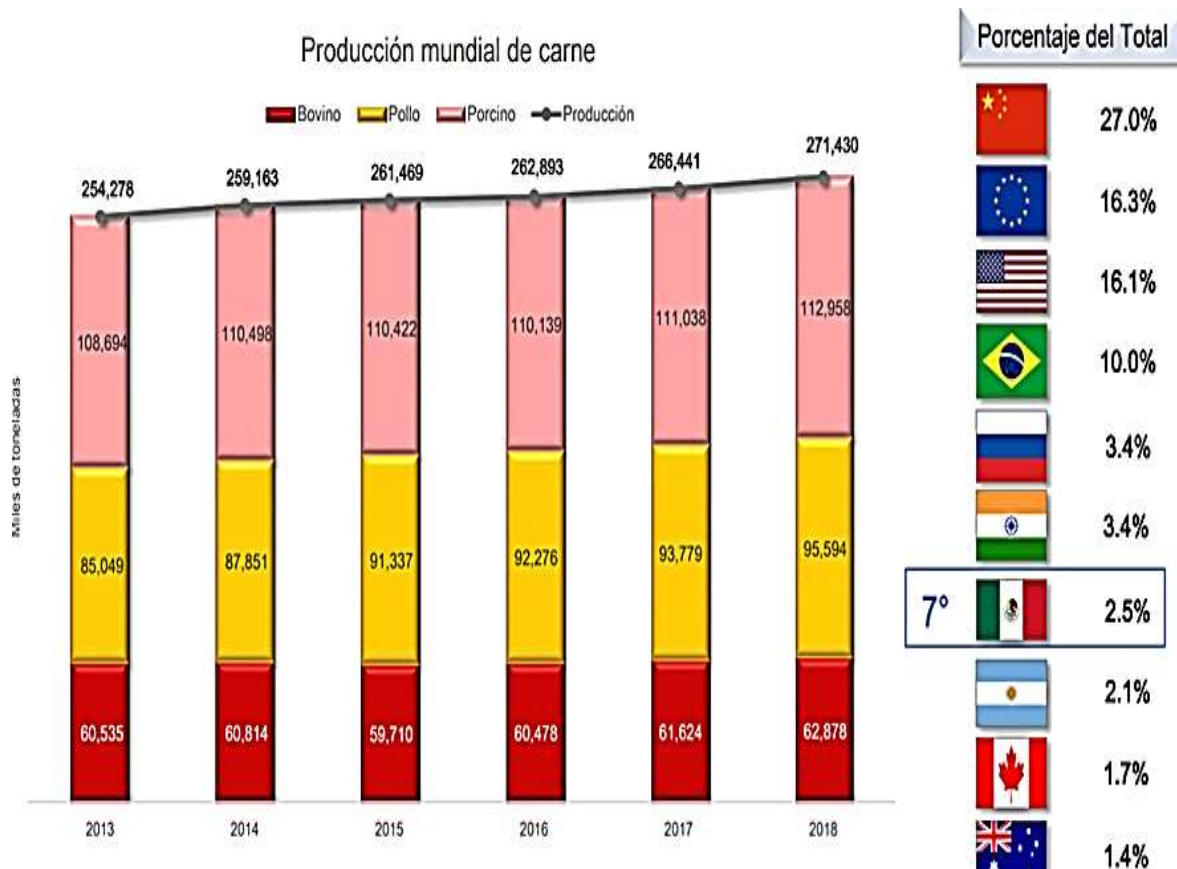


Figura 8. Producción mundial de carne de bovino, pollo y porcino, 2013-2018 (Miles de toneladas equivalente en canal). Fuente: COMECARNE, 2018.

En la Figura 9 se aprecia que los cinco principales productores de bovino en el mundo son Estados Unidos (11.8 millones de toneladas), Brasil (9.7 millones de toneladas), la Unión Europea (7.9 millones de toneladas), China (7 millones de toneladas) e India (4.2 millones de toneladas); México por su parte, se posicionó en el octavo lugar con 1.6 millones de toneladas (COMECARNE, 2018).

Evidentemente, estas cifras reflejan un aumento de la producción desde el año 2015, estimando que, en los próximos años estos países concentraran más del 71% del inventario mundial de ganado bovino (FIRA, 2017).

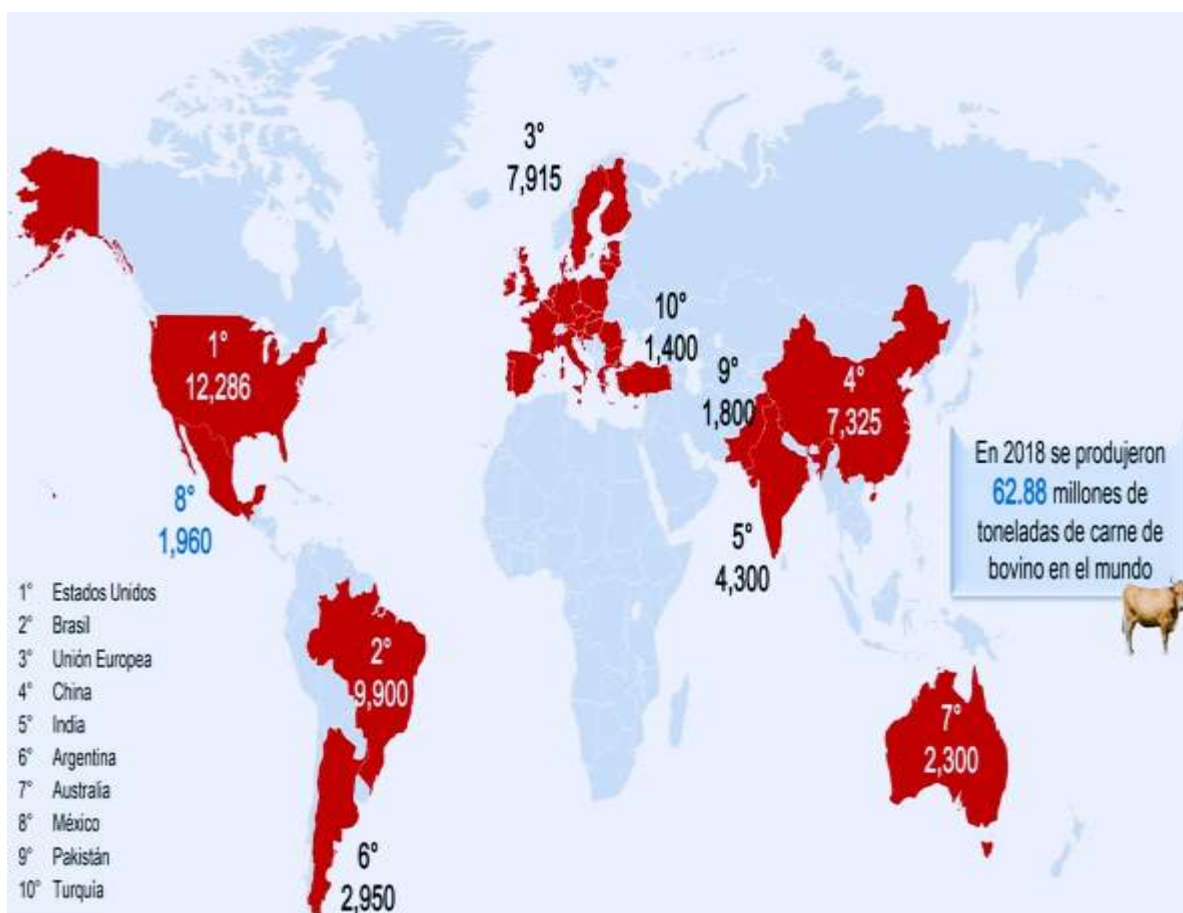


Figura 9. Principales productores de carne de bovino 2018 (Miles de toneladas, equivalente en canal).
Fuente: COMECARNE, 2018.

1.4.5 Consumo a nivel mundial de carne de bovino

En 2018, el 80 por ciento del consumo mundial de carne de bovino se concentró en diez países: Estados Unidos, China, la Unión Europea, Brasil, India, Argentina, México, Rusia, Pakistán y Turquía. México ocupa la octava posición en el consumo mundial de carne de bovino, con una participación del 3.1 por ciento del total como se puede ver en la Figura 10 (COMECARNE, 2018).

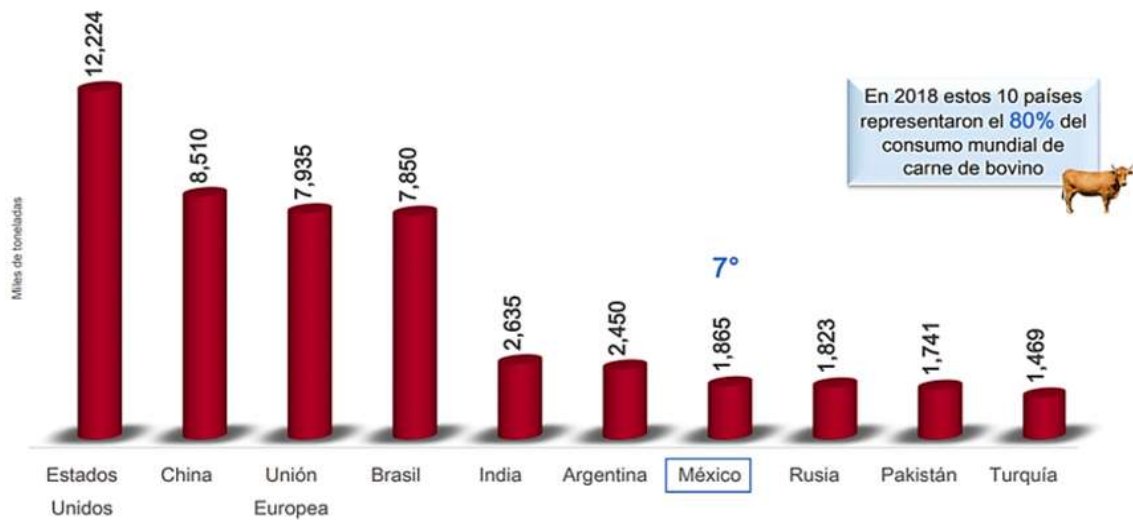


Figura 10. Principales consumidores de carne de bovino en 2018 (Miles de toneladas, equivalente en canal). Fuente: COMECARNE, 2018.

Con respecto al consumo per cápita de carne de bovino en el mundo, éste se redujo entre 2013 y 2016 a una tasa promedio anual de 0.6 por ciento (Figura 11). Estimando que el consumo a nivel mundial de carne de res sea de aproximadamente de 6.7 kg por persona en promedio, y de acuerdo con datos de la OCDE-FAO, se espera que para 2025 se tenga una ligera tendencia de crecimiento de consumo (FIRA, 2017).

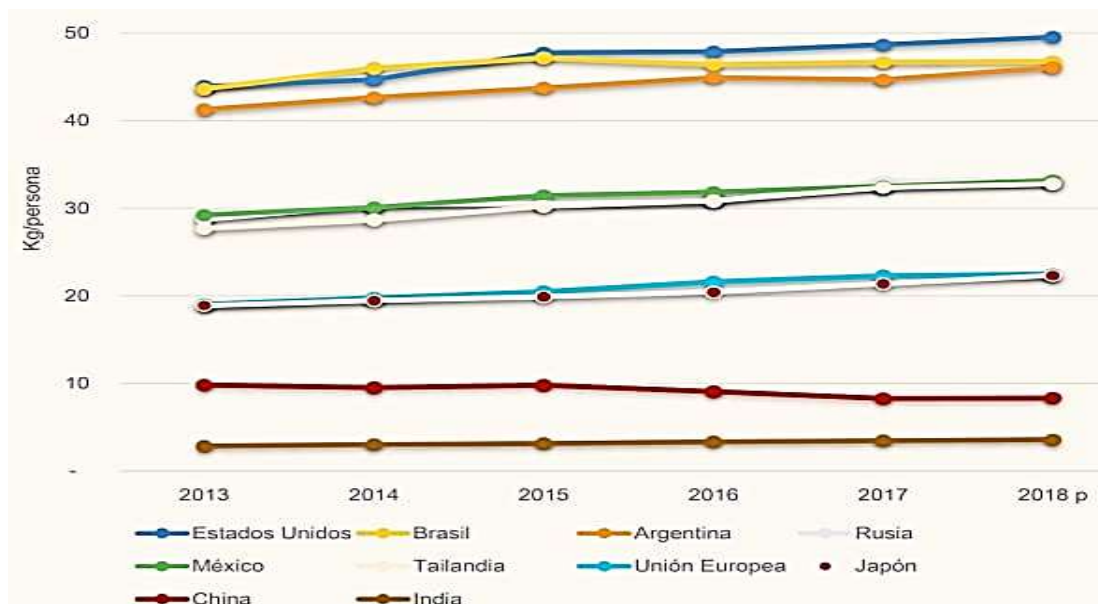


Figura 11. Consumo per cápita de carne de bovino en el mundo en kilogramos por persona, periodo 2013-2018. Fuente: COMECARNE, 2018.

1.5 Características de la carne vinculadas con la calidad

Después de que ocurre el sacrificio del animal, se lleva a cabo el proceso de transformación del músculo en carne. Para hacer esto posible se requieren de cambios bioquímicos que ocurren en el período *post-mortem*: el establecimiento del rigor mortis y la maduración (Zimerman, 2007).

1.5.1 Pre-rigor

En esta etapa se elimina la sangre del animal, provocando su muerte debido a un paro circulatorio y cardíaco, por lo cual el oxígeno deja de llegar al músculo, haciendo que la poca cantidad remanente en los tejidos (mioglobina) sea consumido inmediatamente. La necesidad de energía lleva a las células a consumir el ATP existente con rapidez, y a reponer el mismo usando ahora la vía glicolítica anaerobia, al ocurrir este proceso las reservas de glucógeno disminuyen y el ácido láctico se acumula en el tejido muscular, causando que el pH disminuya desde valores cercanos a 7 hasta 5.3 a 5.7, dependiendo de la especie y el manejo de esta. Este valor de pH puede afectar propiedades fisicoquímicas de la carne como es la retención de agua. También ocurre una disminución de la temperatura corporal, que tiende a disminuir desde 38 a 39°C, interviniendo un sin número de factores: especie, peso, espesor de la grasa dorsal, etc. Cuando la temperatura es aún elevada puede darse una acidificación produciendo que las proteínas se desnaturalicen, y la retención de agua sea menor, originando una carne con una apariencia pálida, suave y humedad, conocida como PSE. El fenómeno opuesto donde el pH disminuye debido a una baja reserva de glucógeno genera una carne oscura, firme y seca es conocido como DFD, por sus siglas en inglés, siendo estos fenómenos antes mencionados indeseables en la carne (Hui, Guerrero Legarreta, & Rosmini, 2006).

1.5.2 Rigor mortis

El rigor mortis se presenta poco después de la muerte en donde el tejido muscular se encuentra en un estado de rigidez sostenida y es inextensible. La condición del rigor es irreversible como consecuencia del agotamiento de las reservas de ATP que evitan la ruptura de los puentes cruzados entre actina y miosina; además carece de control nervioso; el rigor mortis y la contracción muscular son llevados a cabo por procesos similares; en donde la

glucólisis anaerobia y la producción de ácido láctico se acompaña de una reducción de las reservas de glucógeno. Los cambios químicos que ocurren durante el desarrollo del *rigor mortis* incluyen un descenso del pH y en la concentración de ATP y de creatín fosfato; las concentraciones de ATP se mantienen relativamente constantes hasta que los niveles de creatín fosfato alcanzan un nivel bajo, mientras sigue disminuyendo la concentración de ATP, se produce una rápida disminución de la extensibilidad del músculo (Price *et al.*, 1994). El ciclo de contracción-relajación se detiene debido a la falla en los mecanismos que sintetizan ATP, por lo que la elasticidad muscular se pierde paulatinamente hasta llegar a un estado de contracción sostenida por la formación del complejo actomiosina (Hui *et al.*, 2006).

1.5.3 Post-rigor

Una vez completado el *rigor mortis*, se inician cambios en la carne que tienden a hacer que la misma se vuelva progresivamente más suave, a la vez que se mejora el sabor y el aroma. El proceso de maduración es en sí complejo, no obstante, los cambios se deben a la acción de sistemas enzimáticos endógenos los cuales se encuentran relacionados con la ruptura de las proteínas miofibrilares claves responsables de la estructura muscular (Taylor, Geesink, Thompson, Koohmaraie, & Goll, 1995).

En la Figura 12 se muestra un resumen de los cambios bioquímicos para la transformación del músculo en carne.

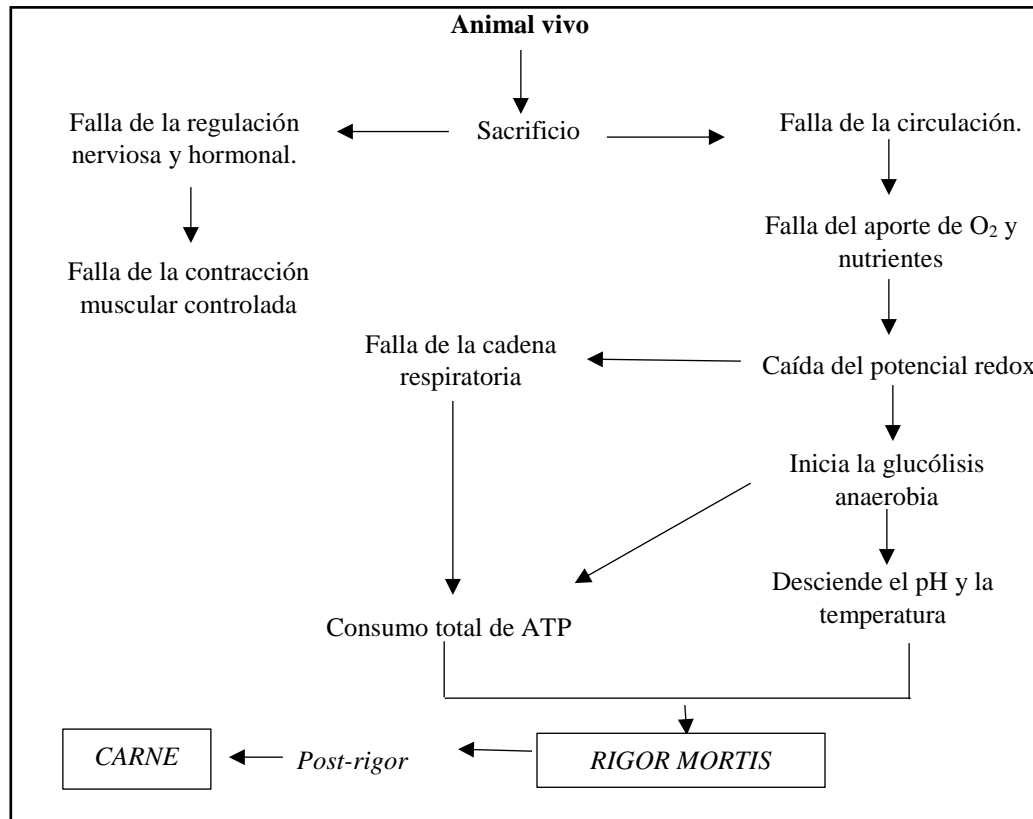


Figura 12. Cambios bioquímicos *pre* y *post-rigor* de la carne. Fuente: Hui *et al.*, 2006.

1.5.4 Relación entre el sistema de producción y la calidad de la carne

Existen diversos factores que pueden determinar la calidad de la carne entre estos destacan los enfocados con el sistema de producción, pues tienen gran importancia en el producto final que llega a la mesa del consumidor.

- El Grupo Genético: En la actualidad existe una gran variabilidad genética en el ganado bovino; donde la mayoría de las razas se han originado de los dos grandes subgéneros bovinos, el *Bos indicus* y *Bos taurus* (Figuras 12 y 13). Los productores han encontrado ventajas producidas por el cruzamiento de razas *Bos indicus* con ganado europeo para la adaptación a ambientes semitropicales.
- El sexo: influye en diversas características de calidad de la carne tales como el color y la deposición de grasa intramuscular, ya que, se conoce que las hembras tienden a

depositar mayor cantidad de grasa, mientras que los machos depositan grasa intramuscular.

