

Polimorfismos de nucleótido simple en hormonas asociadas al crecimiento muscular en ovinos criollos colombianos

Single nucleotide polymorphisms in hormones associated with muscle growth in colombian creole sheep

Paul Nicolás Sarmiento¹, Manuel Fernando Ariza², Yurany Teresa Ortiz³, Susan Lorena Castro⁴

Resumen

Objetivo. Determinar Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) presentes en los genes de la Hormona del Crecimiento (HC) y del Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina 1 (IGF-1) y su asociación con el crecimiento muscular en ovinos de pelo criollos colombianos. **Materiales y métodos.** Se seleccionó una población de 100 ovinos, de tres regiones diferentes: Valles interandinos, Piedemonte Llanero y departamento de Córdoba, sometidos a diferentes sistemas de producción. La identificación de polimorfismos en los genes se realizó mediante las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP). **Resultados.** Se identificaron los genotipos AA, AB y BB para dichos genes. Las frecuencias alélicas para los marcadores HC, IGF-1 (IGFov-1, IGF1ov-2 e IGF1ov-3) fueron de 58,9, 36,87, 53,76 y 56,81% para el alelo A, respectivamente, y de 41,41, 63,13, 46,24 y 43,18% para el alelo B, respectivamente. Asimismo, se determinaron las frecuencias genotípicas para cada marcador a nivel poblacional, calculado a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg con un análisis de correlación Fis. **Conclusión.** Los marcadores seleccionados presentaron un alto nivel de homología en la población seleccionada, lográndose determinar que existe un alto porcentaje de individuos heterocigotos con base a los marcadores evaluados.

Palabras clave: Equilibrio de Hardy Weinberg, Factor insulínico de crecimiento tipo 1, Frecuencia genotípica, Hormona del crecimiento, Variación alélica.

1. Universidad de Cundinamarca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Zootecnia, Fusagasugá, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-5126>

2. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Producción Animal, Grupo de Investigación en Genética Molecular Animal, Bogotá, Colombia.

3. Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Departamento de Zootecnia, Bogotá, Colombia.

4. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo de investigación en Calidad de Aguas, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: paulsarcar@bg.fcen.uba.ar

Abstract

Objective. To determine the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) present in growth hormone (GH) and insulin like growth factor 1 (IGF-1) genes and their association with muscle growth in Colombian Creole hair sheep. **Materials and methods.** A population of 100 sheep was selected, from three different regions: Andean valleys, Piedemonte Llanero and Córdoba department, subjected to different production systems. Polymorphisms identification was determined by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Single Chain Conformation Polymorphism (SSCP) techniques. **Results.** AA, AB and BB genotypes were identified for these genes. Allele frequencies were defined for the GH and IGF-1 (IGF_{ov}-1, IGF_{ov}-2 and IGF_{ov}-3) markers of 58.9, 36.87, 53.76 and 56.81% for allele A, respectively, and 41.41, 63.13, 46.24 and 43.18% for allele B, respectively. Genotypic frequencies were also determined for each marker at the population level, calculated from the Hardy-Weinberg equilibrium with a Fis correlation analysis. **Conclusion.** The selected markers present a high level of homology in the selected population, and it was determined that there is a high percentage of heterozygous individuals based on the markers evaluated.

Keywords: Hardy Weinberg equilibrium, Insulin like Growth Factor 1, Genotypic Frequency, Growth Hormone, Allelic Variation.

Introducción

En Colombia la producción ovina se encuentra sustentada en la cría de animales de carácter tipo cárnico y lechero, localizando las principales explotaciones en los departamentos del Magdalena, Cesar, la Guajira, Santander y el Cañón del Chicamocha (1,2). A partir de cruces de animales puros con criollos se busca la implementación de planes de mejora genética para resaltar características que se desean preservar para la producción (3). Dichas características raciales aportan gran capacidad de adaptabilidad a diferentes ecosistemas, rusticidad

y fecundidad. Estas habilidades heredadas de ovinos africanos (procedencia genética) y de animales autóctonos constituyen la actual base racial de la denominada oveja criolla colombiana de pelo (4, 5, 6).

Entre los principales parámetros que se buscan en las explotaciones ovinas esta la ganancia de peso y el crecimiento muscular, los cuales se ve influenciados por diversos parámetros, tanto ambientales, nutricionales como del desarrollo embrionario hasta el nacimiento. Estos parámetros se vinculan a la hiperplasia e hipertrofia celular, asociadas a factores genéticos (7, 8, 9, 10).

Dichos factores genéticos se relacionan a efecto de diferentes genes asociados al crecimiento, como la hormona del crecimiento (HC) (11), la es cual secretada en la glándula pituitaria y desempeña un rol muy importante desde el nacimiento de los animales, que va desde la síntesis de proteína, regulación de la glucosa en sangre y funciones asociadas al crecimiento de tejido visceral, óseo y formación de cartílagos, división celular y formación de tejido muscular y adiposo (12, 13, 14)

Otra hormona asociada al crecimiento es la hormona del factor insulínico del crecimiento tipo I (IGF-I), siendo esta una proteína tanto funcional como estructural, que se le atribuye acciones a nivel endocrino, autocrino y regulación paracrina en procesos de diferenciación y proliferación celular, además de estar asociada a la fisiología del crecimiento posnatal del músculo esquelético, como en el desarrollo reproductivo (15, 16, 17). Dichas hormonas poseen un nivel de asociación de suma importancia ya que la IGF-1 estimula la secreción de la GH, mientras que la GH cumple una función como facilitador en la liberación pancreática de la insulina, asegurando la participación de la insulina en la síntesis y excreción de la IGF-1 (18). En términos de regulación endocrina la HC e IGF-1 influyen sobre los aspectos fisiológicos del crecimiento y la regulación metabólica, ejerciendo efecto en la partición de nutrientes, estímulo del desarrollo óseo y propiamente del crecimiento celular en el tejido del músculo esquelético (19).

Los estudios relacionados a la variación genética en ovejas, permite implementar planes de mejoramiento en la cría de animales, que pueden partir de conocer y caracterizar el genotipo de genes asociados a parámetros zootécnicos, contribuyendo al avance de técnicas biotecnológicas en la producción animal (20, 21).

