

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 492**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

C12Q 1/6876 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014** **PCT/NZ2014/000224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015** **WO15060732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014** **E 14855747 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023** **EP 3060682**

54 Título: **Marcadores genéticos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

25.10.2013 NZ 61704013

20.05.2014 NZ 62515014

08.07.2014 NZ 62720914

12.09.2014 NZ 63054014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2024

73 Titular/es:

**LIVESTOCK IMPROVEMENT CORPORATION
LIMITED (100.0%)
605 Ruakura Road
Newstead Hamilton, 3286, NZ**

72 Inventor/es:

**LITTLEJOHN, MATHEW, DOUGLAS y
DAVIS, STEPHEN, RICHARD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 962 492 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores genéticos y usos de los mismos

5 Campo

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a métodos para determinar si es o no más probable que un animal de ganado y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y en particular, pero no exclusivamente, a los métodos para seleccionar o rechazar animales de ganado, una o más células o embriones de ganado, y estimar el valor de un animal de ganado.

Antecedentes

La capacidad de mantener temperaturas corporales normales en condiciones de estrés por calor es un rasgo importante para el ganado bovino y otros animales. Esto es de particular importancia para los animales de las regiones tropicales y subtropicales. En ganado bovino, por ejemplo, se ha asociado el estrés por calor con disminuciones en la producción de leche, disminución en la detección del estro, menores tasas de fertilidad y embarazo, y aumentos en la mortalidad embrionaria. Estos factores pueden tener un impacto significativo en la cría de animales de producción.

Algunos animales son capaces de manera natural de regular la temperatura corporal de manera más eficaz que otros en climas tropicales y subtropicales. Un ejemplo de esto es la raza de ganado bovino Senepol. El ganado bovino Senepol tiene un pelaje muy corto y liso.

Sería útil poder identificar animales que tienen más probabilidades de mantener una temperatura corporal normal o de regular de manera más eficaz la temperatura corporal en condiciones de estrés por calor. Entonces, los animales podrían seleccionarse para incluirse en un rebaño o con fines de reproducción. Esto puede ser de particular utilidad cuando se pretende que los animales se críen en lugares donde estarán expuestos a condiciones de temperatura relativamente elevadas.

30 Objetivo

Un objetivo de la presente invención es proporcionar uno o más de un método para determinar si es más probable o no que un animal de ganado y/o su descendencia tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, un método para seleccionar o rechazar animales de ganado, un método para seleccionar o rechazar una o más células de ganado, un método para estimar el valor de un animal de ganado, y un método *in vitro* para identificar si un animal de ganado (y/o su descendencia), o una o más células de ganado o un embrión pueden tener o no un marcador relacionado con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

40 Declaración de la invención

Los inventores han identificado que una alteración o variación de secuencia en el gen del receptor de prolactina (PRLR) está asociada con un animal que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. La alteración o variación se puede utilizar como marcador genético para determinar si es más probable o no que un animal tenga una mayor tolerancia al calor. Dicha información puede utilizarse en métodos de selección, identificación y reproducción de animales, gestión de granjas y estimación del valor de un animal para una industria en particular, por ejemplo. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es más probable o no que un animal de ganado y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o incluye uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, en donde cuando el ácido nucleico incluye dicha variación genética y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, se determina que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del PRLR.

En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas en el exón final del gen *PRLR* y/o

uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, la eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la presencia de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar o rechazar un animal de ganado, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o incluye uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, en donde la presencia de una o más variaciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo implica que es más probable que el animal tenga mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, se selecciona un animal si incluye una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo y se rechaza un animal si no incluye una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del PRLR.

En una realización, se selecciona un animal si se deduce que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un animal si se deduce que no tiene más probabilidad de tener mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas en el exón final del gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende al menos las etapas de:

- a) analizar un ácido nucleico del animal para determinar el nucleótido presente en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo; y,
- b) seleccionar o rechazar un animal basándose en el nucleótido presente en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el animal se selecciona si hay una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o tiene uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de leche. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de carne. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de huevos. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de pieles, pelo, lana, piel o plumas. En una realización, el método se realiza para seleccionar o rechazar un animal por una textura de pelaje deseable. En otra realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal con fines de reproducción. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para su inclusión en un rebaño. En una realización, cuando el método es para seleccionar o rechazar un animal con fines de reproducción y/o para su inclusión en un rebaño, el método comprende determinar si el animal es o no homocigoto o heterocigoto para la una o más alteraciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización particular, el animal se selecciona cuando es homocigoto para la una o más alteraciones genéticas y/o el uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, lo

que implica que es más probable que un animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para estimar el valor de un animal de ganado y/o de su descendencia, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, en donde la presencia de una o más variaciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo implica que el animal y/o su descendencia tendrán más probabilidades de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del *PRLR*.

En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas en el exón final del gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal para determinar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, si hay una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la presencia de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende además seleccionar el segundo animal basándose en que incluye una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o tiene uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del *PRLR*.

En una realización, el primer y/o segundo animal se selecciona si se deduce que es más probable tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del *PRLR*.

En una realización, la una o más alteraciones genéticas se ubican dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas se localizan en el exón final del gen *PRLR*.

En una realización, el método comprende seleccionar el primer y/o segundo animal cuando tiene una variación genética en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o tiene uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, el método comprende seleccionar el primer y/o segundo animal cuando hay una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o tiene uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende seleccionar el primer y/o segundo animal cuando se determina que el animal es homocigoto para una o más alteraciones genéticas particulares y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar o rechazar una o más células o embriones de ganado, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicha una o más células o embriones o un animal del que se procede dicha una o más células o embriones, para determinar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o incluye uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, la presencia de dicha una o más variaciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo implica que la una o más células o embriones son adecuados para su uso en un método para reproducir o clonar un animal que es más probable que tenga mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, se selecciona una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, incluyen una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o incluye uno o más marcadores genéticos

en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, se rechazan una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, no incluye una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

- 5 En una realización, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del *PRLR*.

En una realización, la una o más alteraciones genéticas se ubican dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas se localizan en el exón final del gen *PRLR*.

En una realización, el método comprende al menos la etapa de analizar un ácido nucleico de dicha una o más células o embriones, o de un animal del que proceden una o más células o embriones, para determinar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende al menos las etapas de:

- 20 a) analizar un ácido nucleico de una o más células o embriones, o de un animal del que proceden una o más células o embriones, para determinar el nucleótido presente en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo; y,
b) seleccionar o rechazar una o más células o embriones, basándose en el nucleótido presente en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, la una o más células o embriones se seleccionan si hay una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o tiene uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método comprende determinar si la una o más células o embriones, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, es homocigoto o heterocigoto para la una o más alteraciones genéticas y/o el uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización particular, se selecciona la una o más células o embriones donde ellos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, es homocigoto para la una o más alteraciones genéticas y/o el uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar una o más células o embriones para su uso en la clonación de un animal y/o la reproducción de un animal. En una realización, reproducir un animal puede implicar FIV. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para clonar un animal de ganado, comprendiendo el método al menos la etapa de seleccionar una o más células que tienen una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o tienen uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización del quinto aspecto de la invención, una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad del *PRLR*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas se ubican dentro de una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas se localizan en el exón final del gen *PRLR*.

En una realización del quinto aspecto de la invención, los métodos comprenden seleccionar el primer y/o segundo gameto, el embrión o una o más células cuando tienen una variación genética en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* y/o tienen uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, los métodos comprenden seleccionar el primer y/o segundo gameto, el embrión o la una o más células cuando hay una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 y/o tienen uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, el método comprende seleccionar el primer y/o segundo gameto, el embrión o una o más células cuando se determina que es homocigoto para una o más alteraciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

En una realización de uno cualquiera o más de los aspectos amplios del primero al quinto de la invención, los métodos comprenden analizar un ácido nucleico para determinar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* solo o en combinación con uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, los métodos implican analizar un ácido nucleico para determinar el nucleótido presente en una posición

correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* solo o en combinación con uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

Preferentemente, el análisis de un ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera o más de los aspectos primero a quinto de la invención se produce mediante uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR); electroforesis en gel; transferencia de Southern; secuenciación de ácidos nucleicos; polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP); LCR (reacción en cadena de la ligasa); electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE); oligonucleótidos específicos de alelo (ASO); proteínas que reconocen emparejamientos incorrectos de ácidos nucleicos; protección de RNasa; hibridación de matrices de oligonucleótidos; HPLC desnaturalizante (dHPLC); fusión de alta resolución (HRM); y, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), qRT-PCR.

En el presente documento también se divulga un método para determinar si es más probable que un animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de observar en el animal el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos.

En una realización, el método comprende comparar el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos frente a uno o más patrones.

En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje deseable y un nivel más elevado de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos del animal en comparación con el patrón implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel de expresión del mismo.

En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar un animal de ganado, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos.

En una realización, se selecciona un animal si tiene un nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un animal si no tiene un nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende comparar el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos frente a uno o más patrones.

En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje no deseable, y un nivel más elevado de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos del animal en comparación con el patrón implica que es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, se selecciona un animal si se deduce que lo más probable es que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un animal si se deduce que no tiene más probabilidad de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más

fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel de expresión del mismo.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de leche.
 5 En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de carne.
 En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de huevos.
 En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de pieles, pelo, lana, piel o plumas. En una realización, el método se realiza para seleccionar o rechazar un animal por una textura de pelaje deseable. En otra realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal con
 10 fines de reproducción. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para su inclusión en un rebaño.

En el presente documento también se divulga un método para estimar el valor de un animal de ganado y/o su descendencia, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de uno o más de PRLR, uno o más
 15 precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos.

En una realización, el método comprende comparar el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más
 20 isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos frente a uno o más patrones.

En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas
 25 del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje no deseable, y un nivel más elevado de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los
 30 mismos del animal en comparación con el patrón implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más
 fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel
 de expresión del mismo.

En otra realización, el método comprende además seleccionar un segundo animal identificado que tiene un nivel de
 35 uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende la etapa de observar el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores
 40 del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos del primer y/o segundo animal para identificar si tiene o no un nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del
 45 mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende comparar el nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores
 50 del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos frente a uno o más patrones.

En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas
 55 del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y se selecciona el primer y/o segundo animal cuando se observa que tiene un mayor nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos en comparación con el patrón.
 60

En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más
 fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel
 de expresión del mismo.

En una realización, el primer y/o segundo animal se selecciona si se deduce que es más probable tener una mayor
 65

tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, los métodos comprenden al menos las etapas de:

- 5 a) tomar una muestra de un animal;
- b) detectar uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los mismos en la muestra; y,
- 10 c) comparar el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los mismos frente a un patrón.

En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar una o más células o embriones, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos, en la una o más células o embriones o en un animal del que proceden.

En una realización, se selecciona la una o más células o embriones cuando éstos, o un animal del que proceden, se identifica que tiene un nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza la una o más células o embriones cuando éstos, o un animal del que proceden, se identifica que no tiene un nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende comparar el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos de la una o más células o embriones, o un animal del que se proceden, con uno o más patrones.

En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje no deseable, y un nivel más elevado de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos de la una o más células o embriones, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, en comparación con el patrón, implica que la una o más células o embriones son adecuados para su uso en un método de reproducción o clonación de un animal que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, se selecciona una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, tienen un mayor nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos.

En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel de expresión del mismo.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar una o más células o embriones para su uso en la clonación de un animal y/o la reproducción de un animal. En una realización, reproducir un animal puede implicar FIV. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

En el presente documento también se divulga un método de clonación de un animal de ganado, comprendiendo el método al menos la etapa de seleccionar una o más células cuando se identifica que tienen un nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende la etapa de observar el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos en dicho primer y/o segundo gameto, una o más células o embriones para identificar si tiene o no un nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de

los mismos que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

5 En una realización, los métodos comprenden comparar el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos en dicho primer y/o segundo gameto, embrión o una o más células con uno o más patrones.

10 En una realización, el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje no deseable, y el primer y/o segundo gameto, embrión o una o más células se seleccionan cuando se observa que tienen un nivel más elevado de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos en comparación con el patrón.

15 En una realización, el nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos es el nivel de expresión del mismo.

20 En determinadas realizaciones, el nivel del uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los mismos se determina mediante un inmunoensayo, separación basada en características tales como el peso molecular y el punto isoeléctrico, electroforesis en gel, transferencia de Western o espectroscopia de masas. Preferentemente, el inmunoensayo es un ELISA. Preferentemente, la electroforesis en gel es electroforesis en gel 2D o sistemas sin gel basados en tecnologías de microfluidos.

25 En el presente documento también se divulga un método para determinar si es más probable que un animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de observar en el animal el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

30 En una realización, el método comprende comparar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo frente a uno o más patrones.

35 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y un mayor nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en el animal en comparación con el patrón, implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

40 En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar un animal, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

45 En una realización, se selecciona un animal si tiene un nivel de actividad de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un animal si no tiene un nivel de actividad de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

50 En una realización, el método comprende comparar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo frente a uno o más patrones.

55 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y un mayor nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en el animal en comparación con el patrón, implica que es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

60 En una realización, se selecciona un animal si se deduce que lo más probable es que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un

animal si se deduce que no tiene más probabilidad de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

- 5 En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de leche.
En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de carne.
En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de huevos.
En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de pieles, pelo, lana, piel o plumas. En una realización, el método se realiza para seleccionar o rechazar un animal por una textura de pelaje deseable. En otra realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal con fines de reproducción. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para su inclusión en un rebaño.

- 15 También se divulga un método para estimar el valor de un animal y/o su descendencia, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

- 20 En una realización, el método comprende comparar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo frente a uno o más patrones.

- 25 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y un mayor nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en el animal en comparación con el patrón, implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

- 30 En otra realización, el método comprende además seleccionar un segundo animal que se identifica que tiene un nivel de actividad de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

- 35 En una realización, el método comprende la etapa de observar el nivel de actividad de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo del primer y/o segundo animal para identificar si tiene o no un nivel de actividad de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

- 40 En una realización, el método comprende comparar el nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo para uno o más patrones.

- 45 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y el primer y/o segundo animal se selecciona cuando se observa que tiene un mayor nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en comparación con el patrón.

- 50 En una realización, el primer y/o segundo animal se selecciona si se deduce que es más probable tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, los métodos comprenden al menos las etapas de:

- 55 a) tomar una muestra de un animal;
b) detectar el nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en la muestra; y
c) comparar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo frente a un patrón.

- 60 En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar una o más células o embriones, comprendiendo el método al menos la etapa de observar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

- 65 En una realización, se selecciona una o más células o embriones si tienen un nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a

las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza una o más células o embriones si no tienen un nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

5 En una realización, el método comprende comparar el nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo frente a uno o más patrones.

10 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y un mayor nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en una o más células o embriones, o un animal del que proceden una o más células o embriones, en comparación con el patrón, implica que una o más células o embriones son adecuados para su uso en un método para reproducir o clonar un animal que será más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

20 En una realización, se selecciona una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, tienen un mayor nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos.

25 En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar una o más células o embriones para su uso en la clonación de un animal y/o la reproducción de un animal. En una realización, reproducir un animal puede implicar FIV. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

30 En una realización, el método comprende además seleccionar el segundo gameto cuando se identifica que tiene nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

35 En el presente documento también se divulga un método para clonar un animal, comprendiendo el método al menos la etapa de seleccionar una o más células cuando se identifica que tienen un nivel de actividad de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

40 En una realización, los métodos comprenden la etapa de observar el nivel de actividad de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en dicho primer y/o segundo gameto, una o más células o embriones para identificar si tiene o no un nivel de actividad de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que es indicativo de un animal que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

45 En una realización, los métodos comprenden comparar el nivel de uno o más del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en dicho primer y/o segundo gameto, embrión, o una o más células con uno o más patrones.

50 En una realización, el patrón comprende un nivel de actividad del PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable, y el primer y/o segundo gameto, embrión, o una o más células se seleccionan cuando se observa que tienen un mayor nivel de actividad de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en comparación con el patrón.

60 En el presente documento también se divulga un método para determinar si es más probable que un animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos, en donde cuando uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo tienen dicha una o más variaciones, se determina que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

65 En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar un animal, comprendiendo el

método al menos la etapa de analizar uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos, en donde la presencia de dicha una o más variaciones implica que es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, se selecciona un animal si se deduce que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se rechaza un animal si se deduce que no tiene más probabilidad de tener mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, se selecciona un animal si incluye una o más variaciones de aminoácidos en PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo, y se rechaza un animal si no incluye una o más variaciones de aminoácidos en PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de leche. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de carne. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de huevos. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para la producción de pieles, pelo, lana, piel o plumas. En una realización, el método se realiza para seleccionar o rechazar un animal por una textura de pelaje deseable. En otra realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal con fines de reproducción. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar un animal para su inclusión en un rebaño.

En el presente documento también se divulga un método para estimar el valor de un animal y/o su descendencia, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos, en donde la presencia de dicha una o más variaciones implica que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el método comprende además seleccionar el segundo animal basándose en que se ha identificado que tiene una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

En una realización, el primer y/o segundo animal se selecciona si se deduce que es más probable tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En el presente documento también se divulga un método para seleccionar o rechazar una o más células o embriones, comprendiendo el método al menos la etapa de analizar uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicha una o más células o embriones, o de un animal del que procede la una o más células o embriones, para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos. En una realización, la presencia de dicha una o más variaciones implica que la una o más células o embriones son adecuados para su uso en un método para reproducir o clonar un animal que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En una realización, se selecciona una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, tienen una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de PRLR. En una realización, se rechazan una o más células o embriones si éstos, o un animal del que proceden la una o más células o embriones, no tienen una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de PRLR.

En una realización, el método se realiza con el fin de seleccionar o rechazar una o más células o embriones para su uso en la clonación de un animal y/o la reproducción de un animal. En una realización, reproducir un animal puede implicar FIV. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

En una realización, el método comprende además seleccionar el segundo gameto basándose en que tiene una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

En el presente documento también se divulga un método para clonar un animal, comprendiendo el método al menos la etapa de seleccionar una o más células que tienen una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

En una realización, una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos es aquella que da como resultado un aumento en la actividad del PRLR.

- 5 En una realización, una o más variaciones son una sustitución de uno o más aminoácidos, una eliminación de uno o más aminoácidos y/o una adición de uno o más aminoácidos. En una realización particular, una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos es una eliminación que da como resultado el truncamiento de PRLR.

- 10 En una realización, una o más variaciones de aminoácidos están ubicadas en una región comprendida entre una posición correspondiente al aminoácido 430 y el aminoácido 490 del PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más variaciones dan como resultado un truncamiento de PRLR en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 430 hasta una posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 de PRLR de *Bos taurus*.

- 15 En una realización, una o más variaciones de aminoácidos comprenden una sustitución de alanina por valina en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más variaciones de aminoácidos dan como resultado un truncamiento de PRLR a una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más variaciones de aminoácidos es una sustitución de una alanina por una valina en la posición 461 y el truncamiento de PRLR a una posición
20 correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*.