- La edad al momento de la matanza de los animales: esta tiene influencia porque la carne tiende a ser más oscura conforme la edad del animal incrementa, debido a que los músculos de animales maduros contienen mayor cantidad de mioglobina.
- La influencia de los días de finalización en corral: La carne es más firme al tacto conforme se incrementan los días de finalización en corral ya que el contenido de humedad en los tejidos blandos decrece y el contenido de tejido graso incrementa en periodos mayores de engorda.
- Días de maduración de la carne: La maduración de la carne bajo condiciones adecuadas influye en la suavidad de esta, siendo esto algo positivo en el sabor de la carne, ocasionado por procesos químicos; como la formación de nuevos compuestos derivados de la degradación de proteínas, la formación de compuestos de Maillard y la oxidación de las grasas (Lozano & Braña, 2013).

1.6 Diferencias entre *Bos indicus* y *Bos taurus*

Los animales que se destinan a la producción de carne son normalmente cruza de *Bos taurus* (*Bt*) y *Bos indicus* (*Bi*), las diferencias entre estos radican en la adaptación a diferentes ambientes, como es la influencia polar (origen europeo) y tropical respectivamente (originario de la India). Fisiológicamente las diferencias entre ellos residen en el pelo largo, cuernos cortos, sin giba en el caso de *Bos taurus* y el pelo corto, cuernos largos y con giba en *Bos indicus* (Castro, 2002), esto se puede observar en las Figuras 13 y 14.



Figura 14. *Bos taurus*. Fuente: Lozano & Braña, 2013.



Figura 13. *Bos indicus*. Fuente: Lozano & Braña, 2013.






En el Cuadro 4 se resumen las diferencias entre cada subgénero, en cuanto a su apariencia, temperamento, conformación y extremidades.

Cuadro 4. Características diferenciales entre *Bos indicus* y *Bos taurus*. Fuente: Gasque, 2008.

Atributos	Tipo cebuino	Tipo europeo
Apariencia	Corpulentos, musculosos y sin grasa subcutánea. Esqueletos y huesos largos, finos.	Voluminosos, con abundante masa muscular y grasa. Esqueleto de huesos medios y cortos y gruesos.
Temperamento	Activo, audaz	Tranquilo, apático
Conformación		
Cabeza	Proporción mediana, larga, estrecha.	Proporcionalmente pequeña, corta y ancha.
Orejas	Largas, móviles y/o pendulosas	Cortas, no pendulosas
Cuernos	Grandes, fuertes	Cortos, finos.
Cuello	Mediano y largo.	Corto a mediano.
Línea dorsal	Cruz alta y dorso lomo algo más bajo.	En una sola línea horizontal.
Tórax	Algo estrecho, pero profundo y largo.	Amplio y con costillas bien arqueadas.
Pecho	Estrecho y profundo.	Ancho y profundo.
Espalda	No muy musculosa.	Muy musculosa.
Cuerpo posterior	Musculoso.	Muy desarrollado.
Cola	Implantada, alta, con forma de látigo.	Inserción a nivel, corta y gruesa.
Giba	Implantada en la cruz o dorso, muy voluminosa.	Carece de giba.
Extremidades		
Miembros	Largos, de huesos finos.	Medios- cortos y de huesos gruesos.
Piel (cuero)	Formado de pliegues colgantes.	Textura espesa, sin pigmentar.
Pelaje	Pelos cortos, finos y lacios.	Pelos relativamente largos, ondulados o cortos.
Color	Piel negra y pelos blancos, colorados o negros.	Piel rosada y en claros pelos, algunas razas negras.






A continuación, en el siguiente cuadro se muestran algunas razas de ganado bovino *Bos taurus*:

Cuadro 5. Razas de *Bos taurus*. Fuente: Gasque, 2008.

Raza	Origen	Distribución	Características	Imagen
Aberdeen Angus	Escocia	En México existen cantidades limitadas en el Norte del país	La raza Beefmaster es de gran talla, dispone de cuernos y alcanzan índices de crecimiento elevado. La piel es suelta y el color del pelaje es rojo castaño.	
Beefmaster	E.U. A.	E.U.A. y México.	La raza Beefmaster es de gran talla, dispone de cuernos y alcanzan índices de crecimiento elevado.	
Charolais	Francia	Francia, Canadá, E.U.A., México y Centroamérica, así como en Argentina.	Una de sus características más destacables es su musculatura, sumamente desarrollada, que se encuentra en las extremidades y sobre el lomo.	
Hereford	Inglaterra	Inglaterra, Canadá, E.U.A, Argentina, México, Uruguay y Paraguay	Son animales precoces, el rendimiento de carne limpia en novillos a campo, varía entre 60 y 63%. Es una raza que va de mediano a gran tamaño.	
Holstein	Holanda y Alemania	Desde Canadá hasta Argentina, Europa.	Esta es una raza de notable corpulencia y fortaleza.	

En el Cuadro 6 se muestran algunas razas de ganado *Bos indicus*.

Cuadro 6. Razas de *Bos indicus*. Fuente: Gasque, 2008.

Raza	Origen	Distribución	Características	Imagen
Brahman	India	E.U.A, en México, Centroamérica, Sudamérica, Sudáfrica y Australia.	Alcanza un desarrollo superior al de las razas europeas en las regiones tropicales; se desarrolla con rapidez y continúa su crecimiento hasta que tiene 5 ó 6 años.	
Guzerat	India	Bombay, Pakistán, México.	Su aspecto denota robustez y fortaleza física por sus huesos fuertes y musculatura compacta.	
Gyr	Katiawar, al oeste de la India.	India, Brasil, México y diversos países Centroamericanos.	Es de talla media, siendo su distinción más importante la conformación de su cabeza, que posee frente muy amplia y convexa que la hace inconfundible.	
Indobrasil	Brasil	Brasil, México y otras partes de Latinoamérica.	Su cuerpo es largo, compacto profundo y voluminoso.	
Nelore	India	India, Brasil, México, Venezuela, Colombia, etc.	Son animales de aspecto vigoroso, de gran desarrollo muscular y corporal. El color varía del blanco al gris plateado.	

CAPÍTULO 2 ASPECTOS GENÉTICOS

2.1 Exones e intrones

Las regiones codificantes de los genes de la mayoría de los eucariontes se llaman exones (secuencias expresadas), y los no codificantes intrones (secuencias interpuestas). Se sabe que en un inicio tanto intrones como exones transcriben a RNA, pero después de la transcripción los intrones se eliminan por corte y empalme lo que es conocido como splicing y es entonces que los exones se unen y dan como resultado el RNA maduro (Pierce, 2011).

Los intrones varían de un solo nucleótido a más de 10 000 nucleótidos (Alberts, 2011). A pesar de que son regiones no codificantes y de que son eliminados por splicing; pueden influir en otras etapas del metabolismo del ARNm, incluyendo la transcripción inicial del gen, la alineación y aumentando los niveles de expresión. La manera en cómo pueden los intrones afectar la transcripción es que actúan como potenciadores y represores de la regulación transcripcional (Le Hir, Nott, & Moore, 2003).

2.2 Polimorfismos genéticos

El ADN de todas las especies presenta la misma estructura química, es decir su composición no cambia, pero las diferencias entre un organismo y otro radican en el orden de las bases nitrogenadas; ese orden influye inclusive en organismos de la misma especie, pues se pensaría que al compartir secuencias de ADN no existen variaciones, pero esto no es así; ya que , suelen compartir un 99% de regiones de secuencia; haciendo que el 1% restante sea lo que define la variabilidad genética intra e interespecies (Checa, 2007).

El ADN tiende a sufrir alteraciones, esos cambios son conocidos como mutaciones que es un cambio en la secuencia del ADN, esto puede deberse a errores en la copia del ADN durante la división celular, la exposición a radiaciones ionizantes o a sustancias químicas que son denominadas mutágenos o bien por infección por virus (National Human Genome Research Institute, 2018).

Existen dos tipos principales de mutaciones en los organismos multicelulares: somáticas que ocurren en tejidos que no producen gametos y no son hereditarias, y las mutaciones germinales que son transmitidas a la descendencia por producirse en los óvulos y el espermatozoides. Es decir, mutaciones pueden dar origen a enfermedades, pero también pueden contribuir a la variación de las especies: dando origen a los polimorfismos genéticos, las diferentes formas de estos polimorfismos se conocen como alelos; sin embargo, para que pueda considerarse un polimorfismo como tal la frecuencia de uno de sus alelos en la población debe ser superior al 1% (Checa, 2007).

2.3 Tipos de polimorfismos

Los polimorfismos pueden diferenciarse dependiendo de si involucran cambios en un solo nucleótido o si en estos intervienen deleciones o inserciones de pocos o muchos pares de bases. Suelen clasificarse en:

- Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único (SNP): son la forma más sencilla de polimorfismo genético ya que consisten en el cambio de un sólo nucleótido en el contexto de una secuencia genética. Se distribuyen de manera heterogénea por todo el genoma y se encuentran tanto en las regiones codificantes (exones) como no codificantes (intrones y región promotora) de los genes (USC, 2017).
- Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica: RFLP'S (Rif lips) son un tipo de polimorfismo producido por una variación de secuenciación del ADN, los científicos los utilizan como marcadores moleculares en los mapas genéticos; dicha secuencia es reconocida por las llamadas enzimas de restricción. Estas son enzimas bacterias que utilizan los científicos para cortar moléculas de ADN en lugares conocidos. Para visualizar RFLP's se utiliza la electroforesis en gel (Gómez, Zamora, & Sánchez, 2013).
- Insertion-deletion: Polimorfismos que consisten en bases insertadas o suprimidas. Las secuencias involucradas son pequeñas, en general de hasta 10 pb; sin embargo, es posible que se presenten secuencias de hasta 1000 a 1500 pb (Gómez *et al.*, 2013).

- **Marcadores polifórmicos mitocondriales:** Las mitocondrias son exclusivamente de herencia materna. Este método permite identificar a individuos de acuerdo con parentescos por línea. Los marcadores de mtADN (ADN mitocondrial) pueden también permitir la rápida detección de hibridación entre especies o subespecies de ganado (FAO, 2010).

2.4 Polimorfismos de un Solo nucleótido (SNP's)

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP'S) comúnmente llamado "snips"; son posiciones en el genoma que solo cambian en un solo nucleótido como su nombre lo indica, pueden estar representados por la delección, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica normal como se muestra en la Figura 15 pb (Gómez *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que los SNP pueden localizarse tanto en los exones como en los intrones; en la gran mayoría de los casos se presentan en los intrones, los cuales pueden tener efectos biológicos y cuando están en los exones existe una probabilidad mayor que se altere la función biológica de la proteína para la que codifican, debido a que el cambio de una base por otra puede ser traducido en la sustitución de un aminoácido por otro (Garnacho, Ortiz & Aldabó, 2005).

Al haber surgido de una mutación los SNP se heredan en variantes alélicas (un alelo es una de las versiones de un gen, generalmente se hereda un alelo paterno y otro materno), este tipo de polimorfismos son numerosos y están presente a lo largo de todo el genoma, en un mismo cromosoma al compararlo se puede encontrar un SNP cada 100 pb. Los alelos G (guanina) y C (citosina) tienden a ser los alelos más frecuentes, mientras que A (adenina) y T(timina) son generalmente los alelos menores (Pierce, 2011).

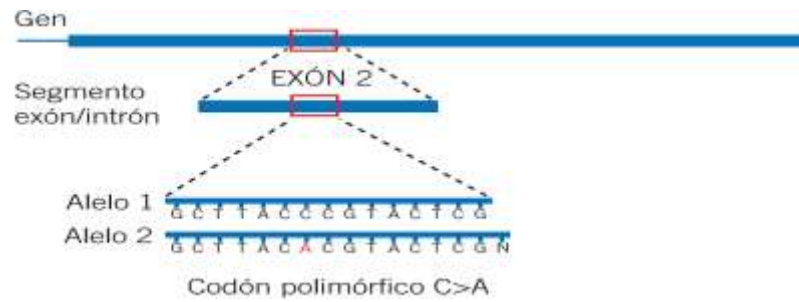


Figura 15. Polimorfismo SNP representado por el cambio de una base por otra. Fuente: Gómez *et al.*, 2013.

2.5 Reacción de la Cadena de la Polimerasa

La Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada por el Dr. Kary Mullis en 1986, en los laboratorios de CETUR Corporation, en Estados Unidos, lo que le hizo valedor del premio Nobel de Química en 1993 (Salazar, Sandoval, & Armendariz, 2013). Concibiendo esta idea con el objetivo de hacer posible obtener millones de copias de DNA, en tiempos cortos, permitiendo la detección específica, automatizada, siendo actualmente utilizada por los investigadores en el diagnóstico de enfermedades, en la clonación y secuenciación de genes, permitiendo que estos estudios genómicos y sean de manera rápida y con una alta sensibilidad (Garibyan & Avashia, 2013).

Como ya se mencionó es una técnica sensible ya que se necesitan cantidades mínimas de ADN para generar suficientes copias, y permitiendo que estas puedan ser analizadas por métodos de laboratorio convencionales.

2.5.1. Fundamento de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa

La PCR se basa en copiar un fragmento de DNA millones de veces, utilizando una enzima que es la Taq polimerasa (que al principio se aisló de una bacteria *Thermus aquaticus*) que sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria, esta enzima es la encargada de agregar los nucleótidos constituidos por las cuatro bases: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) a unas pequeñas cadenas de ADN conocidas como primers (Joshi & Deshpande, 2010), todo esto hace posible delimitar una región específica del fragmento que se desea

amplificar, dando como resultado que al final de la reacción se obtengan copias exactas de ese fragmento. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

2.5.2 Componentes de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa

2.5.2.1 ADN molde

Para la PCR se requiere de una secuencia diana o molde de ADN o ADNc (ADN complementario) para la amplificación; que puede obtenerse de cualquier muestra biológica (Figura 16) , las técnicas actuales permiten la amplificación a partir de 300ng de ADN genómico o bien desde 25 a 100ng en el caso de ADNc o ADN proveniente de genes clonados en vectores (Salazar *et al.*, 2013).

2.5.2.2 ADN Polimerasa

La Taq (de *Thermis aquaticus*) ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR; teniendo como función principal como su nombre lo indica polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como molde otra ya existente, ya que, en cada ciclo de la PCR se lleva a temperaturas de 95°C, esta enzima es termoestable (capaz de soportar dichas temperaturas), con una vida media de aproximadamente 40 minutos a 95°C. Incorpora nucleótidos a una velocidad de aproximadamente 60 bases por segundo a 70 ° C y puede amplificar longitudes de alrededor de 5 kilo bases y su tasa de error en la incorporación de bases es de 4×10^{-4} (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013).

2.5.2.3 Desoxinucleótidos Trifosfato (dNTP's)

Son unidades individuales de las bases A, T, G y C, que son esencialmente "bloques de construcción" para nuevas cadenas de ADN es decir son el sustrato para la síntesis de las innumerables copias de ADN (NCBI, 2017), su concentración óptima es de entre 50 y 200

μM . Esta concentración representa un exceso suficiente que permite tener una concentración adecuada durante toda la reacción. Una alta concentración de dNTPs conlleva a un decrecimiento de la especificidad y fidelidad del PCR, por lo que es importante que la concentración de dNTPs usada esté equilibrada, con el objetivo de minimizar la incorporación de errores. En general $200 \mu\text{M}$ de cada uno de los dNTPs puede usarse para la amplificación de un fragmento de 2 kilo bases durante 30 ciclos (Viljoen, Gerrit J., Nel, Louis H., Crowther, 2005).

2.5.2.4 Iniciadores (Primers)

Son oligonucleótidos monocatenarios, regularmente sintéticos, generalmente con un tamaño de 18-25 pb (pares de bases) teniendo como característica que sus secuencias son complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora (Rahman *et al.*, 2013).

La concentración óptima de los iniciadores debe ser de $0.1- 0.5 \mu\text{M}$ en una reacción estándar, una concentración superior a $0.5 \mu\text{M}$ puede causar la acumulación de productos no específicos debido a uniones inespecíficas en el ADN molde y una concentración menor a $0.1 \mu\text{M}$ puede generar que se terminen los iniciadores antes finalizar los ciclos de la PCR, lo que generaría un bajo rendimiento de amplificación. De manera general, 5 pmol de cada iniciador es adecuado para $25 \mu\text{L}$ de reacción, pero el éxito de la PCR reside en el diseño de los iniciadores para lo cual se suelen utilizar programas bioinformáticos que aseguren que sean complementarios, y teniendo consideraciones como que el contenido G + C debe ser aproximadamente del 50-60 %, la relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40% por ello es recomendable evitar zonas con más de tres repeticiones consecutivas de una sola base (Cornejo, Serrato, & Rocha, 2014).

2.5.2.5 Amortiguador

La solución amortiguadora es la encargada de proporcionar el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa, el pH suele estar entre 8.0-9.5 y está compuesto por Tris-HCl y KCl (Bartlett & Stirling, 2003). Es importante señalar

que la concentración de sales afecta la T_m de los iniciadores y por lo tanto la temperatura de alineamiento.

2.5.2.6 Cloruro de magnesio

El cloruro de Magnesio funciona como un cofactor para la actividad de la ADN polimerasa al permitir la incorporación de dNTPs durante la polimerización. Los iones de magnesio en el sitio activo de la enzima catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre el 3'-OH de uno de los oligonucleótidos y el grupo fosfato de un dNTP (ThermoFisher Scientific, 2018).

De forma general se puede mencionar que las concentraciones de magnesio en la reacción pueden ir de 1.5 a 4 mM (Innis, 1990). Cabe señalar, que el magnesio tiene influencia sobre la temperatura de alineamiento de los iniciadores, la temperatura de disociación de las hebras de las moléculas de ADN, la especificidad de los productos, la fidelidad de la enzima y la formación de dímeros a partir de los iniciadores, por consiguiente, es importante considerarlo un cofactor esencial (Figura 16) (Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2014).

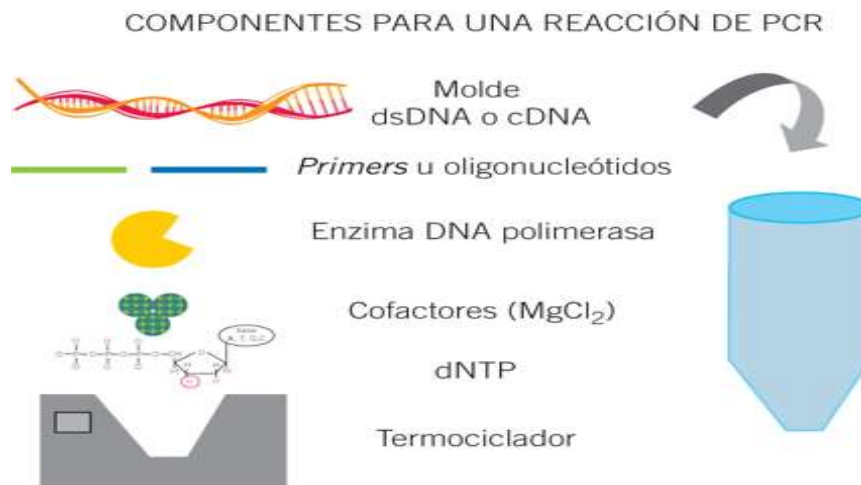


Figura 16. Componentes de la PCR. Fuente: Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2014.

2.5.3 Etapas de la PCR

Por lo general la PCR consta de ciclos sucesivos que son: desnaturalización, alineamiento y extensión, repitiéndose entre 25 y 40 veces. Todo el proceso que conlleva la técnica se puede visualizar en las Figuras 17 y 18.

- **Desnaturalización:** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 30 segundos a 1 minuto, dependiendo de la cantidad de G-C y de la velocidad del termociclador (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013). A medida que aumenta el calor, se rompen los enlaces que unen las dos cadenas de la doble hélice del ADN, lo que permite al ADN separarse en dos cadenas individuales (Nature Eduaction, 2014).
- **Hibridación:** Al disminuir la temperatura de incubación, por debajo de la T_m (temperatura de hibridación) los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. En general se utilizan temperaturas entre 37 y 65°C durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo (extremo 3'-primers) será eficiente (Tamay *et al.*, 2013).
- **Extensión:** también es llamada replicación en donde la ADN polimerasa elonga los primers, empleando como molde ambas hebras originales, ocurriendo la replicación en dirección 5'→3', siendo el sustrato los dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad Finalmente, cuando han terminado los ciclos, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida (Salazar *et al.*, 2013).

