

**Análisis de polimorfismos en el gen de
lactoferrina como indicadores de mastitis en
ganado Holstein de Zamorano**

Pablo Alejandro Valladares Medina

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Análisis de polimorfismos en el gen de lactoferrina como indicadores de mastitis en ganado Holstein de Zamorano

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Pablo Alejandro Valladares Medina

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Análisis de polimorfismos en el gen de lactoferrina como indicadores de mastitis en ganado Holstein de Zamorano

Presentado por:

Pablo Alejandro Valladares Medina

Aprobado:


Marielena Moncada (Nov 27 2020 08:55 CST)

Marielena Moncada Laínez, Ph.D.
Asesora Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Manuel Parra Bracamonte, Ph.D.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano
Académico



Rogel Castillo, M.Sc.
Asesor

Análisis de polimorfismos en el gen de lactoferrina como indicadores de mastitis en ganado Holstein de Zamorano

Pablo Alejandro Valladares Medina

Resumen. La mastitis ocasiona pérdidas económicas y es una de las enfermedades más frecuentes en las explotaciones lecheras de todo el mundo debido a la atrofia de los pezones y falta de inocuidad que produce en la leche. El objetivo del presente estudio fue descubrir variaciones genómicas en el gen de lactoferrina (LTF) potencialmente asociados a la susceptibilidad de mastitis en vacas Holstein de Zamorano. Se recolectaron 126 muestras biológicas, las cuales se clasificaron según la frecuencia a mastitis clínica que presentaron en sus dos primeros ciclos de lactancia. Se terminaron evaluando 26 animales que habían presentado mastitis en sus dos primeras lactancias y un grupo de 12 animales que nunca habían presentado mastitis. Se realizaron extracciones de ADN mediante uso de folículos pilosos, asimismo, la amplificación y secuenciación de dos regiones específicas del LTF se estableció con diferentes programas de PCR; los resultados de la secuenciación fueron analizada en el programa UGENE[®] para determinar los polimorfismos. Sin embargo, únicamente cinco polimorfismos fueron significativos con una frecuencia en el grupo de vacas resistentes de un 13%. Estos polimorfismos están relacionados de forma estadística (prueba de Fisher) con las vacas que según su historial veterinario nunca habían presentado mastitis durante el tiempo que llevaban en el hato lechero. Estos polimorfismos fueron encontrados en el exón 1 del gen de lactoferrina. Se lograron descubrir polimorfismos y su asociación a características productivas, pero aún se debe seguir investigando otros polimorfismos presentes en el gen de lactoferrina y conocer su efecto en el mejoramiento genético.

Palabras clave: ADN, mastitis, mejoramiento genético, resistencia, SNP'S.

Abstract. Mastitis is one of the most frequent and economically important diseases in dairy farms around the world due to the atrophy of the nipples and the lack of innocuousness that it produces in milk. The objective of the present study was to discover genomic variations in the lactoferrin (LFT) gene potentially associated with productive characters of Holstein cows from Zamorano. 126 biological samples were collected, which were classified according to the frequency presented by cows in cases of mastitis during their first two lactational cycles. 26 animals that had presented mastitis in their first two lactations and a group of 12 animals that have never presented mastitis were selected. DNA extractions were made using hair follicles, and specific gene regions amplification and sequencing was established with different PCR programs and sequencing outcome was analyzed in the UGENE[®] program to determine the polymorphisms. There were 23 total polymorphisms of the lactoferrin gene; however, only five polymorphisms were significant with a frequency in the group of resistant cows of 13%. These polymorphisms are statistically related (Fisher test) to cows that according to their health and production record had never had mastitis during the time they were in the dairy herd. This type of polymorphisms was founded from exon 1 of the lactoferrin gene. The polymorphisms and their association with productive characteristics were discovered, but other polymorphisms present in the lactoferrin gene must still be investigated and its effect on genetic improvement must be known.

Key words: DNA, genetic improvement, mastitis, resistance, SNP'S.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA	20
7. ANEXOS	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Condiciones experimentales utilizadas en las soluciones de reacción para la amplificación de las regiones de interés de lactoferrina.....	6
2. Descripción de los volúmenes de reactivos necesarios para el procesamiento de una muestra de PCR.....	8
3. Polimorfismos encontrados en el hato lechero de Zamorano para el gen de la lactoferrina	11
4. Polimorfismos de lactoferrina significativos en el hato lechero de Zamorano	12
5. Porcentaje de heredabilidad de diferentes características de interés en un animal de producción lechera.....	17

Figuras	Página
1. Ilustración del folículo piloso utilizado para la extracción de ADN, recolectado de la granja productiva de Zamorano	3
2. Descripción y recomendaciones de adecuación de los primers diseñados para proceso de PCR.....	7
3. Descripción de las diferentes situaciones interpuestas al momento de analizar las secuenciaciones de los animales.....	10
4. Ilustración de la organización del código necesario para la generación de los codones, la traducción y generación de los diferentes aminoácidos	13
5. Red de interacción del gen de la lactoferrina (LTF) y otros genes candidatos asociados en su actividad funcional	15

Anexos	Página
1. Procedimiento de extracción, lavado y purificación de ADN.....	23
2. Programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN.....	24

1. INTRODUCCIÓN

La producción cárnica y láctea en Honduras se caracteriza por su estacionalidad, ya que la producción de leche depende de la existencia de pasturas y forrajes, por lo tanto, de la presencia o ausencia de lluvias durante el año. Durante las estaciones climáticas que marcan el territorio hondureño, las cuales son verano e invierno suelen ser contraproducentes una de otra, pues durante la época seca los productores pequeños dejan de producir leche, mientras que los mediano y grandes productores se mantienen produciendo la mayor parte del año (Fujisaka *et al.* 2008). Sin embargo, el hato lechero de Zamorano mantiene su producción todo el año dado que proporciona la mayoría de la materia prima a la planta procesadora de Zamorano, la cual suele mantener su precio de compra de leche cruda clase A en un monto exacto de USD 0.47 durante la mayoría del año, pero este precio suele tener una ligera variación durante la época de invierno debido a la alta oferta que se presenta en el mercado (Información proporcionada por instructor de Planta de Lácteos en conferencia de Comercialización de la leche).

La producción lechera (producción primaria) es un negocio de alta rentabilidad, el cual está asegurado por el valor de cada una de las vacas en producción y por el número de lactancias que llegue a tener cada vaca (Utrera *et al.* 2010). En Honduras los cruzamientos con mayor desempeño se han determinado analizando caracteres productivos y reproductivos de los diferentes ejemplares existentes en el territorio. Según Juárez Sierra y Marsan Serrano (2013) los mejores cruces en cuestión de producción láctea fue Holstein × Otra Raza ($5,029 \pm 83$ kg) y Pardo Suizo × Otra Raza ($4,838 \pm 160$ kg), mientras que los cruces de Jersey × Otra Raza ($4,431 \pm 200$ kg) mostraron los peores rendimientos de leche. Los cruces pueden ser muy variados (La mayoría son consecuentes de las decisiones de los ganaderos). Según Morante Brigneti y Trejo Ramos (2003) las razas más comunes utilizadas en las ganaderías lechera de Honduras se conforman por hatos con razas puras tales como Holstein, Pardo Suizo y Jersey, asimismo, existen hatos que usan diferentes proporciones de castes de las razas anteriormente mencionados tales como Holstein con Pardo Suizo y Holstein con Jersey.

En la actualidad los programas de mejoramiento genético han desarrollado estrategias biotecnológicas como la inseminación artificial (IA) y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) para la obtención de animales doble propósito -producción de carne y leche-, a partir de los cruzamientos interraciales y selección genética (Carvajal y Kerr 2015). Asimismo, se utilizan técnicas tales como la transferencia de embriones y la entrecruza de animales (complementariedad genética). Asimismo, las estrategias de biotecnología más comunes utilizadas en hatos lecheros especializados en Honduras son la prueba de progenies que busca analizar la descendencia de una vaca reproductora, mientras que la otra estrategia que es de mayor uso es el análisis por pedigrí, el cual busca analizar un toro mediante los registros de su padre, madre y abuelos. Sin embargo, no existe documentación que realmente demuestre cuantos ganaderos y en que proporciones se usan estas estrategias biotecnológicas para selección de animales y mejoramiento genético de hatos lecheros.