- En el presente documento también se divulga un método para generar un animal que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de introducir una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* de una o más células
25 utilizadas para generar el animal. También se divulga un método para generar una o más células que pueden ser útiles para generar un animal que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método al menos la etapa de introducir una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* de una o más células. También se divulga una célula generada mediante dicho método.
30

En una realización, el método para generar el animal implica FIV. En una realización, el método para generar el animal es un método de clonación.

- 35 En una realización, una o más alteraciones genéticas son aquellas que aumentan la actividad del PRLR. En una realización, una o más alteraciones genéticas incluyen una alteración genética ubicada en una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones genéticas es una alteración genética ubicada en el exón final del gen *PRLR*. En una realización, una o más alteraciones genéticas incluyen una alteración genética en una posición correspondiente a la posición 39136559 en el cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones genéticas
40 incluyen una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 en el cromosoma 20 de *Bos taurus*.

En una realización, la una o más células se eligen entre un gameto o un cigoto. En una realización, la una o más células es una célula somática o una célula de una estirpe celular.

- 45 En una realización, el método de clonación o método de FIV comprende además la etapa de seleccionar o rechazar uno o más animales, células o embriones mediante un método como se describe en el presente documento.

En el presente documento también se divulga un animal generado mediante un método de la invención.

- 50 En el presente documento también se divulga un método para formar un rebaño, comprendiendo el método al menos las etapas de:

- 55 a. realizar un método como se describe en el presente documento;
b. seleccionar o rechazar un animal basándose en los resultados de la etapa a); y,
c. formar un rebaño de animales seleccionados.

- 60 En una realización, se rechaza un animal si se deduce que no tiene más probabilidad de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, se selecciona un animal si se deduce que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

- 65 En una realización, se selecciona un animal si incluye una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o incluye uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo. En una realización, se selecciona un animal si incluye una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo. En una realización, se selecciona un animal si

tiene un nivel más elevado de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos en comparación con un patrón, en donde el patrón comprende un nivel de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable. En una realización, se selecciona un animal si tiene un mayor nivel de actividad de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo en comparación con un patrón, en donde el patrón comprende un nivel de actividad de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable.

En el presente documento también se divulga un rebaño formado mediante un método como se describe en el presente documento.

En el presente documento también se divulga un método para identificar una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* que implica una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en un animal. En una realización, el método comprende identificar una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y determinar si da como resultado o no un aumento en el nivel o la actividad de PRLR. En una realización, cuando la una o más alteraciones dan como resultado un aumento en el nivel o la actividad de PRLR, se determina que implica una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en un animal.

En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para identificar si un animal de ganado (y/o su descendencia), una o más células de ganado o un embrión tiene, o no, o puede tener, o no, una o más alteraciones genéticas relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método observar la secuencia de ácido nucleico para identificar si incluye o no una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con el mismo. Cuando se identifica que la secuencia de ácido nucleico tiene una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* y/o un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con el mismo, se identifica que el animal, célula o embrión tiene una o más alteraciones genéticas que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, la una o más alteraciones genéticas dan como resultado un aumento en el nivel o la actividad de PRLR.

En el presente documento también se divulga un método para identificar una o más variaciones de aminoácidos en PRLR que implican una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en un animal. En una realización, el método comprende identificar una o más variaciones de aminoácidos en PRLR y determinar si da como resultado o no un aumento en el nivel o la actividad de PRLR. En una realización, cuando la una o más alteraciones dan como resultado un aumento en el nivel o la actividad de PRLR, se determina que implica una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en un animal.

En el presente documento también se divulga un método para identificar si un animal de ganado (y/o su descendencia), una o más células o embriones tienen o pueden tener, o no, una o más variaciones de aminoácidos que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable; comprendiendo el método observar la secuencia de aminoácidos para identificar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, o uno o más fragmentos del mismo. Cuando se identifica que el animal, la célula o el embrión tiene una o más de las variaciones en la secuencia de aminoácidos de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, o uno o más fragmentos del mismo, se identifica que el animal, célula o embrión tiene una o más variaciones de aminoácidos que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, la una o más variaciones de aminoácidos da como resultado un aumento en el nivel o actividad de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, o uno o más fragmentos del mismo.

En una realización de la invención, el animal de ganado es un mamífero. En determinadas realizaciones, el animal es de la familia Bovidae, de la familia Phasianidae o de la familia Suidae. En determinadas realizaciones, el animal es de un género, especie o raza como se describe a continuación. En una realización particular, el animal es bovino. En una realización particular el animal bovino es *Bos taurus* o *Bos indicus*. En una realización particular, el animal se elige del grupo formado por ganado lechero Jersey, Holstein, Frisona o cruzado. En otras realizaciones, el animal se elige del grupo formado por bovinos criollos que incluyen Romosinuano, Criollo, Carora, Senepol o cruzado.

En una realización, los métodos de la invención comprenden además el análisis de uno o más marcadores biológicos adicionales. En una realización, el uno o más marcadores biológicos son uno o más marcadores genéticos.

En una realización, los métodos de la invención pueden comprender además; observar el nivel de uno o más de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo, y/o uno o más

ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos; observar en el animal el nivel de actividad de PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo; y/o analizar uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos. Dicho análisis y observación se pueden realizar usando uno o más métodos como se describe anteriormente en el presente documento.

En el presente documento también se divulga un ácido nucleico aislado que abarca una alteración del(C) en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, el ácido nucleico aislado en el que está presente C está en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En otra realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos en la que se ha eliminado la C en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. También se divulga un ácido nucleico aislado que comprende o consiste en la secuencia GACCAAACAGACCAACATGTTTAAAAGCCTCAAAAACCA (SEQ ID NO: 3) o una variante funcionalmente equivalente de la misma. También se divulga un ácido nucleico aislado que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 6 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En el presente documento también se divulga un ADNc que comprende uno o más marcadores genéticos como se describe en el presente documento.

En el presente documento también se divulga uno o más ácidos nucleicos adicionales como se describe más adelante en el presente documento.

En el presente documento también se divulga un péptido aislado como se describe en el presente documento. En una realización, se divulga un péptido aislado que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En el presente documento también se divulga:

- Un animal seleccionado mediante un método de la invención;
- Una o más células o embriones seleccionados mediante un método de la invención.

También se puede decir que la invención consiste en las partes, elementos y características mencionados o indicados en la especificación de la solicitud, individual o colectivamente, en cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características, y cuando se mencionen en el presente documento números enteros específicos que tienen equivalentes conocidos en la materia a la que se refiere la invención, se considerará que dichos equivalentes conocidos se incorporan en el presente documento como si se establecieran individualmente.

Figuras

Estos y otros aspectos de la presente invención, que deben considerarse novedosos en todos sus aspectos, se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción, que se da sólo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1: Muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm del receptor de prolactina (PRLR) de *Bos taurus*, variante de transcrito 2, (Referencia de secuencia del NCBI: NM_001039726.2). PRLR de formato largo. La región traducida está resaltada. El codón de inicio que comienza en la posición 85 corresponde a la posición 39115293 en UMD 3.1. El exón 1 publicado por NCBI comienza en 39115245. El codón de parada que comienza en la posición 1828 en la secuencia de ARNm está en la posición 39136922 en la construcción del genoma UMD3.1. La eliminación de bases identificada en el ADN del ganado Senepol se encuentra en la posición 1466 en la secuencia del ARNm (resaltada) y en la posición genómica 39136559. El cambio de marco resultante codifica una valina seguida de un codón de parada que da como resultado el truncamiento de la proteína (Figura 2).

Figura 2: ARNm del receptor de prolactina (PRLR) de *Bos taurus*, variante de transcrito 2. El producto es PRLR de formato largo (Referencia de secuencia NCBI: NM_001039726.2). La mutación de cambio de marco observada por los inventores dará como resultado el truncamiento de la proteína del aminoácido 581 al 461 mediante la eliminación de la secuencia resaltada y la conversión del nuevo aminoácido carboxiterminal de alanina a valina.

Figura 3: ARNm del receptor de prolactina (PRLR) de *Bos taurus*, variante de transcrito 2, que muestra la alteración identificada por los inventores; la base eliminada (en 39136559 en BTA20) en PRLR de Senepol (c) se indica por omisión. El producto es el PRLR de formato largo (Referencia de secuencia NCBI: NM_001039726.2).

Figura 4: Secuencia de aminoácidos prevista (n461) del receptor de prolactina de Senepol como resultado de la eliminación de la base C en la posición 39136559 de BTA 20 de *Bos taurus*.

Figura 5: Muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm del receptor de prolactina (PRLR) de *Bos taurus*, variante

de transcrito 2, (Referencia de secuencia del NCBI: NM_001039726.1). PRLR de formato largo. La región traducida está resaltada. El codón de inicio que comienza en la posición 87 corresponde a la posición 39115293 en UMD 3.1. El exón 1 publicado por NCBI comienza en 39115245. El codón de parada que comienza en la posición 1830 en la secuencia de ARNm está en la posición 39136922 en la construcción del genoma UMD3.1. La eliminación de bases identificada en el ADN del ganado Senepol se encuentra en la posición 1468 en la secuencia del ARNm (resaltada) y en la posición genómica 39136559. El cambio de marco resultante codifica una valina seguida de un codón de parada que da como resultado el truncamiento de la proteína (Figura 2).

Realizaciones preferidas

La siguiente es una descripción de la presente invención, que incluye realizaciones preferidas de la misma, dada en términos generales. La invención se explica con más detalle a partir de la divulgación proporcionada en la sección "Ejemplos" que proporciona, entre otras cosas, datos experimentales que respaldan la invención.

Los inventores han identificado que alelos particulares de un marcador genético ubicado en el gen del receptor de prolactina (PRLR) en una región del cromosoma 20 de *Bos taurus* están asociados con el pelaje muy corto y liso observado en la raza de ganado bovino Senepol que tiene una mayor tolerancia al calor. Esta es la primera vez que una alteración en el gen *PRLR* se ha asociado directamente con el pelaje corto y liso y los rasgos de tolerancia al calor del ganado bovino. Por consiguiente, los inventores contemplan que cualquier alteración genética en el gen *PRLR*, en particular aquella que dé como resultado un aumento en la actividad de PRLR, puede utilizarse como marcador para determinar si es más probable que un animal tenga una mayor tolerancia al calor. Por consiguiente, mientras que la descripción que sigue puede centrarse en el análisis de la secuencia de nucleótidos en una posición particular de este gen, debe entenderse que se extiende al análisis de la secuencia de nucleótidos en cualquier otra posición dentro del gen.

Los inventores también contemplan que el análisis de uno o más marcadores genéticos que están en desequilibrio de ligamiento con dicha alteración en el gen *PRLR* también se puede utilizar para el mismo propósito. Además, también pueden utilizarse para este propósito haplotipos que incluyen una combinación de dos o más de dichas alteraciones genéticas y/o marcadores en desequilibrio de ligamiento con los mismos.

Asimismo, los inventores contemplan que los métodos para determinar si es más probable que un animal (y/o su descendencia) tenga una mayor tolerancia al calor podrían comprender observar el nivel de PRLR, una o más isoformas, uno o más precursores, uno o más fragmentos, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos, donde en una realización un aumento en el nivel de una cualquiera o más de estas moléculas implica que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor. Además, los inventores contemplan métodos que implican observar la actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, uno o más precursores, uno o más fragmentos, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los mismos), donde en una realización un aumento en el nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, uno o más precursores, uno o más fragmentos, y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno cualquiera o más de los mismos) implica que es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor.

Además, en la medida en que determinadas variaciones o alteraciones genéticas dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos del PRLR, los inventores contemplan que los métodos para determinar si es más probable que un animal (y/o su descendencia) tenga una mayor tolerancia al calor podrían comprender observar si estas moléculas incluyen o no una o más variaciones en su secuencia de aminoácidos. Debe apreciarse que esto podría incluir la observación de una variación de tamaño en PRLR (incluida la referencia a uno o más precursores, isoformas, fragmentos del mismo, y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos).

El análisis de uno o más marcadores biológicos pertinentes para PRLR de acuerdo con la invención también podría utilizarse para seleccionar o rechazar una o más células o embriones. Dicho análisis puede ayudar en métodos de reproducción o clonación de animales, por ejemplo. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

Si bien la invención se describe en el presente documento en términos para determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no una mayor tolerancia al calor, debe apreciarse que es igualmente aplicable a métodos para determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no una tolerancia al calor disminuida o sustancialmente no aumentada. La descripción del presente documento (incluidos todos los aspectos y realizaciones de la invención) debe leerse en consecuencia para abarcar esto.

Además del uso del método de la invención para determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no una mayor tolerancia al calor, los inventores contemplan que los métodos de la invención sean útiles para determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no una textura de pelaje deseable (tal como un pelaje corto y liso en el ganado bovino), ya que esto está asociado con el fenotipo observado en el ganado bovino Senepol y vinculado a la tolerancia al calor. Además, los inventores contemplan que los métodos de la invención sean útiles para determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no un nivel de resistencia a las garrapatas. La resistencia a las garrapatas está asociada con

el tipo de pelaje, los pelajes más cortos mejoran la resistencia a las garrapatas y los pelajes largos aumentan la infestación por garrapatas, y la resistencia a las garrapatas está asociada con el ganado bovino Senepol. Por consiguiente, si bien los métodos de la invención pueden describirse en el presente documento en relación con una mayor tolerancia al calor, debe entenderse que estos métodos (incluidos todos los aspectos y realizaciones de la invención) pueden usarse alternativa o adicionalmente con el propósito de determinar o deducir si es más probable que un animal y/o su descendencia tenga o no una textura de pelaje deseable y/o un nivel de resistencia a las garrapatas o una mayor resistencia a las garrapatas. La descripción debe leerse en consecuencia para abarcar dichos métodos alternativos o adicionales.

En determinadas realizaciones, "textura de pelaje deseable" incluye un pelaje fino, ligero, liso y/o corto. Por ejemplo: en el caso de las familias Bovidae y Capra, una "textura de pelaje deseable" puede ser corta y liso; en el caso de la familia Ovis, una "textura de pelaje deseable" puede ser corta, fina y/o ligera; en el caso de la familia Suidae, una "textura de pelaje deseable" puede ser corta, fina y/o ligera; en el caso de la familia Phasianidae, una "textura de pelaje deseable" puede ser un plumaje fino y/o ligero. En determinadas realizaciones, una "textura de pelaje indeseable" es aquella que está asociada con un animal que tiene una tolerancia al calor sustancialmente limitada. Una "textura de pelaje indeseable" puede incluir un pelaje grueso, pesado, áspero y/o largo.

El análisis de uno o más marcadores biológicos de acuerdo con la invención puede ayudar a, por ejemplo: predecir el rendimiento fenotípico, incluido el uso en sistemas de gestión de producción conocidos como selección asistida por marcadores; la selección o el rechazo de animales con fines de reproducción; la selección o el rechazo de animales para la producción de leche, producción de carne, producción de huevos, producción de pelaje, pelo, lana, piel o plumas, y/o una textura deseable del pelaje; gestionar animales para maximizar su rendimiento y valor potencial individual; estimar el valor o el valor económico de un animal; mejorar las ganancias relacionadas con la venta de animales y/o productos producidos a partir de los animales; mejorar la genética de una población de animales mediante la selección y la reproducción de animales deseables; generar y mantener rebaños de animales; clonar animales que probablemente tengan o no un rasgo específico; predecir la idoneidad de un animal y/o de su descendencia para su uso en diferentes industrias y/o entornos y/o programas de reproducción o clonación. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. Los animales más o menos adecuados para un sistema de producción, industria o medio ambiente particular se pueden evaluar o seleccionar para predecir el rendimiento a lo largo de su vida y segregar o gestionarlos para adaptarlos a su genotipo y, por tanto, a su fenotipo previsto. Los animales se pueden evaluar o seleccionar en cualquier momento de su vida, incluidos, pero sin limitación, en el nacimiento temprano, como gametos, cigotos, embriones, fetos.

La identificación por parte de los inventores de que una alteración en el gen *PRLR* está asociada con la tolerancia al calor y la textura del pelaje deseable (por ejemplo, un pelaje corto y liso en el ganado bovino) también permite la generación de animales que tienen dichos fenotipos deseables usando procesos de clonación y/o edición genética en los que se introduce una o más alteraciones genéticas específicas en el gen *PRLR*. Por ejemplo, se pueden introducir una o más alteraciones específicas en gametos individuales o en un cigoto durante un programa de FIV o en una o más células adecuadas durante un procedimiento de clonación. Por consiguiente, en el presente documento se divulgan métodos para generar animales que probablemente tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

Si bien los inventores han identificado los marcadores pertinentes para la invención en animales bovinos, contemplan que los métodos de la invención son igualmente aplicables a una variedad de animales diferentes (como se describe a continuación), que incluyen, pero sin limitación, ganado vacuno, ovejas, cabras, pollos y cerdos.

Definiciones

La expresión "marcador(es) biológico(s)", tal como se utiliza en el presente documento, debe tomarse en sentido amplio e incluye, por ejemplo, uno o más marcadores genéticos, el nivel de una o más proteínas (incluida la referencia a uno o más fragmentos de la misma, uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma) o un ácido nucleico que codifica una o más proteínas (incluida la referencia a uno o más fragmentos del mismo, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo), el nivel de expresión de uno o más genes o proteínas (incluida la referencia a uno o más fragmentos de los mismos, uno o más precursores de los mismos, una o más isoformas de los mismos), el nivel de actividad de una o más proteínas (incluida la referencia a uno o más fragmentos de la misma, uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma) y/o variación en la secuencia de aminoácidos de una proteína (incluida la referencia a uno o más fragmentos de la misma, uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma) que puede incluir la observación del tamaño de una proteína (incluida la referencia a uno o más fragmentos de la misma, uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma).

La expresión "marcador genético", como se utiliza en el presente documento, se refiere a ácidos nucleicos o loci genéticos específicos (incluidas posiciones de nucleótidos específicas) que son polimórficos o contienen alteraciones o variaciones de secuencia dentro de una población, cuyos alelos se pueden detectar y distinguir mediante uno o más métodos analíticos. La expresión "marcador genético" incluye además dentro de su alcance una pluralidad de marcadores genéticos que se cosegregan, en forma de un "haplotipo". En este contexto, el término "haplotipo" se

refiere a una pluralidad de marcadores genéticos que generalmente se heredan juntos. Normalmente, los marcadores genéticos dentro de un haplotipo están en desequilibrio de ligamiento. La expresión "marcador genético" o "marcador genético de la invención" y términos similares, puede usarse en el presente documento para describir una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR* de acuerdo con la invención.

La referencia en el presente documento al análisis de un ácido nucleico para determinar la secuencia de nucleótidos de un "marcador genético" o en una posición genética particular, o la presencia o ausencia o naturaleza de una o más variaciones genéticas debe considerarse que incluye el análisis y la determinación de la secuencia de nucleótidos en cualquiera de las cadenas del ácido nucleico. Las personas expertas podrán determinar fácilmente el nucleótido o la base en una cadena opuesta basándose en la estructura bien comprendida de las moléculas de ADN: C se empareja con G, A se empareja con T. En consecuencia, si se hace referencia a identificar la presencia de una T en una posición particular, se debe considerar que incluye una referencia a la identificación de la presencia de una A en la cadena opuesta del ADN, y viceversa. De manera similar, si se hace referencia a identificar la presencia de una G en una posición particular, se debe considerar que incluye una referencia a la identificación de la presencia de una C en la cadena opuesta de ADN, y viceversa.