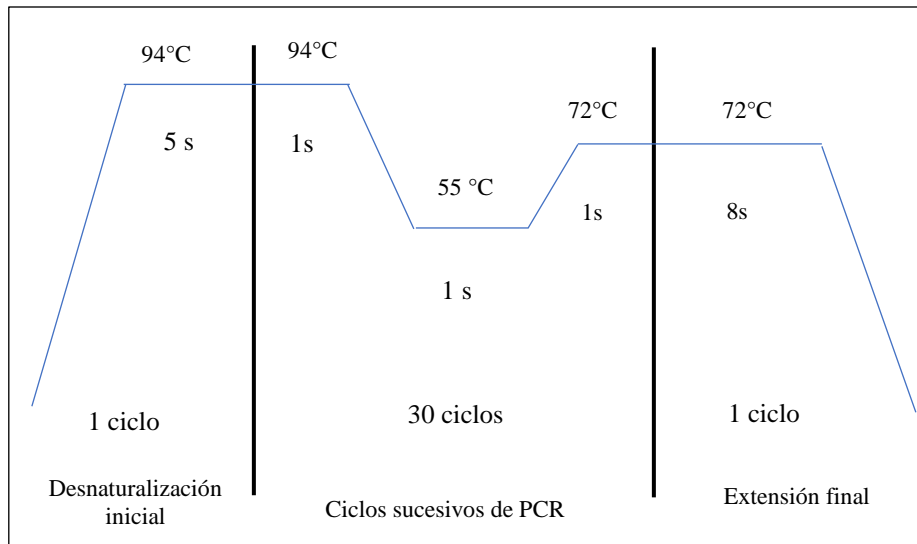


Figura 17. Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos. Fuente: Serrato *et al.*, 2014.

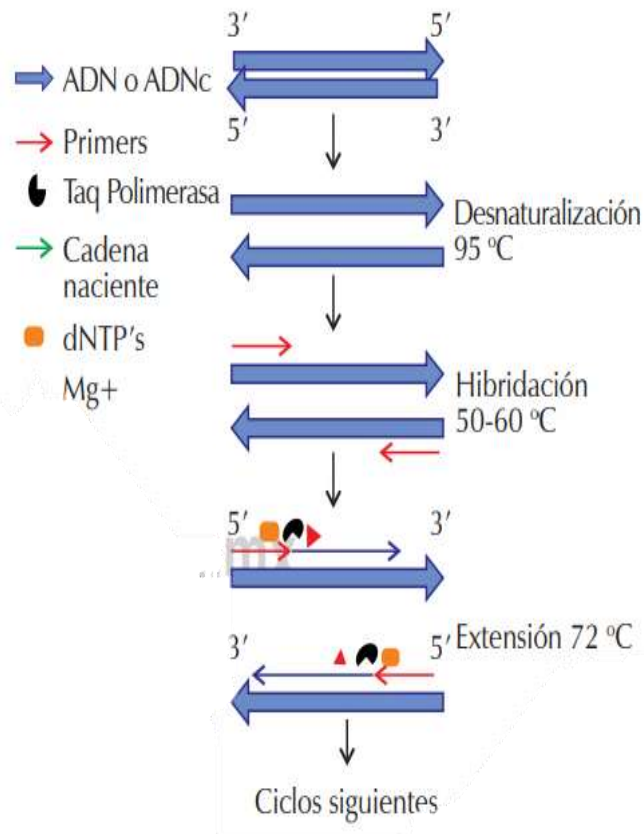


Figura 18. Pasos de un ciclo de la PCR. Fuente: Tamay *et al.*, 2013.

2.5.4 Ventajas y desventajas de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa

Dependiendo del tipo de PCR que se emplee existen una serie de ventajas y desventajas, al utilizar esta técnica, estas se resumen en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Principales métodos de PCR, sus ventajas y limitaciones. Fuente: Walker-Daniels, 2012.

Necesidades experimentales	Método de PCR	Ventajas	Limitaciones
Determinar si una secuencia de ácido nucleico objetivo está presente o ausente en algunas muestras.	Estándar o convencional	*Fácil acceso a los equipos. *Costo mínimo.	*Solo resultados cualitativos. *Manejo posterior a la reacción.
Determinar las cantidades de ácido nucleico objetivo en muchas muestras.	Tiempo real	*Puede generar resultados cuantitativos. *Puede ser secuencia específica.	*Más caro que el convencional. *La velocidad de PCR es de nivel medio.
Determinar las cantidades de muchos ácidos nucleicos objetivo para unas pocas muestras.	PCR arrays	*Se pueden medir hasta 88 genes por muestra a la vez.	*Se necesita una matriz por muestra. *Costoso para muchas muestras.
Detectar objetivo ácido nucleico en el campo.	Chip microfluídico	*Resultados rápidos. *Pequeño. *Portátil	*Equipo especializado. *Costoso.
Detecta objetivos de ácido nucleico de muy baja abundancia o necesita cuantificación extremadamente precisa.	Digital y drop digital	*Cuantificación absoluta muy precisa.	*Equipo especializado. *Costoso.

2.5.5 Aplicaciones de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras, por mencionar algunas:

- *Microbiología*: Permite la detección de microorganismos identificando al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, por ejemplificar un microorganismo esta *Mycobacterium tuberculosis* que ha podido ser estudiado gracias a la PCR, permitiendo desarrollar medicamentos y tratamientos adecuados (Cheriyedath, 2018).
- *Medicina forense*, campo en el que se está utilizando en investigación criminal como parte de la tecnología de la huella digital del ADN, utilizando pequeñas muestras encontradas en las escenas del crimen (Rodríguez & Barrera, 2004).
- *Virología*. En virología, la PCR ayudó a detectar y caracterizar los ácidos nucleicos de los virus, lo que permitió una caracterización viral completa y una mayor comprensión del comportamiento del virus durante la infección, como en el caso del VIH, permitiendo una detección temprana y oportuna (Cheriyedath, 2018).
- *Biotecnología y ciencias agropecuarias*. La PCR ha permitido identificar si un organismo es genéticamente modificado o no, ya sea de origen vegetal o animal, además para detectar la presencia de plagas y parásitos, y para aplicar recientemente marcadores en el ganado (Rodríguez & Barrera, 2004).
- *Estudios de evolución molecular*. Permitted el construir árboles filogenéticos, para comprender la evolución de las especies, identificando las secuencias de los genes a lo largo de este proceso (Rodríguez & Barrera, 2004).

La PCR convirtió en una rutina, la aplicación de estas técnicas, como es el caso de la secuenciación genética, permitiendo la lectura completa del genoma (Serrato *et al.*, 2014), así como de muchos organismos que se toman como modelos en la investigación de distintos problemas biológicos.

2.6 Técnicas de detección de polimorfismos

2.6.1 RFLP Detección de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

El Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) es una técnica desarrollada en 1984 por el científico inglés Alec Jeffreys durante su investigación en enfermedades hereditarias (NCBI, 2018). Se basa en la detección de aquellas variaciones de la secuencia de ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en la diana de restricción; por lo regular esta variación afecta a un solo nucleótido, por ello los fragmentos de restricción se obtienen dependiendo de que alelo esté presente en la muestra. Con el objetivo de utilizar este método en cantidades pequeñas de muestra, es común realizar una amplificación previa por PCR, esto implica que los primers deben ser específicos y que flanqueen en la región polimórfica (Herráez, 2012).

La técnica de análisis de RFLP implica cortar una región particular de ADN con una variabilidad conocida, con enzimas de restricción, luego separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y determinar el número de fragmentos y tamaños relativos como se observa en la Figura 19.

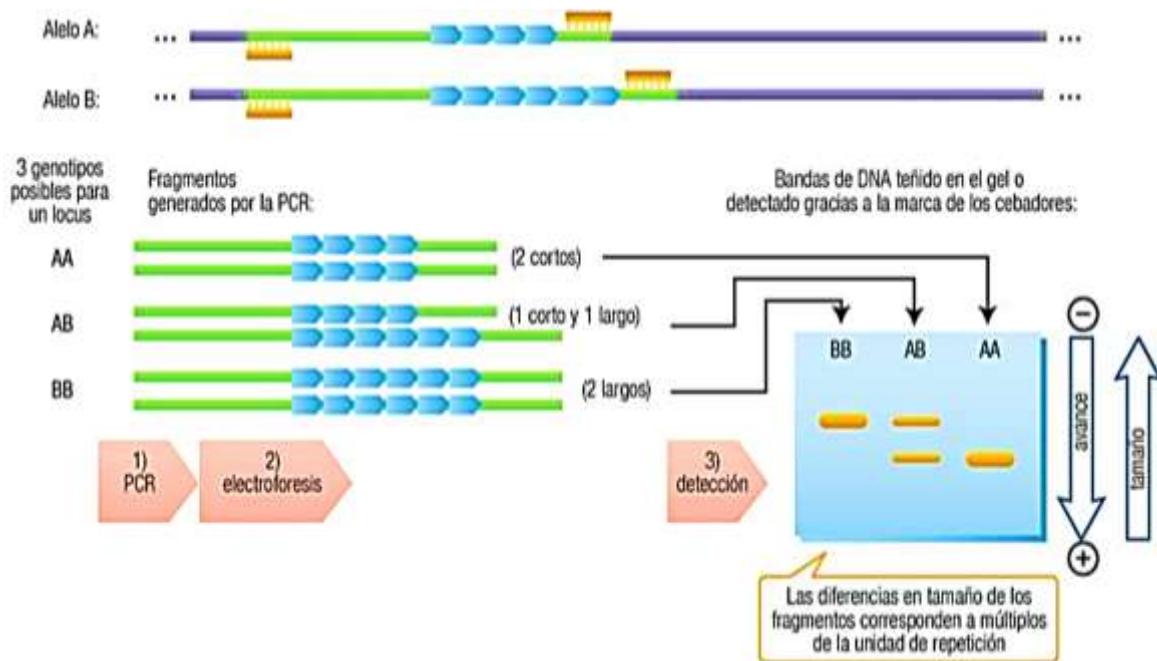


Figura 19. Detección de los polimorfismos mediante PCR-RFLP .Fuente: Herráez, 2012.

2.6 Enzimas de restricción

Estas son enzimas bacterias que utilizan los científicos para cortar moléculas de ADN en lugares conocidos. Los RFLP's (se pronuncia Rif lips) y que se utilizan como marcadores en los mapas genéticos por lo general para visualizar RFLP's se utiliza la electroforesis en gel (NIH, 2018).

También se denominan nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción y en ocasiones enzimas restrictivas o restictasas, suelen nombrarse con tres letras tomadas del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente, seguidos a veces por una letra más que identifica el serotipo(variante antigénica de la bacteria) y finalmente por un número romano que las identifica de las variantes; su importancia radica en su especificidad para reconocer una secuencia corta de ADN bicatenario, los fragmentos resultantes son útiles para iniciar la clonación celular o acelular, para el análisis de DNA, para elaborar mapas físicos de restricción o para la detección de polimorfismos (Herráez, 2012).

2.7 Genes asociados con la calidad de la carne y crecimiento de *Bos taurus* y *Bos indicus*

Diversos estudios en los genes Beta-lactoglobulina (β -Lg), Kappa-caseína (κ -CSN), Diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT1), Prolactina (PRL), Receptor de Prolactina (PRLR), Leptina (LEP), la Hormona de Crecimiento (GH) y su receptor (GHR) han identificado regiones del ADN, locus de características cuantitativas (QTL's), y variantes alélicas asociadas a características de interés en producción de leche, producción de carne, crecimiento y reproducción en ganado bovino (Ángel, Cardona, & Cerón, 2013).

Por lo regular los rasgos de la canal relacionados con la calidad de la carne, crecimiento y producción de leche están regulados por polimorfismos (SNP) que pueden servir como marcadores, y así se puede mejorar el rendimiento del ganado y su crecimiento, algunos de los genes más importantes son:

- El gen calpaína 1 (CAPN1, (mu / I) subunidad grande), que se sabe que se asocia con la ternura de la carne. El SNP 4751 del gen CAPN1 se halló asociado con la resistencia al corte (RC) a los 14 días postmortem en novillos Brahman y cruza de *Bos indicus*

x *Bos taurus*. Polimorfismos en los genes de la calpaína (CAPN1), y la calpastatina (CAST) están asociados a la terneza de la carne (Branda Sica, Soria, & Corva, 2011).

- El gen de GHR se encuentra ubicado en el cromosoma 20 del genoma bovino y ha sido sugerido como un gen candidato para las características relacionadas con producción de carne en ganado vacuno como porcentaje de grasa corporal y composición y con producción de leche (Andreas, Sumantri, Nuraini, Farajallah, & Anggraeni, 2010).
- El gen leptina ha sido asociado en ganado vacuno con predicción de peso corporal, circunferencia escrotal y concentración de testosterona en suero (Thomas *et al.*, 2002).

2.8 Presencia de polimorfismos de un solo nucleótido y su implicación con la canal

La composición de la res es fundamental para determinar el rendimiento y la calidad de la carne, incluyendo su terneza, sabor y jugosidad, para la clasificación de canales de res se encuentra la NMX-FF-078-2002, la cual establece los criterios de calidad que deben cumplir; haciendo referencia a la canal con relación al grado de madurez fisiológica, a la madurez con relación al marmoleo y como se efectúa su identificación.

Los rasgos de la carcasa relacionados con la calidad de la carne de res están normalmente controlados o regulados por una serie de genes y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes; que pueden fungir como marcadores significativos para mejorar el rendimiento del ganado.

Ventajas y desventajas

Como ventajas de que se presenten los polimorfismos de un solo nucleótido y que estos sean utilizados como marcadores para el mejoramiento genético, se encuentran:

- Permiten a criadores y productores, crear estrategias para mantener y optimizar el recurso genético animal disponible en los hatos (Tonhati, Mendoza, Sesana, Aspilcueta, & Galvão, 2013).
- Sirven para obtener información suficiente para llevar a cabo la identificación de individuos en una raza o especie determinada, evaluar susceptibilidad a enfermedades genéticas, establecer características cualitativas como presencia de cuernos o color de pelaje entre otros (Garrick, 2011).
- Las técnicas actuales para identificarlos son menos invasivas, aportan mucha información acerca de la composición genética de un individuo o población respecto a una característica determinada.

Algunas desventajas son:

- Las características de importancia económica son de naturaleza cuantitativa, las cuales muestran variación continua y son controlados por varios pares de genes y la interacción de estos con el medio ambiente (Ángel *et al.*, 2013).
- La mayoría de los caracteres de calidad de la carne y la canal están influenciados por muchos genes (poligenes), y por lo tanto el seguimiento de un bajo número de estos a través de marcadores de ADN sólo explicará una pequeña proporción de la varianza genética (Piñeira, Río, Floody, & Felmer, 2012).
- Los costos de implementación no permiten que cada productor emplee de forma rutinaria el genotipado de individuos, puesto que el tamaño de población de 2000 individuos es el más indicado para obtener alta confiabilidad en el efecto estimado de cada SNP (Universidad de Nariño & Universidad de la Florida, 2013)

2.9 Gen WNT10B

El gen 10B (WNT10B) ha sido estudiado en MVTT (Virus del tumor mamario de ratón) sin alas, se encontró que está relacionado en el deterioro del desarrollo del tejido adiposo in vivo, de ahí deriva su nombre. Por otro lado, el aumento de grasa corporal observado en ratones knockout para WNT10B - / - ha proporcionado una clara evidencia de que WNT10B suprime la acumulación de grasa corporal, este gen ha sido poco estudiado en bovinos, pero se encuentra relacionado a la obesidad en las poblaciones europeas, localizándose en el cromosoma número 5 en bovino, es por ello que los polimorfismos (SNP) asociados a este pueden tener relación con el crecimiento del ganado bovino (Figuras 20 y 21) (Zhao *et al.*, 2012).



Figura 20. Ubicación del gen WNT10B en el cromosoma 5 de *Bos taurus*. Fuente: NCBI, 2019a.

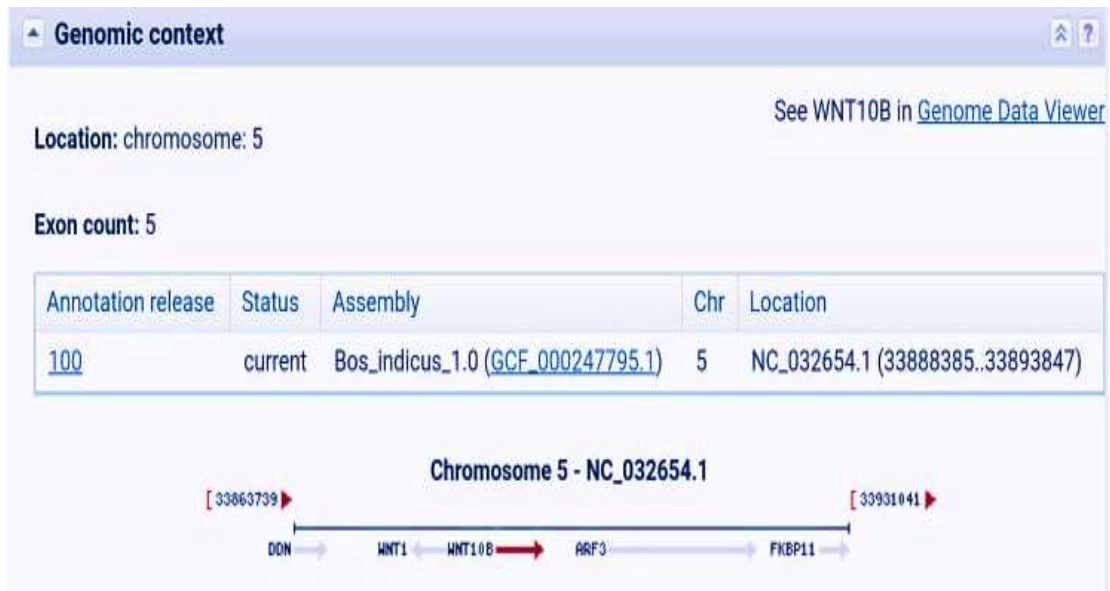


Figura 21. Ubicación del gen WNT10B en el cromosoma 5 de *Bos indicus*. Fuente: NCBI, 2019b.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Justificación

La carne es un alimento con gran importancia en la dieta del ser humano, su ingesta está recomendada en una alimentación balanceada debido a que se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (FAO, 2015).

Entre las fuentes de obtención de la carne destaca la de bovino como una de las más consumidas a nivel mundial, sobresaliendo en cuanto a consumo per cápita países como Uruguay, Argentina, Paraguay y Estados Unidos con 47, 45, 25 y 24 kg al año respectivamente (FIRA, 2017).

Por lo que se refiere a México los principales estados productores de carne de res son: Veracruz 14%, Jalisco 11%, Chiapas 6%, San Luis Potosí 5%, Sinaloa 5% del total de la producción (1,187 millones de dólares de carne bovina.), ubicándonos como el 6° productor mundial, el 9° exportador (194 mil 100 toneladas) y el 11° importador (187 mil 900 toneladas). Siendo el consumo nacional de un millón 872 mil 700 toneladas, con un consumo per cápita de 15.5 kilos (Espinosa, 2018).

Los animales que están destinados a la producción de carne son normalmente cruza *de Bos taurus (Bt)* y *Bos indicus (Bi)*. Los *Bt* son bovinos de origen europeo, de gran musculatura, sin joroba (giba) y con mayor habilidad para depositar grasa; sin embargo, no se adaptan a las condiciones climáticas típicas de los trópicos. Los animales *Bi* son originarios de la India y países asiáticos, por lo que tienen una gran habilidad de adaptación a climas húmedos y calurosos; se reconocen fácilmente por su pronunciada joroba y por sus grandes orejas, sus canales tienen poca masa muscular y depositan menos grasa que los *Bt*. (SAGARPA, 2012), debido a que estas especies son de interés comercial, se han estudiado diversos polimorfismos para identificar características que son importantes no sólo en el aspecto económico sino también con la intención de obtener la mejor calidad posible en la carne, desde la crianza hasta que llega a la mesa del consumidor.