En los últimos años la implementación de herramientas de genética molecular a través del uso de los marcadores moleculares (por ejemplo, “Single-nucleotide polymorphism”) ha abierto la posibilidad de intensificar el mejoramiento genético a través del descubrimiento de sitios en el

genoma bovino que están significativamente asociados a caracteres de interés económico como la producción de leche su composición o la susceptibilidad o resistencia a enfermedades como la mastitis. Es por eso, que el mejoramiento genético de la capacidad de respuesta inmunológica del animal hacia diferentes situaciones de infección es necesario seguirla mejorando. La mastitis es una enfermedad muy compleja que puede ser ocasionada a partir de bacterias, protozoarios, hongos y común del ganado lechero, lo que causa grandes pérdidas económicas para la industria láctea en todo el mundo (Janzen 1970; Lescourret y Coulon 1994; Nash *et al.* 2003; Ruegg 2003; Yuan *et al.* 2012). Las pérdidas por mastitis en el mundo se estima que rondan los 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.* 2002; O'Flaherty *et al.* 2005).

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP, por sus siglas en inglés (“Single-nucleotide polymorphism”) son las más abundantes variaciones genéticas en genomas de mamíferos, ocurriendo en regiones reguladoras, exón e intrón de genes (Teng y Gladwell 2006). Hasta el momento, los SNP son considerados como una herramienta de estudio para el manejo y mejoramiento de poblaciones bovinas. Las predisposiciones genéticas o también conocido como el efecto bruto que tienen los genes sobre una característica de importancia productiva, han sido ampliamente estudiados en investigaciones de animales mediante el uso de marcadores genéticos. El uso de este tipo de marcadores moleculares permite obtener hallazgos de alta relevancia, ya que, al conocer el efecto de un marcador genético sobre una característica productiva, el marcador puede ser utilizado como un indicador para seleccionar animales de interés (Martinez 2018).

En los últimos años el descubrimiento de diferentes genes candidatos asociados a la mastitis permitió encontrar el gen de la lactoferrina (LTF), la cual es una hormona que se encuentra en diversas secreciones mucosas como la leche, las lágrimas y la saliva (Wakabayashi *et al.* 2004; Rodríguez *et al.* 2013). La lactoferrina es un componente abundante de glóbulos blancos (neutrófilos) y puede ser liberada al plasma sanguíneo por la acción de éstos (Schwarcz *et al.* 2008; Rodríguez *et al.* 2013). La LTF humana y bovina, despliegan un amplio espectro antimicrobiano, actuando contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y contra algunos virus y hongos (Shukla y Spear 2001; Rodríguez *et al.* 2013). Inicialmente se pensó que esta actividad antimicrobiana se debía únicamente a su capacidad de secuestrar hierro (Rong-Hua y Schryvers 2002; Rodríguez *et al.* 2013). El efecto bacteriostático de la LTF en su forma de LTF hormonal se ha atribuido a su habilidad de captar el ion Fe^{3+} (presente en la sangre) y limitar así su utilización por bacterias patógenas, que lo requieren como factor esencial para su crecimiento y expresión de factores de virulencia (Orsi 2004; Rodríguez *et al.* 2013). Los objetivos de la presente investigación fueron:

- Determinar la distribución productiva de las vacas productoras Holstein de Zamorano.
- Secuenciar el gen de la lactoferrina bovina en una muestra de vacas Holstein de Zamorano.
- Descubrir variaciones específicas en los sectores del gen de lactoferrina secuenciados potencialmente relacionados a la resistencia a mastitis.
- Analizar las frecuencias de las variaciones encontradas para determinar su asociación potencial con extremos productivos de las vacas productoras de Zamorano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal (LBA), del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional de México, en asociación con la Unidad de Ganado Lechero de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La investigación en asociación con ambas partes mantuvo una duración de tres meses comenzando el 6 de enero de 2020 y finalizando el 12 de abril de 2020.

Origen del material biológico

Las muestras para este estudio se obtuvieron del lote lechero ubicado en el municipio de San Antonio de oriente, Zamorano, Honduras. El hato lechero de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano cuenta con 126 vacas de la raza Holstein en ordeño.

Se colectaron muestras de los folículos pilosos de la punta de la cola del animal durante el ordeño de la tarde (2 P.M. - 5 P.M.) y se almacenaron en sobres de papel manila a temperatura ambiente (18 - 24 °C). Subsecuentemente, las muestras fueron identificadas con el número (tatuaje) del animal. Las muestras posteriormente fueron trasladadas hacia el Centro de Biotecnología Genómica del IPN para sus análisis correspondientes.

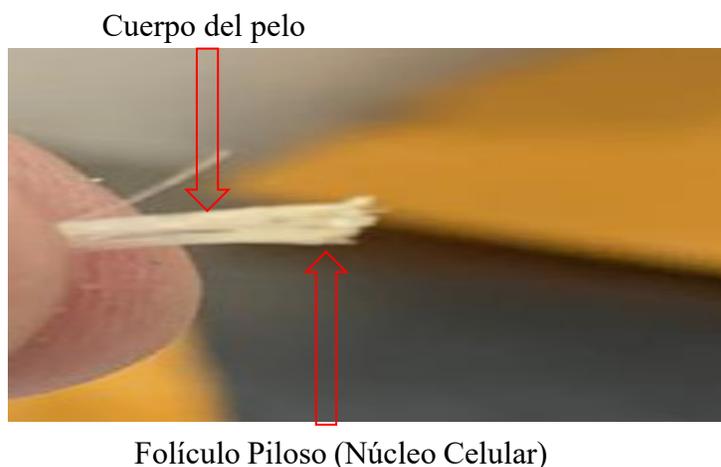


Figura 1. Ilustración del folículo piloso utilizado para la extracción de ADN, recolectado de la granja productiva de Zamorano.

Fuente de datos

Se obtuvieron los datos productivos y reproductivos de las 126 vacas seleccionadas a partir del respaldo de la aplicación VAMPP BOVINO[®] 3.0. La información productiva y sanitaria de estos animales, se extrajo en un documento de Excel para examinar las variables productivas y reproductivas de interés con la finalidad de que puedan realizarse proyecciones estadísticas.

La información procesada logró la identificación de vacas sin historial de mastitis (n = 12), aquellas con un evento de mastitis (n = 22) y las que tuvieron dos o más eventos de mastitis durante su vida productiva (n = 4) Estas vacas fueron consideradas como base de los grupos extremos y seleccionadas para el posterior análisis genómico.

Selección de los individuos: se determinó mediante un análisis estadístico escoger tres grupos de animales por separado, el grupo de baja repetición lo conformaron 22 (veintidós) animales con una frecuencia a mastitis de una vez con una variable limitante de 2 lactancias/animal. El grupo de alta repetición lo conformaron cuatro animales con una frecuencia a mastitis de dos veces con una variable limitante de 2 lactancias/animal y el grupo testigo lo conformaron 12 animales con una frecuencia a mastitis de cero veces con una variable limitante de 2 lactancias/animal.

Extracción de ADN a partir de pelo

Para la correspondiente extracción de ADN de los núcleos celulares de las células del folículo piloso se utilizó el kit especializado “de GenElute Genomic™” DNA CAT. G1N350. Proveniente de la casa comercial Sigma Aldrich, SL Misuri, EUA. Se utilizó específicamente el método de extracción por columnas, con ciclos de limpieza y purificación del ADN. En el Anexo 1 se describe el procedimiento requerido para la adecuada extracción de ADN a partir de folículo piloso.

Análisis de la calidad del ADN

Después de la extracción de ADN proveniente de los folículos piloso extraído de las vacas Holstein, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1.5% (se usaron combinación de tiempo-voltaje, tales como 90 voltios/40 min o 110 voltios/30 min). El marcador de peso molecular utilizado fue el λ DNA de 50 ng, el colorante fue “SYBR green”.