La expresión "polimorfismo de un solo nucleótido" (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) se refiere a variaciones en la secuencia de ácidos nucleicos que ocurren cuando se altera un solo nucleótido en la secuencia del genoma. Un polimorfismo de un solo nucleótido también puede ser una inserción o eliminación de un solo nucleótido. Los diferentes nucleótidos dentro de un SNP se denominan alelo.

El término "genotipo", tal como se utiliza en el presente documento, significa la constitución genética o secuencia de nucleótidos en uno o más locus genéticos, en particular la secuencia de nucleótidos de un alelo de un locus genético.

Por "desequilibrio de ligamiento" debe entenderse, en sentido amplio, la tendencia de la presencia de un alelo en un locus genético a predecir la presencia de un alelo en otro u otros loci genéticos (por ejemplo, un marcador genético distinto). Los loci genéticos no tienen por qué estar necesariamente en el mismo cromosoma. Sin embargo, en una realización preferida, los loci genéticos están ubicados en el mismo cromosoma. En una realización particular de la invención, el marcador en desequilibrio de ligamiento con una alteración genética de acuerdo con la invención está ubicado en el cromosoma 20 de *Bos taurus* que se identifica en una región entre posiciones de aproximadamente 38,35 Mb a aproximadamente 39,85 Mb. En una realización particular, el marcador en desequilibrio de ligamiento se encuentra en el cromosoma 20 y se identifica en una región entre posiciones de aproximadamente 38,4 Mb a aproximadamente 39,8 Mb. En otra realización, el marcador en desequilibrio de ligamiento se encuentra en el cromosoma 20 y se identifica en una región entre posiciones de aproximadamente 38,5 Mb a aproximadamente 39,7 Mb.

Una medida del desequilibrio de ligamiento es Δ^2 , que se calcula usando la fórmula descrita por Devlin *et al.* (Genomics 29 (2): 311-22 (1995)), y es una medida de qué tan bien un alelo X en un primer locus genético predice la aparición de un alelo Y en un segundo locus genético. Un valor de Δ^2 de 1,0 indica que la predicción es perfecta (por ejemplo, si Y está presente, entonces X está presente). Debe apreciarse que la referencia en el presente documento al desequilibrio de ligamiento no debe interpretarse como que implica un valor Δ^2 de 1,0. En realizaciones particulares, el desequilibrio de ligamiento entre un alelo en un locus genético y un alelo en un segundo locus genético tiene un valor de Δ^2 de al menos 0,75, al menos 0,80, al menos 0,85, al menos 0,90, al menos 0,95 y lo más preferentemente 1,0.

Los expertos apreciarán fácilmente los métodos para determinar si dos alelos cualesquiera están en desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, a modo de ejemplo, véase Genetic Data Analysis II, Weir, Sinauer Associates, Editores inc., Sunderland, Mass., 1996.

Cuando en el presente documento se hace referencia al análisis de un ácido nucleico para determinar si incluye o no un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con una o más variaciones genéticas en el gen *PRLR*, debe apreciarse que dicho marcador genético puede ser natural del genoma (de un animal o de una o más células, por ejemplo) o se puede haber generado o insertado de manera artificial. Un marcador genético "generado o insertado de manera artificial" es aquel que se ha introducido en el genoma. Dicho marcador genético puede comprender una cualquiera o más de una variedad de alteraciones genéticas, incluidas, por ejemplo, la adición de uno o más nucleótidos al genoma, la sustitución de uno o más nucleótidos dentro del genoma por uno o más nucleótidos, y/o la eliminación de uno o más nucleótidos del genoma. En una realización particular, el marcador genético es un ácido nucleico heterólogo que comprende uno o más nucleótidos que se insertan en el genoma. Las personas con experiencia general en la materia a la que se refiere la invención apreciarán fácilmente métodos para introducir dicho marcador genético en el genoma de un animal, incluidas una variedad de técnicas recombinantes que incluyen, por ejemplo, metodología de edición de genes y mutagénesis dirigida al sitio. Dichas técnicas pueden describirse, por ejemplo, en: Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; y, Precision Editing of Large Animal Genomes, Wenfang (Spring) Tan, Daniel F. Carlson, Mark W. Walton, Scott C. Fahrenkrug y Perry B. Hackett, Adv Genet. 2012; 80: 37-97. doi:10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8; y, One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering, Haoyi Wang, Hui Yang, Chikdu S. Shivalila, Meelad M. Dawlaty, Albert W. Cheng,

Feng Zhang y Rudolf Jaenisch. Cell. 9 de mayo de 2013; 153(4): 910-918. doi:10.1016/j.cell.2013.04.025. Solo a modo de ejemplo, dicho marcador genético se puede haber introducido en el genoma de una o más células a analizar, en el genoma de una o más células de un ancestro de un animal, o en el genoma de una o más células de un animal a analizar.

5 Una "variación en la secuencia de aminoácidos" del PRLR, isoformas, fragmentos y/o precursores del mismo deben considerarse de manera amplia para incluir cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos. Solo a modo de ejemplo, debe considerarse que incluye la sustitución de uno cualquiera o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos y/o la eliminación de uno o más aminoácidos.

10 Una "variación genética" también debe considerarse en sentido amplio para incluir cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos. Solo a modo de ejemplo, debe considerarse que incluye la sustitución de uno cualquiera o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos y/o la eliminación de uno o más nucleótidos.

15 Cuando la invención se describe en términos de identificar o determinar si un ácido nucleico incluye o no una o más variaciones genéticas, o un péptido o proteína incluye una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos, debe apreciarse que dicha variación es una diferencia en el ácido nucleico o en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de ácido nucleico asociada con uno o más animales que tiene una tolerancia al calor sustancialmente limitada, una resistencia a las garrapatas sustancialmente limitada y/o una textura de pelaje indeseable o no tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Normalmente, la variación se determinará en relación con una secuencia de referencia. En determinadas realizaciones, la secuencia de referencia es un ácido nucleico que codifica parte o la totalidad de un gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo y la secuencia de aminoácidos de PRLR, una isoforma, un precursor o un fragmento del mismo, que está asociado con un animal que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor, una resistencia a las garrapatas sustancialmente limitada y/o una textura del pelaje indeseable, como se define en el presente documento. En una realización, la secuencia de referencia del ácido nucleico es la SEQ ID NO: 4 o una parte de la misma. En una realización, la secuencia de referencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 5 o una parte de la misma. En otras realizaciones, la secuencia de referencia podría ser un ácido nucleico, un péptido o una proteína que tenga una secuencia que ya se sabe que está asociada con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, como se define en el presente documento. Por consiguiente, la referencia a "variación" no debe limitarse a significar que el ácido nucleico, péptido o proteína que se está analizando es diferente de la secuencia de referencia.

35 La referencia al truncamiento de una proteína o péptido "hasta una posición correspondiente a la posición Z", y expresiones similares, pretenden significar que la proteína o péptido termina en la posición Z.

La referencia a una región "delimitada por" nucleótidos o aminoácidos específicos debe entenderse como una región que comprende dichos nucleótidos o aminoácidos. En otras palabras, la región incluye los nucleótidos o aminoácidos terminales mencionados. Por ejemplo, una región "delimitada por" nucleótidos en la posición 39136469 y 39136649 incluye los nucleótidos presentes en la posición 39136469 y 39136649.

45 Una "alteración o variación genética que da como resultado un aumento en la actividad de PRLR" puede ser cualquier cambio genético que afecte al nivel, expresión o actividad del producto del gen *PRLR* (incluida la referencia a isoformas, fragmentos y/o precursores del mismo). A modo de ejemplo, puede aumentar el nivel de expresión o alterar la estructura o función del producto génico. De manera similar, una "variación en la secuencia de aminoácidos que da como resultado un aumento en la actividad de PRLR", o expresiones similares, puede ser cualquier cambio que afecte al nivel o la actividad de PRLR (incluida la referencia a isoformas, fragmentos y/o precursores del mismo). No debe entenderse que el término "aumento" implica ningún nivel particular de actividad o función, todo lo que se requiere es que haya al menos algún aumento en la actividad en comparación con un animal o animales que no tengan la variación o alteración (incluida la referencia al mismo animal si no tuviera un marcador biológico de acuerdo con la invención).

50 En general, cuando se haga referencia a un "aumento" o "disminución" del nivel o actividad del PRLR, una isoforma del mismo, un fragmento del mismo, un precursor del mismo y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos, debe considerarse en sentido amplio que incluye cualquier aumento o disminución en dicho nivel en comparación con un animal o animales de referencia o un patrón. También se puede hacer referencia en el presente documento a un nivel o actividad "mayor" o "menor" de PRLR, una isoforma del mismo, un fragmento del mismo, un precursor del mismo y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos en comparación con un animal o animales de referencia o un patrón. Esto no debe interpretarse como que implica un nivel o actividad particular de PRLR, una isoforma del mismo, un fragmento del mismo, un precursor del mismo y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos. Se puede determinar fácilmente si una variación da como resultado un aumento o una disminución en el nivel o actividad de PRLR o un nivel o actividad mayor o menor de PRLR en comparación con un patrón usando ensayos convencionales conocidos en la materia, incluidas aquellas técnicas ejemplificadas a continuación.

65 En una realización, los inventores contemplan que al menos un nivel o actividad de PRLR aproximadamente un 20 % mayor en comparación con un animal o animales que no tienen el fenotipo deseado (una mayor tolerancia al calor,

una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable) puede ser indicativo de un animal que sí tiene un fenotipo deseable (una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable).

- 5 Se debe considerar que la referencia al "gen *PRLR*" incluye la referencia a las regiones codificantes y no codificantes del gen, incluidos elementos reguladores cadena arriba y cadena abajo. Se ha informado que el gen *PRLR* se transcribe en dos formas de ARNm que difieren en longitud; una forma corta y una forma larga. Por consiguiente, en el presente documento se puede hacer referencia al "gen *PRLR*" utilizando términos tales como "forma larga" o "forma corta", lo que significa que el gen se transcribe en el ARNm de forma larga o corta, respectivamente.
- 10 La referencia a la localización específica de una alteración genética dentro del gen *PRLR* (por ejemplo, en el exón final) debe leerse teniendo en cuenta la forma larga. Sin embargo, la referencia general al gen *PRLR* debe incluir la referencia tanto a la forma corta como a la larga, a menos que se especifique otra cosa. En una realización preferida de la invención, el gen *PRLR* es la forma larga.
- 15 "PRLR" es el receptor de prolactina. La referencia en el presente documento a "PRLR" debe entenderse como una referencia a un precursor de PRLR, una isoforma de PRLR y/o un fragmento de PRLR a menos que el contexto requiera otra cosa. A modo de ejemplo, los métodos pueden implicar el análisis de la secuencia, nivel y/o actividad de PRLR, una isoforma de PRLR, un precursor de PRLR y/o un fragmento de PRLR y/o un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de los mismos. Además, se sabe que PRLR existe en dos isoformas comunes, la forma larga y
- 20 la forma corta. La referencia en el presente documento a PRLR debe entenderse como una referencia a ambas formas. Sin embargo, en una realización preferida, PRLR es la forma larga.

- Una "variante funcionalmente equivalente" de cualquier ácido nucleico particular al que se hace referencia en el presente documento debe considerarse en sentido amplio para abarcar cualquier ácido nucleico cuya secuencia de
- 25 ácido nucleico pueda variar de la secuencia específica proporcionada, pero cuyo ácido nucleico conserve sustancialmente la misma función; por ejemplo, en el caso de un oligonucleótido utilizado para detectar un marcador genético de la invención, la capacidad de unirse a un ácido nucleico diana particular o preparar una reacción particular con la especificidad deseada. La expresión "funcionalmente equivalente" no debe interpretarse en el sentido de que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el ácido nucleico del que es variante, aunque esto puede ser deseable.
- 30 En una realización, las "variantes funcionalmente equivalentes" de cualquier ácido nucleico particular tendrán al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de homología o identidad de secuencia con el ácido nucleico del que es una variante.

- Una "variante funcionalmente equivalente" de cualquier péptido o proteína particular a la que se hace referencia en el presente documento debe considerarse en sentido amplio para abarcar cualquier péptido o proteína cuya secuencia de aminoácidos pueda variar de la secuencia específica proporcionada, pero cuyo péptido o proteína conserva sustancialmente la misma función. La expresión "funcionalmente equivalente" no debe interpretarse en el sentido de que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el péptido o la proteína de la que es variante, aunque esto puede ser deseable. En una realización, las "variantes funcionalmente equivalentes" de cualquier péptido o la proteína
- 35 particular tendrán al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de similitud o identidad de secuencia con el péptido o proteína del que es una variante.

- El término "animal" debe entenderse en sentido amplio para incluir una variedad de animales diferentes. En una realización, el "animal" es un mamífero. En una realización particular, el animal es de la familia Bovidae, la familia Phasianidae o la familia Suidae.
- 45

- En una realización, un animal de la familia Bovidae pertenece a la subfamilia Bovinae. En una realización, el animal es del género *Bos*. En determinadas realizaciones, el animal es *Bos taurus* o *Bos indicus*. En una realización particular, el animal es una raza de carne y/o lechera. A modo de ejemplo adicional, el animal podrá ser elegido del grupo de animales que incluye, pero sin limitación, vacuno de leche Jersey, Holstein, frisona, Ayrshire y cruzado, vacuno de carne Angus, Hereford, Simmental y cruzado. En otras realizaciones, el animal se elige del grupo de las razas bovinas criollas, incluido el vacuno de leche o de carne Romosinuano, Criollo, Carora, Senepol y cruzado. En una realización particular, el animal es un cruce entre una raza de animales que se sabe que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable y una raza de animal conocida por tener una
- 50 tolerancia sustancialmente limitada al calor, una resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura del pelaje indeseable. Los expertos apreciarán fácilmente una variedad de otras especies y razas a las que se puede aplicar la invención.

- En otra realización, un animal de la familia Bovidae pertenece a la subfamilia Caprinae. En una realización, el animal es del género *Capra*. En determinadas realizaciones, el animal es *Capra hircus*. En una realización, el animal es una raza utilizada para cría y producción de leche, carne y/o lana. En determinadas realizaciones, el animal podrá ser elegido del grupo de animales que incluye, sin limitación, Saanen, Alpina, Nubia, Boer y Cachemira. En otra realización, el animal es del género *Ovis*. En determinadas realizaciones, el animal es *Ovis aries*. En una realización, el animal es una raza utilizada para cría y producción de leche, carne y/o lana. En determinadas realizaciones, el animal se puede
- 60 elegir del grupo de animales que incluye, pero sin limitación, Border Leicester, Merino, Wiltshire, Dorset, East Friesian y Lacane. Los expertos apreciarán fácilmente una variedad de otras especies y razas a las que se puede aplicar la
- 65

invención.

En una realización, un animal de la familia Suidae pertenece a la subfamilia Suinae. En una realización, el animal es del género *Sus*. En determinadas realizaciones, el animal es *Sus scrofa*. En una realización, el animal es una raza utilizada para la cría y producción de carne y/o cuero. En determinadas realizaciones, el animal podrá ser elegido del grupo de animales que incluye, pero sin limitación, Landrace, Duroc, Meisham, Berkshire y Philippine native. Los expertos apreciarán fácilmente una variedad de otras especies y razas a las que se puede aplicar la invención.

En una realización, un animal de la familia Phasianidae pertenece a la subfamilia Phasianinae. En una realización, el animal es del género *Gallus*. En determinadas realizaciones, el animal es *Gallus gallus*. En una realización, el animal es una raza utilizada para la cría y producción de carne, plumas y/o huevos. En determinadas realizaciones, el animal podrá ser elegido del grupo de animales que incluye, pero sin limitación, Namtam, Leghorn, Silkie y Wyandotte. Los expertos apreciarán fácilmente una variedad de otras especies y razas a las que se puede aplicar la invención.

La invención puede describirse en el presente documento haciendo referencia a un "rebaño" de animales. Este término debe entenderse de manera amplia para incluir cualquier grupo de animales de la misma especie. El término debe entenderse para abarcar otros sustantivos colectivos utilizados para referirse a un grupo de animales de cualquier especie en particular, tal como un "piara" o una "manada".

"Mayor tolerancia al calor", "tolerancia al calor aumentada" y expresiones similares deben entenderse en sentido amplio en el sentido de que un animal es más capaz de mantener o regular la temperatura corporal en condiciones de estrés por calor que un animal que no tiene una alteración genética u otro marcador biológico como se describe en el presente documento. En una realización, el animal tiene una temperatura corporal promedio más baja en condiciones de estrés por calor que un animal que no tiene un marcador biológico de acuerdo con la invención (incluida la referencia al mismo animal si no tenía un marcador biológico de acuerdo con la invención).

Como se utiliza en el presente documento, "tolerancia sustancialmente limitada al calor" y expresiones similares significa que el animal tiene una capacidad limitada o sustancialmente nula para mantener o regular su temperatura corporal en condiciones de estrés por calor. En una realización, el animal tendrá una temperatura corporal promedio más elevada en condiciones de estrés por calor que un animal que tiene un marcador biológico de acuerdo con la invención (incluida la referencia al mismo animal si tuviera un marcador biológico de acuerdo con la invención).

"Condiciones de estrés por calor", tal como se utiliza en el presente documento, debe entenderse en sentido amplio como la exposición a una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C. La temperatura puede calcularse como una temperatura compuesta teniendo en cuenta una cualquiera o más de las temperaturas del aire, la humedad, el calor radiante y el calor por convección utilizando métodos conocidos. En una realización, las "condiciones de estrés por calor" incluyen la exposición a un índice de temperatura y humedad (THI, del inglés *Temperature Humidity Index*) de aproximadamente 72.

El uso de "pelaje" en el presente documento debe entenderse como referencia a pieles, pelo, lana o plumas, según sea el caso de un animal en particular.

"Resistencia a las garrapatas", "resistencia a garrapatas" y términos similares deben entenderse en sentido amplio para describir la capacidad de un animal para resistir a las garrapatas, limitar el número de garrapatas que se encuentran en el pelaje y/o limitar el número de garrapatas que sobreviven hasta la madurez en comparación con un animal que no tiene un marcador biológico como se describe en el presente documento (incluida la referencia al mismo animal si no tuviera un marcador biológico de acuerdo con la invención). Esto no debe significar que ninguna garrapata afectará, infestará o atacará a un animal o que ninguna garrapata sobreviva hasta la madurez. En una realización, la presencia de un marcador biológico de la invención implica al menos algún nivel de resistencia "aumentada" a las garrapatas. Esto debe entenderse en sentido amplio en el sentido de que un animal es más capaz de resistir a las garrapatas, que incluye, por ejemplo, una reducción de las garrapatas transportadas por el pelaje, una reducción en el ataque o infestación por garrapatas, y/o un menor número de garrapatas que sobreviven hasta la madurez en comparación con un animal que no tiene un marcador biológico descrito en el presente documento (incluida la referencia al mismo animal si no tuviera un marcador biológico de acuerdo con la invención).