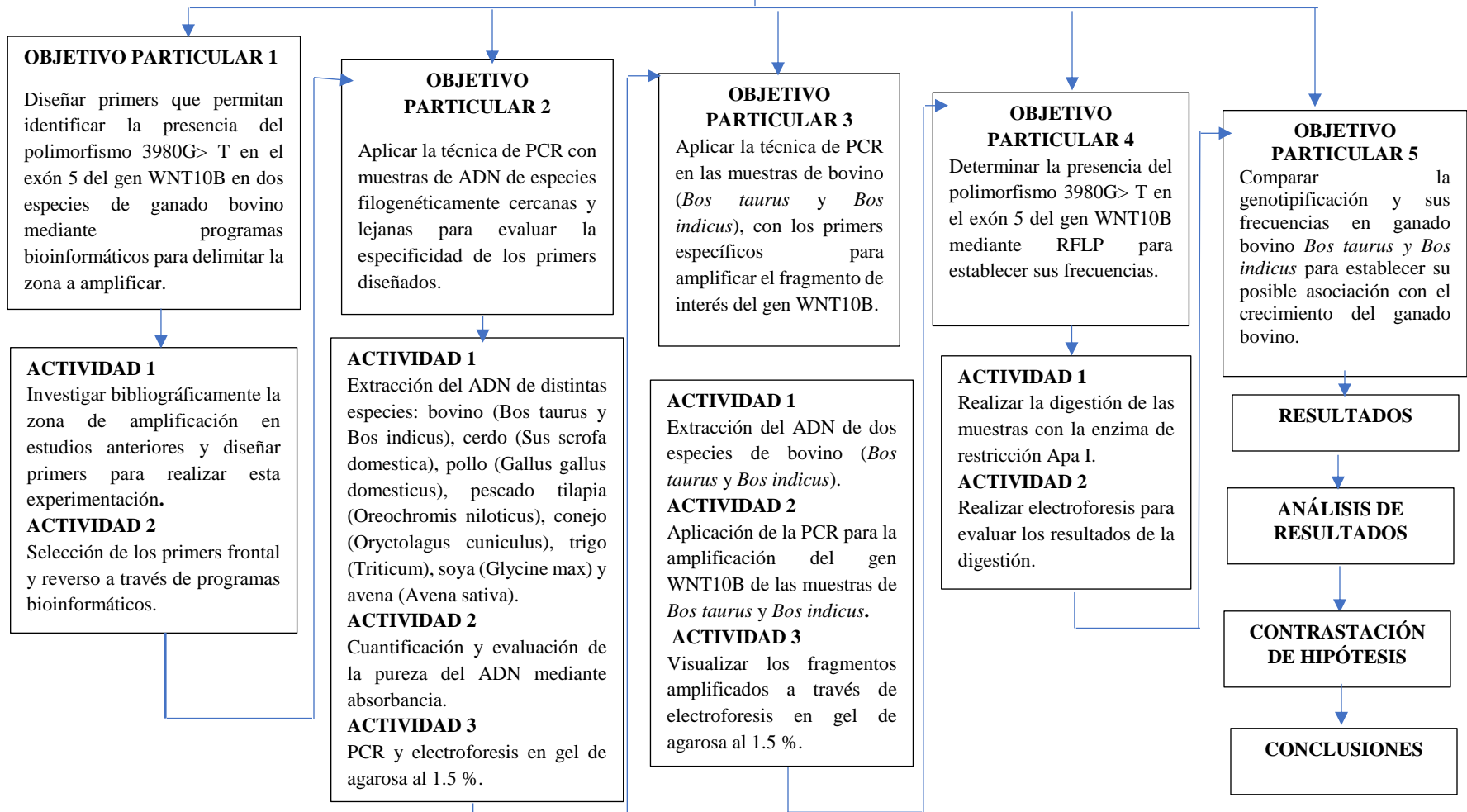
Existen diferentes genes asociados a una característica en particular, por ejemplificar algunos, están los relacionados con el crecimiento de la especie, composición de la carne (ácidos grasos), terneza de la carne; etc. Uno de los genes de interés es el gen 10B (WNT10B) implicado en el crecimiento en ganado bovino.

El objetivo de este estudio es identificar el polimorfismo 3980G> T en el exón 5 asociado al gen 10B (WNT10B), que confiere al ganado bovino rasgos de crecimiento (altura del cuerpo, longitud del cuerpo, circunferencia del pecho) mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa-RFLP de modo que, sea posible amplificar el fragmento de interés, para futuras aplicaciones que puedan asociarse con este polimorfismo.

3.2 Cuadro metodológico

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B en dos especies de ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) mediante PCR-RFLP para comprobar su asociación con el crecimiento de ganado bovino.

HIPÓTESIS: Las frecuencias alélicas del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B serán diferentes en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* relacionando esas diferenciaciones con su crecimiento.



3.3 Objetivo general

Evaluar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B en dos especies de ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) mediante PCR-RFLP para comprobar su asociación con el crecimiento del ganado bovino.

3.4 Objetivos particulares

3.4.1 Objetivo particular 1

Diseñar primers que permitan identificar la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en dos especies de ganado bovino mediante programas bioinformáticos para delimitar la zona a amplificar.

Actividad 1

Investigar bibliográficamente la zona de amplificación en estudios anteriores y diseñar primers para realizar esta experimentación.

Actividad 2

Selección de los primers frontal y reverso a través de programas bioinformáticos.

3.4.2 Objetivo particular 2

Aplicar la técnica de PCR con muestras de ADN de especies filogenéticamente cercanas y lejanas para evaluar la especificidad de los primers diseñados.

Actividad 1

Extracción del ADN de distintas especies: bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), cerdo (*Sus scrofa domestica*), pollo (*Gallus gallus domesticus*), pescado tilapia (*Oreochromis niloticus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), trigo (*Triticum*), soya (*Glycine max*) y avena (*Avena sativa*).

Actividad 2

Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN mediante absorbancia.

Actividad 3

PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

3.4.3 Objetivo particular 3

Aplicar la técnica de PCR en las muestras de bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), con los primers específicos para amplificar el fragmento de interés del gen WNT10B.

Actividad 1

Extracción del ADN de dos especies de bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*).

Actividad 2

Aplicación de la PCR para la amplificación del gen WNT10B de las muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Actividad 3

Visualizar los fragmentos amplificados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

3.3.4 Objetivo particular 4

Determinar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B mediante RFLP para establecer sus frecuencias.

Actividad 1

Realizar la digestión de las muestras con la enzima de restricción ApaI.

Actividad 2

Realizar electroforesis para evaluar los resultados de la digestión.

3.4.5 Objetivo particular 5

Comparar la genotipificación y sus frecuencias en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* para establecer su posible asociación con el crecimiento del ganado bovino.

3.4.6 Hipótesis

Las frecuencias alélicas del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B serán diferentes en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* relacionando esas diferenciaciones con su crecimiento.

3.5 Materiales y métodos empleados

3.5.1 Extracción del DNA

Material biológico:

Muestras de *Bos taurus* y *Bos indicus* y de especies filogenéticamente cercanas y lejanas cerdo (*Sus scrofa domestica*), pollo (*Gallus gallus domesticus*), pescado tilapia (*Oreochromis niloticus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), trigo (*Triticum*), soya (*Glycine max*) y avena (*Avena sativa*).

Cuadro de muestras

Para evaluar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B se utilizaron 10 muestras de *Bos taurus* y 10 del subgénero *Bos indicus*. Las muestras fueron obtenidas del Rastro Municipal de Tehuacán Puebla y del mercado municipal de Ajalpan, Puebla (Cuadro 8), las edades consideradas fueron mayores a 48 meses y con al menos dos partos.

Cuadro 8. Cuadro de identificación de las muestras obtenidas de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

ESPECIE	IDENTIFICACIÓN	PROCEDENCIA	CORTE	Peso (kg)
<i>Bos taurus</i>	B.T.1	Rastro Municipal	Pierna	465
	B.T.2	Rastro Municipal	Filete	370
	B.T.3	Rastro Municipal	Lomo	450
	B.T.4	Rastro Municipal	Pescuezo	398
	B.T.5	Rastro Municipal	Chambarete	490
	B.T.6	Mercado Ajalpan	Pierna	-
	B.T.7	Mercado Ajalpan	Filete	-
	B.T.8	Mercado Ajalpan	Pescuezo	580
	B.T.9	Rastro Municipal	Chambarete	470
	B.T.10	Rastro Municipal	Pescuezo	568
<i>Bos indicus</i>	B.I.1	Mercado Ajalpan	Filete	-
	B.I.2	Mercado Ajalpan	Chambarete	-
	B.I.3	Mercado Ajalpan	Pulpa	-
	B.I.4	Mercado Ajalpan	Chambarete	-
	B.I.5	Mercado Ajalpan	Filete	-
	B.I.6	Rastro Municipal	Chambarete	600
	B.I.7	Rastro Municipal	Pescuezo	460
	B.I.8	Rastro Municipal	Pescuezo	540
	B.I.9	Rastro Municipal	Pescuezo	430
	B.I.10	Rastro Municipal	Pescuezo	475

Método

El método utilizado para la extracción de ADN fue el de (Sambrook & Russell, 2001).

Disgregación del tejido

Para realizar la disgregación del tejido, se trituró la muestra en un mortero, después se pesaron 0.125g de muestra en un tubo *Eppendorf* estéril. Se añadieron 1250 μL de solución de Lisis (Tris base 50nM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.3%) y 7 μL de enzima Proteinasa K, agitando durante 1 minuto en el agitador vortex, *Genie K-55-G*, estos pasos se pueden ver en la Figura 22.



Figura 22. Esquema que muestra la metodología de la disgregación del tejido de la muestra.

Extracción de proteínas y polisacáridos de ADN

Posteriormente se incubó la reacción en el Termoblock *Eppendorf* por 2 horas a 50°C, transcurrido este tiempo se elevó la temperatura a 60 °C por 1 hora, para desactivar a la enzima. Se agregaron 250 μL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos en la centrifuga *Minispin plus Eppendorf*. En esta etapa se separó el ADN de las proteínas y polisacáridos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación como se observa en la Figura 23.



Figura 23. Diagrama que muestra cómo se lleva a cabo la extracción de proteínas y polisacáridos del DNA.

Precipitación del ADN

El último paso de la extracción es la precipitación del material genético, para lo cual se adicionó etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble (Cornejo, 2014).

Primeramente, se recuperó la fase acuosa que contiene el DNA; añadiendo 1500 μL de etanol frío. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos en la centrifuga *Minispin plus Eppendorf*; a continuación, se decantó el etanol y se dejó secar a 37°C por 1 hora, para que se evaporara totalmente. Como último paso se resuspendió el DNA, con 50 μL de agua desionizada y se mezcló perfectamente en el vortex *Genie K-55-G* (Figura 24).

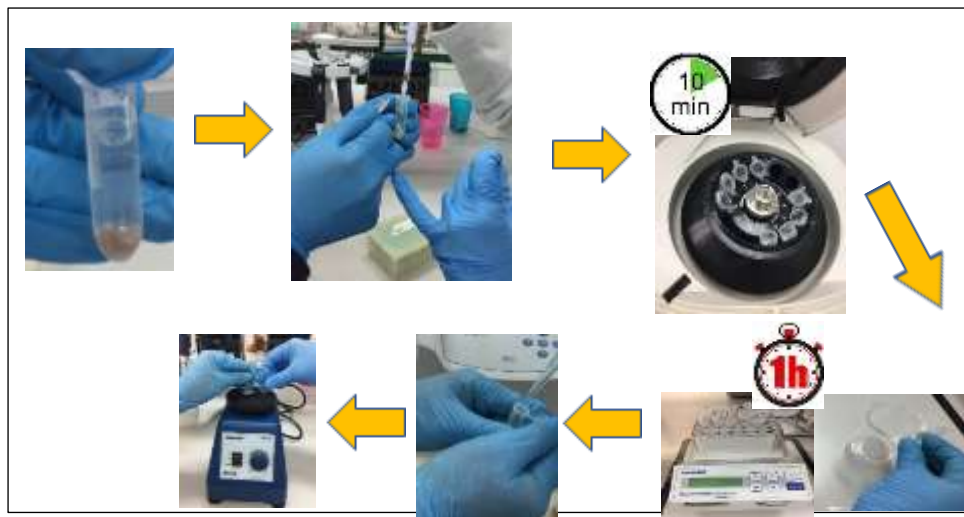


Figura 24. Diagrama de la precipitación del DNA.

3.5.2 Cuantificación de ADN

Método

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar su concentración y pureza mediante espectrofotometría. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm; un valor de 1.8 es generalmente aceptado como "puro" para ADN, aunque puede oscilar entre 1.7-1.9; por encima de 2 se tiene RNA puro. Si la relación es apreciablemente más baja, puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben la luz ultravioleta (UV) fuertemente a 280 nm.

Para llevar a cabo este método, se usó el espectrofotómetro *Nanodrop (ND-1000)*; este equipo se encuentra conectado a una computadora que cuenta con un programa, utilizando la opción ácidos nucleicos. Primero se limpió el sensor del equipo y se colocaron 2 μL de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo, la cual sirvió como blanco "blank"; a continuación, se pulsó la opción "OK". Cuando el equipo registró los valores del blanco se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo. Se procedió a colocar 2 μL de la muestra que se deseaba cuantificar y se registraron los valores de la relación 260/280 nm y $\text{ng}/\mu\text{L}$ y se limpió el equipo. La concentración ideal de ADN es 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para que se pueda realizar la PCR (Sambrook, 2001), por lo que se realizó la dilución correspondiente (Figura 25).



Figura 25. Esquema que muestra los pasos para la cuantificación del DNA.

3.5.3 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis se realizó para corroborar la integridad el ADN extraído y si este sirve para utilizarlo en la PCR; se realizó en geles de agarosa al 1% y para evaluar los productos de la PCR se realizó en geles de agarosa al 1.5%.

Método

Preparación del gel de agarosa para electroforesis

Para preparar los geles de agarosa se pesaron 0.5 g de agarosa para geles al 1% y 0.75 g de agarosa para geles al 1.5%, posteriormente se disolvió con 50 mL de TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA, 1X), a continuación, se calentó la disolución en el horno de microondas *Mirage JMI-010* por aproximadamente 1 minuto por intervalos de 20 segundos. Después se dejó enfriar y se añadió 1 gota de BRET (Bromuro de Etidio), agitando la mezcla. Se cerraron las aperturas laterales del soporte de la cámara de electroforesis y se vertió la mezcla en el soporte, evitando la formación de burbujas y se colocó el peine correspondiente. Una vez gelificado el gel, se retiró el peine y se situó el gel en el soporte de la cámara agregando TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA, 1X) de modo que el gel quedó cubierto, el método se ilustra en la Figura 26.

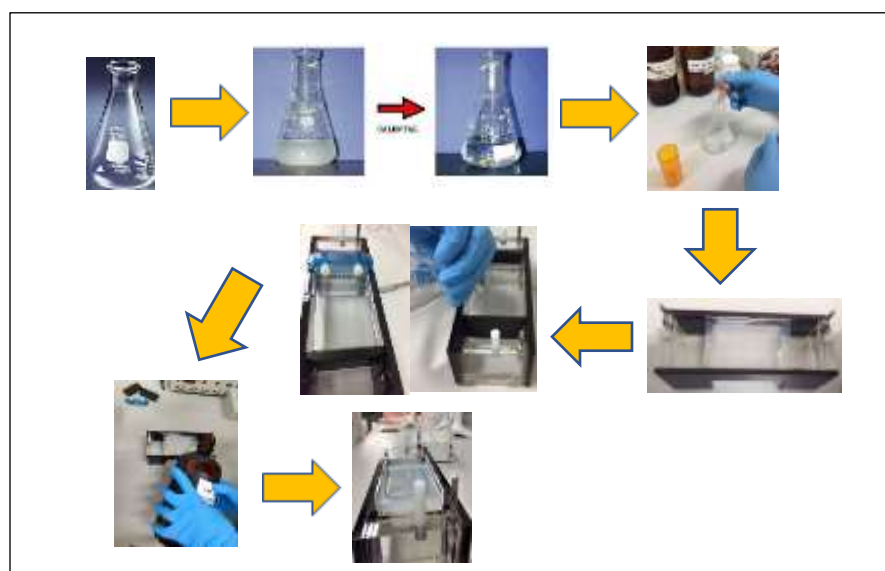


Figura 26. Diagrama que muestra los pasos para la preparación de un gel de agarosa.

Carga y corrida del gel

Previamente, para cargar el gel se colocó en un trozo de Parafilm 3 μ L de BRET (Bromuro de Etilio); 2 μ L de colorante blue/Orange y 5 μ L de la muestra resultante del DNA extraído, homogeneizando con la micropipeta *Eppendorf*, luego se transfirieron cada una de las muestras dentro de los pocillos que se formaron en el gel. Se conectaron los electrodos y se activó un campo eléctrico de 80V; la corrida se detuvo cuando el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto de la cámara (Figura 27).

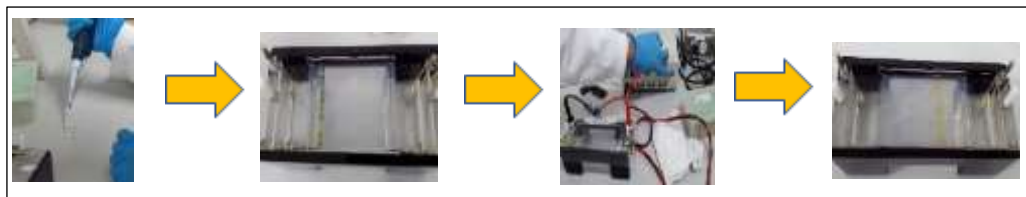


Figura 27. Diagrama que muestra la carga y corrida del gel de agarosa.

Visualización del gel

Finalmente, el gel se visualizó en el transluminador *Cleaver Scientific LTD*, cuidando que el gel no se rompiera, para ello se colocó en el centro y se encendió el transluminador, al igual que la cámara *Kodac Digital Science* y se tomó la fotografía correspondiente, este procedimiento se muestra en la Figura 28.

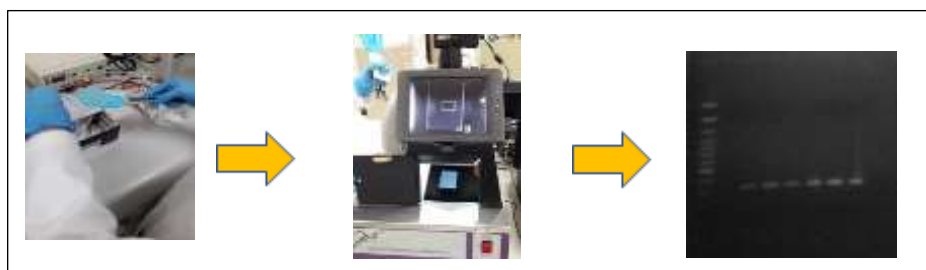


Figura 28. Diagrama que muestra los pasos para la visualización del gel de agarosa tras la electroforesis

3.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Método

En primer lugar, se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la cantidad de cada componente en la reacción como se muestra en el Cuadro 9. Se agregó la cantidad calculada del Kit Máster Mix (compuesto por 50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3mM de MgCl₂), los primers y el agua libre de nucleasas en un tubo Eppendorf, se dividió la mezcla en los tubos Eppendorf previamente identificados, y se agregó el ADN correspondiente a cada tubo, posteriormente se colocaron los tubos en la mini centrífuga por 5 segundos aproximadamente. Por último, se introdujeron los tubos al termociclador, que previamente se programó de acuerdo con el programa de PCR a emplear; el método se esquematiza en la Figura 29.

Cuadro 9. Cantidades para la preparación de PCR.

Componente	Proporción por muestra μ L
Kit Máster Mix	6.25
Agua libre de nucleasas	5.25
Primer Frontal	0.25
Primer Reverso	0.25
ADN	0.75



Figura 29. Esquema que muestra los pasos para realizar PCR.

3.5.5 RFLP

Digestión enzimática

Para la digestión con la enzima de restricción *ApaI* se prepararon reacciones con las cantidades que muestra la Tabla 9, y después las reacciones resultantes se colocaron en el termociclador a 37°C durante 1 hora.