La visualización del gel se realizó por medio del fotodocumentador “Kodak Gel Logic” 112. Se cuantificó la concentración de ADN de cada una de las muestras por medio del software “Kodak Molecular Imaging Software®” v.5.0.1.27 de Carestream Health Inc.

Selección de genes candidatos

Para la selección de genes candidatos se considerando dos criterios: a) que el gen estuviera implicado en la producción de leche, b) que estuviera implicado en la resistencia a mastitis. Se buscaron las secuencias genómicas que estuvieran disponibles en la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y “Genome Software” (ENSEMBL). Una vez que se realizó la recopilación y síntesis de la información se eligió lactoferrina con referencia ENSBTAG0000001292 quien cumplió con los criterios de selección, además que ha sido reportada de participar ampliamente en la producción de leche y la resistencia a mastitis en otras especies y se han encontrado diferentes polimorfismos con efectos en el fenotipo de producción de leche y resistencia a mastitis.

Dilución de la concentración de ADN

Se determinó utilizar una concentración final de 10 ng/1 μ l (la concentración final fue establecida utilizando como punto de referencia la menor concentración obtenida a partir del kit de extracción

de ADN) por lo cual fue necesario diluir las muestras obtenidas mediante el kit de extracción “GenElute™ Genomic” DNA CAT. G1N350 (Sigma Aldrich, SL Misuri, EUA). No obstante, fue necesario el uso de operaciones matemáticas para la correcta dilución de las muestras.

Al momento de cuantificar, se requirió dividir el resultado entre dos (2) debido a que se suministró 2 µL de ADN por muestra al momento de realizar la electroforesis y realizar la cuantificación, utilizando la ecuación 1:

$$\text{ADN} / 1 \mu\text{L} = X / 2 \quad [1]$$

Donde:

ADN / 1µL = Cantidad de ng de ADN, diluidos en un microlitro de solución.

X = Cuantificación de ADN obtenida mediante la lectura del fotodocumentador.

2 = Es el número de µL de ADN añadidos a la solución de lectura de la electroforesis.

Del mismo modo, al obtener dicho resultado se utilizó una fórmula de igualación de concentración y volúmenes para obtener una disolución exacta de 10 Ng/1µL, el cual se utilizó para los procedimientos de PCR (ecuación 2).

$$\frac{c1}{v1} = \frac{c2}{v2} \longrightarrow C1 = \frac{(C2)*(V1)}{V2} \longrightarrow V2 = \frac{(C2)*(V1)}{C1} \quad [2]$$

Donde:

V2 = Volumen de ADN necesario para una disolución establecida.

C2 = Concentración de ADN que requerimos en la disolución.

V1 = Volumen obtenido mediante el Kit de extracción de ADN.

C1 = concentración de ADN obtenida en la cuantificación de ADN.

Diseño de oligonucleótidos para cada gen

Se diseñaron los pares de oligonucleótidos en la interface de la aplicación “PrimerBLAST” del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tomando como base la secuencia reportada ENSBTAG00000001292, así como la longitud ideal de oligonucleótido para patrones no mayor de 1500 pb, temperatura de alineamiento (Tm), contenidos en G/C y cadenas de polipirimidinas (T,C) o polipurinas (A,G), complementariedad, especificidad, secuencia 3’ y 5’ terminal y regiones centrales.

La longitud de los oligonucleótidos para el gen de lactoferrina se diseñó de tal forma que se traslapara las regiones para la obtención de una cobertura total al momento de la secuenciación. Para el gen de la lactoferrina bovina se diseñaron tres pares de oligonucleótidos, para la secuenciación de la región promotora del gen de lactoferrina y abarcar del exón I. Una vez que se decidieron cuáles serían los oligonucleótidos para el gen de Lactoferrina, estos se comenzaron a sintetizar a una casa comercia especializada en la fabricación de “primers” para luego ser utilizados en la amplificación de los sectores de interés del gen de lactoferrina.

Optimización de los oligonucleótidos para el gen candidato

La importancia de optimizar los primers consiste en encontrar la forma más eficiente de utilizar los reactivos, el banco de ADN y el termociclador. La práctica consistió en cuatro ensayos experimentales en los cuales se incluían controles negativos (no contenían ADN) con la finalidad de poder confirmar que no existió la posibilidad de contaminación durante la preparación de las mezclas de reactivos. De la misma forma, al concluir la PCR de los cuatro ensayos experimentales, se procedió a realizar un gel de agarosa al 1.5%, con la finalidad de realizar una electroforesis que permitiera realizar una lectura de la amplificación del fragmento de ADN de interés mediante el uso del fotodocumentador “Kodak Gel Logic 112” y el “Kodak Molecular Imaging Software® v.5.0.1.27” de Carestream Health Inc. (Figura 2).

Optimización de los oligonucleótidos de lactoferrina

La optimización de los tres pares de “primers” para los genes candidatos a lactoferrina se realizó mediante dos programas de PCR-TD 55 y PCR-TD 60 (Anexo 2), previamente establecidos en el termociclador, los ensayos tenían como objetivo poder amplificar el ADN de un mismo individuo variando los volúmenes de tres reactivos (ADN, MgCl₂ Primers) propios de la mezcla de PCR y la temperatura de acción de los ciclos que componen una PCR (desnaturalización, hibridación y síntesis). Los primers para lactoferrina obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 1. Condiciones experimentales utilizadas en las soluciones de reacción para la amplificación de las regiones de interés de lactoferrina

Experimento	Condiciones del experimento		Primer 1	Primer 2	Primer 3
A	ADN	Bajo	Amplificó	Amplificó	Amplificó
	MgCl ₂	Bajo			
	Iniciadores	Alto			
	Temperatura	Alto			
B	ADN	Bajo	Amplificó	No Amplificó	Amplificó
	MgCl ₂	Alto			
	Iniciadores	Bajo			
	Temperatura	Bajo			
C	ADN	Alto	Amplificó	No Amplificó	Amplificó
	MgCl ₂	Bajo			
	Iniciadores	Bajo			
	Temperatura	Bajo			
D	ADN	Alto	Amplificó	Amplificó	Amplificó
	MgCl ₂	Alto			
	Iniciadores	Alto			
	Temperatura	Alto			

Upper Primer: 21-mer 5' TGCATATCCACCCCAACAGG 3' Lower Primer: 24-mer 5' CGCAATACAGCTCCAGAAAACAG 3'			Upper Primer: 21-mer 5' GTTCCTGTCTCCACCTATA 3' Lower Primer: 20-mer 5' GCGCCCCAGCCTCCCTCCTC 3'			Upper Primer: 22-mer 5' GGTCCCAAGCACTTTAGATAC 3' Lower Primer: 24-mer 5' ACTGAGGGGTGAGGGGACTGGATG 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer	DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer	DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	59.0 °C	58.9 °C	Primer Tm	50.5 °C	65.8 °C	Primer Tm	49.3 °C	63.1 °C
Primer Overall Stability	-42.8 kcal/mol	-46.0 kcal/mol	Primer Overall Stability	-37.4 kcal/mol	-47.3 kcal/mol	Primer Overall Stability	-39.1 kcal/mol	-47.2 kcal/mol
Primer Location	14..34	783..740	Primer Location	629..649	1284..1265	Primer Location	921..942	1544..1521
Product Tm - Primer Tm	20.8 °C		Product Tm - Primer Tm	33.2 °C		Product Tm - Primer Tm	35.8 °C	
Primers Tm Difference	0.1 °C		Primers Tm Difference	15.3 °C		Primers Tm Difference	13.8 °C	
Optimal Annealing Temperature	58.4 °C		Optimal Annealing Temperature	58.8 °C		Optimal Annealing Temperature	59.4 °C	
Product Length	750 bp		Product Length	656 bp		Product Length	624 bp	
Product Tm (%GC Method)	79.5 °C		Product Tm (%GC Method)	83.6 °C		Product Tm (%GC Method)	85.0 °C	
Product GC Content	50.0%		Product GC Content	60.4%		Product GC Content	63.8%	
Product Tm at 6xSSC	101.1 °C		Product Tm at 6xSSC	105.2 °C		Product Tm at 6xSSC	106.6 °C	