Dicha implementación influye en obtención de un mayor rendimiento en las producciones animales, lográndose a través de la implementación de nuevas herramientas de análisis tales como: estudios de genética poblacional, moleculares y estadísticos y particularmente el análisis molecular ha demostrado su utilidad en la mejora de características de crecimiento y eficiencia nutricional (22,23, 24). Por otra parte, la implementación de técnicas para la identificación de SNPs mediante técnicas de SSCP suministra un poderoso recurso para los programas selección de animales, ya que mediante esta tecnología es posible determinar mutaciones que producen modificaciones en la secuencia del ADN, permitiendo determinar aquellos alelos con efecto aditivo en los animales con mayor rendimiento productivo y así mejorando los parámetros genéticos en las explotaciones pecuarias (25). Qasimi 2019 (26) logro identificar en HC e IGF-1 en ovinos de la raza ovina Awassi, los genotipos CT y TC, donde los animales con el genotipo CT en el gen de la HC obtenían mayor peso al nacimiento en comparación con animales con

el genotipo TC, mientras que en IGF-1 no se presentó una diferencia significativa.

En este sentido, el objetivo del presente estudio fue identificar algunas variaciones alélicas en genes que codifican por las hormonas HC e IGF-1 y que están asociados con crecimiento muscular, en tres poblaciones de ovinos de pelo criollos colombianos, mediante la aplicación de la técnica de PCR-SSCP.

Materiales y métodos

Población. La población destinada al estudio estuvo conformada por 100 ovinos de pelo criados en las regiones de los valles interandinos (n=41), Córdoba (n=23), y Piedemonte Llanero (n=36) con una edad y peso aproximado de 14 meses y 35 kg respectivamente.

Material biológico y extracción de ADN. Se tomaron muestras de sangre (10 ml) de la vena yugular en tubos con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Morfofisiología Animal de la Universidad Nacional de Colombia y almacenadas a -20 °C hasta su utilización. La extracción de ADN de las muestras se realizó a partir de 200 µl de sangre utilizando la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (27). Se llevó a cabo un primer lavado de la muestra mediante la adición del buffer T₁₀E₁₀ (Tris 10 mM - EDTA 1mM, pH 8) y agitación. Una

vez realizada la lisis de los glóbulos rojos, se realizó la lisis de los glóbulos blancos mediante la adición de 700 µl de solución Salting Out (SDS 1% - Tris HCL 0,05 M, pH 8,0 - EDTA 0,05 M - NaCl 0,1 M) mas 10 µl de proteinasa K y llevando las muestras a 56 °C a baño maría. Posteriormente, se realizó el lavado con fenol cloroformo alcohol isoamílico, y la adición de etanol y NaCl [3M] durante 10 horas con agitación constante (28). Una vez obtenido el ADN se realizó la lectura de la concentración y determinación de los niveles de pureza mediante los datos de absorbancia 260 nm y 280 nm en espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Vis Genesys. Por último, se visualizó el ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% adicionado de Sybr green.

Marcadores moleculares y técnica PCR-SSCP. Los cebadores fueron diseñados a partir de información de las bases de datos Ensembl Genome Browser y National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando la secuencia de los genes IGF-1 (IGFov1, IGFov2: X17229.1; IGFov3: XM_012159659.2;) y HC (KU341778.1) de *Bos taurus*. Dichos marcadores fueron seleccionados a partir de cebadores previamente diseñados en el laboratorio, esto debido a su asociación a características de crecimiento (tabla 1) (29,30, 31).

Genotipificación. Para la amplificación del material genético se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

utilizando un termociclador *MultiGene*. Se implementaron las siguientes condiciones: denaturación de iniciación del ADN a 95 °C durante 5 min, 32 ciclos de denaturación a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 53,2, 56, 53 y 55,7 °C, respectivamente, para los marcadores HC, IGF1ov1, IGF1ov2, IGF1ov3 por 60 segundos, posteriormente la fase de extensión a 72 °C durante 90 segundos y una elongación final a 72 °C durante 10 min. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2%, utilizando el marcador de fluorescencia *Sybr Green* (Invitrogen, USA). De igual manera al momento de realizar la visualización de los productos amplificados se lleva a cabo la adición de un marcador de peso molecular *Hyperladder V* como control.

Electroforesis. Para la determinación de los genotipos se usó la técnica de PCR-SS-

CP, en la cual las muestras fueron sometidas a un corrido electroforético mediante geles de poliacrilamida en una concentración de 59:1 acrilamida-bis acrilamida con una concentración de 10X, ajustando el tiempo de corrido para cada uno. Luego se realizó la visualización de geles con la adición de una solución fijadora, nitrato de plata y solución reveladora, permitiendo identificar los diferentes genotipos presentes en las poblaciones.

Análisis estadístico. Una vez identificados los genotipos y los alelos se determinaron: Frecuencia alélica, frecuencia genotípica, Heterocigosidad esperada (He), la Heterocigosidad observada (Ho), Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y coeficiente de endogamia (Fis) aplicando la herramienta Gen Alex 6.5 (32, 33, 34).

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados en la técnica de amplificación del PCR-SSCP.

Marcador	Secuencia	pb
HC	F: 5'-GCCAGTGGTCCTTGCATAAAA-3' R: 5'-CTGGACTCAGGTGGTGGG-3'	479
IGF1ov1	F: 5'-CTGAGGGGAGCCAATTACAA-3' R: 5'-TGTGTTAGTGACAAGAGGAGCAG -3'	359
IGF1ov2	F: 5'-TGCTCTAGTTTTAAAAATGCAAAGG'-3' R: 5'-TTTCTAAGCAGAAGCAAGCAG -3'	497
IGF1ov3	F: 5'-CACACGATGGAAAATCAGTGG-3' R: 5'-TGGAATATCAATTGGTTCCAGA-3'	255

¹ Marcadores moleculares desarrollados por el Grupo de Genética Molecular Animal, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Resultados

Extracción de ADN y corrido electroforético

La cantidad y calidad del material genético extraído de los ovinos fueron adecuadas como se muestra en la Figura 1, llevándolas a una concentración final de trabajo

entre 80 y 120 ng/ μ l y posteriormente fueron sometidas a corrido electroforético y expuestas bajo luz U.V para determinar su integridad.