Cuadro 10. Componentes para preparar las reacciones para RFLP.

Componente	Proporción por muestra μL
Agua libre de nucleasas	3.6
Buffer	1
Enzima <i>ApaI</i>	0.4
ADN producto de PCR	5

Geles de poliacrilamida

Para poder evaluar los cortes de la enzima *ApaI* se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, para ello se utilizaron 2.7mL de agua libre de nucleasas, 2.8mL de acrilamida/bisacrilamida, 1.4mL de TBE 5X, 0.048mL de APS y 2.4 μL de TEMED, dando como resultado 7mL por cada gel.

Para cargar él se utilizaron 3 μL de colorante Blue/Orange y 5 μL de la reacción digerida y 1.5 μL de marcador de peso molecular en el primer pocillo; este gel se cargó verticalmente, y se corrió a 80V, como se observa en la Figura 30.

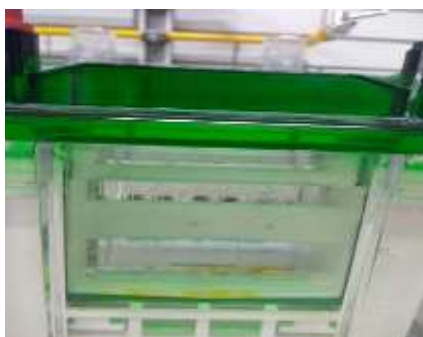


Figura 30. Gel de poliacrilamida al 12% para evaluar RFLP.

A continuación, se muestran los fragmentos esperados después de la digestión enzimática:

- Ausencia del polimorfismo G/G :159pb, 262pb (Figura 31).
- Individuo heterocigoto para el polimorfismo G/T o T/G: 421pb, 159pb y 262pb.
- Presencia del polimorfismo T/T: 421pb (Figura 30).

Con la ayuda del software de *New England Biolabs* se simularon los sitios de corte que realizaría la enzima *ApaI*, ocupando el *Custom Digest*, como se observa en la Figura 31.

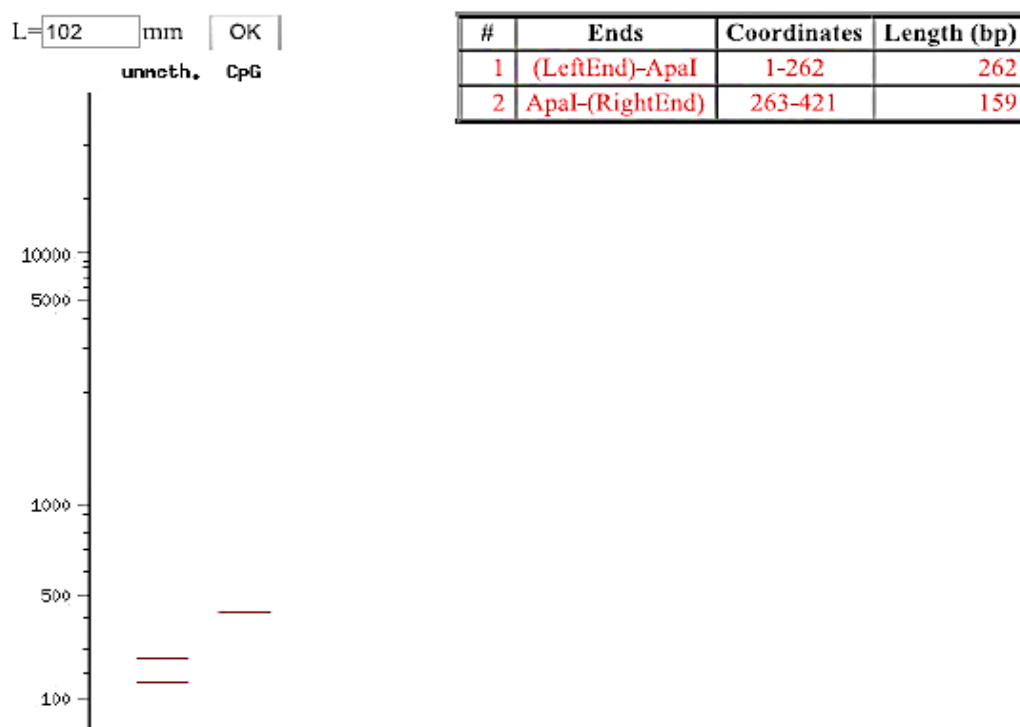


Figura 31. Sitios de corte de la enzima *Apa I* simulados en *Custom Digest* *New England Biolabs*.

Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo particular 1

Establecer los primers que permitan identificar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B en dos especies de ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) mediante programas bioinformáticos para delimitar la zona a amplificar.

Se tomó como referencia los primers utilizados en el artículo “Polymorphisms of the bovine WNT10B gene and their associations with growth traits” (Zhao et al., 2012) utilizando el número de acceso del GenBank y en base a ello se diseñaron los primers empleados en esta experimentación (Anexo1), utilizando programas bioinformáticos: Sequencer 4.14 y Primer Quest Tool.

Los primers diseñados se muestran a continuación (Cuadro 11).

Cuadro 11. Primers utilizados en la experimentación.

PRIMER	SECUENCIA	NÚMERO DE BASES	%G-C	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO
Frontal	CTTACTCTCAGTGGCTTG TCAG	22	50	421 pb
Reverso	ATCCACAACAACAGGGT GG	19	52.6	

Objetivo particular 2

Aplicar la técnica de PCR con muestras de ADN de especies filogenéticamente cercanas y lejanas para evaluar la especificidad de los primers diseñados.

Se realizó la extracción de una muestra de carne de bovino para la obtención del control positivo C+, se cuantificó y diluyó (Cuadro 12), además esta muestra se utilizó para la PCR en gradiente; con el objeto de verificar que los primers amplificaban a 421 pb y establecer la Tm más adecuada a utilizar, proponiendo un rango de temperaturas entre 57.3 °C y 64.8 °C en base a la Tm calculada (57 °C) (Anexo 2) y a la recomendada por el proveedor de los primers (62 °C).

Cuadro 12. Concentración y pureza del ADN extraído de bovino para la obtención del C+.

Muestra concentrada	ng/μL	Relación 260/280 nm	Muestra diluida	ng/μL	Relación 260/280 nm
Bovino (B)	233.3	1.43	Bovino (B)	109	1.55

En la Figura 33 se puede observar que la Tm en la que se obtuvo una banda más clara del amplificado (421 pb) a 57.3°C, por lo que se estableció un nuevo programa de PCR con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, la segunda desnaturalización se dio a la misma temperatura por 40 segundos. La hibridación fue a 57.3°C por 40 segundos; la elongación a 72°C por 40 segundos (35 ciclos) y la extensión final con un total de 5 minutos por 35 ciclos (Figura 34).

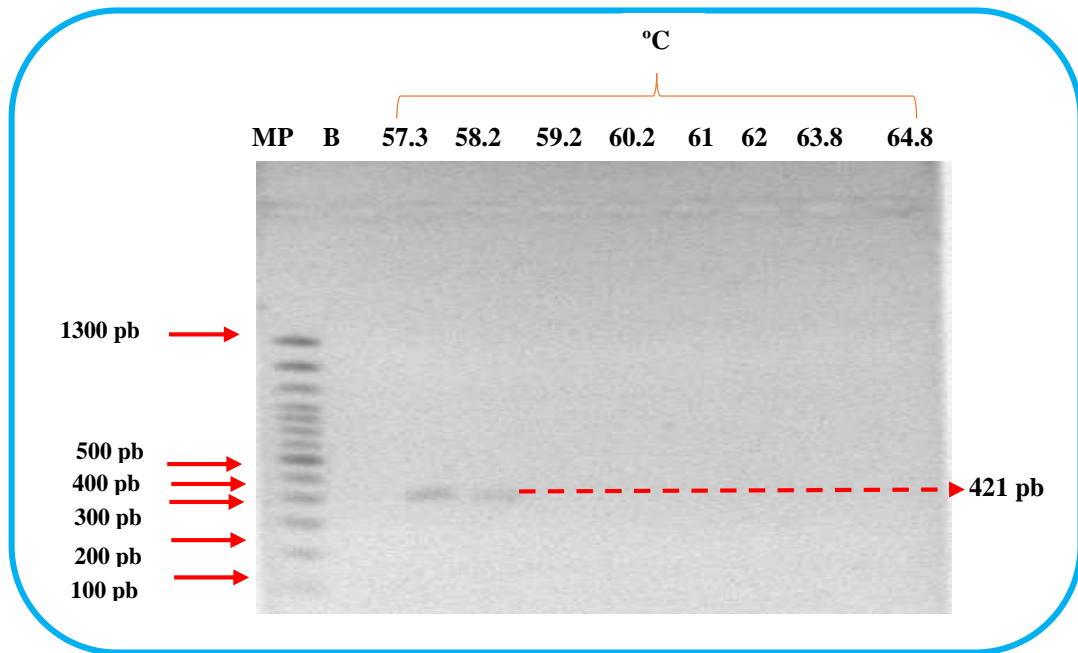


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la amplificación de ADN de bovino a diferentes temperaturas. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco.

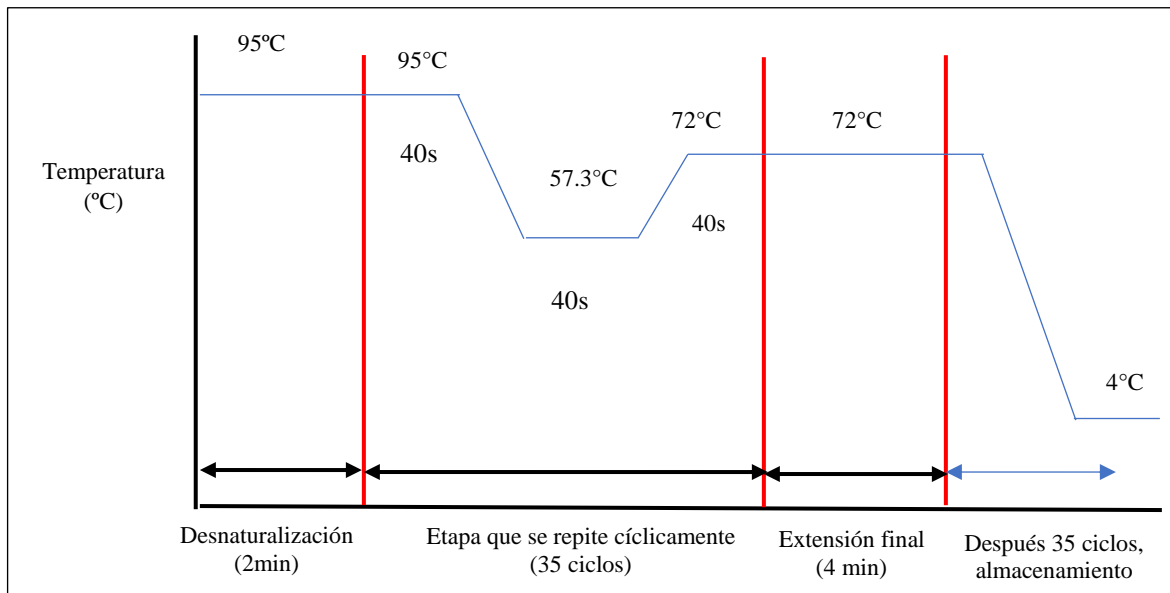


Figura 33. Programa de PCR *Bos taurus* y *Bos indicus*

Para la prueba de especificidad de los primers, se efectuó una PCR, empleado ADN de especies filogenéticamente cercanas y lejanas, obteniendo los resultados de concentración y pureza que se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Concentración y pureza del ADN extraído de especies filogenéticamente cercanas y lejanas para evaluar la especificidad de los primers.

Muestra concentrada	ng/μL	Relación 260/280 nm	Muestras diluidas	ng/μL	Relación 260/280 nm
Bovino (B)	233.3	1.43	Bovino (B)	109	1.55
Cerdo (Cer)	327.2	1.48	Cerdo (Cer)	65.9	1.46
Conejo (Co)	240.1	1.58	Conejo (Co)	71.4	1.53
Pescado (Pes)	337.7	1.56	Pescado (Pes)	71.6	1.45
Trigo (Tri)	228.4	1.59	Trigo (Tri)	76.8	1.50
Avena (Av)	270.0	1.51	Avena (Av)	75.7	1.46
Soya (So)	451.2	1.47	Soya (So)	75.6	1.41

En la Figura 34 se muestra el gel de especificidad para los primers de bovino, por lo que se comprobó que los primers son específicos, ya que, solamente amplificaron para bovino.

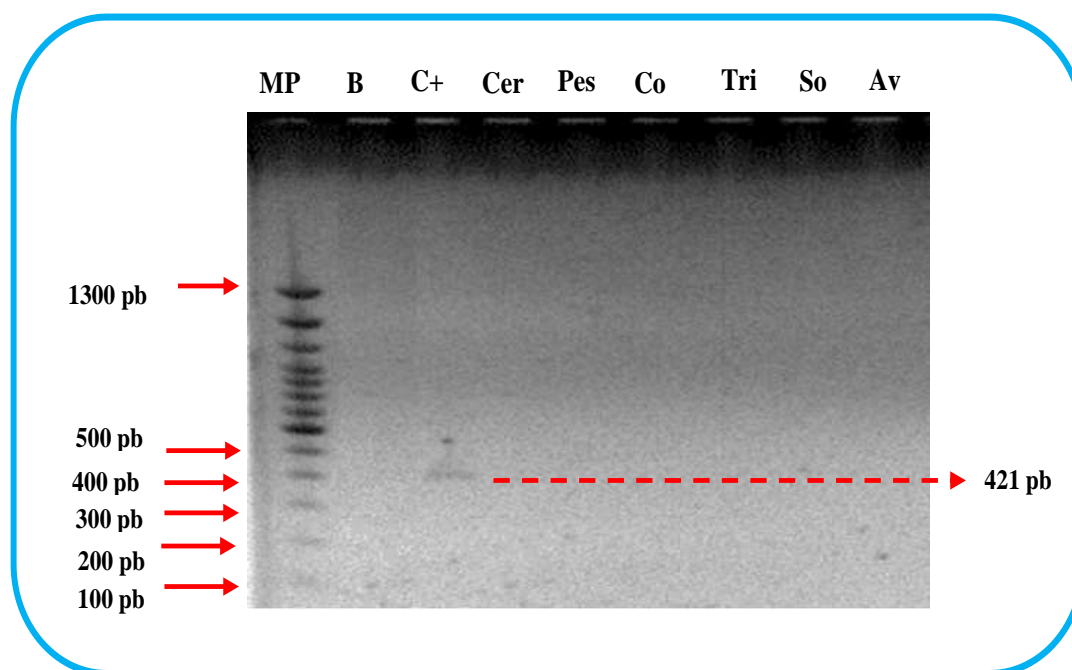


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para comprobar la especificidad de los primers utilizados. MP= Marcador de peso molecular 100 pb, B= Blanco, C+= Control positivo, Cer=Cerdo, Pes= Pescado, Co= Conejo, Tri= Trigo, So= Soya y Av= Avena.

Objetivo particular 3

Aplicar la técnica de PCR en las muestras de bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), con los primers específicos para amplificar el fragmento de interés del gen WNT10B.

Se extrajo el DNA de 10 muestras de *Bos taurus* y 10 de *Bos indicus* y se obtuvieron los resultados de concentración y pureza que se muestran en el Cuadro 14, después de realizar la dilución correspondiente se obtuvieron los valores registrados en el Cuadro 15; como puede observarse la relación 260/280 nm se encontró dentro de los valores recomendados 1.6-1.9, tanto de *Bos taurus* como de *Bos indicus*, asimismo las concentraciones estuvieron en un rango de 60-90 ng/ μ L; por lo cual todas las muestras sirvieron para realizar PCR.

Cuadro 14. Concentración y pureza del ADN concentrado extraído de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Muestras especie <i>Bos taurus</i>			Muestras especie <i>Bos indicus</i>		
Muestras concentradas	ng/ μ L	Relación 260/280 nm	Muestras concentradas	ng/ μ L	Relación 260/280 nm
B.T. 1	501.1	1.87	B.I. 1	552.9	1.68
B.T. 2	358.5	1.73	B.I. 2	372.4	1.81
B.T. 3	528.9	1.81	B.I. 3	836.6	1.68
B.T. 4	1499.5	1.79	B.I. 4	313.6	1.87
B.T. 5	791.5	1.74	B.I. 5	525.6	1.70
B.T. 6	806.9	1.72	B.I. 6	300.4	1.68
B.T. 7	1414.0	1.85	B.I. 7	1319.2	1.65
B.T. 8	604.7	1.73	B.I. 8	486.9	1.60
B.T. 9	1455	1.84	B.I. 9	850.9	1.72
B.T. 10	1030.1	1.86	B.I. 10	330.1	1.67

Cuadro 15. Concentración y pureza del ADN diluido extraído de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Muestras especie <i>Bos taurus</i>			Muestras especie <i>Bos indicus</i>		
Muestras diluidas	ng/μL	Relación 260/280 nm	Muestras diluidas	ng/μL	Relación 260/280 nm
B.T. 1	74.9	1.86	B.I. 1	61.6	1.69
B.T. 2	64.6	1.77	B.I. 2	64.6	1.71
B.T. 3	72.5	1.74	B.I. 3	93.9	1.68
B.T. 4	83.4	1.77	B.I. 4	74.1	1.91
B.T. 5	89.7	1.76	B.I. 5	70.2	1.73
B.T. 6	79.9	1.74	B.I. 6	64.4	1.62
B.T. 7	63.9	1.93	B.I. 7	90.8	1.77
B.T. 8	76.9	1.81	B.I. 8	67.3	1.61
B.T. 9	61.1	1.72	B.I. 9	63.7	1.71
B.T. 10	94.53	1.76	B.I. 10	66.8	1.60

En las Figuras 35 y 36 se muestra que las muestras de *Bos taurus* B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4, B.T.5, B.T.8, B.T.9 y B.T.10 amplificaron a 421pb obteniendo bandas claras; siendo útiles para RFLP, excepto las marcadas con el número 6 y 7; en consecuencia, se repitió esa PCR, para las muestras antes mencionadas como se puede ver en la Figura 36.

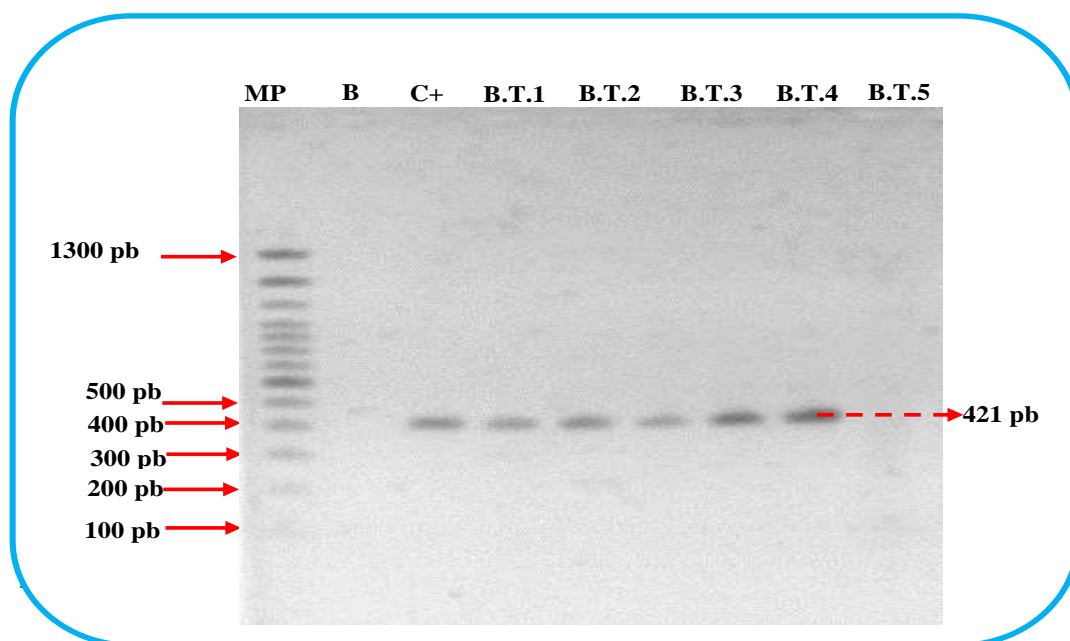


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de *Bos taurus* B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4 y B.T.5. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.