Product Melting Temperature (%GC Method)						
Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.008	51.3	44.8	38.3	18.8
10	0.051	0.062	67.9	61.4	54.9	35.4
50	0.256	0.312	79.5	73.0	66.5	47.0
165	0.846	1.031	88.1	81.6	75.1	55.6
330	1.692	2.062	93.1	86.6	80.1	60.6
500	2.564	3.125	96.1	89.6	83.1	63.6
1000	5.128	6.250	101.1	94.6	88.1	68.6
195	1.000	1.219	+0.0	%formamide = Tm 89.3 °C		

Product Melting Temperature (%GC Method)						
Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.008	55.4	48.9	42.4	22.9
10	0.051	0.062	72.0	65.5	59.0	39.5
50	0.256	0.312	83.6	77.1	70.6	51.1
165	0.846	1.031	92.2	85.7	79.2	59.7
330	1.692	2.062	97.2	90.7	84.2	64.7
500	2.564	3.125	100.2	93.7	87.2	67.7
1000	5.128	6.250	105.2	98.7	92.2	72.7
195	1.000	1.219	+0.0	%formamide = Tm 93.4 °C		

Product Melting Temperature (%GC Method)						
Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.008	56.8	50.3	43.8	24.3
10	0.051	0.062	73.4	66.9	60.4	40.9
50	0.256	0.312	85.0	78.5	72.0	52.5
165	0.846	1.031	93.6	87.1	80.6	61.1
330	1.692	2.062	98.6	92.1	85.6	66.1
500	2.564	3.125	101.6	95.1	88.6	69.1
1000	5.128	6.250	106.6	100.1	93.6	74.1
195	1.000	1.219	+0.0	%formamide = Tm 94.8 °C		

Figura 2. Descripción y recomendaciones de adecuación de los primers diseñados para el proceso de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa de lactoferrina (LTF)

Mediante la optimización de los oligonucleótidos de lactoferrina se obtuvieron las condiciones más apropiadas para la amplificación de los “primers” en todas las muestras seleccionadas. Las condiciones para la amplificación de los primers se formularon de la siguiente forma para la mezcla o soluciones de reactivos de PCR; en cuestión de formulación, las soluciones constaban con una baja cantidad de ADN y cloruro de magnesio (MgCl₂), mientras que los iniciadores y la temperatura de acción (TD60) fueron altas.

Cuadro 2. Descripción de los volúmenes de reactivos necesarios para el procesamiento de una muestra de PCR.

Reactivos	Stock	Concentración Final	Volumen Final (µL)	Vol/Reacción	Vol/Mix
Buffer	5	1.0	12.5	2.50	2.50
MgCl ₂	25	1.5	12.5	0.75	0.75
dNTP's	10	0.2	12.5	0.25	0.25
Primer F'	5	0.1	12.5	0.25	0.25
Primer R'	5	0.1	12.5	0.25	0.25
Taq Polimerasa	5	0.1	12.5	0.25	0.25
ADN				0.50	0.50
Suma					4.75
Agua MiliQ					7.75
Vol Total					12.50

Vol: Volumen

Mix: Solución

La finalidad de obtener un volumen tan alto consistía en las siguientes prácticas a realizar una vez finalizado los PCR, se procedía al desarrollo de un gel de agarosa al 1.5% para el desarrollo de una electroforesis y corroborar que el fragmento que se había amplificado era el correcto mediante su conteo de pares de bases, este conteo de pares de bases ya se tenía previamente mediante el análisis del gen de lactoferrina para el desarrollo de los “primers”, es decir, se conocía el máximo de pares de bases que debía amplificar el primer que se había mandado a sintetizar. La electroforesis constaba de 30 minutos a un voltaje entre los 110 y 112 voltios para la migración de la muestra (se utilizaron para las muestras de PCR 2 µL de la mezcla de PCR y 3 µL de “SYBR green”, mientras que para el marcador de pares de bases de utilizaron 4 µL de “SYBR green” y 1.5 µL de marcador de 100 pares de bases). Una vez finalizada la electroforesis se prosiguió a realizar la cuantificación de las muestras.

Secuenciación del gen de lactoferrina

Una vez finalizado todos los PCR, se inició la preparación de las muestras para ser secuenciadas. Las muestras fueron preparadas para un volumen final de 8 µL, las muestras incluían 6 µL de la solución de PCR y 2 µL de agua MiliQ. La mezcla se añadió a un tubo de secuenciación con la premezcla utilizando el kit Simple Seq de “Eurofin Genomics” (Eurofins Scientific, Luxemburgo). Los resultados de la secuenciación se recibieron de forma electrónica y se analizaron con el

software “Unipro UGENE[®]” (Okonechnikov *et al.* 2012) para detectar los polimorfismos que fueran observados en al menos cuatro individuos y la información, se extrajo en un documento de Excel todas las mutaciones existentes en las secuencias con respecto al gen de lactoferrina previamente establecido en la literatura científica.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Experimental Verdadero en el cual se seleccionaron los animales con un genoma con pureza 4/4 Holstein o como mínimo 2/4 Holstein, bajo el criterio de que es la raza bovina con mayor producción láctea en el hato lechero, además de ser la raza que conforma cerca del 50% del hato lechero de Zamorano (se requiere la mayor población existente). Mediante el historial médico de las vacas seleccionados se establecieron los grupos experimentales (susceptibles) y los grupos testigos (resistentes) usando como variable limitante dos ciclos completos lactantes. Asimismo, para determinar la asociación entre la ocurrencia de repeticiones con las que se encontraban los polimorfismos identificados entre los grupos experimentales y testigos se hizo uso de la prueba exacta de Fisher, dicha prueba fue corrida en el programa estadístico “Software SAS[®] University edition” (SAS Institute, Cary NC, EUA). Mediante el uso de este software se compararon las frecuencias observadas de cada polimorfismo entre los grupos de vacas susceptibles a mastitis y vacas resistentes a mastitis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alineación de los fragmentos de interés del gen de lactoferrina

Las secuencias fueron alineadas en el software “Unipro UGENE[®]” (Okonechnikov *et al.* 2012) para identificar los polimorfismos en el exón I y en la región promotora del gen de lactoferrina en ganado Holstein. La alineación se establece de acuerdo con la secuencia de referencia ENSBTAG00000001292 de lactoferrina bovina.

El gen de la lactoferrina bovina (bLTF) está localizado en el cromosoma 22 del genoma bovino, se extiende sobre 33.4 kb, contiene 17 exones, 16 intrones y 1122 pb (pares de bases) de región promotora (NCBI: NC_007320.4). En este estudio, se analizaron tanto la región promotora como el exón I, para la región promotora se encontró que estaba muy conservada y no se observaron polimorfismos. Sin embargo, en el exón I fue donde se encontraron muchos cambios, entre los cuales se eligieron aquellos con mayor frecuencia para analizar.

Al momento de realizar la alineación de las pares de bases conforme al gen de referencia ENSBTAG00000001292 se encontraron los polimorfismos existentes, los vacíos o gaps y las bases no secuenciadas. Las cuales se demuestran en la Figura 3.