Como se utiliza en el presente documento, "resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas" y expresiones similares significan que un animal tiene una capacidad limitada o sustancialmente nula para resistir el ataque o la infestación por garrapatas. En una realización, en presencia de garrapatas, el animal portará un mayor número de garrapatas en su pelaje y/o un mayor número de garrapatas que sobreviven hasta la madurez en comparación con un animal que tiene un marcador biológico de acuerdo con la invención (incluido la referencia al mismo animal si tuviera un marcador biológico de acuerdo con la invención).

Como se utiliza en el presente documento, el "valor" de un animal se refiere a un índice utilizado para evaluar el valor de un animal, con fines de reproducción, inclusión en un rebaño, manejo del rebaño, por ejemplo. El "valor" es la suma del valor estimado de una o más características que pueden estar asociadas con el animal, normalmente ponderado por un valor económico. Las características ilustrativas incluyen grasa láctea, proteína, volumen de leche, peso vivo,

fertilidad y células somáticas de leche, tasa de crecimiento, eficacia de conversión alimenticia y producción de huevos. El término "valor" debe entenderse para abarcar el "valor reproductivo" y otros índices conocidos utilizados para evaluar el valor de un animal. Los expertos en la materia a la que se refiere la invención apreciarán fácilmente los métodos y fórmulas adecuados para estimar el valor reproductivo basándose en cualquier número de características diferentes. Los resultados, los datos y/o la información generados por un método de la invención se pueden utilizar en cálculos para estimar el "valor".

Debe apreciarse que cuando los métodos divulgados se relacionan con animales reproductores, se puede utilizar cualquier método de reproducción adecuado, incluido, por ejemplo, la inseminación natural, la inseminación artificial y la fecundación *in vitro* (FIV). Por consiguiente, la palabra "apareamiento" debe interpretarse de manera amplia y no limitarse al apareamiento físico de dos animales. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. Debe apreciarse que los métodos de reproducción de animales pueden implicar una o más etapas de edición de genes y/o técnicas de clonación.

Como se señaló anteriormente en el presente documento, los métodos de la invención pueden utilizarse para identificar animales adecuados para la clonación. También pueden utilizarse durante los procesos de clonación, para determinar si una o más células, embriones o animales clonados tienen o no una variación genética en el gen *PRLR* y es probable que tengan (o se convierta en un animal que tenga) una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Se podría utilizar cualquier método de clonación adecuado. Sin embargo, a modo de ejemplo, dichas técnicas de clonación incluyen la transferencia nuclear de células somáticas, transferencia de cromatina y división de embriones. Las personas con experiencia general en la materia apreciarán fácilmente las metodologías adecuadas de transferencia nuclear de células somáticas y transferencia de cromatina. Sin embargo, a modo de ejemplo, se pueden utilizar los métodos descritos en las siguientes publicaciones: Bovine somatic cell nuclear transfer, Ross P. J. y Cibelli, JB 2010. *Methods in Molecular Biology* 636: 155-177; y, Influence of cloning by chromatin transfer on placental gene expression at Day 45 of pregnancy in cattle. Mesquita F. S., Machado S. A., Drnevich J., Borowicz P., Wang Z., Nowak R. A. *Anim Reprod Sci.* 2013 Jan 30;136(4):231-44. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.030. Epub 8 de noviembre de 2012.

Cuando se emplea FIV en el contexto de la divulgación, se puede utilizar cualquier metodología de FIV adecuada, como será evidente los expertos habituales en la materia a la que se refiere la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo, se describen los métodos adecuados, por ejemplo, en: Imai K., Tagawa M., Yoshioka H., Matoba S., Narita M., *et al.* (2006) The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. *J Reprod Dev* 52: 19-29.

Los métodos de la invención pueden describirse en el presente documento con referencia a un "patrón". El patrón puede comprender cualquier muestra adecuada u otra información suficiente para comparar los resultados de una muestra de un animal. En una realización, el patrón puede ser una muestra de control que comprende *PRLR* (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) y/o un ácido nucleico que lo codifica de un animal con un fenotipo conocido, que se analiza simultáneamente con una muestra de un animal que se va a analizar. Sin embargo, en otra realización, el patrón podría ser un gráfico impreso o información electrónica o similar que contenga datos generados previamente que se considere que proporcionan un patrón adecuado y con el que se puedan comparar las muestras de prueba en función del color, niveles de fluorescencia o valores numéricos, por ejemplo. A continuación se explicarán más ejemplos de patrones adecuados. Sin embargo, en una realización, el patrón será representativo de un animal que tiene una tolerancia al calor sustancialmente limitada, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura del pelaje indeseable. En otra realización, el patrón será representativo de un animal que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar ambos patrones.

Los métodos de la invención pueden implicar tomar una "muestra" de un animal que se va a analizar. La muestra puede ser cualquier muestra de tejido o líquido corporal adecuado. En una realización, la muestra puede comprender una o más células, sangre, músculo, hueso, células somáticas, saliva, piel, hígado, cerebro, placenta, líquido amniótico y/o semen. Se puede tomar una "muestra" de un animal mediante técnicas convencionales conocidas en la materia. Debe tenerse en cuenta que se puede tomar una muestra de un animal en cualquier etapa de su vida, incluso antes del nacimiento; a modo de ejemplo no limitante, un cigoto, un embrión, un feto. También podrían probarse gametos individuales mediante los métodos de la invención. Esto puede ayudar en programas de reproducción y/o clonación. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. Por consiguiente, "muestra" debe incluir un cigoto, tejido embrionario, tejido fetal y gametos. También se puede tomar una muestra después de la muerte de un animal.

Además, debe apreciarse que cuando el análisis u observación de un ácido nucleico o péptido de un animal se realiza durante la gestación, el análisis u observación podría realizarse mediante el análisis de una proteína, péptido, ácido nucleico o una o más células de ese animal que pueden estar presentes en el suministro de sangre materna, placenta, líquido amniótico o cualquier otro tejido o líquido materno antes del nacimiento del animal. Por consiguiente, la referencia al análisis de un ácido nucleico de un animal, al análisis de *PRLR*, un precursor, una isoforma y/o fragmento del mismo de un animal, a la observación del nivel de uno o más *PRLR*, un precursor, una isoforma y/o fragmento del mismo en un animal, y/o la observación del nivel de actividad de un *PRLR*, un precursor, una isoforma y/o fragmento

del mismo en un animal, y similares, debe considerarse que incluye la referencia al análisis y/o la observación de uno o más de estos de ese animal que pueden estar presentes en un tejido o líquido materno.

"Embrión" debe entenderse en sentido amplio para incluir un organismo de la primera división del cigoto. En determinadas realizaciones, un embrión es un organismo entre la primera división del cigoto hasta el momento en que se convierte en feto. Se debe entender que la referencia a un "embrión" incluye la referencia a un organismo en diferentes etapas de desarrollo, incluida una blástula, blastocisto, gástrula y mórula, por ejemplo.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para la selección o rechazo de una o más células. En determinadas realizaciones, dichas "células" pueden incluir un gameto (por ejemplo, espermatozoide u óvulo) o cigoto. La selección de dichas células puede ser útil en un programa de FIV, por ejemplo. En otras realizaciones, dichas "células" pueden ser células somáticas, células embrionarias, células madre embrionarias, células en una estirpe celular, una o más células de uso en clonación, por ejemplo. La selección de estas células puede ser útil en procedimientos de clonación o en la preparación de estirpes celulares para su uso en clonación y otros procedimientos, por ejemplo.

Determinados aspectos y realizaciones de la divulgación pueden describirse en el presente documento con referencia a "fusionar un primer y un segundo gameto" para formar un cigoto. Esta expresión debe entenderse de manera amplia para incluir los procesos de fecundación, tales como los que se pueden utilizar en procesos de fecundación *in vitro*. Las personas expertas apreciarán fácilmente los medios convencionales para "fusionar" gametos para formar un cigoto.

Para facilitar la referencia, los métodos de la invención se pueden describir a continuación en el presente documento en términos de analizar un marcador biológico (tal como una secuencia de ácido nucleico) en o a partir de un "animal" o para determinar si un "animal" tiene o no un marcador particular unido o asociado con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, o la determinación del genotipo de un "animal" y similares. Debe apreciarse que los métodos de la invención también son aplicables para analizar y determinar si células individuales, incluidos los gametos, y los embriones pueden tener o no marcadores biológicos en cuestión. Por consiguiente, la referencia a "animales" también debe entenderse como la referencia a una o más células o embriones, a menos que el contexto requiera otra cosa.

La invención puede describirse en el presente documento con referencia a una secuencia de ácido nucleico que es "indicativa" de un animal (o animales) que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. "Indicativo" no debe entenderse en el sentido de que el nivel es exactamente el mismo que un nivel asociado con dicho animal o animales. Sin embargo, en una realización, el nivel o nivel de actividad es sustancialmente similar o sustancialmente el mismo al asociado con dicho animal o animales. Se puede identificar fácilmente si una secuencia de ácido nucleico es o no "indicativa" de un animal (o animales) que tiene o es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable mediante los diversos métodos descritos en el presente documento; por ejemplo, comparar los resultados de una muestra de prueba con uno o más patrones o referencias. La referencia a "animal o animales" debe entenderse en el sentido de que una referencia o patrón particular se basa en un valor de un solo animal o en una combinación o promedio de un grupo de animales.

Marcadores

El marcador específico identificado en el presente documento está ubicado en el gen *PRLR* en una posición de nucleótido en el cromosoma 20 de *Bos taurus*. La secuencia y posición dadas para este gen y el marcador genético específico se basan en la secuencia genómica del cromosoma 20 en la estructura bovina UMD3.1 (gil258513347reflAC_000177.1) en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La posición del marcador genético debe leerse de acuerdo con la posición de la base que es el sitio de inicio de la alteración, dado que el primer nucleótido de la secuencia (gil258513347reflAC_000177.1) se indica como posición uno. Asimismo, la información de secuencia del gen *PRLR* y su ubicación en el cromosoma 20 se proporciona en las bases de datos del NCBI: Referencia de secuencia NM_001039726.2 e ID del gen: 281422, por ejemplo. El gen *PRLR* se asigna a 38.951.611 y 39.146.316 (excluyendo las secuencias promotoras). En el presente documento, la referencia a la ubicación de una alteración genética específica en gen *PRLR* (véase la tabla 3 a continuación, por ejemplo) debe leerse en relación con su posición en gen de forma larga. De manera similar, en el presente documento, la referencia a la ubicación de una variación de aminoácido específica en *PRLR* debe leerse en relación con su posición en la proteína *PRLR* de forma larga de *Bos taurus*. En las figuras 1 y 2 del presente documento se proporcionan información ilustrativa de transcripción y secuencia de proteínas para *PRLR* de *Bos taurus*.

En el presente documento se hace referencia al ARNm de la variante 2 del transcrito de *PRLR* proporcionado en NCBI como NM_001039726.2. Con referencia a esta secuencia: el codón de inicio comienza en la posición 85 que corresponde a la posición 39115293 en UMD 3.1; el exón 1 publicado por NCBI comienza en 39115245; el codón de parada comienza en la posición 1828 en la secuencia de ARNm que está en la posición 39136922 en la construcción del genoma UMD3.1; la eliminación de la base identificada por los inventores está en la posición 1466 y en la posición genómica 39136559. Cabe apreciar que existía una versión anterior de esta secuencia NCBI (NM_001039726.1) - Figura 5, SEQ ID NO: 8. Con referencia a esta secuencia: el codón de inicio comienza en la posición 87 que

corresponde a la posición 39115293 en UMD 3.1; el exón 1 publicado por NCBI comienza en 39115245; el codón de parada comienza en la posición 1830 en la secuencia de ARNm que está en la posición 39136922 en la construcción del genoma UMD3.1; la eliminación de la base identificada por los inventores está en la posición 1468 en la secuencia de ARNm que corresponde a la posición genómica 39136559.

Se apreciará que la ubicación precisa del marcador genético utilizado en un método de la invención puede variar ligeramente de un genoma a otro; por ejemplo, la ubicación del marcador puede variar en una especie diferente de animal o en una raza diferente de animal. Del mismo modo, la ubicación precisa de cualquier variación de aminoácidos en una proteína PRLR puede variar ligeramente de un proteoma a otro; por ejemplo, la ubicación de una alteración puede variar en especies diferentes de animales o en razas diferentes de animales. Sin embargo, los expertos en la materia a la que se refiere la invención podrán identificar fácilmente un marcador particular en diferentes genomas y/o proteínas PRLR (incluidas isoformas, fragmentos y precursores de las mismas) a través del alineamiento de secuencias de rutina y con conocimiento de que reside en el gen *PRLR*/proteína PRLR (incluidas isoformas, fragmentos y precursores de la misma). Para tener en cuenta esta variación en la ubicación de cualquier marcador genético particular entre los genomas, el marcador se describe en el presente documento como "en una posición correspondiente a la posición X del cromosoma 20 de *Bos taurus*", siendo X el número de nucleótido o par de bases leído frente a la secuencia del cromosoma 20 en la construcción del genoma UMD3.1. De manera similar, para tener en cuenta cualquier variación en la ubicación de una variación de aminoácido particular a través de los proteomas, la variación de aminoácidos puede describirse en el presente documento como "en una posición correspondiente a la posición Y de PRLR (o la forma larga de PRLR) en *Bos taurus*", siendo Y el número de aminoácidos leído en relación con la secuencia PRLR de *Bos taurus* proporcionada en la figura 2 a continuación.

En las bases de datos del NCBI se puede encontrar información ilustrativa de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de PRLR para animales distintos de *Bos taurus*. Sin embargo, los siguientes números de registro de la base de datos se dan a modo de ejemplo:

Cerdo (*Sus scrofa* (581)), NC_010458.3 (secuencia de nucleótidos completa) y NM_001001868.1 (secuencia proteica);
 pollo (*Gallus gallus*), NC_006127.3 (secuencia de nucleótidos completa) y NP_990185.1 (secuencia proteica);
 oveja (*Ovis aries*), NC_019473.1 (secuencia de nucleótidos completa), 046561.1 (secuencia proteica); y, cabra (*Capra hircus*), JF966783.1 (secuencia de nucleótidos completa), AEJ76924.1 (secuencia proteica).

Tabla 3: Marcador genético específico identificado

Nombre del marcador	Ubicación (Región del gen)	Posición (Cromosoma 20 de <i>Bos taurus</i>)	Alteración
39136559del(C)	Último exón	39136559	delC, dando como resultado un desplazamiento de marco

Si bien los inventores han observado que la alteración identificada en la tabla 3 es indicativa de que es más probable que un animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, se contempla que cualquier variación en la secuencia de nucleótidos en este locus genético puede ser indicativa de una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Asimismo, los inventores contemplan que cualquier variación en la secuencia de nucleótidos del gen *PRLR* que dé como resultado un aumento en la actividad de PRLR puede ser indicativa de una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. La invención debe interpretarse en consecuencia. Dichas variaciones pueden incluir, por ejemplo, la adición de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos, la sustitución de uno o más nucleótidos o combinaciones de dos o más de los mismos.

En una realización, una o más alteraciones se ubican en una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En otras realizaciones, una o más alteraciones están ubicadas en una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136498 y 39136620, a las posiciones 39136528 y 39136590 o a las posiciones 39136543 y 39136575. En una realización, la una o más alteraciones genéticas se ubican en el exón final del gen *PRLR*; por ejemplo, una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136033 a 39136920 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

En una realización, una o más alteraciones dan como resultado una sustitución de alanina por valina en una posición correspondiente a la posición 461 del *PRLR* de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones genéticas dan como resultado el truncamiento del transcrito o péptido expresado a partir del gen *PRLR*. En determinada realización, una o más alteraciones dan como resultado un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 430 hasta una posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 de PRLR de *Bos taurus*, un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 440 hasta la posición de aminoácido 480 de PRLR de *Bos taurus*, un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 450 hasta la posición de aminoácido 470 de PRLR de *Bos taurus*, o un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la

posición 455 hasta la posición de aminoácido 465 del PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones dan como resultado el truncamiento de PRLR en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones dan como resultado la sustitución de una alanina por una valina en la posición 461 y el truncamiento de PRLR en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*.

De manera similar, si bien los inventores han observado que la variación de aminoácidos en PRLR descrita en el presente documento es indicativa de que es más probable que un animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, se contempla que cualquier variación de secuencia de aminoácidos en la misma posición puede ser indicativa de una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Asimismo, los inventores contemplan que cualquier variación en la secuencia de aminoácidos de una PRLR que dé como resultado un aumento en la actividad de PRLR puede ser indicativa de una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. La invención debe interpretarse en consecuencia. Dichas variaciones pueden incluir, por ejemplo, la adición de uno o más aminoácidos, la eliminación de uno o más aminoácidos, la sustitución de uno o más aminoácidos o combinaciones de dos o más de los mismos.

En determinadas realizaciones, una o más variaciones de aminoácidos están ubicadas en una región correspondiente a la posición del aminoácido 430 a la posición del aminoácido 490 de PRLR de *Bos taurus*, en una región correspondiente a la posición del aminoácido 440 a la posición del aminoácido 480 de PRLR de *Bos taurus*, en una región correspondiente a la posición de aminoácido 450 a la posición de aminoácido 470 de PRLR de *Bos taurus* o en una región correspondiente a la posición de aminoácido 455 a la posición de aminoácido 465 de PRLR de *Bos taurus*.

En una realización, una o más variaciones de aminoácidos son una sustitución de alanina por valina en una posición correspondiente a la posición 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización particular, una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos es una eliminación que da como resultado el truncamiento de PRLR. En una realización, una o más variaciones dan como resultado un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 430 hasta una posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 de PRLR de *Bos taurus*, un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 440 hasta la posición de aminoácido 480 de PRLR de *Bos taurus*, un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 450 hasta la posición de aminoácido 470 de PRLR de *Bos taurus*, o un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 455 hasta la posición de aminoácido 465 del PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones dan como resultado un truncamiento de PRLR en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más variaciones de aminoácidos es una sustitución de una alanina por una valina en la posición 461 y el truncamiento de PRLR a una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*.

Los inventores señalan que la alteración específica a la que se hace referencia en la tabla 3 es de naturaleza dominante. Se cree que este será el caso de otras alteraciones en el gen *PRLR*. Por consiguiente, por ejemplo, cuando un animal es heterocigoto para una alteración, se deducirá que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. A la luz de esto, los métodos de la invención no necesitan una determinación de la homocigosidad o heterocigosidad de un animal. Sin embargo, en determinadas realizaciones, puede ser deseable determinar si el animal es homocigoto. Por ejemplo, en el caso de selección de animales con fines de reproducción o para su inclusión en un rebaño, saber si el animal es homocigoto puede ser beneficioso, ya que ayudará a garantizar que cualquier descendencia porte la alteración genética deseada. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

Alteración en la secuencia de ácidos nucleicos

Los métodos de la invención implican el análisis de un ácido nucleico (incluido uno o más ácidos nucleicos) de un animal para determinar la presencia o ausencia de una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR*. Dichas una o más alteraciones genéticas serán indicativas de un animal y/o animales que tienen o es más probable que tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, la una o más alteraciones genéticas dan como resultado un aumento en la actividad de PRLR.