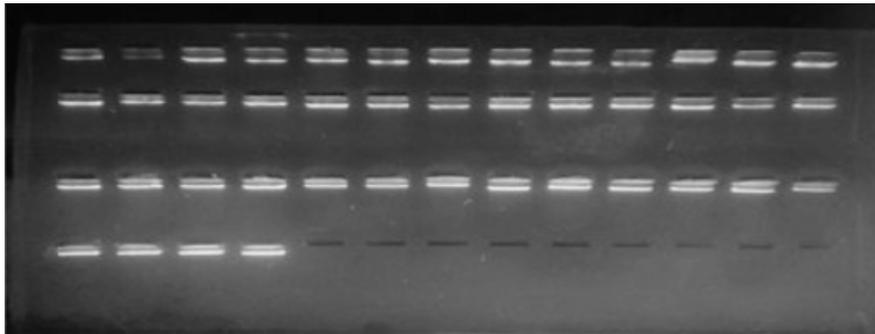


Figura 1. Confirmación de extracción de ADN y evaluación de integridad de material extraído mediante corrido electroforético expuesto bajo luz UV.

Marcador HC

Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 11 del genoma ovino y cuenta con 5 exones, con una longitud de 1958 pares de bases (pb), ubicado entre el intrón 1, exón 1 e intrón 2 (35). Mediante la técnica de PCR se amplió un fragmento de 479 pb. Una vez expuesto a corrido electroforético en geles de poliacrilamida 59:1, se logró identificar los genotipos AA, AB y BB dentro de la población (Figura 2 A).

La frecuencia del alelo A fue de 58,6% dentro de la población en general y se presentó una frecuencia genotípica de 64,6% de animales heterocigotos mientras que el genotipo BB fue el que obtuvo menor incidencia en la población (Figura 3 A). Mientras que la frecuencia del alelo A para las poblaciones de Valles interandinos y Piedemonte llanero son más altos, para la población de Córdoba se evidencia mayor frecuencia del alelo B (Figura 3 B).

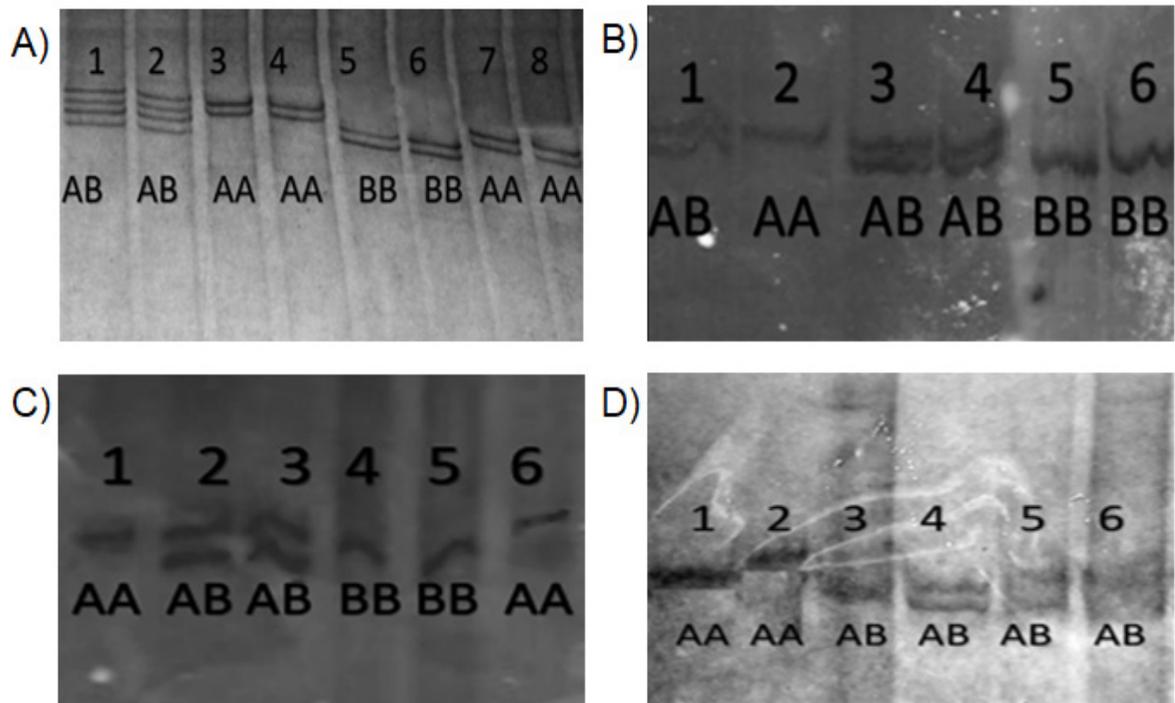


Figura 2. Genotipificación de los distintos marcadores moleculares en ovinos criollos colombianos de las 3 poblaciones. A) Marcador molecular HC, Carril 3, 4, 7 y 8 genotipo AA; Carril 1, 2 genotipo AB; Carril 5 y 6 genotipo BB; B) Marcador IGfov-1, Carril 1, 3 y 4 genotipo AB; Carril 2 genotipo AA; Carril 5 y 6 genotipo BB; C) Marcador molecular IGfov-2, Carril 1, 3 y 4 genotipo AB; Carril 2 genotipo AA; Carril 5 y 6 genotipo BB; D) Marcador molecular IGfov-3 Carril 1 y 2 genotipo AA; Carril 3, 4, 5 y 6 genotipo AB.

Para la evaluación de HC dentro de cada población se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (X^2) y se estimaron los valores de Heterocigosidad esperada (H_e), Heterocigosidad observada (H_o) e Índice de fijación (F_{is}).