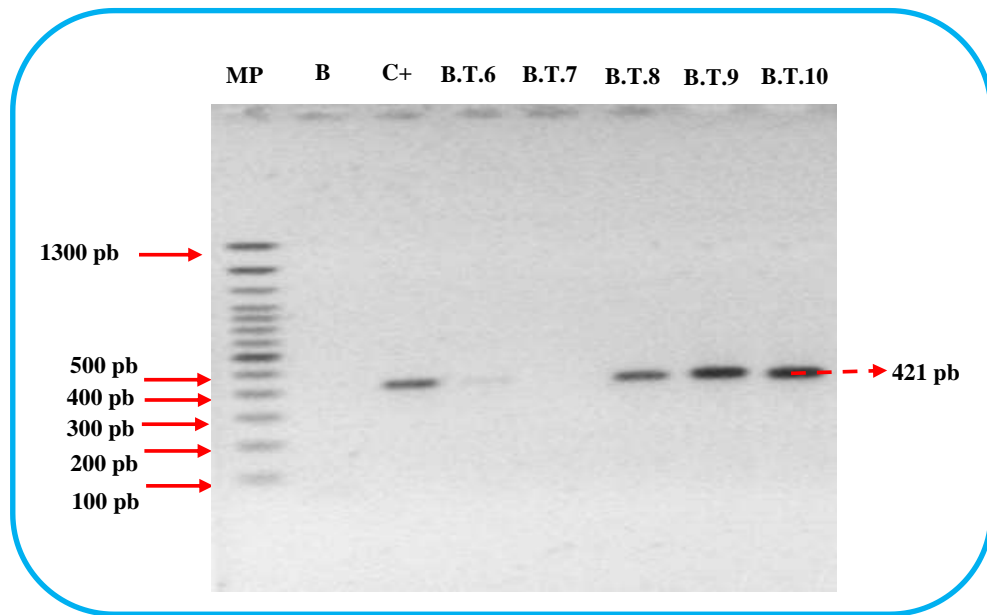


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de *Bos taurus* B.T.6, B.T.7, B.T.8, B.T.9 y B.T.10. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.

En la Figura 37, se muestra la repetición de la PCR de las muestras 6 y 7 de *Bos taurus*, mostrando que son útiles para RFLP, puesto que, se obtuvieron bandas claras en la evaluación electroforetica, estas muestras fueron amplificadas con el Kit Go Taq.

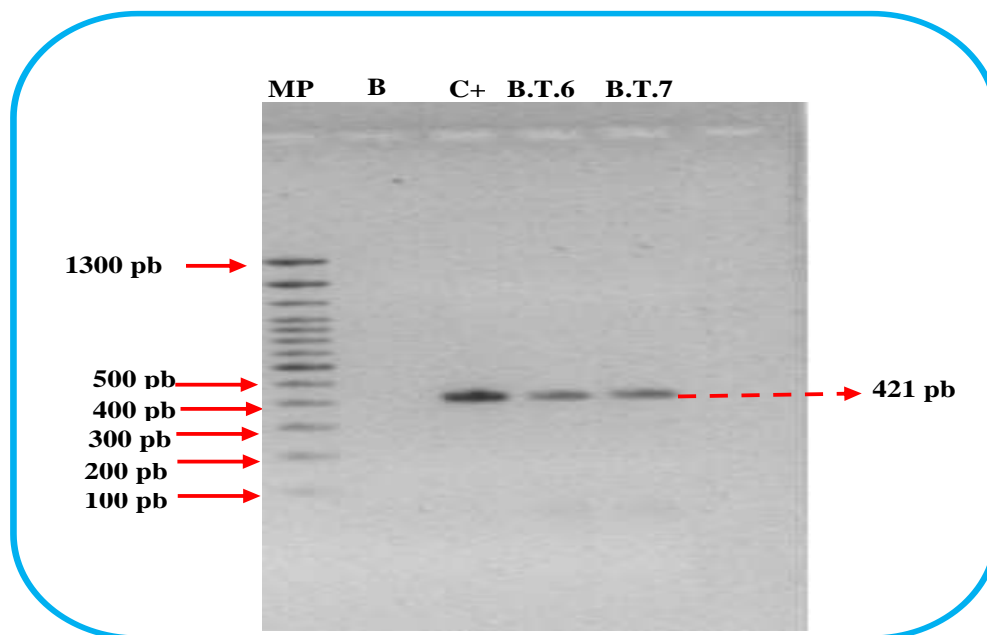


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de *Bos taurus* B.T.6 y B.T.7. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.

Posteriormente se realizó una PCR a las muestras de la especie *Bos indicus*, obteniendo bandas definidas en todas las muestras, esto se puede constatar en las figuras 38 y 39, siendo las diez muestras aptas para realizar RFLP.

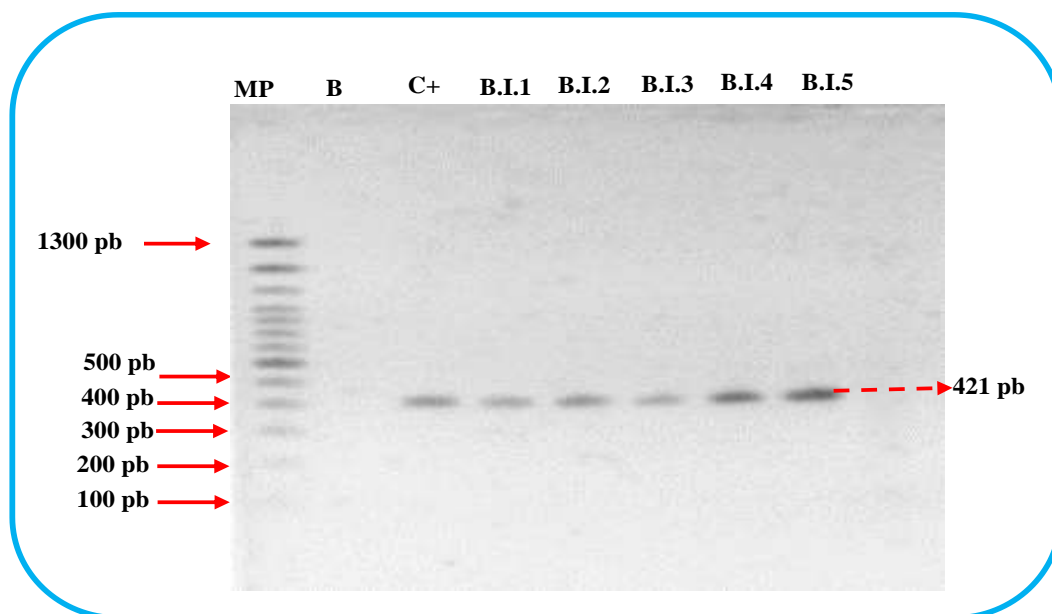


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de *Bos indicus* B.I.1, B.I.2, B.I.3, B.I.4 y B.I.5. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo

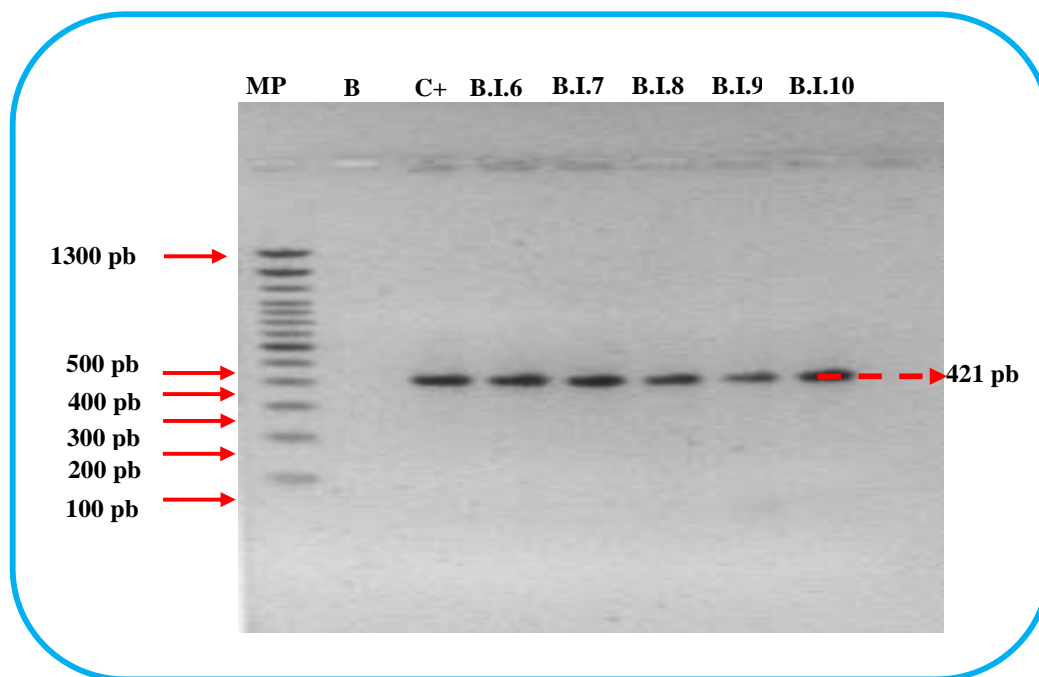


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para las muestras de *Bos indicus* B.I.6, B.I.7, B.I.8, B.I.9 y B.I.10. MP= Marcador de peso molecular, B= Blanco y C+= Control positivo.

Objetivo particular 4

Determinar la presencia del polimorfismo 3980G> T en el exón 5 del gen WNT10B mediante RFLP para establecer sus frecuencias.

El ADN resultante de la PCR fue sometido a digestión, con la enzima Apa I, siguiendo el método descrito anteriormente. La endonucleasa de restricción ApaI proviene de una cepa de *Escherichia coli* que porta el gen de *Acetobacter pasteurianus*. En la Figura 40 se puede esquematiza el sitio de corte de esta enzima.



Figura 40. Sitio de corte de la enzima ApaI.

Cuando el polimorfismo se encuentre presente en algún individuo, la enzima no realizará corte; por el contrario, si el individuo no presenta el polimorfismo la enzima realizará dos cortes uno de 156 pb y otro de 262 pb, esto cuando el amplificado obtenido de la PCR presente la secuencia GCCC y su correspondiente CCCG. Los resultados de la digestión fueron evaluados en geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) al 12%, sometidos a un campo eléctrico de 80V, obteniendo lo resultados siguientes:

Geles de las muestras de Bos Taurus

En la figura 41 se puede apreciar que la enzima ApaI realizó dos cortes (uno de 156pb y otro de 262 pb), indicando la ausencia del polimorfismo 3980 G>T en el exón 5 del gen WNT10B, esto para las muestras B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4 y B.T.5.

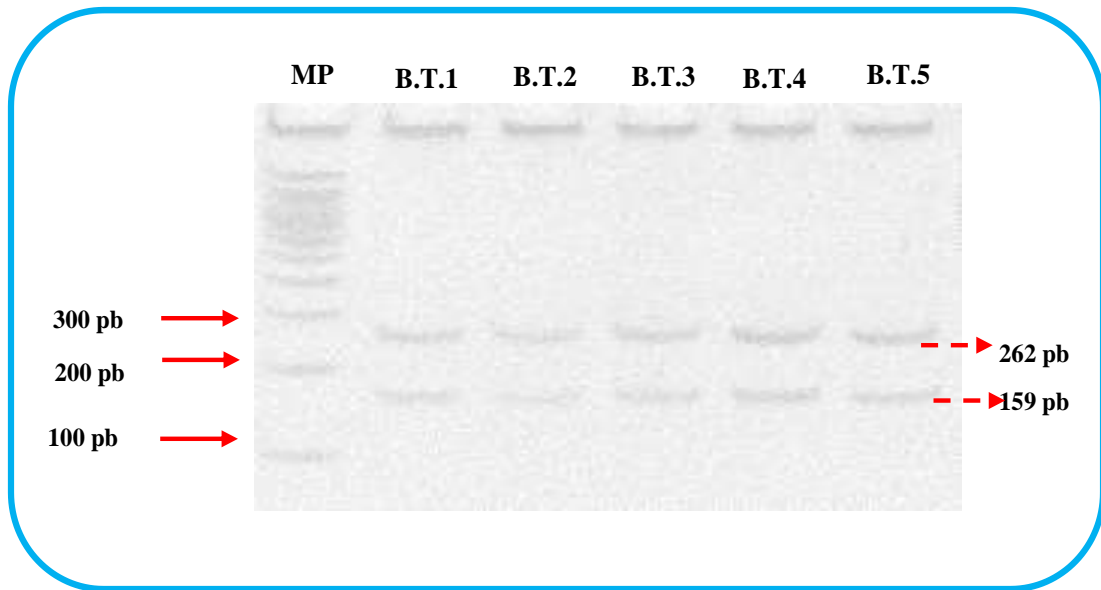


Figura 41. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de *Bos taurus* B.T.1, B.T.2, B.T.3, B.T.4 y B.T.5. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.

En el siguiente gel de poliacrilamida, se observa que las muestras de *Bos taurus* 6 a 10 (Figura 42), no presentaron el polimorfismo, estos resultados indican que esta especie carece del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen de estudio.

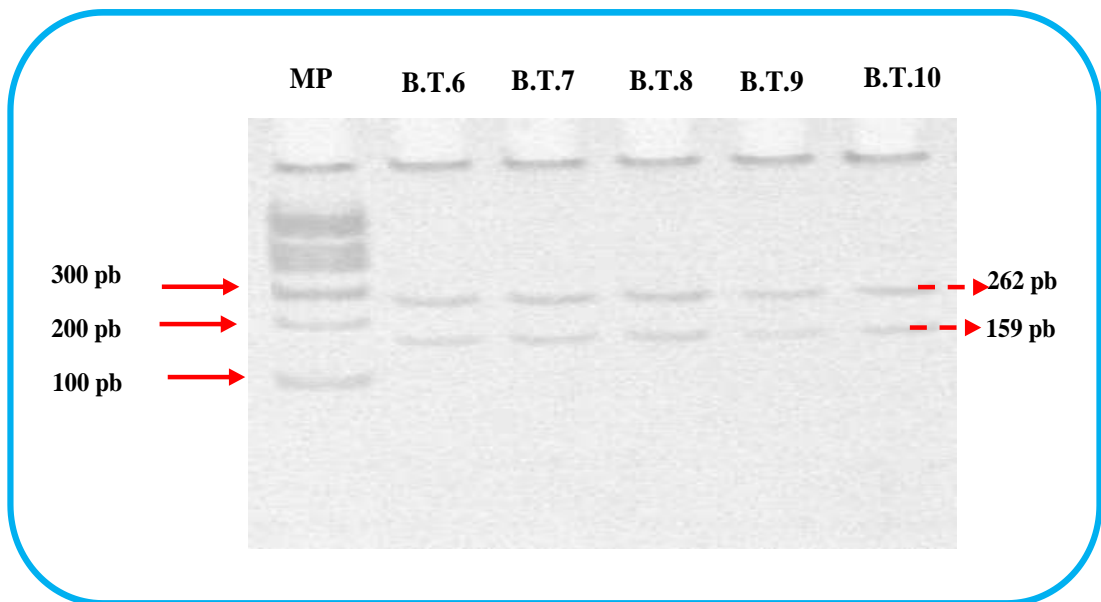


Figura 42 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de *Bos taurus* B.T.6, B.T.7, B.T.8, B.T.9 y B.T.10. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.

Geles de las muestras de *Bos indicus*

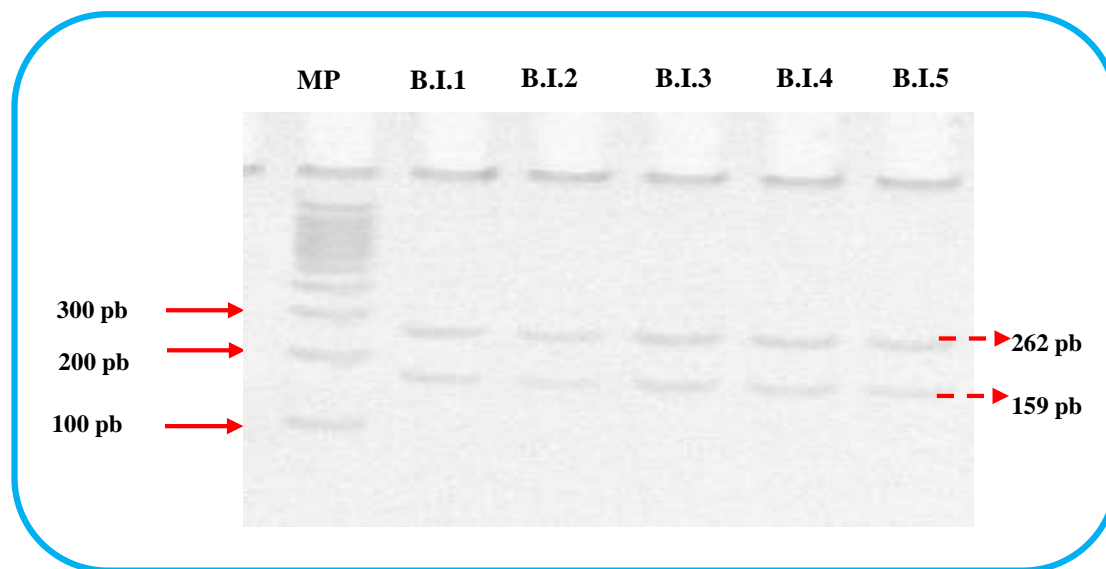


Figura 43. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de *Bos indicus* B.I.1, B.I.2, B.I.3, B.I.4 y B.I.5. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.

En la Figura 43, se muestra que todos los individuos carecen del polimorfismo, en las muestras 1 a la 5 de *Bos indicus*; puesto que, el patrón de corte evidencia la ausencia del polimorfismo al presentarse dos fragmentos uno de 156pb y otro de 262 pb.

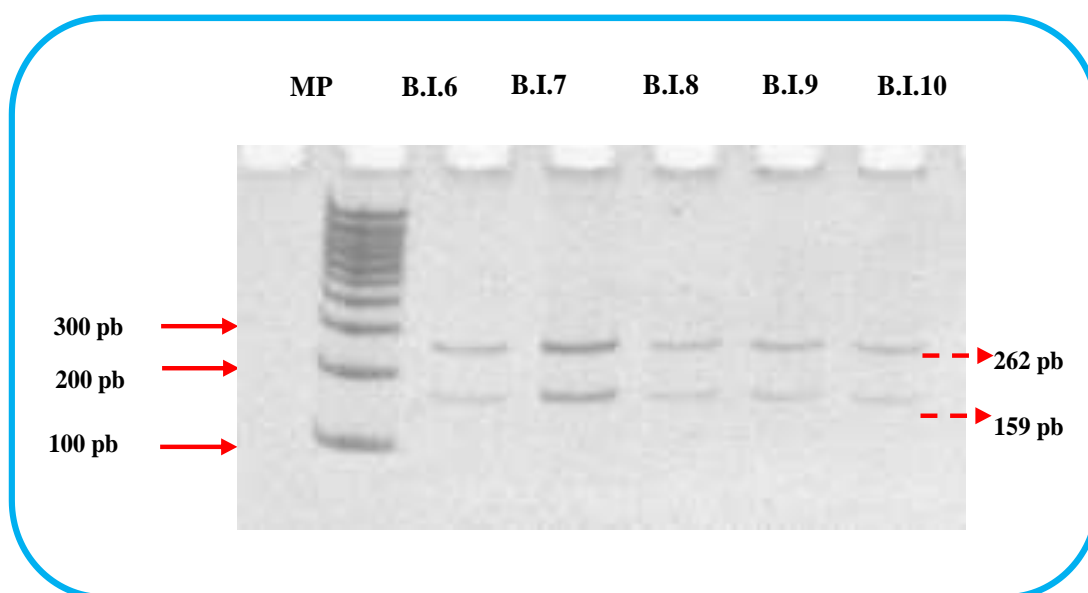


Figura 44. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% para visualizar los resultados de RFLP de muestras de *Bos indicus* B.I.6, B.I.7, B.I.8, B.I.9 y B.I.10. MP= Marcador de peso molecular de 100 pb.