Debe apreciarse que pueden identificarse una o más alteraciones genéticas mediante la observación del tamaño del gen *PRLR* o una parte o región del mismo.

En una realización, una o más alteraciones se ubican en una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*. En otras realizaciones, una o más alteraciones están ubicadas en una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136498 y 39136620, a las posiciones 39136528 y 39136590 o a las posiciones 39136543 y 39136575. En una realización, la

una o más alteraciones genéticas se ubican en el exón final del gen *PRLR*; por ejemplo, una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136033 a 39136920 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

En una realización, por ejemplo, los métodos implican el análisis de un ácido nucleico (incluido uno o más ácidos nucleicos) para determinar el nucleótido presente en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

Como alternativa o además, los métodos pueden implicar analizar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico para determinar la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con una alteración genética en el gen *PRLR*, por ejemplo, un marcador genético (variación genética) en la posición mencionada anteriormente.

En una realización particular, los métodos de la invención pueden implicar analizar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico para determinar el haplotipo de un animal, de una o más células o de un embrión, por ejemplo, en donde el haplotipo incluye el marcador genético (variación genética en el gen *PRLR*) mencionado anteriormente en combinación con uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo.

También se debería apreciar que se podría analizar la secuencia de ácido nucleico de cualquier cadena del ácido nucleico para identificar la secuencia en un locus o posición genética particular; por ejemplo, en lugar de analizar la cadena asociada con la variante de secuencia enumerada anteriormente, se podría analizar la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN opuesta o complementaria. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente las variaciones de la secuencia de ácidos nucleicos en dicha cadena opuesta que se correlacionan con los genotipos mencionados anteriormente, teniendo en cuenta la información contenida en el presente documento y los principios de emparejamiento de bases de ácidos nucleicos (es decir, A se empareja con T y C se empareja con G).

Los ácidos nucleicos se pueden analizar para determinar el genotipo/secuencia de un marcador genético de acuerdo con cualquier técnica adecuada. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluida la PCR específica de alelo, electroforesis en gel, el uso de hibridación de sondas de oligonucleótidos, transferencia de Southern, secuenciación directa, digestión de restricción, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), LCR (reacción en cadena de la ligasa), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), el uso de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), el uso de proteínas que reconocen emparejamientos incorrectos de ácidos nucleicos, tal como la proteína mutS de *E. coli*, ensayos de protección de ARNasa, hibridación de matrices de oligonucleótidos (por ejemplo, micromatriz), HPLC desnaturalizante (dHPLC), PCR de extinción de fluorescencia (TaqMan™ Applied Biosystems, CA 94404, EE. UU.), fusión de alta resolución (HRM), espectroscopia de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) y qRT-PCR. Se pueden utilizar combinaciones de dos o más de dichas técnicas. Dicha combinación puede aumentar la sensibilidad del análisis que se está realizando.

En determinadas realizaciones, el análisis se puede realizar en una sola célula. En dichos casos, se puede utilizar la amplificación del genoma y/o la metodología de secuenciación de próxima generación. Las personas cualificadas apreciarán fácilmente la metodología adecuada. Sin embargo, a modo de ejemplo, se podría utilizar la metodología descrita en Navin *et al.*, (Nature, 7 de abril de 2011; 472(7341):90-4. doi: 10.1038/nature09807. Epub 13 de marzo de 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing).

Las técnicas utilizadas dependerán de la naturaleza del marcador a detectar, como apreciarán los expertos. Por ejemplo, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden analizarse mediante aquellas técnicas capaces de resolver una diferencia de un solo nucleótido entre secuencias; por ejemplo, secuenciación directa o LCR, PCR específica de alelo, RFLP, SSCP, DGGE, utilizando oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) o proteínas que reconocen emparejamientos incorrectos de ácidos nucleicos, hibridación de matrices de oligonucleótidos, dHPLC, PCR de extinción de fluorescencia y matriz MALDI-TOF MS.

Cualquiera o más de las técnicas mencionadas anteriormente (incluidas, por ejemplo, SSCP, RFLP, DGGE, dHPLC y secuenciación directa) pueden utilizarse para analizar marcadores genéticos que pueden incluir la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos.

Debe apreciarse que algunas de las técnicas de uso para analizar un marcador genético de acuerdo con la invención utilizarán uno o más oligonucleótidos que se hibridan con una región genética que abarca el marcador, adyacente al marcador o que flanquea al marcador. Dichos oligonucleótidos pueden ser ADN, ARN o formas derivadas de los mismos e incluyen cebadores de ácidos nucleicos, tales como cebadores de PCR y LCR, y sondas de ácido nucleico.

Las personas con conocimientos habituales en la materia a la que se refiere la invención apreciarán fácilmente los oligonucleótidos adecuados de uso en la invención teniendo en cuenta una o más de las secuencias de ácidos nucleicos del gen *PRLR*, cromosoma 20, en particular en las regiones genéticas próximas a un marcador genético, la naturaleza del marcador genético a analizar y los principios generales de la hibridación de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos serán capaces de hibridarse de una manera específica con un ácido nucleico diana y, en el caso de los cebadores, serán capaces de cebar una PCR o una reacción similar. Si bien dichos ácidos nucleicos tendrán

preferentemente el 100 % de complementariedad con su región diana del ARNm o ADNc de la proteína de interés, pueden contener uno o más nucleótidos no complementarios en una posición particular y al mismo tiempo conservan sustancialmente la especificidad por el ácido nucleico diana al que están diseñados para unirse. A modo de ejemplo, los ácidos nucleicos pueden tener aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de complementariedad u homología con su diana. A modo de ejemplo adicional, en determinados casos, los oligonucleótidos pueden diseñarse de manera que un emparejamiento incorrecto en una posición de nucleótido particular sea indicativo de la naturaleza del marcador genético que se analiza (por ejemplo, un SNP). A modo de ejemplo, un emparejamiento incorrecto en el nucleótido presente en el extremo 3' de un cebador LCR inhibirá la reacción proporcionando una indicación de la naturaleza del nucleótido en esa posición. Los emparejamientos incorrectos pueden utilizarse de manera similar en técnicas que incluyen ensayos de protección de ARNasa y PCR específica de alelo, así como en PCR de extinción de fluorescencia, por ejemplo. Normalmente, los ácidos nucleicos se hibridarán con su ácido nucleico diana en condiciones de hibridación estrictas (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Los cebadores o sondas oligonucleotídicas pueden tener cualquier longitud que sea adecuada para una aplicación particular, teniendo en cuenta la secuencia de la región genética a la que están diseñados para unirse. Una sonda o cebador normalmente será capaz de formar un híbrido estable con la secuencia complementaria con la que está diseñada para hibridarse. Por consiguiente, la longitud depende de la composición del ácido nucleico y del porcentaje de homología entre el oligonucleótido y su secuencia complementaria, así como las condiciones de hibridación que se utilizan (por ejemplo, temperatura y concentraciones de sal). Dichos factores de hibridación son bien conocidos en la materia a la que se refiere la invención. A modo de ejemplo, los oligonucleótidos de uso en la presente invención pueden tener de 2 a 500 nucleótidos de longitud. En una realización, en particular cuando se utilizan como cebadores, los oligonucleótidos pueden tener una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a 30 nucleótidos.

Los ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de uso en la invención incluyen CCTATTTTCTGGCCAATGGA (SEQ ID NO: 1), CAGCCCAACTGGAGTCTGC (SEQ ID NO: 2) y/o variantes funcionalmente equivalentes de uno o más de los mismos. En una realización, estos oligonucleótidos se utilizan como cebadores directos e inversos en un método de la invención que utiliza PCR.

En una realización particular, los oligonucleótidos CCTATTTTCTGGCCAATGGA (SEQ ID NO: 1) y CAGCCCAACTGGAGTCTGC (SEQ ID NO: 2) y/o variantes funcionalmente equivalentes de uno o más de los mismos se utilizan como cebadores directos e inversos para la detección de una alteración genética en la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus* de acuerdo con un método de la invención.

Los cebadores y sondas oligonucleotídicas de uso en la invención pueden prepararse mediante cualquier método convencional de síntesis de ADN, incluidas técnicas recombinantes y síntesis química, o pueden adquirirse comercialmente. Se apreciará que se puede evaluar la utilidad de cualquier sonda o cebador, al menos teóricamente, mediante el programa informático adecuado y la información de secuencia para el ácido nucleico que codifica la proteína de interés. Por ejemplo, paquetes de programas informáticos como Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>), PC Oligo5 (National Bioscience Inc), Amplify (Universidad de Wisconsin) y el programa PrimerSelect (DNASar Inc) pueden utilizarse para diseñar y evaluar cebadores.

Cuando se utilizan técnicas de amplificación (por ejemplo, PCR) en los métodos de la invención, la amplificación se puede realizar de acuerdo con procedimientos convencionales en la materia a la que se refiere esta invención, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.683.202. A modo de ejemplo, las reacciones de PCR generalmente incluirán de 0,1 µM a 1 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ de 3 a 7 mM y 1 U de ADN polimerasa Taq. Asimismo, las condiciones de ciclado de PCR ilustrativas incluyen: desnaturalización a una temperatura de aproximadamente 94 °C durante 30 a 60 segundos, hibridación a una temperatura calculada en función de la secuencia y la longitud del cebador (como se analiza más adelante en el presente documento) durante 30 a 60 segundos, y extensión a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 72 °C durante 30 a 60 segundos. A modo de ejemplo, se ejecutan entre 25 y 45 ciclos.

Los expertos en la materia apreciarán que cualquier condición de amplificación proporcionada en el presente documento es meramente ilustrativa y puede variarse para optimizar las condiciones en las que, por ejemplo, se utilizan cicladores de PCR alternativos o ADN polimerasas, donde la calidad del ADN molde difiere, o donde se utilizan variaciones de los cebadores no ejemplificados específicamente en el presente documento, sin apartarse del alcance de la presente invención. Las condiciones de la PCR pueden alterarse u optimizarse mediante el cambio de la concentración de los diversos constituyentes dentro de la reacción y/o el cambio de los constituyentes de la reacción, la alteración del número de ciclos de amplificación, la desnaturalización, los tiempos y temperaturas de hibridación o extensión, o la cantidad de ADN molde, por ejemplo. Los expertos en la materia apreciarán que existen otras formas en las que se pueden optimizar las condiciones de la PCR para superar la variabilidad entre reacciones.

Se entenderá que, si bien no se ejemplifica específicamente en el presente documento, las temperaturas de hibridación adecuadas para cualquier cebador dentro del alcance de la presente invención pueden derivar de la temperatura de fusión calculada de ese cebador. Dichas temperaturas de fusión pueden calcularse mediante fórmulas convencionales,

tales como las descritas en Sambrook y Russell, 2001. Como entenderán los expertos en la materia a la que se refiere esta invención, las temperaturas de hibridación pueden estar por encima o por debajo de la temperatura de fusión, pero generalmente es adecuada una temperatura de hibridación de aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura de fusión calculada del cebador.

Los oligonucleótidos utilizados para la detección y/o análisis de marcadores genéticos de acuerdo con la invención pueden modificarse para facilitar dicha detección. De manera similar, los productos de ácido nucleico obtenidos usando técnicas tales como PCR pueden modificarse para facilitar la detección y/o el análisis. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden marcarse para facilitar la identificación visual mediante técnicas convencionales en la materia. A modo de ejemplo, los ácidos nucleicos pueden radiomarcarse usando P³² como se describe en Sambrook y Russell, 2001. Asimismo, los ácidos nucleicos pueden marcarse de manera adecuada para su uso en procedimientos colorimétricos, fluorogénicos o de quimioluminiscencia.

Se apreciará que los métodos de la invención pueden emplear una o más muestras de control. Dichas muestras de control pueden ser controles positivos o negativos para un marcador genético particular. El tipo de muestras de control utilizadas puede variar dependiendo de dichos factores tales como la naturaleza del marcador genético que se analiza y la técnica específica que se utiliza para dicha detección y análisis. Los controles positivos pueden incluir muestras que tengan secuencias de ácidos nucleicos conocidas o que sean de un tamaño conocido, por ejemplo. Los controles negativos pueden incluir muestras que no tengan ácido nucleico presente. A modo de ejemplo general, en el análisis de un control positivo de SNP, las muestras podrían incluir ácidos nucleicos que se sabe que tienen un nucleótido particular en la posición en cuestión. En una realización, el método puede utilizar una muestra de control que tiene una secuencia que no está asociada con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, o que está asociada con una tolerancia sustancialmente limitada al calor, una resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura del pelaje indeseable. En otra realización, el método puede utilizar una muestra de control que tiene una secuencia que está asociada con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

Los métodos de esta realización de la invención pueden implicar comparar la secuencia de un ácido nucleico que se está probando con una o más secuencias de referencia, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Los métodos de la invención pueden implicar tomar una muestra (como se describió anteriormente en el presente documento) de un animal que se va a analizar. En esta realización de la invención, las muestras se analizan mediante técnicas que permiten la observación o el análisis de los ácidos nucleicos, incluida la secuencia de un ácido nucleico particular.

Para facilitar la detección de un marcador genético de acuerdo con la invención, puede procesarse una muestra antes del análisis. Por ejemplo, se puede procesar la muestra para aislar el ácido nucleico de la muestra que se va a analizar o para amplificar una región genética específica que se va a analizar.

En una realización, el ácido nucleico se aísla o extrae de la muestra antes del análisis. En una realización, el ADN genómico se aísla o se extrae de la muestra. En una realización alternativa, el ARNm puede aislarse o extraerse de la muestra. En tal caso, el ARNm puede convertirse en ADNc mediante técnicas de transcripción inversa conocidas en la materia. Los expertos apreciarán fácilmente las técnicas para aislar ácidos nucleicos de muestras. A modo de ejemplo, los métodos de uso para aislar ácidos nucleicos se describen en Sambrook y Russell, 2001.

En una forma alternativa de esta realización de la invención, el análisis del ácido nucleico puede realizarse *in situ* obviando la necesidad de extraer el ácido nucleico de la muestra. Esto se puede hacer mediante PCR, por ejemplo. Los expertos apreciarán fácilmente las técnicas y metodologías adecuadas para este fin (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001).

Los métodos de la invención se pueden combinar con uno o más métodos de uso para evaluar el genotipo, predecir el fenotipo, seleccionar un animal, célula o embrión en función de determinadas características, estimar valores de reproducción o estimar el valor y similares. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. Por consiguiente, los métodos de la invención pueden incluir, además del análisis de un marcador genético identificado en el presente documento, el análisis de marcadores genéticos adicionales, y/o del nivel de expresión de determinados genes/proteínas, y/o de uno o más rasgos fenotípicos, por ejemplo.

Ácidos nucleicos

La invención también proporciona el uso de ácidos nucleicos que portan marcadores genéticos en los métodos de la invención. Por ejemplo, en los métodos de la invención se pueden utilizar ácidos nucleicos aislados que abarcan una región de un gen *PRLR* en la que reside un marcador genético como el descrito anteriormente en el presente documento.

La invención también abarca el uso de ácidos nucleicos que pueden hibridarse, preferentemente en condiciones

estrictas (como se describió anteriormente en el presente documento), a una región de un gen *PRLR* en la que reside uno o más de los marcadores genéticos de la invención. Dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse como cebadores o de otro modo en el análisis de marcadores genéticos de la invención, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

5 Los ácidos nucleicos utilizados en los métodos de la invención pueden tener el 100 % de identidad de secuencia, homología o complementariedad con la región en cuestión de un gen *PRLR*, pero también puede tener alguna variación de secuencia.

10 Por ejemplo, los ácidos nucleicos utilizados en los métodos de la invención pueden tener aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia, homología o complementariedad.

15 Los ácidos nucleicos utilizados en los métodos de la invención pueden tener cualquier longitud adecuada. En una realización, tienen al menos 4 nucleótidos de longitud, o al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más nucleótidos de longitud.

20 En una realización, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico que comprende (o en una realización que consiste en) la secuencia de nucleótidos GACCAAACAGACCAACATG (C)del TTAAAAAGCCTCAAAAACCA en donde (C)del indica la ausencia de una C en esa posición (es decir, GACCAAACAGACCAACATGTTTAAAAAGCCTCAAAAACCA - SEQ ID NO: 3).

25 En otras realizaciones, un ácido nucleico utilizado en los métodos de la invención comprende (o en una realización que consiste en) la secuencia de nucleótidos CCTATTTTCTGGCCAATGGA (SEQ ID NO: 1), CAGCCCAACTGGAGTCTGC (SEQ ID NO: 2) o una secuencia de nucleótidos que es una variante funcionalmente equivalente de uno cualquiera o más del mismo. Dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse como cebadores en un método de la invención que implica el uso de PCR.

30 En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de uno o más ADNc que comprenden una alteración genética como se describe en el presente documento o que codifica un *PRLR*, una isoforma, fragmento o precursor del mismo, incluidos aquellos que comprenden una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos.

Variación en la secuencia de aminoácidos

35 En el presente documento también se divulgan métodos que comprenden analizar uno o más *PRLR*, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, y/o uno o más fragmentos del mismo de dicho animal para determinar si incluye o no una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos. Dichas una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos serán indicativas de un animal y/o animales que tienen o es más probable que tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una
40 realización, la una o más variaciones dan como resultado un aumento en la actividad de *PRLR*. La variación en la secuencia de aminoácidos puede ser la adición de uno o más aminoácidos, la eliminación de uno o más aminoácidos, la sustitución de uno o más aminoácidos, o una combinación de dos o más de los mismos. En una realización particular, la variación en la secuencia de aminoácidos es una eliminación de uno o más aminoácidos. En una realización, la una o más variaciones es una sustitución de aminoácidos. En una realización, la secuencia de aminoácidos de *PRLR* está
45 truncada. En determinadas realizaciones, la una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos es como se describió anteriormente en el presente documento.

50 Debe apreciarse que pueden identificarse una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos mediante la observación del tamaño de *PRLR*, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo.

55 En determinadas realizaciones, la una o más variaciones de aminoácidos están ubicadas en una región correspondiente a la posición del aminoácido 430 a la posición de aminoácido 490 de *PRLR* de *Bos taurus*, en una región correspondiente a la posición del aminoácido 440 a la posición del aminoácido 480 de *PRLR* de *Bos taurus*, en una región correspondiente a la posición de aminoácido 450 a la posición de aminoácido 470 de *PRLR* de *Bos taurus* o en una región correspondiente a la posición de aminoácido 455 a la posición de aminoácido 465 de *PRLR* de *Bos taurus*.