La prueba de Chi-cuadrado indicó un valor de 10,92, demostrando que el marcador de HC no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg. El valor de F_{is} fue de -0,367 para la población general con una correlación altamente significativa ($p < 0.001$), indicando que el nivel de endogamia es alto

dentro la población en general produciendo más individuos heterocigotos (Tabla 2). Sin embargo, los valores F_{is} de las poblaciones de Córdoba (-0,394) y de Piedemonte Llanero (-0,238) no fueron estadísticamente significativas, lo que quiere decir que las poblaciones cuentan con un nivel similar de animales homocigotos y heterocigotos, a diferencia de los resultados para la población de los valles interandinos cuyo valor para F_{is} es de (-0,481) y de (9,273) para X^2 siendo altamente significativo ($p < 0.01$), indicando que cuenta con una mayor incidencia de animales heterocigotos (Tabla 2).

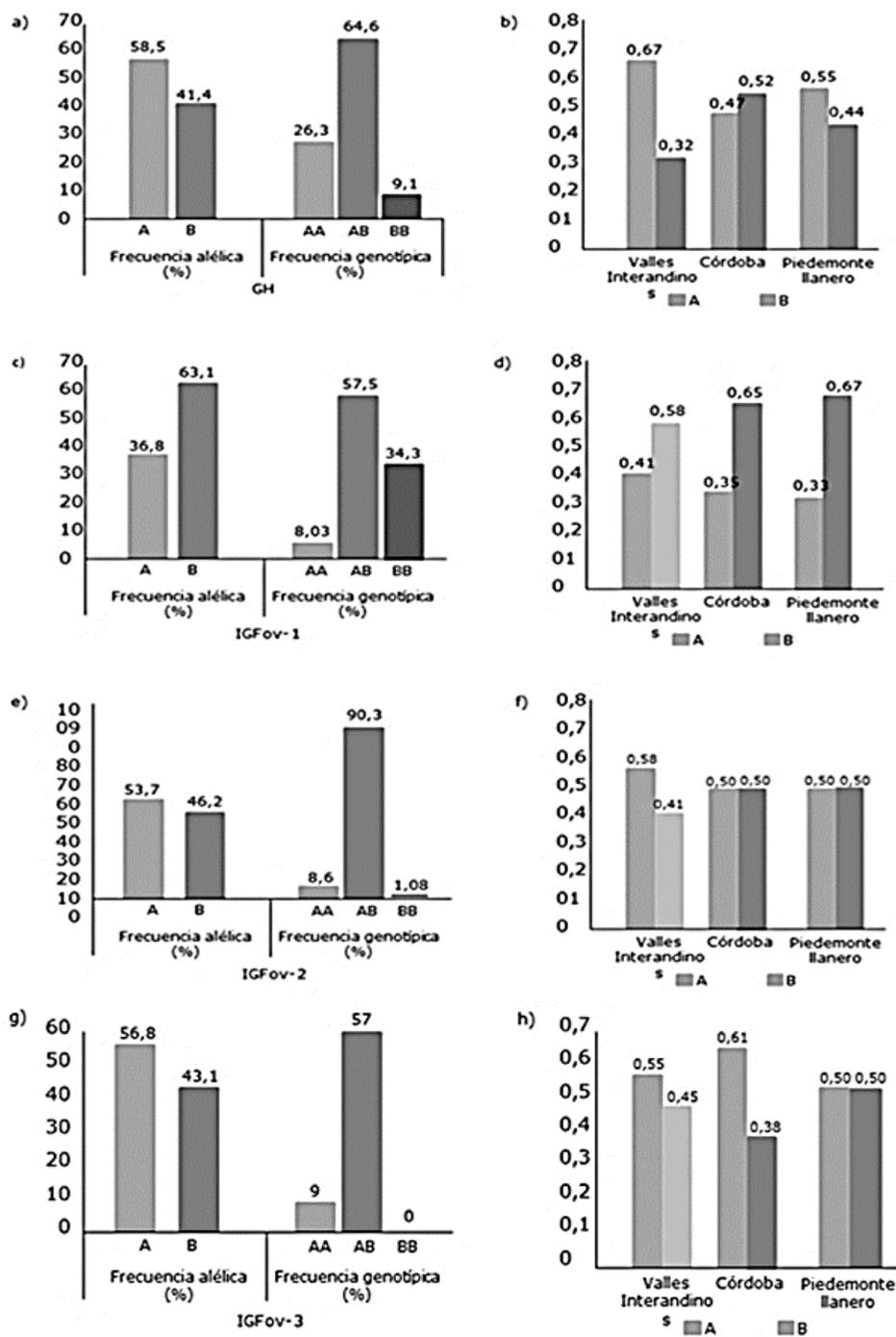


Figura 3. Determinación de las frecuencias alélicas para los marcadores moleculares. (A, C, E y D) frecuencia alélica y genotípica para GH, IGFov-1, IGFov-2 e IGFov-3 respectivamente, en la población general. (B, D, F y H) por cada población ovina y tipo de alelo (A y B) para GH, IGFov-1, IGFov-2 e IGFov-3 respectivamente.

Tabla 2. Valores de Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y valores de Fis, para el marcador GH en la población ovina (Colombia).

Valores generales en la población						
Población general	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
	GH	0,64	0,485	-0,367	10,926	***
Valores poblacionales						
	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
Valles interandinos	GH	0,650	0,439	-0,481	9,273	**
Córdoba		0,696	0,499	-0,394	3,569	ns
Piedemonte Llanero		0,611	0,949	-0,238	2,031	ns

Grados de libertad (número de alelos Sign.: ns = no significativo; ** p<0.01; *** p<0.001 X²: Prueba de Chi cuadrado.

Marcador IGF-1

El gen para IGF-1 en los ovinos se encuentra ubicado en el cromosoma 3 y está constituido por 5 exones, con una longitud de 4,132 pb (36).

IGF-1 ov1 (IGFov-1): Dentro del gen IGF-1 en el genoma del ovino se seleccionó el marcador IGF1ov1, ubicado en el intrón 1 del gen y mediante la técnica de PCR se amplió un fragmento de 359 pb.

En la población general se obtuvo mayor frecuencia del alelo B (63%) contra A (36,8%), mientras que para la frecuencia genotípica se encontró que el 57% de la población es heterocigota y correspondiente al genotipo AB (Figura 3 C). En comparación entre las poblaciones se encontró que en

cada una de ellas hay una mayor frecuencia de individuos con el alelo B (Figura 3 D).