De igual manera en la Figura 45 se aprecia en el gel de poliacrilamida, que las muestras de *Bos indicus* numeradas del 6-10 carecen del polimorfismo; por lo que se puede afirmar que en esta especie no hay presencia de este.

Objetivo particular 5

Comparar la genotipificación y sus frecuencias en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* para establecer su posible asociación con el crecimiento del ganado bovino.

En los Cuadros 16 y 17 se presentan los resultados obtenidos en la identificación del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B, por cada individuo y especie analizado.

Cuadro 16 Resultados de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en *Bos taurus*.

Muestra	T/T (Polimorfismo)	G/G (Normal)	G/T o T/G (Heterocigoto)
B.T. 1		✓	
B.T. 2		✓	
B.T. 3		✓	
B.T. 4		✓	
B.T. 5		✓	
B.T. 6		✓	
B.T. 7		✓	
B.T. 8		✓	
B.T. 9		✓	
B.T. 10		✓	

Cuadro 17 Resultados de la presencia del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B en *Bos indicus*.

Muestra	T/T (Polimorfismo)	G/G (Normal)	G/T o T/G (Heterocigoto)
B.I. 1		✓	
B.I. 2		✓	
B.I. 3		✓	
B.I. 4		✓	
B.I. 5		✓	
B.I. 6		✓	
B.I. 7		✓	
B.I. 8		✓	

Muestra	T/T (Polimorfismo)	G/G (Normal)	G/T o T/G (Heterocigoto)
B.I. 9		✓	
B.I. 10		✓	

El polimorfismo WNT10B 3980G>T se ausentó en todas las muestras, tanto en la especie *Bos taurus* como *Bos indicus*, indicando que este polimorfismo no se encuentra presente de manera significativa en los individuos de este estudio.

Las frecuencias alélicas para este polimorfismo están resumidas en el Cuadro 18:

Cuadro 18. Comparación de las frecuencias alélicas en *Bos taurus* y *Bos indicus* para el polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B.

Polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B				
	No. de muestras de <i>Bos taurus</i>	Frecuencia	No. de muestras de <i>Bos indicus</i>	Frecuencia
Presencia del polimorfismo T/T: 421pb	0	0	0	0
Individuo heterocigoto para el polimorfismo G/T o T/G: 421pb, 159pb y 262pb.	0	0	0	0
Ausencia del polimorfismo G/G: 159pb, 262pb	10	1.0	10	1.0
Total	10	1.0	10	1.0

Discusión

El mejoramiento genético evalúa y utiliza la variación genética para mantener y mejorar cualitativa y cuantitativamente la producción animal, la identificación de estas variaciones en el material genético comúnmente conocidos como polimorfismos (tanto asociados a la producción de carne como de leche en ganado bovino), han permitido predecir con mayor precisión los valores genéticos de los animales desde su nacimiento, disminuyendo el intervalo entre generaciones y aumentando la intensidad de la selección (Ángel *et al.*, 2013).

El conocimiento del genoma bovino y el desarrollo de métodos moleculares ha permitido la identificación de los polimorfismos en regiones cromosómicas y genes asociados con interés reproductivo, uno de estos genes es el WNT10B, que se investigó en MVTT (Virus del tumor mamario de ratón) del tipo sin alas, mostrando que tiene dos funciones, una de las cuales está relacionada con la activación de beta-catenina / Tcf, (factor de células), que está asociado con el desarrollo de cáncer y la otra está involucrada con que afecta el desarrollo del tejido adiposo in vivo (Longo *et al.*, 2004), pero por otra parte este gen se relaciona con obesidad en poblaciones europeas (Christodoulides *et al.*, 2006).

El gen WNT10B ha sido previamente estudiado en cerdos, como candidato funcional para los rasgos de deposición de grasa. El polimorfismo Cfr421 localizado en el cromosoma 5 en el gen WNT10B se asoció con el espesor de grasa dorsal, los resultados indicaron que en cerdos este gen puede ser un candidato muy importante en relación al espesor de grasa dorsal; siendo la expresión del tejido graso en cerdos Tongcheng más alta que en la raza gran cerdo blanco inglés (He, Gao, Liu, Fan, & Liu, 2011).

El polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B fue evaluado en especies de ganado bovino hembras en China; resultando en un SNP silencioso (224 Ser→Ser) que actualmente se ha demostrado que este tipo de cambios podrían tener funciones biológicas similares, incluyendo alteración de la estabilidad del ARNm, modulación de la eficiencia

de la traducción, y en consecuencia influencia en la proteína que codifican (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Aquellos con el genotipo TT presentaron mayor longitud corporal, peso corporal y circunferencia torácica, que aquellos con genotipo GG en ganado Jiaxian (Zhao *et al.*, 2012). Por ello en este trabajo de investigación se tomó como referencia este artículo, aplicando a ganado bovino hembra *Bos taurus* y *Bos indicus* en México, considerando que el rendimiento en cortes (kilos de carne obtenidos sobre el peso total de la res) es una buena medida del porcentaje de carne deshuesada y lista para la venta. Este porcentaje está fuertemente afectado por la cantidad de grasa del animal en especial la subcutánea e intermuscular (situada entre las principales masas musculares), parámetros que fueron evaluados en el artículo antes mencionado.

Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los individuos analizados presentó el polimorfismo 3980G>T, por lo que todos tienen el genotipo GG (Tabla 17); por consiguiente, se demuestra que este polimorfismo no es característico de las razas *Bos taurus* y *Bos indicus* y que el peso corporal, deposición de grasa no pueden relacionarse a este polimorfismo.

Contrastación de hipótesis

La hipótesis planteada en este trabajo fue:

Las frecuencias alélicas del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B serán diferentes en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* relacionando esas diferenciaciones con su crecimiento.

Los resultados mostraron la ausencia del polimorfismo para ambas especies, en todos los individuos muestreados, por lo que se puede afirmar que el polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B no tiene presencia diferente en estas dos especies.

Esto evidencia que las características de crecimiento de estas especies pueden estar influidas por otros factores y que al carecer del polimorfismo se comprueba que el polimorfismo no tiene relación con esos parámetros de crecimiento en *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Conclusiones

Los primers diseñados en los programas bioinformáticos para esta experimentación fueron específicos para *Bos taurus* y *Bos indicus*, puesto que se obtuvieron los amplificadores esperados de 421 pb.

El ADN extraído de las 20 muestras analizadas (10 por cada especie) se encontraba en buena concentración y pureza para realizar la amplificación mediante PCR con los primers específicos; obteniendo favorablemente de esta técnica amplificadores de 421pb; ya que, en los geles de electroforesis se mostraron bandas claras, demostrando que eran útiles para realizar RFLP.

Mediante la técnica RFLP, utilizando la enzima ApaI se logró la identificación del polimorfismo 3980G>T en el exón 5 del gen WNT10B; la enzima realizó cortes de 262 pb y 159 pb que indicaban la ausencia del polimorfismo en todos los individuos.

Puesto que ambas especies carecieron del polimorfismo se puede decir que este polimorfismo no tiene presencia diferente en *Bos taurus* y *Bos indicus* que confiera características relacionadas con su crecimiento y para descartar la influencia de este polimorfismo en ambas especies sería necesario ampliar el número de muestras estudiadas, para tener datos concluyentes.

A pesar de que el polimorfismo estudiado no tuvo presencia en *Bos taurus* y *Bos indicus*, los polimorfismos siguen teniendo importancia en el mejoramiento genético para la producción de carne y leche; contribuyendo a una mayor producción de alimentos con la calidad y características que demandan los consumidores.

REFERENCIAS

- Alberts, B. (2011). *Introducción a la biología celular* (3a ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
- Andreas, E., Sumantri, C., Nuraini, H., Farajallah, A., & Anggraeni, A. (2010). Identification of GH|ALUI and GHR|ALUI genes polymorphisms in Indonesian Buffalo. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 35(4), 215–221. <https://doi.org/10.14710/jitaa.35.4.215-221>
- Ángel, A., Cardona, H., & Cerón, F. (2013). *Genómica en la producción animal*. 5(2), 497–518.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (4a ed.). México: Pearson Education.
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). *PCR protocols*. Humana Press.
- Branda, A., Soria, L. A., Corva, P. M., Villarreal, E. L., Melucci, L. M., Mezzadra, C. A., ... Miquel, M. C. (2011). Variantes en dos genes candidatos para características de calidad de carne bovina en Argentina. *Archivos de Zootecnia*, 60(231), 521–532. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922011000300041>
- Castro. (2002). *Producción bovina* (1a ed.). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Chacón. (2014). La suavidad de la carne: implicaciones físicas y bioquímicas asociadas al manejo y proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, 15(2), 225. <https://doi.org/10.15517/am.v15i2.11918>
- Checa, M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. En *Segunda Época* (Vol. 20). Recuperado de www.iner.gob.mx
- Cheriyedath, S. (2018). Usos de la reacción en cadena de polimerasa. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de 23/08 website: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications-(Spanish).aspx)
- Christodoulides, C., Scarda, A., Granzotto, M., Milan, G., Dalla Nora, E., Keogh, J., ... Vettor, R. (2006). WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia*, 49(4), 678–684. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0144-4>
- COMECARNE. Consejo Mexicano de la Carne. (2018). *Compendio Estadístico 2018*. Recuperado de <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadístico>

2018-VF.pdf

- Cornejo, A., Serrato, A., & Rocha, M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos - PDF* (1a ed.). México: SEMARNAT.
- Dekkers, J. C. M. (2012). Application of genomics tools to animal breeding. *Current genomics*, 13(3), 207–212. <https://doi.org/10.2174/138920212800543057>.
- Eroski Consumer. (2009). *La carne de vacuno* | EROSKI CONSUMER. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/guia-alimentos/carnes-huevos-y-derivados/2002/08/06/50279.php>
- FAO. (2010). *Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s17.pdf>
- FAO. (2015). División de Producción y Sanidad Animal. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html
- Financiera Rural. (2009). *Bovino y sus derivados*. Recuperado de [http://www.gbcbiotech.com/bovinos/industria/Bovino y sus derivados Financiera Rural 2012.pdf](http://www.gbcbiotech.com/bovinos/industria/Bovino_y_sus_derivados_Financiera_Rural_2012.pdf)
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2017). *Panorama Agroalimentario Carne de bovino 2017*. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Garnacho Montero, J., Ortiz Leyba, C., & Aldabó Pallas, T. (2005). *Polimorfismos genéticos en la sepsis*. 185–191.
- Garrick, D. J. (2011). The nature, scope and impact of genomic prediction in beef cattle in the United States. *Genetics Selection Evolution*, 43(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-17>
- Gasque. (2008). *Enciclopedia Bovina* (1º ed). UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Gómez, B. C., Zamora, A. L., & Sánchez, M. G. (2013). Polimorfismos de DNA y huella genética.

- En & J. S. A. B. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez (Ed.), *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (2ed., pp. 171–180). Mexico: McGraw-Hill Medical.
- He, X., Gao, H., Liu, C., Fan, B., & Liu, B. (2011). Cloning, chromosomal localization, expression profile and association analysis of the porcine WNT10B gene with backfat thickness. *Molecular Biology Reports*, 38(5), 3095–3099. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-9978-4>
- Herráez, A. (2012). *Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética : Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Elsevier.
- Hui, Y. H., Guerrero Legarreta, I., & Rosmini, M. R. (2006). *Ciencia y tecnología de carnes*. Recuperado de <https://latam.casadellibro.com/libro-ciencia-y-tecnologia-de-carnes/9789681865498/1076534>
- Innis, M. A. (1990). *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Academic Press.
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *Int J Biomed Res*, 1(5), 81–97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). A silent polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>
- Latham, M. C. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s00.html>.
- Le Hir, H., Nott, A., & Moore, M. J. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00052-5)
- Longo, K. A., Wright, W. S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P. C., ... MacDougald, O. A. (2004). Wnt10b Inhibits Development of White and Brown Adipose Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35503–35509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402937200>

López, L., Patiño, L., López, A., & Echeverri, J. (2017). Genotyping of SNPs associated with meat tenderness: comparison of two PCR-based methods. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 16029635. <https://doi.org/10.4238/gmr16029635>

Lozano, R., & Braña, M. de la S. (2013). *Sistemas de Producción y Calidad de Carne Bovina* (28a ed); SNITT & UNAM F.M.V.Z, Eds.). Recuperado de <http://www.anetif.org/files/pages/0000000034/18-sistemas-de-produccion-y-calidad-de-carne-bovina.pdf>

National Human Genome Research Institute. (2018). Glossary of Genetic Thems. Recuperado de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Mutacion>

Nature Eduaction. (2014). 8.3 Scientists Can Make Copies of a Gene through PCR. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <https://www.nature.com/scitable/ebooks/a-brief-history-of-genetics-defining-experiments-16570302/126434788>.

NCBI. (2017). Polymerase Chain Reaction (PCR). Recuperado el 3 de junio de 2019, de National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

NCBI. (2018). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Recuperado el 3 de junio de 2019, de U.S. National Library of Medicine website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>

NCBI. (2019a). WNT10B Wnt family member 10B [Bos taurus (cattle)]. Recuperado el 3 de junio de 2019, de Acta chirurgica Scandinavica website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/539337>

NCBI. (2019b). WNT10B Wnt family member 10B [Bos indicus (zebu cattle)] - Gene - NCBI. Recuperado el 3 de junio de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/109559150>

NIH. (2018). Restriction Enzyme. Recuperado el 3 de junio de 2019, de National Human Genome Research Institute website: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Restriction-Enzyme>

NMX-FF-078-2002.(2002). *Norma Oficial Mexicana Productos pecuarios*. Carne de bovino en canal. Clasificación. Dirección General de Normas.

NOM-194-SSA1. (2004). *Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004*. Recuperado de http://cdam.unsis.edu.mx/files/Servicios_publicos_municipales/6_Rastro/NOM_194-SSA1-2004.pdf

- Ortiz Espinosa, C. I. (2018). Perspectivas de la Carne bovina para México y el Mundo 2017 - Engormix. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/perspectivas-carne-bovina-mexico-t41704.html>.
- Pierce, B. A. (2011). *Fundamentos de genética conceptos y relaciones*. Recuperado de <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4356/Fundamentos-de-Genetica.html>.
- Piñeira, J., Río, J., Floody, H., & Felmer, R. (2012). Distribución de polimorfismos asociados al grado de infiltración de grasa intramuscular en siete razas bovinas de carne utilizadas en la Región de La Araucanía, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(1), 43–52. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2012000100007>
- Price, J. F., Schweigert, B. S., & Fuente, J. L. de la. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (2a ed.). Zaragoza: Acribia.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Rodríguez, I. P., & Barrera, H. A. (2004, septiembre). *Reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención*. 323–335. Recuperado de http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf
- SAGARPA. (2015). Ganadería bovina y sus derivados. Recuperado el 8 de septiembre de 2018, de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/ganaderia-bovina-y-sus-derivados>
- SAGARPA. (2018). *La Ganadería en México*. Recuperado el 3 de junio de 2019, de <https://www.gob.mx/firco/articulos/la-ganaderia-en-mexico?idiom=es>
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendariz, J. (2013). *Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (David W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Recuperado https://books.google.com.mx/books/about/Molecular_Cloning.html?id=Bosc5JVxNpkC&redir_esc=y de
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). *PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa* (A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, & B. Rendón Aguilar, Eds.). Mexico: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.


- Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos del PCR y PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70–78. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invisdis/ir-2013/ir132d.pdf>
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M., & Goll, D. E. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1351–1367. <https://doi.org/10.2527/1995.7351351x>
- ThermoFisher Scientific. (2018). *PCR Setup—Six Critical Components to Consider - MX*. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html#Buffer>
- Thomas, M. G., Enns, R. M., Hallford, D. M., Keisler, D. H., Obeidat, B. S., Morrison, C. D., ... Narro, L. (2002). Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance-tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. *Journal of Animal Science*, 80(3), 757–767. <https://doi.org/10.2527/2002.803757x>
- Tonhati, H., Mendoza-Sánchez, G., Sesana, R. C., Aspilcueta Borquis, R. R., & Galvão De Albuquerque, L. (2013). Revista Argentina de producción animal. En *Revista Argentina de Producción Animal* (Vol. 28). Recuperado de <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/rapa/article/view/3558>
- Universidad de Nariño, & Universidad de la Florida. (2013). *Investigación selección mediante modelos genómicos y poligénicos para el mejoramiento genético de los bovinos de leche*. Recuperado de http://contratacion.udenar.edu.co/wp-content/uploads/2013/12/Proyecto-Genómica_junio_10_FINAL2.pdf
- USC. (2017). Tipos de polimorfismos. Recuperado el 3 de junio de 2019, de http://www.usc.es/es/institutos/incifor/xeneticaforense_conceptos_tipopolimorfismos.html
- Vilaboa, J., Díaz, P., Ruíz, O., Platas, D., & Juárez, F. (2009). *Factores que Influyen en la Calidad de la Carne Bovina Mexicana - Engormix*. Recuperado el 29 de mayo de 2019, de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/factores-influyen-calidad-carne-t27975.html>.
- Viljoen, Gerrit J., Nel, Louis H., Crowther, J. R. (2005). PCR — The Basic Reaction. En *Molecular Diagnostic PCR Handbook* (1a ed.). https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0_2

- Walker-Daniels, J. (2012). Current PCR Methods. *Materials and Methods*, 2. <https://doi.org/10.13070/mm.en.2.119>
- Wood, J. D. (2017). Meat Composition and Nutritional Value. En *Lawrie's Meat Science: Eighth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00020-0>
- Zhao, J., Zhang, C., Fang, X., Zhang, H., Liu, X., Li, J., ... Chen, H. (2012). Polymorphisms of the bovine WNT10B gene and their associations with growth traits. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1301–1306. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.008>
- Zimmerman, M. (2007). pH de la carne y factores que lo afectan. Recuperado el 2 de junio de 2019, de http://www.infocarne.com/bovino/ph_de_la_carne_y_factores_que_afectan.asp

ANEXOS


Anexo 1 Diseño de primers

Se realizó la evaluación de los primers propuestos en el artículo “Polymorphisms of the bovine WNT10B gene and their associations with growth traits”(Zhao et al., 2012); consultando en el NCBI la secuencia de nucleótidos del cromosoma 5 Bos taurus breed Hereford (NC_007303.6).

 Due to the large size of this record, sequence and annotated features are not shown. Use the "Customize view" panel to change the display.

Bos taurus breed Hereford chromosome 5, alternate assembly Btau_5.0.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_007303.6

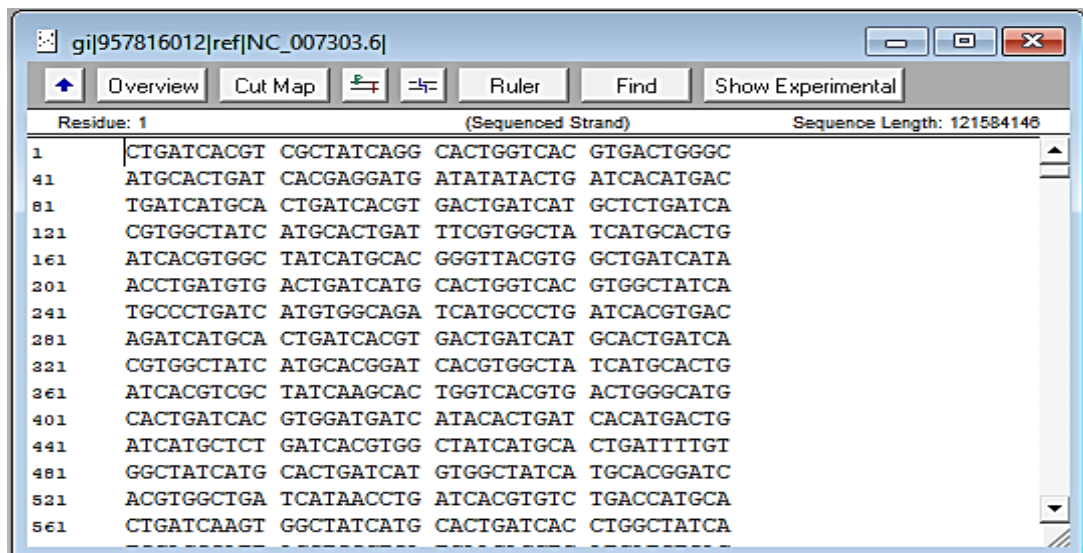
 **Record removed.** This record was removed as a result of standard genome annotation processing. Please see www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/process/ for more information.