60 En una realización, una o más variaciones de aminoácidos son una sustitución de alanina por valina en una posición correspondiente a la posición 461 de *PRLR* de *Bos taurus*. En una realización particular, una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos es una eliminación que da como resultado el truncamiento de *PRLR*. En una realización, una o más variaciones dan como resultado un truncamiento de *PRLR* en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 430 hasta una posición de aminoácido correspondiente a la posición 490 de *PRLR* de *Bos taurus*, un truncamiento de *PRLR* en una posición de
65 aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 440 hasta la posición de aminoácido 480 de *PRLR* de *Bos taurus*, un truncamiento de *PRLR* en una posición de

aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 450 hasta la posición de aminoácido 470 de PRLR de *Bos taurus*, o un truncamiento de PRLR en una posición de aminoácido que está en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 455 hasta la posición de aminoácido 465 del PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más alteraciones dan como resultado un truncamiento de PRLR en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, una o más variaciones de aminoácidos es una sustitución de una alanina por una valina en la posición 461 y el truncamiento de PRLR a una posición correspondiente a la posición del aminoácido 461 de PRLR de *Bos taurus*. En una realización, un método podría comprender probar la presencia o ausencia de una valina carboxiterminal, por ejemplo.

En la medida en que un marcador biológico pueda incluir la adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, o el tamaño de una proteína (incluida la referencia a uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma, y/o uno o más fragmentos de la misma), los métodos pueden implicar la observación o medición del tamaño de una proteína, uno o más precursores de la misma, una o más isoformas de la misma y/o uno o más fragmentos de la misma. En una realización particular, la presencia de un PRLR que tiene 430 aminoácidos de longitud o menos, de 430 a 490 aminoácidos de longitud, de 440 a 480 aminoácidos de longitud, de 450 a 470 aminoácidos de longitud, de 455 a 465 aminoácidos de longitud, implica que un animal, célula o embrión porta un marcador biológico relacionado con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización particular, la presencia de un PRLR que tiene 461 aminoácidos de longitud o menos implica que un animal, célula o embrión porta un marcador biológico relacionado con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

El PRLR, isoformas del mismo, precursores del mismo y/o fragmentos del mismo pueden analizarse mediante técnicas convencionales conocidas en la materia. Sin embargo, a modo de ejemplo, se podrían utilizar métodos de secuenciación de péptidos, espectrometría de masas, transferencia Western y ELISA.

Los métodos pueden emplear una o más muestras de control, tales como controles positivos y/o negativos para una variación de secuencia de aminoácidos particular. El tipo de muestras de control utilizadas puede variar dependiendo de factores tales como el tipo de variación que se analiza y la técnica específica que se utiliza para la detección y el análisis. Los controles positivos pueden incluir muestras que tengan secuencias de aminoácidos conocidas o que sean de un tamaño conocido, por ejemplo. Los controles negativos pueden incluir muestras que no tengan péptido presente. En una realización, el método puede utilizar una muestra de control que tiene una secuencia que no está asociada con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, o que está asociada con una tolerancia sustancialmente limitada al calor, resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura de pelaje indeseable. En otra realización, el método puede utilizar una muestra de control que tiene una secuencia que está asociada con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

Los métodos de esta realización pueden implicar comparar la secuencia de un péptido o proteína que se está probando con una o más secuencias de referencia, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Los métodos pueden implicar tomar una muestra para someter a prueba a un animal. Para facilitar el análisis de un péptido, puede procesarse una muestra antes del análisis de acuerdo con cualquiera de varios métodos conocidos. Por ejemplo, la muestra puede procesarse para eliminar una o más proteínas de alta abundancia que podrían dificultar el análisis del PRLR, una isoforma, fragmento o precursor del mismo. Las técnicas ilustrativas que pueden emplearse para procesar una muestra antes del análisis del PRLR, una isoforma, fragmento o precursor del mismo se describen en otra parte del presente documento.

Proteínas o péptidos

En el presente documento también se divulgan péptidos y proteínas que portan marcadores biológicos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se describen péptidos o proteínas aislados que abarcan una región de PRLR en la que reside un marcador biológico como el descrito anteriormente.

Los péptidos o proteínas pueden tener cualquier longitud adecuada. En una realización, tienen al menos 4 aminoácidos de longitud, o al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más aminoácidos de longitud.

En el presente documento también se divulga un péptido que consiste o comprende (o en una realización que consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Nivel de PRLR, precursores, fragmentos y/o isoformas

En el presente documento también se divulgan métodos para observar el nivel de uno o más PRLR (incluida la referencia a una cualquiera o más isoformas de PRLR, una cualquiera o más precursores de PRLR, uno cualquiera o más fragmentos de PRLR) y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los anteriores.

Como se mencionó anteriormente en el presente documento, los inventores contemplan que un aumento en el nivel (por ejemplo, un aumento en el nivel de expresión) de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores o fragmentos del mismo) y/o un ácido nucleico que lo codifica implica que lo más probable es que un animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Por tanto, los inventores contemplan que se puede considerar que cualquier aumento en el nivel implica una mayor tolerancia al calor (y/o una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable) en el animal y/o en su descendencia. De manera similar, una disminución o un aumento sustancialmente nulo en el nivel (por ejemplo, el nivel de expresión) en comparación con un patrón también puede implicar una disminución o un aumento sustancialmente nulo en la tolerancia al calor, aumento de la resistencia a las garrapatas, y/o una textura del pelaje indeseable para el animal y/o su descendencia.

En determinadas realizaciones, los métodos pueden tomar una muestra de un animal, observar el nivel (en una realización el nivel de expresión) de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) o ácidos nucleicos que lo codifican, y comparar el nivel con uno o más patrones. Los niveles observados en la muestra y cualquier diferencia en el nivel entre la muestra y el patrón implican si es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el patrón representa un nivel de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) y/o un ácido nucleico que lo codifica, que está asociado con un nivel en un animal o animales que tienen una tolerancia sustancialmente limitada al calor, resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura de pelaje indeseable. En otra realización, el patrón representa un nivel de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) y/o un ácido nucleico que lo codifica que está asociado con un nivel en un animal (o animales) que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, un nivel más elevado de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) o un ácido nucleico que lo codifica en comparación con un patrón (que tiene un nivel asociado con un animal o animales que tienen una tolerancia sustancialmente limitada al calor, resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura de pelaje indeseable, por ejemplo) implica que lo más probable es que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, sustancialmente similar a, sustancialmente el mismo o un nivel menor de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores o fragmentos del mismo) o un ácido nucleico que lo codifica implica que lo más probable es que el animal tenga una tolerancia al calor disminuida, sustancialmente limitada o sustancialmente no aumentada, mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura del pelaje indeseable.

En una realización, cuando el patrón representa un nivel de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) y/o un ácido nucleico que lo codifica que está asociado con un nivel en un animal (o animales) que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y el animal sometido a prueba tiene un nivel de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) o un ácido nucleico que lo codifica sustancialmente similar a, sustancialmente el mismo o superior al patrón, se deduce que lo más probable es que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Cuando el animal sometido a prueba tiene un nivel inferior al del patrón, se puede deducir que lo más probable es que el animal tenga una tolerancia al calor disminuida, sustancialmente limitada o sustancialmente no aumentada, resistencia a las garrapatas sustancialmente no aumentada y/o una textura de pelaje indeseable.

El PRLR (incluida la referencia a uno o más precursores, fragmentos y/o isoformas del mismo) y los ácidos nucleicos que codifican los mismos pueden detectarse y compararse sus niveles con un patrón mediante una cualquiera o una combinación de técnicas que son útiles para identificar, cuantificar y/o resaltar niveles diferenciales o expresión de una o más proteínas. Dichas técnicas serán fácilmente apreciadas por los expertos habituales en la materia a la que se refiere la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo, los niveles de PRLR (incluida la referencia a uno o más precursores, fragmentos y/o isoformas del mismo) pueden medirse mediante métodos de purificación de proteínas, técnicas inmunológicas, separación de proteínas basada en características tales como el peso molecular y el punto isoelectrico, incluida la electroforesis en gel (por ejemplo, PAGE) y tecnologías basadas en microfluidos como, por ejemplo, en técnicas de separación de proteínas sin gel, y espectrometría de masas (MS) que utiliza MS basada en marcadores isobáricos, tal como iTRAQ o enfoques sin marcadores, tal como la monitorización de reacción múltiple (MRM).

Las técnicas inmunológicas adecuadas incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (ELISA en sándwich, ELISA en sándwich doble, ELISA directa, ELISA de micropartículas), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, transferencia de Western, tinción inmunohistoquímica, matrices de anticuerpos o ensayos de aglutinación. Los protocolos para llevar a cabo dichas técnicas están disponibles; por ejemplo, véase "Antibodies a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

Los anticuerpos de uso en dichas técnicas inmunológicas pueden adquirirse comercialmente o producirse de acuerdo con una metodología convencional en la materia teniendo en cuenta la naturaleza de las proteínas que se van a

analizar. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con los procedimientos descritos en el texto "Antibodies a Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) usando una o más de las proteínas o un fragmento de las mismas como antígeno. Preferentemente se utilizan anticuerpos monoclonales.

5 Las técnicas de uso basadas en ácidos nucleicos para determinar el nivel de un ácido nucleico (por ejemplo niveles de ADNc) pueden incluir procedimientos de visualización diferencial, transferencia Northern, PCR competitiva, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR), análisis de micromatrices y secuenciación de ARN. Los expertos en la materia a la que se refiere la invención apreciarán fácilmente la metodología para realizar estas técnicas.

15 Los ácidos nucleicos, tales como cebadores y sondas oligonucleotídicas, de uso en la detección de niveles de expresión de proteínas (por ejemplo, usando transferencia Northern o PCR competitiva) serán fácilmente apreciados por los expertos teniendo en cuenta la información contenida en el presente documento y cualquier información publicada sobre secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleicos para PRLR. Los ácidos nucleicos serán capaces de hibridarse de manera específica a un ARNm o ADNc asociado con PRLR y, en el caso de cebadores, serán capaces de cebar una reacción de PCR o similar.

20 Las técnicas de espectroscopía de masas se describen, por ejemplo, en "Proteins and proteomics-A Laboratory manual" (RJ Simpson, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002).

25 Los niveles de PRLR (incluida la referencia a uno o más fragmentos, precursores y/o isoformas) o ácidos nucleicos que los codifican en una muestra frente a un patrón se pueden comparar usando tecnología convencional teniendo en cuenta el método empleado para detectar la proteína o ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas colorimétricas y fluorométricas en las que una molécula de detección (tal como un anticuerpo o una sonda o cebador de ácido nucleico) se marca con una molécula que puede visualizarse a simple vista o detectarse de otro modo usando un espectrofotómetro o un fluorómetro, por ejemplo. De manera alternativa, las moléculas de detección podrían marcarse con radioisótopos. La incorporación de marcadores en los ácidos nucleicos durante la amplificación por PCR cuando se emplea (en lugar de marcar una molécula de detección, tal como una sonda o un cebador), también se contempla.

Los expertos en la materia a la que se refiere la invención conocerán métodos para marcar moléculas y posteriormente medir la intensidad de las señales generadas.

35 Cabe apreciar que además de analizar muestras y patrones, los métodos pueden incluir la prueba de una o más muestras de control positivas o negativas para garantizar la integridad de los resultados. Por ejemplo, se podría incluir una muestra que no contenga proteína/ácido nucleico y una o más muestras que contengan un nivel conocido de proteína/ácido nucleico para que los resultados puedan calibrarse en diferentes ejecuciones del método.

40 Una muestra tomada de un animal podrá procesarse antes del análisis del PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos) y/o un ácido nucleico que lo codifica para facilitar el análisis de las proteínas o ácidos nucleicos. Las personas expertas apreciarán fácilmente las etapas de procesamiento adecuadas y las técnicas adecuadas para realizarlas.

45 En una realización, las proteínas de gran abundancia que tienen el potencial de dificultar el análisis, tal como detectar y/o medir el nivel de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos) pueden eliminarse de la muestra. Por ejemplo, se puede utilizar el agotamiento de Top6 o Top7. La muestra también puede estar sujeta a digestión proteolítica. Como tal, se debe considerar que la detección de una proteína o isoforma incluye la detección de uno o más fragmentos de la misma. Los fragmentos deben tener una longitud suficiente para garantizar la especificidad del PRLR. Dichos fragmentos tendrán, por ejemplo, al menos 8 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 10, 15 o 20 aminoácidos de longitud.

50 Las etapas de procesamiento para preparar una muestra para el análisis de ácidos nucleicos que codifican PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos) pueden incluir lisis de células, aislamiento de ARNm y generación de ADNc mediante procedimientos convencionales, tales como PCR con transcripción inversa, como se conocerá en la materia a la que se refiere la invención. En una realización, el ARNm puede observarse *in situ*.

60 Los expertos podrán apreciar fácilmente otros medios mediante los cuales se puede procesar la muestra para su uso en la invención.

Actividad de PRLR, precursores, fragmentos y/o isoformas

65 En el presente documento también se divulgan métodos para observar el nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a uno o más precursores, isoformas y/o fragmentos del mismo).

Como se mencionó anteriormente en el presente documento, los inventores contemplan que un aumento en el nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores o fragmentos del mismo) implica que lo más probable es que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Por tanto, los inventores contemplan que se puede considerar que cualquier aumento en el nivel de actividad implica una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en el animal y/o en su descendencia. De manera similar, una disminución o un aumento sustancialmente nulo en el nivel de actividad en comparación con un patrón también puede implicar una disminución o un aumento sustancialmente nulo en la tolerancia al calor, aumento de la resistencia a las garrapatas, y/o una textura del pelaje indeseable para el animal y/o su descendencia.

En determinadas realizaciones, los métodos pueden implicar tomar una muestra de un animal, observar el nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo), y comparar el nivel de actividad frente a uno o más patrones. El nivel de actividad observado en la muestra y cualquier diferencia entre la muestra y el patrón implican que es más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, el patrón representa un nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) que está asociado con un nivel en un animal o animales que tienen una tolerancia sustancialmente limitada al calor, resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura de pelaje indeseable. En otra realización, el patrón representa un nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) que está asociado con un nivel en un animal (o animales) que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

En una realización, un mayor nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) en comparación con un patrón (que tiene un nivel asociado con un animal o animales que tienen una tolerancia sustancialmente limitada al calor, resistencia sustancialmente limitada a las garrapatas y/o una textura de pelaje indeseable, por ejemplo) implica que lo más probable es que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, sustancialmente similar a, sustancialmente el mismo o inferior al nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores o fragmentos del mismo) implica que lo más probable es que el animal tenga una tolerancia al calor disminuida, sustancialmente limitada o sustancialmente no aumentada, resistencia a las garrapatas sustancialmente no aumentada y/o una textura de pelaje indeseable.

En una realización, donde el patrón representa un nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) que está asociado con un nivel en un animal (o animales) que tiene una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y el animal sometido a prueba tiene un nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos del mismo) sustancialmente similar a, sustancialmente el mismo o superior al patrón, se deduce que lo más probable es que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Cuando el animal sometido a prueba tiene un nivel inferior al del patrón, se puede deducir que lo más probable es que el animal tenga una tolerancia al calor disminuida, sustancialmente limitada o sustancialmente no aumentada, resistencia a las garrapatas sustancialmente no aumentada y/o una textura de pelaje indeseable.

El nivel de actividad de PRLR se puede medir mediante una metodología convencional como se conoce en la materia, teniendo en cuenta la función del PRLR. A modo de ejemplo, los métodos utilizados pueden implicar una o más de las siguientes técnicas: inmunoprecipitación, transferencia de Western, ELISA, espectrometría de masas, resonancia de plasmón superficial, calorimetría de titulación isotérmica, ensayos de luciferasa y ensayos de genes indicadores. En una realización, la actividad de PRLR puede medirse mediante la medición de uno o más eventos cadena abajo de la señalización de PRLR, tal como fosforilación de una o más moléculas. En un ejemplo particular, se podrían utilizar métodos que impliquen inmunoprecipitación con un anticuerpo PRLR seguido de transferencia Western o ELISA que mida la fosforilación de tirosina de JAK2 (Janus Kinase 2) y/u otras moléculas fosforiladas cadena abajo de la señalización de PRLR. A modo de ejemplo adicional, se podrían utilizar los métodos descritos en Perot-Appianat *et al.*, 1997, Mol Endo 11(8).

El nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a uno o más fragmentos, precursores y/o isoformas) en una muestra y cualquier diferencia en la misma frente a un patrón se puede comparar mediante tecnología convencional teniendo en cuenta el método empleado para detectar la actividad. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas colorimétricas y fluorométricas en las que una molécula de detección (tal como un anticuerpo o una sonda o cebador de ácido nucleico) se marca con una molécula que puede visualizarse a simple vista o detectarse de otro modo usando un espectrofotómetro o un fluorómetro, por ejemplo. De manera alternativa, las moléculas de detección podrían marcarse con radioisótopos. Sin embargo, puede utilizarse a modo de ejemplo la metodología descrita en Perrot-Appianat *et al.*, 1997 Mol Endo 11(8).

Cabe apreciar que además de analizar muestras y patrones, los métodos pueden incluir la prueba de una o más muestras de control positivas o negativas para garantizar la integridad de los resultados. Por ejemplo, se podría incluir

una muestra que no contenga proteínas y una o más muestras que contengan una proteína con un nivel de actividad conocido para que los resultados puedan calibrarse en diferentes ejecuciones del método.

5 Se puede procesar una muestra antes de analizar la actividad del PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos). Las personas expertas apreciarán fácilmente las etapas de procesamiento adecuadas y las técnicas adecuadas para realizarlas.

10 En una realización, las proteínas de gran abundancia que tienen el potencial de dificultar el análisis, tal como detectar y/o medir el nivel de actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos) pueden eliminarse de la muestra. Por ejemplo, se puede utilizar el agotamiento de Top6 o Top7. A modo de ejemplo adicional, también podría utilizarse la inmunoprecipitación de la proteína de interés.

15 Las etapas de procesamiento para preparar la muestra para el análisis de la actividad de PRLR (incluida la referencia a una o más isoformas, precursores y/o fragmentos) pueden incluir lisis celular, inmunoprecipitación y preparación de membranas celulares, por ejemplo. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente otras técnicas útiles que pueden utilizarse.

20 Los expertos podrán apreciar fácilmente otros medios mediante los cuales se puede procesar la muestra para su uso en la invención.