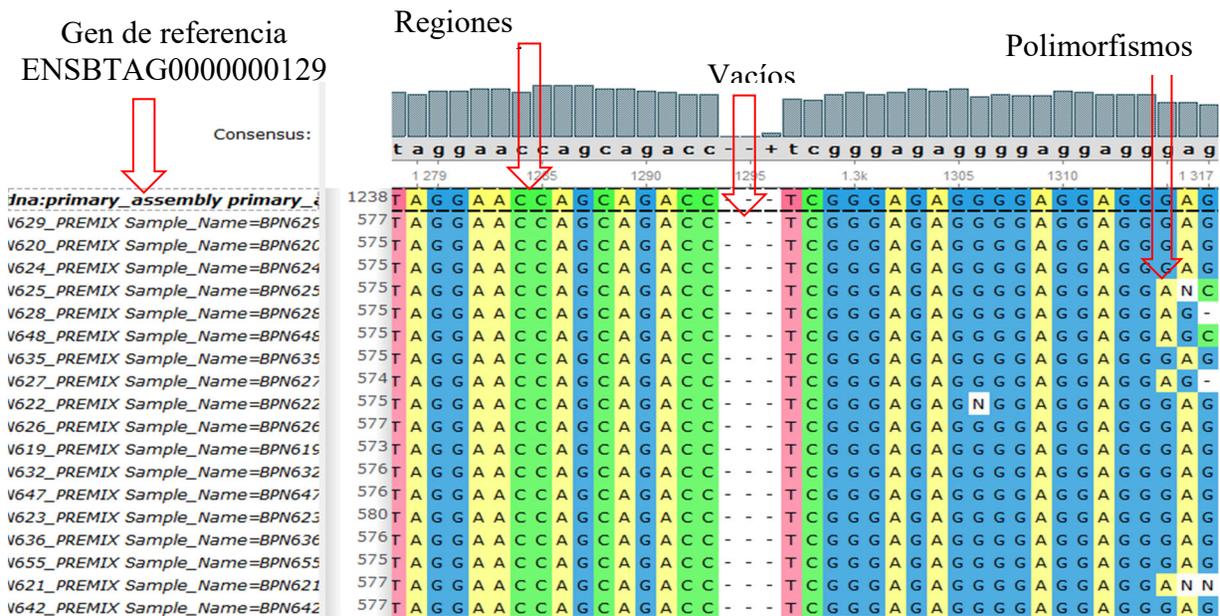


Figura 3. Descripción de las diferentes situaciones interpuestas al momento de analizar las secuenciaciones de los animales analizados.

Polimorfismos encontrados en el gen de lactoferrina

El Cuadro 3, muestra los cambios encontrados en diferentes sitios del exón 1 del gen de lactoferrina, el polimorfismo encontrado, el tipo de cambio (transición o transversión), su frecuencia y el valor de probabilidad obtenido de la prueba exacta de Fisher para determinar su asociación con el grupo de susceptibilidad a la mastitis.

Los polimorfismos que tienen un valor $P \leq 0.05$ según la prueba de distribución de Fisher, se consideran datos significativos, es decir, se presentan con una frecuencia amplia en la muestra de la población analizada, mientras que los polimorfismo que tienen un valor $P \leq 0.08$ son polimorfismos en tendencias que pueden llegar a ser significativos si se vuelven a secuenciar el exón 1 en los mismo animales aumentando la precisión del trabajo de la PCR o evaluando diferentes regiones del gen de lactoferrina.

Cuadro 3. Polimorfismos encontrados en el hato lechero de Zamorano para el gen de la lactoferrina.

Sitio	Polimorfismo	Tipo de cambio	Frecuencia	Valor de P
305	G>A	Transición	0.13	0.0833*
350	G>A	Transición	0.13	0.0833*
358	T>C	Transición	0.16	0.0284**
365	G>A	Transición	0.13	0.0833*
394	G>A	Transición	0.13	0.0833*
432	A>G	Transición	0.13	0.0833*
457	A>G	Transición	0.13	0.0833*
479	T>G	Transición	0.13	0.0833*
497	G>A	Transición	0.13	0.0833*
501	G>A	Transición	0.13	0.0833*
568	T>C	Transición	0.1	0.1514
299	C>G	Transversión	0.13	0.0833*
300	G>C	Transversión	0.13	0.0833*
303	C>G	Transversión	0.13	0.0833*
310	A>C	Transversión	0.13	0.0833*
325	T>G	Transversión	0.13	0.0833*
353	A>T	Transversión	0.13	0.0833*
363	T>A	Transversión	0.13	0.0833*
403	G>C	Transversión	0.16	0.0284**
415	G>C	Transversión	0.16	0.0284**
427	C>G	Transversión	0.16	0.0284**
435	A>C	Transversión	0.16	0.0284**
464	G>C	Transversión	0.13	0.0833*

**P ≤ 0.05 *P ≤ 0.10

Fuente: Unipro UGENE (Okonechnikov *et al.* 2012).

Es innegable que puedan existir otros polimorfismo diferentes o iguales a los mostrados en esta investigación, por lo tanto, los polimorfismos que fueron significativos son de amplio interés ya que pueden ser asociados a una característica productiva de interés para el desarrollo del hato lechero.

Polimorfismos significativos del gen de lactoferrina en el exón 1

El Cuadro 4, muestra los cambios encontrados en diferentes sitios del exón 1 del gen de la lactoferrina, el polimorfismo encontrado, el tipo de cambio, su frecuencia y el valor de probabilidad obtenido de la prueba exacta de Fisher para determinar su asociación con el grupo de susceptibilidad a la mastitis.

Cuadro 4. Polimorfismos de lactoferrina significativos en el hato lechero de Zamorano.

Sitio	Polimorfismo	Tipo de cambio	Cambio	Frecuencia	Valor de P
358	T>C	Transición	Purina/Purina	0.16	0.0284**
403	G>C	Transversión	Purina/Pirimidina	0.16	0.0284**
415	G>C	Transversión	Purina/Pirimidina	0.16	0.0284**
427	C>G	Transversión	Pirimidina/Purina	0.16	0.0284**
435	A>C	Transversión	Purina/Pirimidina	0.16	0.0284**

Hay que considerar que el tipo de cambio es de amplio interés debido a que involucra cambios de transversión y transición en la lectura del ADN, es decir, estos cambios pueden proporcionar una diferencia en la lectura del código genético (codones) para la producción de ciertos aminoácidos de la proteína de lactoferrina que tiene una función bacteriostática. Por ejemplo, el polimorfismo G>C presenta un cambio de transversión en la posición 415. Si se traduce este polimorfismo del código genético a sustancias bioquímicas se produciría el aminoácido Lisina (AAG) o Asparagina (AAC), también se podría desarrollar el aminoácido ácido aspártico (GAC) o ácido glutámico (GAG) y así sucesivamente se pueden crear una gran variedad de aminoácidos cuando existen modificaciones en la lectura de los codones del código genético, que pueden tener un impacto positivo o neutro en el desarrollo y efecto de la proteína. Además, se debe considerar que la predicción del efecto sobre la proteína de los polimorfismos encontrados no se pudo estimar por limitantes (tiempo, accesibilidad de trabajo en los laboratorios.) de fuerza mayor durante el desarrollo de la investigación producidas por la pandemia COVID-19. Sin embargo, existe la posibilidad de poder determinar el efecto real de estos polimorfismos en un futuro.

La Figura 4, demuestra la lectura de los codones y el producto de dicha lectura. Existen 64 lecturas de codones, los cuales pueden representar el inicio de una lectura, la traducción de aminoácidos, la cual puede dar como resultado un mismo aminoácido o un aminoácido diferente según el codón que presente la lectura y la finalización de la lectura.

		Segunda Letra								
		U		C		A		G		
Primera Letra	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Try	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
	AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
	AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGG	Gly	A	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	
		Tercera Letra								

Figura 4. Ilustración de la organización del código necesario para la generación de los codones, la traducción y generación de los diferentes aminoácidos.
Fuente: BIOINNOVA 2017.

Es importante resaltar que la frecuencia de los cambios encontrados era más alta en el grupo de vacas que no manifestaron la mastitis clínica (resistencia inmunológica), es decir, los polimorfismos significativos se encontraban en las vacas que según el programa de registro VAMPP BOVINO[®] 3.0 indicaba que jamás se había registrado un evento de mastitis durante sus dos primeras lactancias, y la frecuencia del polimorfismo en el grupo susceptible fue de tan solo el 3%. Es decir, para el gen de lactoferrina casi todas las vacas que habían presentado susceptibilidad a mastitis compartían la misma secuencia de bases nitrogenadas para el gen de lactoferrina (Figura 2). De toda la población analizada únicamente el 13% presenta polimorfismos frecuentes al cambio, provocando una resistencia metabólica por parte del animal a la enfermedad de mastitis.