El valor de Fis fue de -0,298 para la población general, con una correlación significativa pero baja (p<0.05), determinando que el grado de endogamia en la población no es tan elevada para animales homocigotos en comparación a la proporción presente de heterocigotos. Por otro lado, el valor obtenido para la población de los valles interandinos (0,096) no fue significativa, mientras que los valores para las poblaciones de Córdoba de -0,533 (p<0.05) y de Piedemonte Llanero de -0,489 fueron medianamente significativos (p<0.01). Estos resultados indican que el grado de endogamia no es tan elevada, aunque tiene una tener mayor incidencia de animales heterocigotos (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y valores de Fis en el marcador IGF1ov1, según la población ovina (Colombia).

Valores generales en la población							
Población general	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.	
		IGF-1ov1	0,576	0,466	-0,298	5,552	*
Valores poblacionales							
Valles interandinos	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.	
		0,439	0,485	0,096	0,375	ns	
	Córdoba	IGF-1ov1	0,696	0,454	-0,533	6,542	*
	Piedemonte Llanero		0,657	0,441	-0,489	8,382	**

Grados de libertad (número de alelos Sign.: ns = no significativo; ** p<0.01; *** p<0.001, X²: Prueba de Chi cuadrado.

IGF-1 ov2 (IGFov-2)

Este marcador está ubicado en el intrón 1, exón 1 e intrón 2 del gen IGF-1. Se amplifica un fragmento mediante la técnica de PCR de una longitud de 497 pb y se lograron identificar los genotipos AA, AB, BB dentro de la población (Figura 3 C).

En términos generales se puede indicar que la frecuencia del alelo A posee mayor incidencia en la población, mientras que las frecuencias de las poblaciones de Córdoba y Piedemonte Llanero para los dos alelos se encuentran en las mismas proporciones. Esto indica que estas poblaciones son a simple vista homogéneas referente a su carga genética, mientras que la población de los valles interandinos presenta mayor frecuencia para el alelo A (Figura 3 E y F).

La relación genotípica indica que el 90% de la frecuencia es para los individuos heterocigotos AB y 1% para el genotipo homocigoto BB. En forma similar, los valores muestran que la población se acerca a un proceso de deriva génica, por pérdida alélica (alelo B) en la población.

Para la población general el valor de Fis fue de -0,872 con una correlación significativamente alta (p<0,001), determinándose que el grado de endogamia en la población es tan elevada que su conformación de animales heterocigotos es casi total (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y valores de Fis en el marcador IGFov-2, según la población ovina (Colombia).

Valores generales en la población						
Población general	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
		IGF-1ov2	0,903	0,497	-0,872	62,038
Valores poblacionales						
	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
Valles interandinos		0,780	0,485	-0,608	15,148	***
Córdoba	IGF-1ov2	1,000	0,500	-1,000	18,000	**
Piedemonte Llanero		1,000	0,500	-1,000	34,000	***

Grados de libertad (número de alelos Sign.: ns = no significativo; ** p<0.01; *** p<0.001, X²: Prueba de Chi cuadrado.

El valor obtenido para la población de Córdoba de -1,000 fue medianamente significativo ($p < 0,01$), interpretando que la población tiene un mayor número de individuos heterocigotos que homocigotos. Por otro lado, los valores en la población de valles interandinos (-0,608) y para la población de Piedemonte Llanero (-1,000) fueron altamente significativos ($p < 0,001$), dado que la mayor parte es heterocigótica. Dichos valores apuntan a que los sistemas de producción manejan un grado de endogamia alto, que podrían estar asociados al manejo reproductivo y de selección de reproductores con alto parentesco entre ellos, esto basado a lo expuesto por Kalmes (37) bajo la hipótesis y el concepto de equilibrio de Hardy-Weinberg. (Tabla 4).

IGF1 ov3 (IGFov-3)

El marcador IGFov-3 se encuentra ubicado en la región promotora del gen IGF-1. Se lograron identificar los genotipos AA y AB dentro de la población (Figura 2 D). La frecuencia del alelo A fue mayor que la del alelo B para el marcador IGFov-3, con una incidencia en de la frecuencia genotípica del 57% para individuos heterocigotos (Figura 3 G). En términos generales, el genotipo BB no tuvo incidencia alguna en la población, posiblemente asociado a los planes de mejoramiento genético en la población, lo cual ha llevado a la deriva génica en la población estudiada (Figura 3 H).

Al evaluar las frecuencias alélicas de las tres zonas, se encontró que el alelo A en la población de Córdoba obtuvo la mayor frecuencia, mientras que en la población de Piedemonte Llanero se encontró una incidencia semejante entre los dos alelos, lo que quiere decir que es una población homogénea y, por lo tanto, que cumple con ciertas características de manejo y reproducción, manteniendo una proporción de endogamia equitativa.

El valor de Fis fue de -0,504 para la población general, con una correlación significativamente alta ($p < 0,001$), determinando

un alto grado de endogamia dentro de la población, confirmando la gran presencia de un alto porcentaje de animales heterocigotos. Con base a las poblaciones, el valor obtenido para Piedemonte Llanero (-0,111) no fue significativo, determinando que cuenta con un nivel semejante de animales homocigotos y heterocigotos; de otra parte, se obtuvo una correlación de -0,822 para la población de valles interandinos ($p < 0,001$) y de -0,630 para la población de Córdoba ($p < 0,01$), indicando que estas poblaciones cuentan con proporción de animales heterocigotos alta en comparación con la incidencia de animales homocigotos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y valores de Fis en el marcador IGF1ov3, según la población ovina (Colombia).

Valores generales en la población						
Población general	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
		IGF-1ov3	0,670	0,446	-0,504	38,122
Valores poblacionales						
	Locus	Ho	He	Fis	X ²	Sign.
Valles interandinos		0,902	0,495	-0,822	27,718	***
Córdoba	IGF-1ov3	0,733	0,474	-0,630	9,722	**
Piedemonte Llanero		0,200	0,180	-0,111	0,309	ns

Grados de libertad (número de alelos Sign.: ns = no significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, X²: Prueba de Chi cuadrado.