Reproducción y clonación

25 En el presente documento también se describen métodos para reproducir animales. Se pueden utilizar varios métodos de la invención (tales como los utilizados para determinar si es más probable que un animal tenga o no una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable y métodos para seleccionar animales (incluyendo seleccionar sus gametos, por ejemplo)) para identificar animales (o gametos, por ejemplo) de uso en los métodos de reproducción descritos en el presente documento. Dichos métodos pueden comprender identificar al menos un primer animal que tiene o se deduce que tiene más probabilidades de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable (mediante uno o 30 más métodos como se describe en el presente documento), y aparear dicho animal con un segundo animal. En un aspecto, el método puede comprender además identificar al menos un segundo animal que tiene o se deduce que tiene más probabilidades de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y aparear dicho al menos segundo animal con al menos un primer animal. Por ejemplo, un método puede comprender seleccionar un primer animal (y opcionalmente también un segundo animal) identificado por tener uno o más marcadores biológicos como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, el apareamiento producirá una o más crías. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

40 En el presente documento también se divulgan métodos de reproducción que comprenden: 1) seleccionar un primer gameto y/o un segundo gameto y fusionar dicho primer gameto con dicho segundo gameto para formar un cigoto; 2) seleccionar un embrión. En el presente documento se divulga un método de clonación de un animal, que comprende seleccionar una o más células mediante un método de la invención. Se pueden utilizar uno o más métodos de la invención (tales como aquellos para seleccionar o rechazar una o más células o embriones) para identificar y seleccionar gametos y embriones adecuados para estos métodos de reproducción. Por ejemplo, un método de estos 45 aspectos puede comprender seleccionar un gameto, embrión o célula identificada por tener uno o más marcadores biológicos como se describe en el presente documento. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

50 En los métodos de reproducción descritos en el presente documento, los animales pueden aparearse utilizando cualquier método adecuado, incluido de forma natural, inseminación artificial o FIV. En dichos casos, se pueden seleccionar gametos individuales para su uso en el proceso. Dichos gametos pueden seleccionarse mediante un método de la invención; por ejemplo, se puede utilizar un método de la invención para identificar animales de los que se deduce que es más probable que tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y gametos de aquellos animales seleccionados para su uso en un programa o proceso 55 de reproducción o los gametos pueden probarse de acuerdo con la invención y después seleccionarse para su uso en un programa o proceso de reproducción como se describe en el presente documento. En un aspecto particular, podría utilizarse un método de selección o rechazo de uno o más animales para seleccionar el primer y/o segundo animal y sus gametos utilizados en FIV. En otro aspecto, podría utilizarse un método para seleccionar o rechazar una o más células para seleccionar un primer y/o segundo gameto y seleccionar gametos utilizados en FIV. Tras la selección de gametos masculinos y femeninos, el gameto femenino se fecunda *in vitro*. En el momento pertinente, uno o más 60 embriones se transfieren a una portadora gestacional. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

65 En un aspecto, puede producirse la fecundación *in vitro* de un gameto femenino y después utilizar un método de la invención para determinar si un embrión tiene o no un genotipo/fenotipo deseado y debe seleccionarse o rechazarse para uso posterior en un programa de reproducción. Esto podría ocurrir cuando los gametos individuales, o los

animales de los cuales se obtuvieron o procedieron, no han sido probados para determinar si es probable que tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable antes de la fecundación (en consecuencia, en el presente documento se describen métodos de reproducción en los que el primer y/o segundo animal y/o gametos no se seleccionan basándose en dicha prueba, pero se prueba y selecciona un embrión o descendencia resultante). De manera alternativa, se podría utilizar un método en el que los gametos individuales, o los animales de los que se han obtenido o han procedido, se han probado y seleccionado basándose en que tienen un genotipo/fenotipo deseable, con fines de control de calidad o para comprobar que los embriones resultantes tengan el mismo genotipo/fenotipo deseable. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada.

Opcionalmente, tras el apareamiento de los animales, se pueden utilizar uno o más métodos de la invención para determinar si alguna descendencia tiene o se puede deducir que tiene las características deseadas asociadas con PRLR como se describió anteriormente en el presente documento. Estas pruebas pueden realizarse en cualquier momento durante la vida de la descendencia, incluso antes del nacimiento; solo a modo de ejemplo, analizar un embrión, un feto, líquido amniótico, placenta, sangre materna, al nacer.

En determinados casos, la clonación puede utilizarse para generar un animal. En dichos casos, el método puede comprender identificar al menos un primer animal que tiene o se deduce que tiene más probabilidades de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable (mediante uno o más métodos como se describe en el presente documento) y utilizando el núcleo o la cromatina de una o más células de ese animal en un procedimiento de clonación (tal como transferencia nuclear de células somáticas, técnicas de transferencia de cromatina y división de embriones). Dichos métodos de clonación se describen, por ejemplo, en Bovine somatic cell nuclear transfer Ross PJ and Cibelli, JB 2010. Methods in Molecular Biology 636: 155-177. En el momento pertinente durante el procedimiento de clonación, uno o más embriones serán transferidos a una portadora gestacional.

En determinadas realizaciones, un procedimiento de clonación puede utilizar una célula procedente de una estirpe celular y se puede utilizar un método de la invención para seleccionar una célula que sea, o una estirpe celular cuyas células sean, capaz de utilizarse para generar un animal que probablemente tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. En una realización, la estirpe celular puede ser una estirpe celular embrionaria.

Se pueden seleccionar una o más células de uso en la clonación mediante un método de la invención. Después de la selección de una o más células se puede realizar un procedimiento de clonación. Por ejemplo, se puede utilizar un método de la invención para identificar animales de los que se deduce que es más probable que tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y células de aquellos animales seleccionadas para su uso en un proceso de clonación. De manera similar, se puede utilizar un método de la invención para identificar células de una estirpe celular que comprenden una o más alteraciones genéticas como se describe en el presente documento y puede ser útil para generar un animal que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Los métodos de la invención también podrían utilizarse para identificar animales cuyas células podrían utilizarse para generar estirpes celulares con fines de clonación.

En una realización particular, se podría utilizar un método para seleccionar o rechazar uno o más animales como se describe en el presente documento para seleccionar un animal para la clonación. En otra realización, se podría utilizar un método para seleccionar o rechazar una o más células como se describe en el presente documento para seleccionar una o más células para su uso en la clonación.

Opcionalmente, en diversas etapas durante el procedimiento de clonación, se pueden utilizar uno o más métodos de la invención para determinar si algún animal clonado tiene o se puede deducir que tiene o no las características deseadas asociadas con PRLR como se describió anteriormente en el presente documento. Estas pruebas pueden realizarse en cualquier momento durante la vida del animal clonado. Solo a modo de ejemplo, análisis de un blastocisto, un embrión, un feto, líquido amniótico, placenta, sangre materna, al nacer.

Además, un método de clonación de la invención puede implicar seleccionar células deseables sin probar esas células o los animales o la estirpe celular de la que provienen para determinar la presencia o ausencia de un marcador biológico asociado con una mayor tolerancia al calor y/o una textura de pelaje deseable. Se puede iniciar el procedimiento de clonación y después utilizarse un método de la invención para determinar si un embrión, feto o animal resultante del procedimiento de clonación tiene un marcador biológico en cuestión de acuerdo con la invención, y seleccionar un embrión, feto o animal cuando tenga un genotipo/fenotipo deseable.

Los métodos de reproducción descritos en el presente documento o los métodos de clonación de la invención pueden implicar someter una o más células, cigotos, embriones y/o fetos, por ejemplo, a uno cualquiera de varios métodos convencionales de crecimiento y/o gestación.

Formación de un rebaño

En el presente documento también se divulgan métodos para formar un rebaño de animales. Dichos métodos pueden comprender determinar si un animal porta o no un marcador biológico relacionado con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable como se describe en el presente documento, determinar si es más probable que un animal (y/o su descendencia) tenga o no una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable como se describe en el presente documento, seleccionar o rechazar un animal como se describe en el presente documento, y/o estimar el valor de un animal como se describe en el presente documento, por ejemplo. En determinadas realizaciones, también se pueden utilizar métodos de la invención que implican seleccionar o rechazar una o más células para seleccionar uno o más animales para su inclusión en un rebaño. Los animales pueden seleccionarse o rechazarse para su inclusión en el rebaño en función de los resultados de uno o más de los métodos de la invención antes mencionados. En determinadas realizaciones, cuando se identifica que un animal tiene uno o más marcadores biológicos de acuerdo con la invención o se deduce que es más probable que tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, y/o tener un "valor" deseable, puede seleccionarse para su inclusión en el rebaño. Cuando se identifica que un animal no tiene uno o más marcadores biológicos de acuerdo con la invención o se deduce que es más probable que no tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, o se deduce que tiene una tolerancia sustancialmente limitada al calor y/o una textura de pelaje indeseable y/o que no tiene un "valor" deseable, se puede rechazar y no seleccionar para su inclusión en el rebaño.

En determinadas realizaciones, se seleccionan animales que son homocigotos para uno o más marcadores biológicos de acuerdo con la invención para su inclusión en un rebaño, aunque esto puede no ser lo preferido.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, los métodos implican analizar uno o más animales o células de acuerdo con un método de la invención, seleccionar animales que tengan un genotipo/fenotipo deseable o que se deduzca que tienen una o más características o valores deseados y formar un rebaño con los animales seleccionados.

En el presente documento también se divulga un rebaño formado mediante los métodos descritos en el presente documento.

El rebaño de animales puede formarse por cualquier motivo deseable. Sin embargo, solo a modo de ejemplo, puede ser deseable formar un rebaño para: cría de ganado vacuno; producción de leche; producción de carne; producción de huevos; y/o producción de pelaje, pelo, lana, piel o plumas.

Métodos de edición de genes

Como se señaló anteriormente en el presente documento, la identificación por parte de los inventores de que una alteración en el gen *PRLR* está asociada con una textura de pelaje deseable y tolerancia al calor también permite la generación de animales que tienen dichos fenotipos deseables mediante procesos de clonación y/o edición de genes en los que se introduce una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR*. Por ejemplo, se pueden introducir una o más alteraciones específicas en una o más células que se pueden utilizar para generar un animal. Por consiguiente, en el presente documento también se divulga una o más células en las que se han introducido una o más alteraciones de especificación de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

La alteración genética introducida en el gen *PRLR* puede ser de cualquier naturaleza, incluida la inserción de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos, y/o la sustitución de uno o más nucleótidos. En una realización, la una o más alteraciones genéticas es aquella que aumenta la actividad de *PRLR*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas incluyen una alteración genética en una posición correspondiente a la posición 39136559 en el cromosoma 20 de *Bos taurus*. En una realización, la una o más alteraciones genéticas incluyen una eliminación de una C en la posición correspondiente a la posición 39136559 en el cromosoma 20 de *Bos taurus*. En otras realizaciones, la una o más alteraciones genéticas son como se describe anteriormente en el presente documento.

En una realización, la una o más células utilizadas para generar un animal incluye gametos individuales, cigotos, embriones, células somáticas, células de una estirpe celular, por ejemplo. En una realización, cuando se utiliza FIV, se pueden introducir una o más alteraciones genéticas en uno o más gametos o cigotos, por ejemplo. En una realización, cuando se utiliza la clonación, se pueden introducir una o más alteraciones genéticas en una o más células somáticas o en células de una estirpe celular, por ejemplo.

Dichos métodos pueden comprender además analizar o seleccionar una o más células, embriones o animales después de una etapa de edición genética para garantizar que incluyan la alteración genética deseada y que se pueda deducir que un animal generado por el proceso tendrá más probabilidades de tener una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.

Puede utilizarse cualquiera de varios métodos convencionales para introducir una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR*. Sin embargo, a modo de ejemplo, se pueden utilizar los métodos TALEN o CRISPR. Con CRISPR, los

genomas de los embriones se pueden modificar directamente mediante la inyección de ARNsg y ARNm de Cas9 en el óvulo fecundado, lo que da como resultado la producción eficaz de animales que portan mutaciones bialélicas en un gen determinado, por ejemplo. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en: Precision Editing of Large Animal Genomes, Wenfang (Spring) Tan, Daniel F. Carlson, Mark W. Walton, Scott C. Fahrenkrug y Perry B. Hackett, Adv Genet. 2012; 80: 37-97. doi:10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8; y, One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering, Haoyi Wang, Hui Yang, Chikdu S. Shivalila, Meelad M. Dawlaty, Albert W. Cheng, Feng Zhang y Rudolf Jaenisch. Cell. 9 de mayo de 2013; 153(4): 910-918.doi: 10. 10 16/j.cell.2013.04.025.

En una realización, el método de reproducción puede implicar FIV. Los procesos esencialmente biológicos para la producción de animales no están cubiertos por la invención reivindicada. En este ejemplo, en primer lugar, se pueden elegir gametos masculinos y femeninos individuales en función de sus méritos genéticos o de otro tipo, realizar métodos de edición de genes en uno o ambos gametos para introducir al menos una alteración deseada en el gen *PRLR* y fecundar el gameto femenino *in vitro*. De manera alternativa, se pueden elegir gametos masculinos y femeninos individuales, fecundar el gameto femenino *in vitro* y después realizar un método de edición de genes en el cigoto fecundado para introducir al menos una alteración deseada en el gen *PRLR*. Debe apreciarse que también podrían introducirse una o más alteraciones en el genoma de un gameto o cigoto. En el momento pertinente, pueden transferirse uno o más embriones a una portadora gestacional.

Los métodos de esta realización pueden comprender opcionalmente realizar un método de la invención descrito anteriormente en el presente documento para determinar si alguna célula o animal tiene o no una alteración deseada y se puede deducir que será más probable que el animal tenga una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Dichas pruebas pueden realizarse en cualquier momento durante el proceso y la vida de cualquier animal. A modo de ejemplo, analizar un blastocisto, un embrión, un feto, líquido amniótico, placenta, sangre materna, al nacer. En una realización, se analiza un embrión antes de transferirlo a la portadora gestacional. En otra realización, el animal es analizado al nacer.

En una realización, la edición de genes se combina con la clonación. En este ejemplo, primero se puede elegir un animal para utilizarlo en la clonación en función de su mérito genético o de otro tipo. Una célula del animal puede someterse a métodos de edición genética para introducir al menos una alteración deseada en el gen *PRLR*. El núcleo de dicha célula podrá entonces utilizarse en procesos de clonación conocidos, tales como la transferencia de cromatina, transferencia nuclear de células somáticas y la división de embriones. Debe apreciarse que también podrían introducirse una o más alteraciones en el genoma si se desea. En el momento pertinente, se pueden implantar uno o más embriones en una hembra para su gestación.

Los métodos de esta realización pueden comprender opcionalmente realizar un método de la invención descrito anteriormente en el presente documento para determinar si cualquier célula o animal clonado tiene o no una alteración deseada y si se puede deducir que será más probable que el animal tenga una mayor tolerancia a calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable. Dichas pruebas pueden realizarse en cualquier momento durante el proceso y la vida de cualquier animal. A modo de ejemplo, análisis de un embrión, un feto, líquido amniótico, placenta, sangre materna, al nacer. En una realización, se analiza un embrión antes de transferirlo a la portadora gestacional. En otra realización, el animal es analizado al nacer.

Kits

En el presente documento también se divulgan kits que son útiles en un método de la invención.

En una realización, el kit comprende al menos uno o más reactivos adecuados para el análisis de uno o más marcadores genéticos de acuerdo con la invención. Los reactivos adecuados para el análisis de uno o más de los marcadores incluyen una o más sondas de ácido nucleico y/o cebadores como se describe en el presente documento.

En otra realización, el kit comprende al menos uno o más reactivos adecuados para la detección del nivel o actividad de uno o más *PRLR*, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo, uno o más fragmentos del mismo y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más de los mismos.

A modo de ejemplo, cuando se utiliza un procedimiento inmunológico, el kit puede comprender uno o más anticuerpos específicos de *PRLR* (incluida la referencia a uno o más precursores, isoformas y/o fragmentos del mismo). En una realización particular, se utiliza ELISA y el kit comprende uno o más anticuerpos de captura y/o de detección para *PRLR* (incluida la referencia a uno o más precursores, isoformas y/o fragmentos del mismo).

A modo de ejemplo adicional, cuando un método implica la detección del nivel de uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más *PRLR*, uno o más precursores, una o más isoformas y/o uno o más fragmentos del mismo, puede comprender una o más sondas de ácido nucleico y/o cebadores que tienen especificidad por el ácido nucleico o ácidos nucleicos diana.

Los kits también pueden comprender uno o más patrones y/u otros controles que incluyen uno o más ácidos nucleicos

cuya secuencia o genotipo en una posición particular es conocida, o que contienen una cantidad conocida de uno o más PRLR, uno o más precursores del mismo, una o más isoformas del mismo y/o uno o más fragmentos del mismo y/o uno o más ácidos nucleicos que codifican los mismos. Asimismo, los kits también pueden comprender instrucciones para el uso de los componentes del kit, así como gráficos impresos o similares que podrían utilizarse como patrones con los que podrían compararse los resultados obtenidos de las muestras de prueba. Los reactivos pueden guardarse en cualquier recipiente adecuado.

Ejemplos

Ejemplo 1

El semen de un toro Senepol se obtuvo de Genetic Enterprises Ltd 21 Grace Ave., Leamington, Cambridge, Nueva Zelanda. El ADN genómico se extrajo del semen mediante un procedimiento de extracción convencional con fenol/cloroformo. Los fragmentos de ADN que codifican el receptor de prolactina se amplificaron utilizando varios pares de cebadores, incluidos los proporcionados en la tabla 1 y el sistema de PCR KAPA2G Robust (KAPA Biosystems). La PCR se realizó según las instrucciones del fabricante utilizando tampón A (que contiene cloruro de magnesio 1,5 mM) y 25 ng de ADN genómico en reacciones de 50 µl. El ciclo de PCR (30 ciclos por ejecución) se realizó según las instrucciones del fabricante, incluido un gradiente de temperatura de 55 a 68 °C para la etapa de hibridación. La extensión se realizó a 72 °C durante 60 segundos. Los productos de PCR se evaluaron con un gel de agarosa/TBE al 1 %. Las reacciones de PCR que contenían suficiente producto limpio se secuenciaron mediante secuenciación Sanger (Centre for Genomics, Proteomics and Metabolomics, La Universidad de Auckland) utilizando los mismos cebadores que se utilizaron para la amplificación por PCR.

Tabla 1:

Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
PRLR_Exón final_F2	CCTATTTTCTGGCCAATGGA	1
PRLR_Exón final_R2	CAGCCCAACTGGAGTCTGC	2

Tras el análisis de los datos de secuencia obtenidos, los inventores han identificado una alteración genética en el gen *PRLR* que no se había observado previamente y parece ser exclusiva del ganado Senepol.

Esta alteración es 39136559delC (ubicada en el exón final del gen); Tabla 2. La posición de la alteración se lee en relación con la posición en el cromosoma 20 de *Bos taurus*, construcción UMD3.1 (gi|2585133471|ref|AC 000177.1|) en la base de datos GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como se detalla anteriormente en el presente documento. Los inventores también han mapeado la ubicación de la alteración en el gen *PRLR* de forma larga (Tabla 2).

Utilizando secuenciación de ARN en tejido mamario, los inventores determinaron empíricamente la estructura del transcrito del receptor de prolactina bovina. Esta transcripción contenía un exón 5'UTR cadena arriba adicional de aproximadamente 120 kb de la transcripción PRLR de referencia (ID génica del NCBI: 281422. AC_000177.1), similar a la vista en la transcripción XM_05221577.1 para la ID génica: 281422. La transcripción derivada experimentalmente también tenía una 3'UTR mucho más grande, de aproximadamente 10 kb de longitud. Los inventores utilizaron esta anotación actualizada para diseñar cebadores y amplicones de PCR que representan todos los exones de PRLR, 5 kb de secuencia promotora y la 3'UTR.

Tabla 2:

Marcador	Ubicación (dentro del gen <i>PRLR</i>)	Secuencia alrededor y que incluye la alteración	SEQ ID NO.
39136559delC	Exón final	GACCAACAGACCAACATG (C) del TTAAAAAGCCTCAAAAACCA	3

Se identificó que 39136559delC era una mutación de cambio de marco en el exón final de PRLR y, por lo tanto, se predijo que tendría importantes consecuencias funcionales para la actividad de la forma larga del receptor de prolactina. Estos datos sugieren que esta mutación de cambio de marco puede ser la mutación (o al menos una mutación) causante de la tolerancia al calor y el pelaje fino en Senepol; si bien no se desea quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores contemplan que esto probablemente se debe a una activación mejorada de la vía de señalización de la prolactina.