Asociación de lactoferrina con componentes en la leche

En la actualidad, las lecherías especializadas tienen un objetivo muy específico en cuestión de sus programas de reproducción modernos, están fuertemente ligadas a incorporar de forma constante una mayor resistencia a la mastitis, esto sin afectar los genes ligados a niveles productivos de las vacas (Hayes *et al.* 2009; Beecher *et al.* 2010).

Según Corbellini (2002), en promedio el 1% de los cuartos mamarios de las vacas lecheras presentan infecciones por bacterias Gram negativas (Gram -). A diferencia de las bacterias Gram positivas (Gram +) que suelen tener una tasa del 35 al 50% de infección en los cuartos mamarios, en un mismo lapso. Así, se ha estimado que para observar una infección mamaria por bacterias Gram - se requiere que las vacas productoras pasen por un procedimiento de 2,000 a 4,000 ordeños durante su vida productiva. Sin embargo, para las bacterias Gram + las vacas productoras deben pasar por un proceso de 600 a 800 ordeños para presentar una infección por Gram +. Aun así, la infección causada por bacterias Gram - son las causantes de aproximadamente del 30 al 50% de todos los casos de mastitis clínica.

Las vacas con secreciones lácteas que presenten un conteo de células somáticas $<200,000$ cel/mL no suelen presentar infecciones por patógenos que puedan provocar una mastitis, mientras que si la secreción láctea cuenta con un umbral $\geq 300,000$ CCS representa automáticamente un cuadro de infección en los cuartos mamarios. Por lo general, el conteo de células somáticas para diagnosticar mastitis se encuentra entre $200,000$ CCS a $300,000$ CCS. Mediante agencias reguladoras de varios países y con ayuda de la investigación se ha determinado límites superiores de CCS en leche cruda, llegando a tener como límite en la Unión Europea $400,000$ cel/mL, mientras que los Estados Unidos han impuesto un límite de $750,000$ cel/mL (Smith 1996).

La proteína de lactoferrina es una proteína que se encuentra en las secreciones que captura los iones de Fe^{3+} presentes en la sangre del animal y limita su uso por parte de las bacterias patógenas presentes en algún área de la anatomía del animal permitiendo a los anticuerpos atacar al huésped microbiano es su etapa más temprana. Se ha determinado una asociación fuerte entre la producción de lactoferrina y la variación de las concentraciones de células somáticas presentes en la secreción láctea de las vacas en ordeño (Serrano *et al.* 2008).

La producción de lactoferrina permite combatir las infecciones mamarias mediante el sistema inmunológico propio de la vaca, es decir, el animal produce sus propias sustancias endocrinas tales como glóbulos blancos, proteínas antimicrobianas. Asimismo, se evita incurrir en gastos innecesarios de antibióticos o recibir pérdidas o castigos del precio de la leche (Hameed *et al.* 2006).

Es probable que, con los polimorfismos encontrados en el grupo de resistencia a mastitis, existan un número muy reducido de células somáticas en la secreción láctea, sin embargo, el tener muy poco animales que presenten una inmunología propia a mastitis en el hato lechero de Zamorano provoque una influencia muy baja en el conteo final de células somáticas en la leche. Pero es necesario aclarar, que no son los únicos polimorfismo presentes o asociados a resistencia a mastitis, existen muchos polimorfismos a lo largo del gen de lactoferrina tales como diferentes exones, intrones y regiones promotoras del gen de lactoferrina, aunque los conteos de células somáticas totales de la leche ordeñada en el hato lechero de Zamorano es aceptable se podría mejorar realizando estudios que asocien y confirmen estos polimorfismo con dicha característica productiva, logrando obtener un mejor precio de pago de la leche por parte de la industria procesadora de leche fluida, que podría provocar un mayor plazo de vida anaquel de la leche.

Asociación de lactoferrina como indicativo de mejoramiento genético de hatos lechero

El desarrollar investigaciones que involucren el análisis tan específico de segmentos del código genético de los animales, abre una brecha tan significativa para mejorar el concepto de mejoramiento genético, es decir, únicamente el concepto de mejoramiento genético no se enfoca en las prácticas biotecnológicas tales como complementariedad de razas (cruzamientos), inseminación artificial y transferencia de embriones. Los programas de mejoramiento genético deben ser direccionados al análisis de genes asociados a características productivas. Según Guttmacher y Collins (2002) “los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades”.

Sin embargo, estos estudios requieren de la infraestructura e inversión necesaria pero una vez bien establecidos, los resultados podrían generar mayor eficiencia y rentabilidad. Hay que considerar que la secreción de lactoferrina es una glicoproteína monomérica no hémica de unión a hierro, asimismo, la secreción de lactoferrina bovina y la humana estimulan o inhiben diversos componentes hormonales y celulares de la inmunidad que permiten la prevención y/o resolución de infecciones Gram⁻ o Gram⁺ (Serrano *et al.* 2008), es decir, que es considerada componente esencial de la inmunidad innata del hospedero y está fuertemente asociada con la producción de diferentes sustancias endocrinas. Un análisis de la interacción funcional proteína-proteína indica que la Lactoferrina está relacionada a un considerable número de genes tales como LYZ2, HP, CLU, CHI3L1, entre otros. que puedan ser candidatos para evaluar en busca de polimorfismos que puedan significativamente describir la vulnerabilidad o resistencia a la mastitis (Figura 5).

Los hallazgos del presente estudio pueden sentar las bases para el establecimiento de programas de mejoramiento genético asistido de esta y otras características de importancia económica que fomenten la eficiencia y rentabilidad de los sistemas de producción lechera en Honduras.

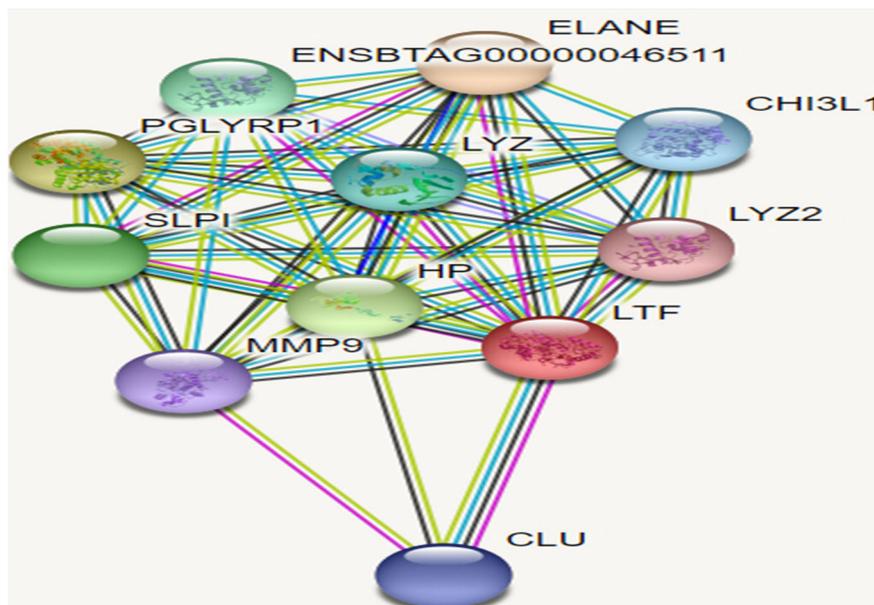


Figura 5. Red de interacción del gen de la lactoferrina (LTF) y otros genes candidatos asociados en su actividad funcional.

Fuente: String v11 (Szklarczyk *et al.* 2019).

Según Singh *et al.* (2014) muchos polimorfismos de resistencia a mastitis con respecto a la lactoferrina se encuentran en animales que son híbridos, determinaron que en su investigación al comparar las secuencias de nucleótidos del gen de lactoferrina de las vacas Deoni con ganado taurino reveló un total de 39 mutaciones puntuales. Esto podría ser un punto clave de análisis para un futuro experimento, ya que podría proporcionarnos información sobre cuáles son las mejores entrecruzas que presentan una resistencia innata a mastitis o poder confirmar que los animales

puros también tienen dicha resistencia a mastitis. Sin embargo, aún falta mucho por analizar sobre el mejoramiento genético del hato lechero de Zamorano.