Discusión

Con base a los objetivos planteados en la presente investigación, se logró identificar la presencia de algunos SNPs en genes que se asocian al crecimiento muscular en ovi-

nos criollos colombianos en tres poblaciones diferentes. Mediante la aplicación de la técnica molecular PCR-SSCP. Para el marcador molecular HC, García (31) reportó una asociación de este gen con características productivas por ser uno de los principa-

les reguladores del crecimiento. Asimismo, Supakorn (38) identificó mutaciones para el gen HC en ganado bovino, pudiendo identificar polimorfismos puntuales presentes en la región promotora y en el exón 5, en las posiciones 253, 303 y 313. Donde identificó la sustitución de una citosina por una timina en cada una de las posiciones indicadas, mientras que, en el quinto exón, se registró el cambio de un aminoácido en la posición 127 (una leucina por una valina), causando que los animales tuviesen un bajo peso corporal y una baja ganancia de peso. Por otro lado, Balia (39) determinaron la presencia de polimorfismos en el gen del crecimiento HC en ovinos mediante la técnica SSCP logrando evaluar varios fragmentos de la región no traducida (UTR) del gen, el cual se caracterizó por la presencia de 5 patrones; sin embargo, dicha mutación no tuvo efecto sobre la proteína de la GH.

Hasta la fecha no se han logrado detectar una gran cantidad de polimorfismos asociados al gen de HC en pequeños rumiantes (40). En este sentido, Piza Jerez (41) determinó la presencia de un polimorfismo en el exón 3, identificando una sustitución de una Guanina a Adenina, produciendo una mutación tipo *missense* en el aminoácido 20, donde se refleja el cambio de una leucina con una prolina, denominado este cambio como GH1-3. Este autor expone que dentro de la población estudiada el 93,9% de animales presentaba esta mutación, la cual no ejerce un efecto sobre el peso de los ani-

males en ninguna de las etapas afectando los parámetros productivos. En comparación con Kumari (42) en ganado Nelore, donde los valores para la frecuencia alélica fueron de 0,6016 para el alelo A y 0,3983 para el B; de igual manera el valor obtenido para la frecuencia genotípica fue mayor en animales heterocigóticos (79,68% en la población). Logrando inferir que los datos suministrados por el presente estudio se podrían llegar asociar con los expuestos por los autores anteriormente citados, obteniendo mayor presencia de animales con genotipo de tipo heterocigóticos dentro de las poblaciones con valores mayores al 60% y con frecuencias alélicas similares para los alelos A y B.

Con respecto al marcador molecular IGF1, Thissen; He y Lateulade (43, 44,45) reportaron una asociación y efecto como mediador y regulador en el crecimiento del marcador IGF1. De igual manera, el IGF-I de las ovejas presenta una gran similitud al IGF-I humano y bovino (46). Asimismo, se reporta que los efectos del polimorfismo del gen IGF-1 se ven influenciados principalmente en la ganancia de peso (45). Por otro lado, en estudios realizados en la raza ovina Santa Inés se evidencia la presencia de algunos SNPs en el gen IGF-1, entre los exones 1 y 2 incluyendo el intrón 1, encontrando mayor incidencia de animales homocigotos en la población, sin embargo, no se logra estimar algún tipo de efecto sobre el crecimiento de los animales (47). En cambio, las

alteraciones en este gen, exón 3, mostraron una alta asociación con parámetros reproductivos como la tasa de fertilidad más no en el crecimiento (48).

Debido a la ausencia de estudios donde se relaciona el crecimiento en ovinos, se hizo una comparación en especies homólogas como el bovino. Tomando como referencia el estudio de Rodríguez (30), quien reporta valores para las frecuencias alélicas de poblaciones de Romosinuano, cebú y Romosinuano x cebú de 94, 54 y 65% para el alelo A y de 6, 46 y 35% para el alelo B. asimismo, la frecuencia genotípica de los valores obtenidos para el homocigoto AA fueron de 90, 25 y 32%, para heterocigoto AB de 8, 55 y 66%, y para el homocigoto BB de 2, 20 y 2%, respectivamente. Encontrando que los valores en el estudio anterior, comparados con el del presente estudio para los marcadores IGFov-1, IGFov-2 y IGFov-3 muestra que las existe una mayor proporción de individuos con una frecuencia genotípica de tipo heterocigótica (AB) 57,58, 90,32 y 57% y con proporción mucho menor para animales de genotipo BB, encontrando que dichas poblaciones están cercanas a tener la pérdida de este genotipo e incluso se encaminan a una deriva genética.

En este mismo sentido, los resultados del presente estudio concuerdan con lo expuesto por Cuetia-Londoño (49) donde indica que las frecuencias alélicas para la identificación de SNPs se encuentran influenciadas por la selección de determinadas características de

la producción debido a que el apareamiento no es al azar, pudiéndose esperar, por lo tanto, que las poblaciones no se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Conclusiones

A pesar de la aplicación de técnicas de detección de mutaciones y estudios asociados al crecimiento y desarrollo muscular en animales de interés productivo, actualmente no se cuenta con resultados que asocien dichas mutaciones con parámetros de crecimiento, ganancia de peso y rendimiento en canal en ovinos. Sin embargo, el actual estudio da un primer paso para la generación de planes de mejoramiento genético en diferentes explotaciones. Además, este trabajo permitió realizar asociaciones mediante el análisis de marcadores asociados al crecimiento como HC, IGF-1 (IGFov-1, IGFov-2 e IGFov-3) diseñados a partir del genoma de bovino, debido a su nivel de homología. De igual manera se pudo determinar las frecuencias alélicas genotípicas y el índice de fijación encontrando que las 3 poblaciones no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, y esto podría estar asociado al tipo de manejo reproductivo que se pudieron estar llevando en las diferentes producciones.

Agradecimiento

Queremos extender nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia,

particularmente al Departamento de Producción Animal de la sede Bogotá por hacernos partícipes de este proyecto y permitirnos hacer uso de su laboratorio y facilitar todo lo requerido, a todas aquellas personas que participaron y aportaron conocimiento durante el proceso experimental y en la redacción de este artículo.

Conflicto de interés

Los autores del presente trabajo de investigación declaran que el presente trabajo no tiene conflicto de interés.

Financiamiento

Queremos extender nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia, particularmente al Departamento de Producción Animal y al grupo de Investigación de Genética Molecular Animal, bajo la dirección del Dr. Fernando Ariza, por hacernos partícipes en el financiamiento de este proyecto.