[FASTA](#) [Graphics](#)

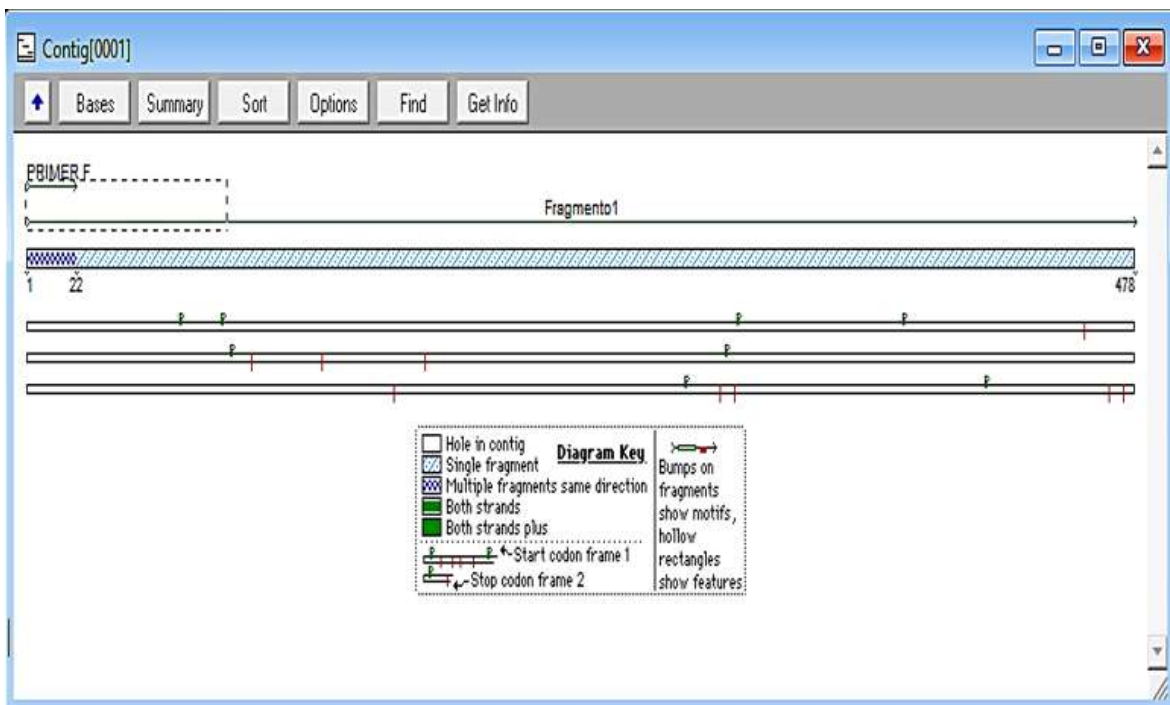
[Go to:](#)

LOCUS NC_007303 121584146 bp DNA linear CON 26-JAN-2016
DEFINITION Bos taurus breed Hereford chromosome 5, alternate assembly
Btau_5.0.1, whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NC_007303
VERSION NC_007303.6
DBLINK BioProject: [PRJNA13366](#)

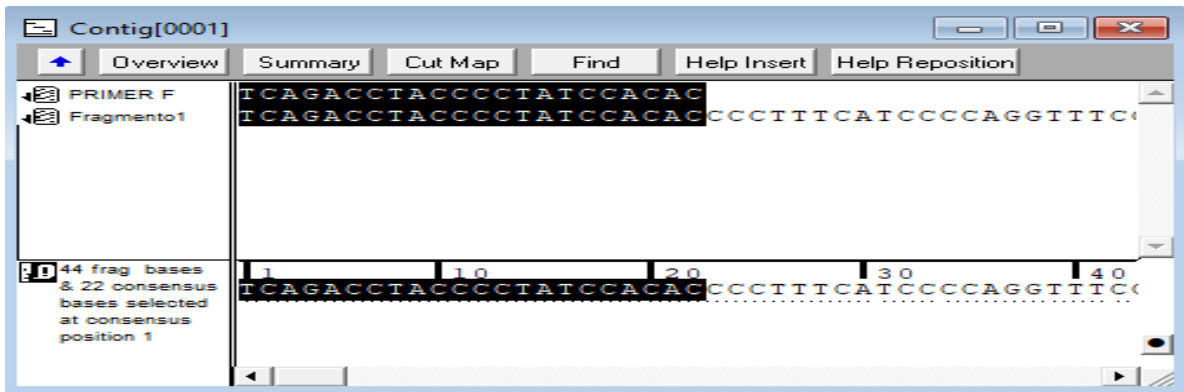
Posteriormente se descargó en formato FASTA esta secuencia y se insertó dicha secuencia en el programa Sequencer.



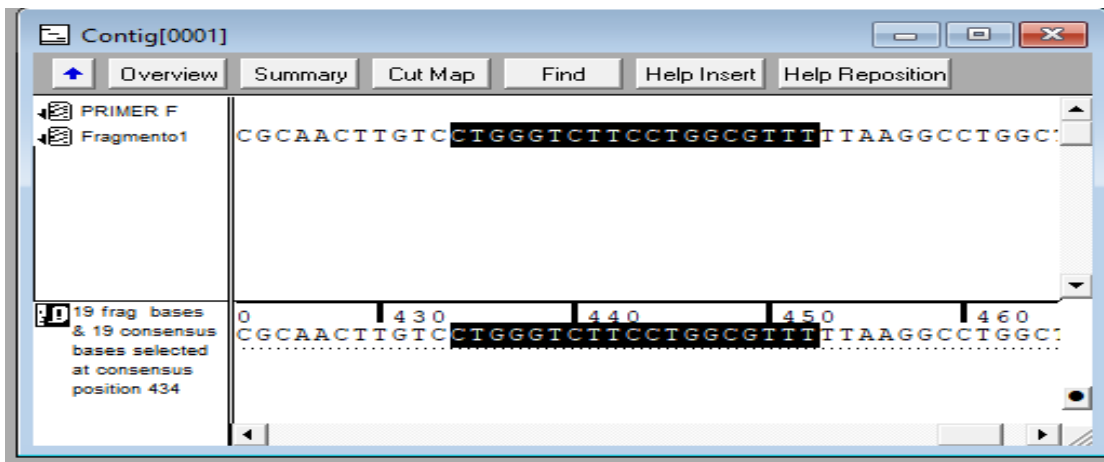
Se alineó esa secuencia y los primers frontal y reverso reportados en el artículo, pero sólo se identificó el primer frontal.



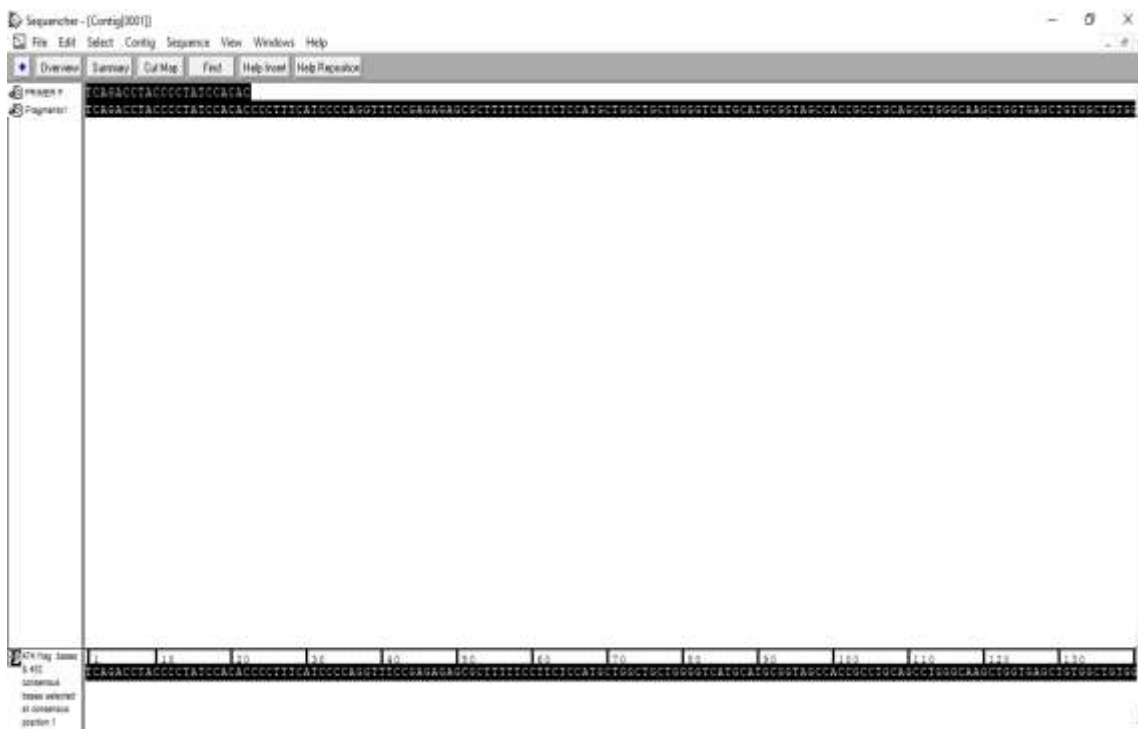
Se buscó el primer frontal reportado (21pb).



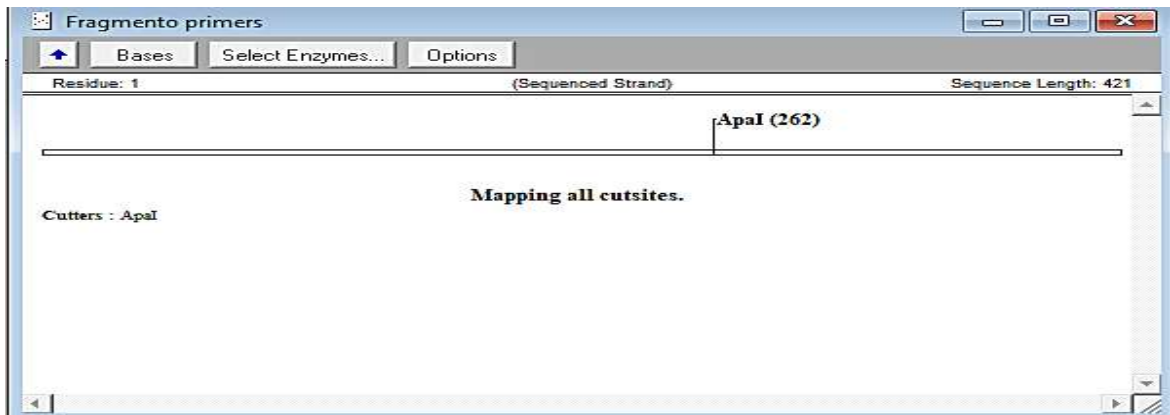
Posteriormente se buscó el primer reverso (19pb).



Se corroboró que el fragmento de 452pb reportado en el artículo era correcto.



Como siguiente paso se seleccionó la opción Cut map para verificar si la enzima Apa I cortaba en el sitio del polimorfismo encontrando dos amplificadores de 262pb y 119 pb.



Para el diseño de los primers que fueron utilizados en esta experimentación, se procedió a seleccionar un fragmento en el que se encontrará el polimorfismo (CTCGGGCCC) y se procedió a utilizar la herramienta Primer Quest Tool, obteniendo una pareja de primers.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN
RESULTS
HELP
ABOUT

Bt Assay Set 1 Details

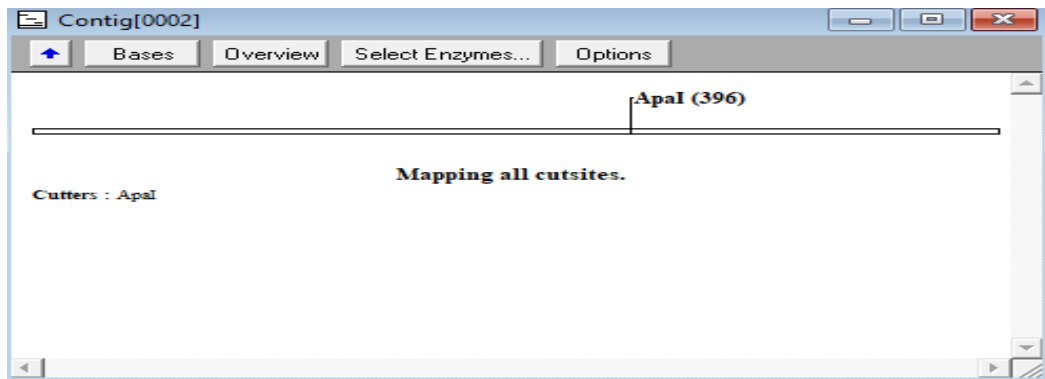
[BACK TO RESULTS](#)

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: Bt
 Amplicon Length: 421

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	<u>CTTACTCTCAGTGGCTTGTTCAG (Sense)</u>	1	23	22	62	50
Reverse	<u>CCACCCTGTTGTTGGAT (AntiSense)</u>	403	422	19	62	52.6

Base	Sequence
1	<u>CTTACTCTCAGTGGCTTGTTCAG</u> ACCTACCCCTATCCACACCCCTTTCATCCCCAGGTTTCCGAGAGAGCGCT
101	TCATGCATGCGGTAGCCACCGCCTGCAGCCTGGGCAAGCTGGTGAGCTGTGGCTGTGGCTGGAAGGGCAGTG
201	GCTGCAGCTGCAGGCACTATCGCGGGGCAAGAGCTTTTCCCACTCCCTGCCAGCTCGGGCCCCGGCTCCGG
301	GAATGGGGCGGCTGTAACCATGACATGGACTTCGGGGAGAAGTTCTCTCGGGATTTTTGGATTCCAGGGAA
401	GG <u>ATCCACAACAACAGGGTGG</u>

Se comprobó que la enzima ApaI, realizará el corte donde se ubicaba polimorfismo.

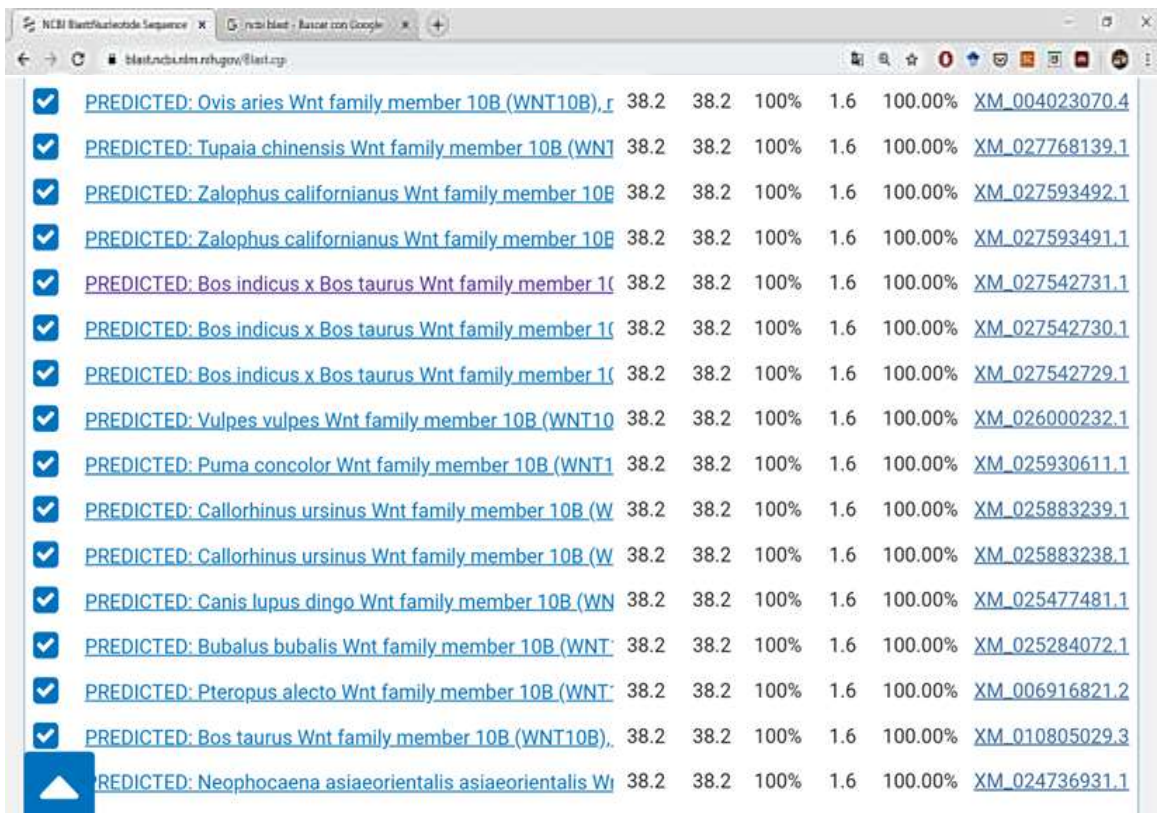


Se realizó finalmente BLAST de ambos primers (frontal y reverso) para asegurar que fueran específicos para el gen WNT10B.

*Primer frontal

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bos mutus wingless-type MMTV integration site	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	XM_005896381.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Oreochromis niloticus gastrula zinc finger protein	38.2	38.2	86%	1.6	100.00%	XM_025900006.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Kryptolebias marmoratus extended synaptotagmin	38.2	38.2	86%	1.6	100.00%	XM_017429561.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Kryptolebias marmoratus extended synaptotagmin	38.2	38.2	86%	1.6	100.00%	XM_017429560.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Kryptolebias marmoratus extended synaptotagmin	38.2	38.2	86%	1.6	100.00%	XM_017429559.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Oncorhynchus nerka thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_029665497.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Oncorhynchus nerka thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_029665496.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Labrus bergylta chromodomain-helicase-DNA topoisomerase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_020629176.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Ricinus communis calcium-transporting ATPase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_015723034.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Oncorhynchus tshawytscha thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_024396075.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Oncorhynchus tshawytscha thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_024396073.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Salvelinus alpinus thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_023975518.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Salvelinus alpinus thiopurine S-methyltransferase	36.2	36.2	81%	6.2	100.00%	XM_023975517.1

*Primer reverso



<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Ovis aries Wnt family member 10B (WNT10B), r	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_004023070.4
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Tupaia chinensis Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027768139.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zalophus californianus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027593492.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zalophus californianus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027593491.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bos indicus x Bos taurus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027542731.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bos indicus x Bos taurus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027542730.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bos indicus x Bos taurus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_027542729.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Vulpes vulpes Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_026000232.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Puma concolor Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_025930611.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Callorhinus ursinus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_025883239.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Callorhinus ursinus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_025883238.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Canis lupus dingo Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_025477481.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bubalus bubalis Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_025284072.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Pteropus alecto Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_006916821.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Bos taurus Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_010805029.3
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis Wnt family member 10B (WNT10B)	38.2	38.2	100%	1.6	100.00%	XM_024736931.1

Anexo 2 Cálculo de la temperatura de hibridación

El cálculo de la temperatura de hibridación (T_m) se realizó de la siguiente manera:

PRIMER	SECUENCIA	NÚM. T	NÚM. G	NÚM. C	NÚM. A
Frontal	CTT ACT CTC AGT GGC TTG TCA G	8	5	6	3
Reverso	ATC CAC AAC AAC AGG GTG G	2	5	5	7

Se utilizó la siguiente ecuación

$$T_m = (G + C)4 + (A + T)2 - 5$$

Dónde:

G= número de guaninas presentes en el primer.

C= número de citocinas presentes en el primer.

A= número de adeninas presentes en el primer.

T= número de timinas presentes en el primer.

Sustituyendo la ecuación para el primer frontal:

$$PF = [(5 + 6)4 + (3 + 8)2] - 5 = 61^\circ C$$

Sustituyendo la ecuación para el primer reverso:

$$PR = [(5 + 5)4 + (7 + 2)2] - 5 = 53^\circ C$$

Promediando los resultados se obtiene:

$$T_m = 57^\circ C$$