O'Halloran *et al.* (2009), en su investigación identificaron diecinueve polimorfismos nuevos y algunos de estos se encontraron dentro del factor de transcripción, sitios de unión. En la presente investigación se encontraron 22 polimorfismos de los cuales únicamente cinco fueron significativos aun analizando únicamente el exón I y la región promotora gen, por lo cual aún se puede percibir que falta mucho por descubrir acerca de este gen y sobre todo su aplicación en programa de mejoramiento genético y programas de diferenciación de la leche.

Es de amplio interés para la creación de nuevos programas de mejoramiento con bases en genética molecular el descubrir la heredabilidad de las características de interés de un animal lechero, aun en la investigación que se realizó, falta por confirmar los polimorfismos descubiertos en una población Holstein más grande y a partir de esto analizar la descendencia de los animales que presentaron los polimorfismos para determinar la heredabilidad y el funcionamiento exacto que tienen estos polimorfismos en la resistencia a mastitis.

El Cuadro 5, indica que la heredabilidad teóricamente a mastitis es de un 10%, pero se debe trabajar en futuras investigaciones este porcentaje de heredabilidad y llegar a ser capaces en el hato lechero de Zamorano de reducir ese porcentaje de heredabilidad a susceptibilidad y poder aumentar el porcentaje de heredabilidad de la resistencia a mastitis, llegando a reducir las grandes pérdidas que esta enfermedad llega a causar cada año en los hatos lecheros de todo el mundo.

Estos procedimientos de heredabilidad podrían lograrse una vez finalizado la comprobación de los polimorfismos en una población más grande a la estudiada en esta investigación, mediante prácticas que permitan el análisis constante de las progenies de los animales con polimorfismos asociados a la característica de resistencia a mastitis u otra característica de interés, asimismo, tendríamos que estar realizando constantes pruebas de PCR con la finalidad de descubrir si dichos animales heredaron el polimorfismo de interés y esta manera seleccionar los reemplazos a futuro del hato lechero. Asimismo, también podríamos llegar a tener un fuerte impacto en el conteo final de células somáticas, logrando reducir dicho conteo y teniendo una leche con mayor vida anaquel, pero es necesario seguir investigando para poder hacer realidad todos estos procedimientos de mejoramiento en el hato lechero de Zamorano.

Por supuesto, este tipo de análisis de genética molecular aparte de tener un gran impacto en las bases de los nuevos programas de mejoramiento genético de los animales productivos, permite mejorar la calidad de todos los productos ofrecidos por los animales (reducción de células somáticas en la leche) y permite identificar a los animales con las mejores características tanto en el aspecto genético como en el aspecto fenotípico, permitiendo su procreación como posibles reemplazos del lote y analizando constantemente que la progenie está siendo mucho más efectiva en los ámbitos reproductivo y productivo con respecto a la media productiva de sus padres.

Cuadro 5. Porcentaje de heredabilidad de diferentes características de interés en un animal de producción lechera.

Característica	% Heredabilidad
<i>Producción</i>	
Leche	25
Grasa	25
Solidos no grasos	21
% Grasa	57
Proteína	25
% Solidos totales	54
% Proteína	50
<i>Susceptibilidad a enfermedades</i>	
Mastitis	10
Cetosis	5
Fiebre de leche	5
Ovarios quísticos	5
<i>Características Corporales</i>	
Peso corporal	35
Carácter lechero	25
Calificación del tipo	20
Eficiencia Alimentaria	20
<i>Características de la ubre</i>	
Sostén de la ubre	15
Sistema mamario	22
Profundidad de la ubre	15

Fuente: Ochoa Galván 1991.

Los análisis de genética molecular no son baratos ni de amplia accesibilidad para el ganadero común en Honduras y en muchas partes del mundo, debido al personal y los instrumentos de laboratorio requeridos para realizar las prácticas que conlleva esta tecnología. Es necesario comenzar a estandarizar estas prácticas en el sector agropecuario para mejorar los programas de mejoramiento genético y no seguir utilizando programas de mejoramiento genético con individuos con un genoma que provoquen un fenotipo no tan eficiente en cuestión de producción o que simplemente no cumplan con el perfil del animal deseado para las explotaciones lechera de la actualidad. De igual forma, se comienza a crear ganadería de precisión que garantice al productor una producción estable y eficiente, que reduzca los rangos de pérdidas y evite el desarrollo de animales que no retornaran la inversión realizada durante sus etapas productivas.

4. CONCLUSIONES

- Se descubrieron veintitrés polimorfismos en el exón I, de los cuales cinco polimorfismos fueron significativos en el exón 1 del gen de lactoferrina que no habían sido evaluadas ni patentados con anterioridad, dichos cambios en las bases nitrogenadas fueron de transición y transversión.
- Dentro del análisis expuesto, se determinó con amplia especificidad las distribuciones productivas de los animales mediante la amplia base de datos productivos y reproductivos con los que cuenta el hato lechero de Zamorano.
- En relación con lo antes expuesto, la secuenciación permitió determinar que las vacas Holstein de Zamorano presentaron regiones conservadas en su ADN conforme al gen de lactoferrina, pero también un número considerable de animales presentaron cambios en su ADN.
- De igual forma, la secuenciación permitió descubrir polimorfismos en sectores específicos del gen de la lactoferrina para los diferentes individuos estudiados, dichos polimorfismos fueron de alta frecuencia en el grupo con resistencia inmunológica a mastitis.

5. RECOMENDACIONES

- Es indispensable el implementar análisis constantes de los componentes de la leche por grupos raciales, especialmente de los animales que tienen los polimorfismos encontrados, para poder determinar si existe una relación entre los polimorfismos encontrados y la reducción considerable de las células somáticas presentes en la leche que se ordeña y de esta forma diferenciar la leche por componentes y poder obtener un mejor precio de compra.
- Es recomendable adquirir de forma inmediata una herramienta tecnológica que nos permita lecturas rápidas y constates durante el ordeño de los componentes de la leche, de esta forma se podrían determinar diferencias entre grupos genéticos.
- Es posible que aun existan muchos más polimorfismos que los que se encontraron en esta investigación, es por eso, que se deben seguir investigando muchos más sobre los polimorfismos presentes en todo el gen de lactoferrina y otros genes relacionados.
- Es indiscutible que, una vez comprobados los polimorfismos se comience a realizar prácticas biotecnológicas tales como superovulación y transferencia de embriones extraídos de las vacas que presentaron resistencia a mastitis y mediante el análisis de la descendencia que logremos de estos animales analizar la heredabilidad, asimismo, la asociación de los polimorfismos y sus efectos en la característica que consideramos de interés. Asimismo, se podrá garantizar la venta de genética para el aspecto de resistencia a mastitis y empezar a ser los pioneros en la venta de genética lechera garantizada en Honduras.

6. LITERATURA CITADA

- Beecher C, Daly M, Childs S, Berry DP, Magee DA, McCarthy T, Giblin L. 2010. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC Genetics*. 11(99): 1471-2156
- BIOINNOVA. 2017. El código Genético. Madrid (España): BIOINNOVA; [actualizado el 25 de jun. de 2017; consultado el 5 de jun. de 2020]. <https://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/el-codigo-genetico/>.
- Carvajal AM, Kerr B. 2015. Factores genéticos que influyen la composición de la leche bovina. Valdivia (Chile): Engomix; [actualizado el 8 de abr. de 2015; consultado el 24 de ene de 2020]. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/factores-geneticos-influyen-composicion-t31737.htm>
- Corbellini CM. 2002. La mastitis bovina y su impacto económico sobre la calidad de leche. Argentina: Instituto de Tecnología Agropecuaria, Proyecto Lechero, E.E.A. INTA Pergamino. *SciELO*. 251-263.
- Fujisaka S, Holmann F, Peters M, Schmidt A, White D, Burgos C, Ordoñez JC, Mena M, Posas MI, Cruz I, Davis C. 2005. Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua. Colombia: CIAT; [consultado el 16 de ene de 2020]. <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/1879/EstrategiasParaMinimizarEscasezDeForrajes-Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guttmacher AE, Collins FS. 2002. Genomic medicine - a primer. *N Engl J. Med.* 347(19): 1512-1520. eng. doi: 10.1056/NEJMra012240
- Hameed KG, Sender G, Mayntz M. 2006. Major histocompatibility complex polymorphism and mastitis resistance. A review. *Animal Science Papers and Reports*. 24(1): 11-25.
- Janzen J. 1970. Economic losses resulting from mastitis: a review. *Journal Dairy Science*. 53:1151-1161. eng. doi: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(70\)86361-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(70)86361-5/pdf)
- Juárez Sierra JA, Marsan Serrano CF. 2013. Evaluación productiva y reproductiva de vacas Holstein, Pardo Suizo, Jersey y sus cruces en el hato lechero de Zamorano, Honduras. [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. 2009. Invited review: genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *Journal of Dairy Science*. 92:433-443.