Referencias

1. Espinal C F, Covalada H M, Amézquita J E. Cadena de Ovinos y Caprinos en Colombia. Obtenido de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrociudades Colombia. 2006; Disponible en: www.agrociudades.gov.co
2. Vargas-Bayona J E, Bello D A, Serrano-Novoa C A, Rivera O F. Diversidad de la Cabra en Colombia. Biodiversidad caprina iberoamericana. 2016; 140-143. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Lenin-Aguirre/publication/325184212_Libro_Diversidad_caprina_Iberoamericana_Capitulo_Recursos_geneticos_caprinos_locales_en_el_Ecuador/links/5afcc30f7e9b98e03e8e4c/Libro-Diversidad-caprina-Iberoamericana-Capitulo-Recursos-geneticos-caprinos-locales-en-el-Ecuador.pdf#page=138
3. Vergara-Garay O, Llorente E, Ramos L, Bustamante-Yáñez M, Simanca-Sotelo J C. Descripción del crecimiento en ovinos criollos utilizando el modelo Brody. Orinoquia. 2016; 20(2), 34-39. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092016000200005&lng=en&tlng=es. On-line versión ISSN 0121-3709
4. Dorado J C. Huertas H R, Rivera M A, Escobar E R. Ovinos Colombianos de Pelo: Alternativa Productiva para el Sur del Departamento del Tolima. CORPOICA, Centro de investigación de Nataima. 2002
5. Gutierrez JH. (1992). Ovinos. Bogotá: Retina Ltda
6. Ascue NJ. Diversidad genética de ovinos criollos colombianos (tesis maestría). Colombia Universidad nacional de Colombia; 2013. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21711/2013-Nini_Johana_Vivas_Ascuet.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. Faria LC. Estudio genético cuantitativo de características de crecimiento e reproductivas em bovinos da raça Brahman no Brasil. (Tesis de maestría). Universidade Estadual Paulista, 23-30. 2006; Disponible en: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/92629/faria_lc_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
8. Zhang S, Regnault T R, Barker P L, Botting K J, McMillen I C, McMillan C M, Morrison J L. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients*. 2015; 7(1), 360-389. <https://doi.org/10.3390/nu7010360>
9. J. Li, A. J. Control of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I expression by cortisol in ovine fetal skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 2002; 541(2), 581-589 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.016402>
10. Mohammad Koohmaraie, MP. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship. *Meat science*. 2002; 62(3), 345-352. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00127-4)
11. Díaz AÁ. Esteban, H. P., Hernández, T. D. L. C. M., Torres, J. Q., & Puzo, A. S. Fisiología animal aplicada. Editorial Universidad de Antioquia. 2009.

12. Devesa J, Devesa P, Reimunde P. Hormona de crecimiento: acciones y aplicaciones preventivas y terapéuticas. *Medicina Clínica*, 2010; 135(14), 665-670. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2009.10.017>
13. Rajni Kumari, R. K. GENETIC POLYMORPHISM OF GROWTH HORMONE GENE IN NATIVE SHEEP BREEDS OF INDIA. *The Indian Journal of Small Ruminants*. 2014. Disponible en: <https://indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijsr&volume=20&issue=2&article=003>
14. Valencia, C. F. Association of single nucleotide polymorphisms in the CAPN, CAST, LEP, GH, and IGF-1 genes with growth parameters and ultrasound characteristics of the Longissimus dorsi muscle in Colombian hair sheep. *Trop Anim Health Prod*, 2022; 54 - 82. doi:<https://doi.org/10.1007/s11250-022-03086-x>
15. Devesa J, Almengló C, Devesa P. Multiple effects of growth hormone in the body: is it really the hormone for growth?. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*. 2016; 9, CMED-S38201. <https://doi.org/10.4137/CMED.S38201>
16. Sebastiano, L. C. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its relationship with reproductive performances and milk yield in Sarda dairy sheep. *Veterinary and Animal Science*. 2020; doi:<https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100084>
17. Karadag, O. The polymorphism of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) gene in meat-type Lambs in Turkey: I. Effect on growth traits and body measurements. *Small Ruminant Research*. 2022; 215. doi:<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106765>
18. Simal R S. Hormona del crecimiento (GH). *Fisiología humana II*. 2012. Disponible en: <http://www.webfisio.es/fisiologia/endocrino/textos/gh.htm#e31> ISBN: 84-688-1218-8.
19. Beermann D. H. *Physiology*. Dikeman M, Devine C editor. *Encyclopedia of Meat Sciences*. 2nd ed Kansas, Manhattan; USA, Hamilton; New Zeland 2014.
20. Altwaty NH, S. L. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone receptor gene and Alu1 polymorphisms in the diacylglycerol acyltransferase 1 gene as related to meat production in sheep. *Vet World*. 2020; 884-889. doi: 10.14202/vetworld.2020.884-889
21. Shakweer, W. A.-R. Cloning, nucleotide sequencing, and bioinformatics analyses of growth hormone mRNA of Assaf sheep and Boer goats reared in Egypt. *J Genet Eng Biotechnol*, 2020; 18- 30. doi:<https://doi.org/10.1186/s43141-020-00046-6>
22. Marwal A, Gaur Rajarshi. *Molecular Markers: Tools for Genetic Analysis*. *Animal Biotechnology*, 2nd Edition Models in Discovery and Translation. 2020; pp.353-372. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/342330547_Molecular_Markers_Tools_for_Genetic_Analysis
23. Chekol C, Gebreyohannes M. Application and current trends of biotechnology: a brief review. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2018; vol. 5, no 1, p. 1-8. Disponible en: https://biotechnology.report/Resources/Whitepapers/28d904dc-b8e3-4b1a-9c76-bf32a6734c47_fulltext_ajbtbe.pdf
24. E. Armstrong, G. C. Novel genetic polymorphisms associated with carcass traits in grazing Texel sheep. *Meat Science*, 2018; 202-208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.014>
25. Koopae H K, Koshkoiyeh A E. SNPs Genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014; 57(1), 87-95. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/babt/a/fSn5pdNkvvLk9BMxhhfdKcd/?format=pdf&lang=en> ISSN 1516-8913
26. Qasimi Al, R. H., Hassan, A. F., & Khudair, B. Y. (2019). Effect of IGF-1 and GH Genes polymorphism on weights and body measurements of Awassi lambs in different ages. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 32(1), 39-46.
27. Peñafiel N, Flores D M, Rivero- De Aguilar J, Guayasamin J M, Bonaccorso E. A cost-effective protocol for total DNA isolation from animal tissue. *Neotropical Biodiversity*, 2019; 5(1), 69-74. <https://doi.org/10.1080/23766808.2019.1706387>
28. Montgomery G W, Sise J. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1990; 33(3), 437-441. <https://doi.org/10.1080/00288233.1990.10428440>
29. Rosa V L. Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da raça Crioula Lageana. *Universidade Federal de Santa Catarina*. 2016. Disponible en: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/174490/TCC%20-%20VANESSA%20LAUS%20DA%20ROSA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

30. Rodríguez, M. R. Estudio de los genes MYF5, PDE1B e IGF1 y los microsatelites BM6026, CSSM34, RM500 Y ETH10 asociados a crecimiento en ganado Criollo Romosinuano. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. 2010. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522010000100004 Print version ISSN 0120-2952
31. García L A. Polimorfismos en el gen de la hormona del crecimiento bovina y su asociación a características de producción. *Ciencia AUT.* 2009; Disponible en: <http://www.revistaciencia.uat.edu.mx/index.php/CienciaUAT/article/view/370/181> ISSN 2007-7521. 4(1) 54-57
32. Castro-Molina SL, Ariza-Botero MF, Ríos-Rodríguez M, Moreno DJ, Guerrero-Castillo GH. Using PCR-SSCP for detecting polymorphism 1843 in the ryanodine receptor gene. *Orinoquia*, 2011; .15(2), 192-200. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-37092011000200007&script=sci_abstract&tlng=pt ISSN 0121-3709.
33. Ortiz-Sánchez Y, Martínez-Guzmán M, Kübler I, Ariza M F, Castro-Molina S, Infante-González, J. Diversidad genética del Ovinio Criollo de Pelo Colombiano mediante el uso del marcador molecular de tipo polimorfismos de nucleótido simple (SNP). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2021; 32(1). <http://dx.doi.org/10.15381/riვეp.v32i1.19487>
34. Meira, A. N. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and IGF type-1 (IGF1) genes associated with carcass traits in Santa Ines sheep. *Animal*, 2019; 460-468. [doi:10.1017/S1751731118001362](https://doi.org/10.1017/S1751731118001362)
35. NCBI. (S.f). GH growth hormone *Ovis aries* (sheep). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/443329>
36. NCBI. (S.f). IGF1 insulin like growth factor 1 *Ovis aries* (sheep). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/443318>
37. Kalmes R, Huret J L. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2001. Disponible en: Modelo de Hardy-Weinberg: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/HardySp.html>
38. Supakorn, C. Effect of growth hormone and growth hormone receptor genes for preweaning growth traits in a multibreed beef population. Kasetsart University, Tailandia. 2007.
39. Balia F, Garippa G, Vacca G M. Effetto del polimorfismo del gen GH ovino sulla produzione di latte. (tesis maestría). Italia Università degli studi di Sassari. 2012; Disponible en: http://eprints.uniss.it/8476/1/Balia_F_Effetto_polimorfismo_gene_GH.pdf
40. Gorlov I F, Kolosov Y A, Shirokova N V, Getmantseva L V, Slozhenkina M I, Mosolova N I, Zlobina E Y. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed. *Small Ruminant Research*, 2017;150, 11-14. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.019>
41. Piza-Jerez A C. Polimorfismos en genes candidatos asociados a parámetros de crecimiento y rendimiento en canal de ovinos (*Ovis aries*) del centro agropecuario Marengo y concepción, Santander. (Tesis maestría). Universidad Nacional de Colombia, 2018; 129-133. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69133>
42. Kumari R, Kumar R, Meena A, Jyotsana B, Prince L, Kumar S. Genetic polymorphism of growth hormone gene in native sheep breeds of India. *The Indian Journal of Small Ruminants*. 2014; 15-18. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/267926327> Online ISSN: 0973-9718.
43. Thissen J P, Ketelslegers J M, Underwood L E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine reviews*. 1994; 15(1), 80-101.[doi:https://doi.org/10.1210/edrv-15-1-80](https://doi.org/10.1210/edrv-15-1-80)
44. He J N, Zhahg B Y, Chu M X, Wang P Q, Feng T, Cao G L, Li N. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular Biology Reports*. 2012; Disponible en: <https://rd.springer.com/article/10.1007/s11033-012-1846-y>
45. Lateulade- Basigaluz, M D P, Kaitazoff Lago, A. Asociación de un marcador genético del factor similar a la insulina-1 (IGF-1) con características de crecimiento de terneras Aberdeen Angus. (Tesis de grado). Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay. 2012; Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1679/1/3852bas.pdf>
46. Francis G L, Kerrie A, Mcneil J C, Ballard F J, Owens P C. Sheep Insulin-Like Growth Factors I and II: Sequences, Activities and Assays. *Endocrinology*. 1989; Disponible en: <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/124/3/1173/2531915?redirectedFrom=fulltext>
47. Meira A, Montenegro H, Coutinho L, Mourão G, Azevedo H, Muniz E, Machado A, Junior L, Pedrosa V, Pinto L.

Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and IGF type-1 (IGF1) genes associated with carcass traits in Santa Ines sheep. *Animal. International journal of animal Bioscience*. 2019; 13(3), 460-468. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001362>

48. Luridiana S, Mura MC, Di Stefano MV, Pulinas L, Cosso G, Nehme M, Vincenzo C. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its relationship with reproductive performances and milk yield in Sarda dairy sheep. *Veterinary and Animal Science*. 2020; doi:<https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100084>
49. Cuetia-Londoño J A. Polimorfismos de los genes Calpaina, Calpastatina y leptina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de polimorfismos de nucleotidos simples (SNPs) (tesis maestría). Universidad Nacional de Colombia Palmira, Colombia. 2012; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20014>