- Lescourret F, Coulon JB. 1994. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77(8) :2289-2301.
- Martinez FJ. 2018. Marcadores genéticos SNP: una herramienta biotecnológica para el estudio, manejo y mejoramiento de poblaciones de ganado bovino. México: Ganadería Pecuaria; [consultado el 24 de ene de 2020]. <https://www.ganaderia.com/destacado/Marcadores-geneticos-SNP%3A-una-herramienta-biotecnologica-para-el-estudio%2C-manejo-y-mejoramiento-de-poblaciones-de-ganado-bovino>
- Morante Brigneti LI, Trejo Ramos CO. 2013. Evaluación del comportamiento productivo y reproductivo de cruces raciales en 13 fincas lecheras de Honduras. [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Nash D, Roger GW, Cooper JB, Hargrove GL, Keown JF. 2003. Heritability of intramammary infections at first parturition and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science*. 86(8): 2684–2695. eng. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73864-8
- O’Flaherty S, Ross RP, Flynn J, Meaney WJ, Fitzgerald GF, Coffey A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Letters in Applied Microbiology*. 41(6): 482-486. eng. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01781. x.
- O’Halloran F, Bahar B, Buckley F, O’Sullivan O, Sweeney T, Giblin L. 2009. Characterisation of single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds. *Biochimie*. 91(1): 68-75.
- Ochoa Galván P. 1991. Mejoramiento genético del ganado bovino productor de leche. En: Moreno Chan R, ed. *Ciencia Veterinaria*, México D.F. (México): Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. p.68-85.
- Orsi N. 2004. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*. 17:189-196.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Varlamov A, Vaskin Y, Efremov I, Grehov G, Kandrov D, Rasputin K, Syabro M, Tleukenov T. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8): 1166-1167.
- Rodríguez N, López A, Echeverri J. 2013. Estructura genética poblacional del gen lactoferrina bovino en vacas Holstein del departamento de Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*. 18(1): 3355-3361.
- Ruegg PL. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 19(1): 47-73.

- Rong-Hua Y, Schryvers B. 2002. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochemistry and Cell Biology*. 80(1): 81-90.
- Szwarcz WD, Carnelocce L, Silva JL, Oliveira AC, Gonçalves RB. 2008. Conformational changes in bovine lactoferrin induced by slow or fast temperature increases. *Biol Chem*. 389(8):1137–1142. eng. doi:10.1515/bc.2008.116.
- Serrano ME, Romo L, Aguillón G, Luna R, Garfias H, Cabrera E, Rodríguez RC. 2008. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Medigraphic Bioquímica*. 33:71-82.
- Shukla D, Spear PG. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *The Journal of Clinical Investigation*. 108(4): 503-510. eng. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209412/>
- Singh A, Ramesha KP, Isloor S, Divya P, Akhila R, Basavaraju M, Das DN, Munde U. 2014. Single nucleotide polymorphisms in lactoferrin gene are associated with lactoferrin content in milk and somatic cell count in Deoni (*Bos indicus*) cows. *Pakistan Veterinary Journal*. 35(3): 303-308.
- Smith KL. 1996. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. *IDF Mastitis News*. 21: 7–9. eng. doi: <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/08/MastitisNewsletterNo.21.pdf>
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ. 2019. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*. 47(D1): 607–613.
- Teng CT, Gladwell W. 2006. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene. *Biochemistry and Cell Biology*. 84(3): 381–384.
- Utrera A, Calderón R, Fernández J, Lagunes J. 2010. Correlaciones genéticas y fenotípicas entre características reproductivas de vacas lecheras. *Agronomía Mesoamericana*. 21(2): 235–244.
- Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y. 2004. No detectable transfer of dietary lactoferrin or its functional fragments to portal blood in healthy adult rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68: 853-860.
- Wellenberg GJ, van der Poel M, Van Oirschot T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 88(1): 27-45. eng. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00098-6
- Yuan Z, Chu G, Dan Y, Li J, Zhang L, Gao X, Gao H, Li J. 2012. BRCA1: a new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphisms and milk somatic cell score. *Molecular Biology Report*. 39: 6625–6631.

7. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de extracción, lavado y purificación de ADN.

1. Transferir 50-100 folículos pilosos a un tubo Eppendorf™ (tubo de microcentrífuga) de 1.5 mL.
2. Adicionar 180 µL de solución de lisis T (B6678) Y 20 µL proteinasa K, mezclar la solución en un 33.4 kb Vortex® mixer por 15 seg.
3. Incubar a 55 °C/4-8 hrs., (toda la noche). Hasta observar que el folículo piloso esté completamente lisado.
4. Adicionar 200 µL de solución de lisis C (B8803); mezclar al Vortex® mixer por 15 seg, e incubar a 70 °C/10 min.
5. Agregar 20 µL RNAsa, mezclar e incubar por 2 min. a temperatura ambiente.
6. Adicionar 500 µL de solución de preparación de columnas a la misma y centrifugar a 12,000 rpm/ 1 min, descartar la solución.
7. Adicionar 200 µL de etanol al 100% de concentración al lisado y llevar al Vortex® mixer por 20 seg.
8. Transferir a la columna el lisado junto con el etanol del paso anterior y centrifugar a 6,500 rpm/ 1 min.
9. Transferir la columna a un tubo nuevo y adiciona 500 µL de solución de lavado y centrifugar a 6,500 rpm/ 1 min.
10. Transferir la columna a un tubo nuevo, adiciona 500 µL de solución de lavado y centrifugar a 12,000 rpm/ 3 min. Para secar la muestra.
11. Transferir la columna a un tubo nuevo y adiciona entre 50-80 µL de solución de elusión y centrifugar a 6,500 rpm/ 1 min.

Anexo 2. Programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN.

Programa de PCR-TD 55			Programa de PCR-TD 60		
Acción	Temperatura	Duración	Acción	Temperatura	Duración
Incubación	95 °C	5 minutos.	Incubación	95 °C	5 minutos.
Incubación	95 °C	45 segundos.	Incubación	95 °C	45 segundos.
Incubación	65 °C	45 segundos.	Incubación	62 °C	45 segundos.
<i>Disminución de ± 2 °C cada ciclo.</i>			<i>Disminución de ± 2 °C cada ciclo.</i>		
Incubación	72 °C	45 segundos.	Incubación	72 °C	1:30 minutos.
<i>Repetición del paso 2 durante 5 veces más.</i>			<i>Repetición del paso 2 durante 5 veces más.</i>		
Incubación	95 °C	45 segundos.	Incubación	95 °C	45 segundos.
Incubación	60 °C	45 segundos.	Incubación	55 °C	45 segundos.
Incubación	72 °C	1:30 minutos.	Incubación	72 °C	1:30 minutos.
<i>Repetir el paso 6 durante 30 veces más.</i>			<i>Repetir el paso 6 durante 30 veces más.</i>		
Incubación	72°C	10 minutos.	Incubación	72 °C	5 minutos.
Incubación	16 °C	Indefinidamente.	Incubación	16 °C	Indefinidamente