En las figuras 1 y 2 se ilustran las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) del receptor de prolactina (PRLR) de *Bos taurus*, forma larga (NM_001039726.2), que indica la ubicación de 39136559delC. La eliminación de la base (C) identificada se encuentra en la posición 1466 en la secuencia de ARNm (flecha) y en la posición genómica 39136559. La secuencia de nucleótidos del gen que incluye la C eliminada en esta posición se proporciona en la figura 3 (SEQ ID NO: 6). El cambio de marco resultante codifica una valina seguida de un codón de parada que da como resultado el truncamiento de la proteína (Figura 2). La mutación de cambio de marco observada dará como resultado el truncamiento de la proteína del aminoácido 581 al 461 mediante la eliminación de la secuencia resaltada (Figura 2) y la conversión del nuevo aminoácido carboxiterminal de alanina a valina. La

secuencia de proteínas truncada se ilustra en la figura 4 (SEQ ID NO: 7). La forma larga de PRLR es importante para muchos aspectos de la función de la prolactina.

La secuencia de referencia del NCBI NM_174155.2 para la forma corta de PRLR da como resultado una variante de PRLR de 296 aminoácidos, lo que significa que es poco probable que la variante de eliminación de una sola base identificada por los inventores afecte a la secuencia de aminoácidos de esta isoforma. Sin embargo, los inventores creen que la eliminación también puede afectar a la función de la isoforma corta ya que la variante todavía está contenida dentro de la 3'UTR de esta transcripción.

Los resultados obtenidos se correlacionan con una mutación previamente identificada por los inventores y localizada en el gen de la hormona prolactina (PRL) que se asocia con una tolerancia reducida al calor y fenotipos de composición del pelaje "peludo". Por consiguiente, los inventores creen que las alteraciones en el gen *PRLR* son responsables del pelaje corto y liso, y de la mayor tolerancia térmica o al calor de Senepol en comparación con otras razas de ganado bovino. Esta es la primera demostración de una relación directa entre las alteraciones en el gen *PRLR* y estos fenotipos en el ganado Senepol. Anteriormente, había cierta incertidumbre en cuanto al gen implicado en el pelaje corto y liso, y en la mayor tolerancia al calor de este ganado bovino, y se había propuesto que varios otros genes estuvieran relacionados con el fenotipo.

Ejemplo 2

También se ha informado que la raza de ganado bovino Romosinuano posee el fenotipo "fino".

Se tomaron muestras mediante punción auricular de cinco bovinos romosinuano costarricenses para el genotipado de PRLR. Se enviaron las muestras de punción auricular a GeneSeek (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) para la extracción del ADN y el genotipado de la variante de PRLR cr20:39136559delC utilizando Sequenom iPLEX (Sequenom), buscando alelos en orientaciones de cadena tanto directa como inversa.

Los inventores identificaron la mutación de cambio de marco cr20:39136559delC en dos animales de fenotipo "fino" de la raza Romosinuano. Ambos animales eran heterocigotos para la eliminación (genotipo C.Del).

Estos datos muestran que la mutación de cambio de marco identificada por los inventores, que se asocia con la tolerancia al calor y el pelaje fino, se ha identificado en ganado no perteneciente a Senepol.

Ejemplo 3

Los inventores seleccionaron 28 bovinos cruzados con ascendencia Senepol, incluyendo ascendencia Red Angus y/o Tuli, para el genotipado de PRLR. El pelaje del ganado bovino se calificó cualitativamente como fino o normal.

Se enviaron muestras de pelo a GeneSeek (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) para la extracción del ADN y el genotipado de la variante de PRLR cr20:39136559delC utilizando Sequenom iPLEX (Sequenom), buscando alelos en orientaciones de cadena tanto directa como inversa.

En la tabla 3 se muestra la información de genotipo y fenotipo de los 28 animales cruzados con ascendencia Senepol. Todos los animales clasificados cualitativamente como de pelaje fino mostraron una segregación perfecta con la eliminación del cambio de marco en cr20:39136559delC. Todos estos animales eran heterocigotos para la eliminación (genotipo C.Del) excepto un único homocigoto (genotipo Del.Del). Siete animales que no portaban la mutación (genotipo CC) se clasificaron cualitativamente como de "pelaje normal".

Tabla 3:

Identificador	Genotipo en cr20:39136559	Tipo de pelaje
Jessi	CC	Normal
Wally	CC	Normal
Charity	Del.Del	Fino
Cana	C.Del	Fino
Blondie	C.Del	Fino
Faith	C.Del	Fino
Chi	C.Del	Fino
Lucy	C.Del	Fino
Petunia	C.Del	Fino
Epsilon	C.Del	Fino
Perky	C.Del	Fino
Sherry	C.Del	Fino
Beth	C.Del	Fino
Grey Bull	C.Del	Fino

(continuación)

Identificador	Genotipo en cr20:39136559	Tipo de pelaje
Alpha	C.Del	Fino
Sally	C.Del	Fino
Stevie	C.Del	Fino
Queen	C.Del	Fino
Tina	C.Del	Fino
Chiffon	C.Del	Fino
Dusty	C.Del	Fino
Kathy	C.Del	Fino
Berry	C.Del	Fino
Judy	CC	Normal
Abby	CC	Normal
Beta	CC	Normal
Tokay	CC	Normal
Misty	CC	Normal

El análisis de estos datos en PLINK1 (versión 1.07, Purcell, S. <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) que utiliza un modelo genético de dominancia dio una asociación altamente significativa de la eliminación del cambio de marco con el tipo de pelaje ($P < 0,00000012$).

Estos datos muestran que la mutación de cambio de marco identificada por los inventores está fuertemente asociada con la tolerancia al calor y el pelaje fino. Si bien no se desea quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores contemplan que esto probablemente se debe a una activación mejorada de la vía de señalización de la prolactina.

Estos datos respaldan el hallazgo de los inventores de que las alteraciones en el gen *PRLR* son responsables de un pelaje corto y liso, y de una mayor tolerancia térmica o al calor. Estos rasgos se encuentran comúnmente en la raza de ganado bovino Senepol. Los datos también demuestran una relación directa entre las alteraciones en el gen *PRLR* y estos fenotipos.

Ejemplo 4

La secuenciación del exoma se realizó en 115 animales que representan las razas Holstein Friesian (N = 10), Jersey (N = 10), Angus (N = 9), Belgian Blue (N = 29), Brahman (N = 10), Charolais (N = 10), Nelore (N = 10), Senepol (N = 9), Simmental (N = 10) y Yak (N = 8).

La captura personalizada dirigida a RefSeq, Ensembl y genes parálogos humanos se realizó utilizando el sistema de enriquecimiento de dianas SureSelect (Agilent), con secuenciación de ambos extremos de 101 pb realizada en el HiSeq 2000. La profundidad media de secuenciación entre las dianas del exoma fue de 25 a 40× por muestra.

La restricción del análisis a un intervalo de consenso de 1 Mbp informado en análisis independientes de Senepol y cruces de Senepol, y el filtro de las variantes que no son de referencia y que estaban presentes en todos los Senepol, pero ausente en las otras razas, produjo solo la eliminación del cambio de marco en cr20:39136559delC.

Estos resultados muestran que la eliminación del cambio de marco identificada por los inventores en el intervalo de consenso "fino" informado del cromosoma 20 está presente en el ganado Senepol de fenotipo "fino", pero no está presente en animales que se observa que no tienen un fenotipo "fino".

Estos datos muestran además que la mutación de cambio de marco identificada por los inventores está fuertemente asociada con la tolerancia al calor y el pelaje fino. Si bien no se desea quedar ligados a ninguna teoría en particular, los inventores contemplan que esto probablemente se debe a una activación mejorada de la vía de señalización de la prolactina.

Estos datos también respaldan el hallazgo de los inventores de que las alteraciones en el gen *PRLR* son responsables de un pelaje corto y liso, y de una mayor tolerancia térmica o al calor. Estos rasgos se encuentran comúnmente en la raza de ganado bovino Senepol. Los datos también demuestran adicionalmente una relación directa entre las alteraciones en el gen *PRLR* y estos fenotipos.

Ejemplo 5

Producción de animales mediante edición genética

Se generan embriones mediante fecundación *in vitro* de óvulos de una madre deseable (generalmente de alto mérito genético para un rasgo de desempeño) con espermatozoides de un padre deseable.

Para las especies diana de ganado de granja, se identifican una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR*, por ejemplo, aquellas que dan como resultado un aumento en la actividad de *PRLR*. En un ejemplo, se identifican las mutaciones que truncan la proteína producida por la forma larga del gen *PRLR* hasta una longitud de 461 aminoácidos en el ganado bovino o el truncamiento hasta una posición de aminoácido equivalente para la especie diana. Estas mutaciones pueden consistir en una eliminación de una sola base, como en la mutación 'fino' de Senepol, una adición de una sola base, o puede ser más complejo produciendo un codón de parada en la posición deseada en el gen *PRLR*. La una o más alteraciones genéticas pueden identificarse mediante la referencia a información o conocimientos preexistentes (tales como alteraciones genéticas conocidas), o mediante el análisis de uno o más animales para identificar una alteración genética deseable previamente desconocida.

Habiendo identificado uno o más cambios genéticos adecuados en el gen *PRLR*, se utilizarán herramientas de edición de genes (como las descritas en Wang *et al.*, 2013 y Wenfang *et al.*, 2013) para introducir los cambios de bases deseados en el gen *PRLR* en un cigoto.

Una vez que se ha producido la edición de genes, los embriones pueden crecer *in vitro* para que se puedan tomar células para verificar que las ediciones sean correctas. A continuación, los embriones seleccionados se implantarán en el útero de las vacas receptoras para que lleguen a término.

Este procedimiento en particular puede permitir la producción de machos de alto valor genético que pueden utilizarse para inseminaciones generalizadas para introducir la característica de tolerancia al calor en una población o poblaciones de ganado bovino, cerdos, ovejas, cabras o pollos.

Ejemplo 6

Producción de animales mediante clonación

La tecnología de clonación (como la descrita por Brophy *et al.*, 2003. Nature Biotechnology 21, 157-162) se puede utilizar para introducir una o más alteraciones genéticas deseables en un animal. En resumen, esto implicará la introducción de una o más mutaciones deseadas en una estirpe celular *in vitro* y la transferencia nuclear a un ovocito enucleado.

Como en el ejemplo 2, los embriones pueden crecer *in vitro* para permitir la biopsia y el análisis de los embriones permite la selección de aquellos que portan el genotipo deseable.

La invención se ha descrito en el presente documento, con referencia a determinadas realizaciones preferidas, para permitir al lector llevar a la práctica la invención sin excesiva experimentación. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá fácilmente que muchos de los componentes y parámetros pueden variarse o modificarse hasta cierto punto o sustituirse por equivalentes conocidos sin apartarse del alcance de la invención. Debe apreciarse que dichas modificaciones y equivalentes se incorporan al presente documento como si se expusiesen individualmente. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de dichas etapas o características. Por otra parte, se proporcionan títulos, encabezados o similares para mejorar la comprensión del lector de este documento y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

A lo largo de esta memoria descriptiva y de cualquiera de las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprender", "que comprende" y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo en lugar de exclusivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero sin limitación".

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar si un animal de ganado y/o su descendencia, una o más células o embriones de ganado tienen o puede tener o no una o más alteraciones genéticas en el gen del receptor de prolactina (PRLR) que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método:
 - a. observar la secuencia de ácido nucleico del gen *PRLR* para identificar si incluye o no una o más alteraciones genéticas y/o un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con el mismo.
2. Un método para determinar si es más probable que un animal de ganado y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable, comprendiendo el método las etapas de:
 - a. realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b. determinar si es más probable que un animal de ganado y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable en donde, cuando la secuencia de ácido nucleico incluye la una o más alteraciones genéticas y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo, se determina que es más probable que el animal y/o su descendencia tengan una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.
3. Un método para seleccionar o rechazar un animal de ganado, una o más células o embriones de ganado, comprendiendo el método las etapas de:
 - a. realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b. seleccionar un animal de ganado, una o más células o embriones de ganado cuando se ha identificado que tienen una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable; y/o
 - c. rechazar un animal de ganado, una o más células o embriones de ganado cuando se ha identificado que no tienen una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* que están relacionadas con una mayor tolerancia al calor, una mayor resistencia a las garrapatas y/o una textura de pelaje deseable.
4. Un método para estimar el valor de un animal de ganado y/o de su descendencia, comprendiendo el método las etapas de:
 - a. realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b. calcular un valor estimado del animal de ganado utilizando los resultados de la etapa a.
5. Un método para clonar un animal de ganado, comprendiendo el método las etapas de:
 - a. realizar un método de la reivindicación 1;
 - b. seleccionar una o más células que se han identificado que incluyen una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* y/o uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con el mismo; y
 - c. utilizar el núcleo o la cromatina de una o más de las células en un procedimiento de clonación.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el procedimiento de clonación es la transferencia nuclear de células somáticas, una técnica de transferencia de cromatina o división de embriones.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde una o más alteraciones genéticas en el gen *PRLR* dan como resultado un aumento en la actividad de PRLR.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye o no una alteración que da como resultado un truncamiento de la transcripción o péptido expresado a partir del gen *PRLR*.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye o no una alteración que da como resultado el truncamiento de PRLR en una región desde aproximadamente una posición de aminoácido correspondiente a la posición 430 hasta aproximadamente un aminoácido correspondiente a la posición 490 de PRLR de *Bos taurus*.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas en el exón final del gen *PRLR*.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye o no una o más alteraciones genéticas ubicadas en

una región delimitada por los nucleótidos correspondientes a las posiciones 39136469 y 39136649 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar el nucleótido en una posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye o no una alteración genética correspondiente a una eliminación de una citosina (C) en la posición correspondiente a la posición 39136559 del cromosoma 20 de *Bos taurus*.

15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el método comprende analizar un ácido nucleico de dicho animal de ganado para determinar si incluye uno o más marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con uno o más de los anteriores.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el animal de ganado se selecciona de *Bovidae sp.*, *Phasianidae sp.*, o *Suidae sp.*

Figura 1

SEQ ID NO: 4:

Referencia de secuencia NCBI: NM_001039726.2 ARNm del receptor de prolactina (PRLR) de *Bus taurus*
 Se indica la base eliminada (en 39136559 en BTA20) en PRLR de Senepol (c)

INICIO

```

1  ggcaaatgct gaggataactt tccaagtga cctgagtga acctctaata tatttacttc
61  ctgtggaaag aggaaggagc caacatgaag gaaaatgcag catctagagt ggthtcaatt
121 ttgtactttt ttctcagtgt cagccttctg aatggacagt cacctoctga aaatcccaag
181 ctggttaaag gtgggtctcc tggaaaggaa acattcacct gctgggtggg gctgggggca
241 gatggaggac ttcttaacaa ttacacgctg acttaccaca aggaaggaga aacactcaco
301 catgaatgtc cagactacaa aaccgggggc cccaactcct gctactttac caagaagcac
361 acctccatct ggaagatgta cgtcatcaca gtaaacgcca tcaaccagat ggaatcagt
421 tectcgatgc cactttatgt gcacgtgact tacatagttg aaccagagcc tctgcaaac
481 ctgacttttg aattaaaaca tccagaagat agaaaaccat atctatggat aaaatggtct
541 ccaccaccca tgactgatgt aaaatctggt tggttcatta tccagtacga aattcgatta
601 aaacctgaga aagcaactga ttgggagact cactttactc tgaagcaaac tcagcttaag
661 attttcaact tatatccagg aaaaaatac cttgtgcaga ttgctgcaa gccagaccat
721 ggatactgga gtgagtggag cccagagagc tccatccaga taccataatga cttccagtg
781 aaggacacaa gcatgtggat ctttgtggcc atcctttctg ctgtcatctg tttgattatg
841 gtctgggcag tggctttgaa gggctatagc atggtgacct gcatctccc accagttcca
901 gggccaaaaa taaaaggatt tgatgttcat ctgctggaga agggcaagtc cgaagaactt
961 ctgagagctc tggaaagcca agacttccc cccacttctg actgagagga cttgctgatg
1021 gagtcatag aggtagatga ctgtgaggac cagcagctga tggcagccc ctccaaagaa
1081 cacacggagc aaggcgtgaa gccatgcac ctgatcttg acagtgaact tggccggggc
1141 agctgagaca gcccttcgct cttgtctgaa agtgtgatg aaactcaggc ccatecctcc
1201 aagttccata ctcccaggg cctgagaag ttggagaatc cggaaacaaa cttacatgt
1261 ctccaggccc ctccagagcac aagcgtggaa ggcaaaatcc cctattttct ggccaatgga
1321 cccaaatctt ccacatggcc ttcccgcag ccccccagcc tatacagccc cagatattct
1381 taccacaaca ttgctgacgt gtgtgactg gccctgggca tggccggcac cacageccat
1441 tegetggacc aaacagacca acatgcttta aaagcctcaa aaaccattga aactggcagg
1501 gaaggaaagg caaccaagca gaggagatca gaaggctgca gttecaagcc tgaccaagac
1561 acggtgtggc cagcaeccca agacaaaacc cccttgatct ctgctaaacc cttggaatac
1621 gtggagatcc acaaggtcag ccaagatgga gtgtggctc tgttcccaaa acaaaacgag
1681 aagttttggc cccctgaagc cagcaaggag tactcaagg tgtccgggt gacagatagc
1741 aacatcctgg tattggtgcc ggatccgcaa ggcgaaaacc tgactctgtt agaagaacca
1801 gccaaagagg ccccgccagc cctgccatag aatccagcca aggcagacct ggtatctcc
1861 cccacaacc caggcaactg cagactccag ttgggtggg gactgggtcc cgcaggtttt
1921 atgcactctt gcagtgaag ttatggaagg atgggttcaa ttgtgatttt ccttcaggga
1981 aactacaga gtacgtgaaa tgcactctac cagagagggc tcaagaacag ggttagaatg
2041 aactaccca actcccagtt cactcttaat tototatttt caaccagttg cctctttgtc
2101 caacagctga ttccagaaca aatcgttcca tcttggtgta tttgtagatt tacttttttg
2161 ctattagttg tcagattata tgttcaasga tataaaagca cattgcttag tattcttaag
2221 agacagtgcc aataggtata taatctggaa aaggccttca tggtttlogta tgtgacagag
2281 ggtataagt cagtcaaaat tgtttaccat ggggaagatg tagataggag agaaatgcc
2341 tgaaaaccac tttgaagacc agttgcttaa cctttgcact cctcttt

```

Figura 2

SEQ ID NO: 5:

```

/traducción="MKENAASRVVFILLFLSVSLNGQSPPEKPKLVKCRSPGKETF
TCWWEPGADGGLPTNYTLTYHKEGETLIHBCPDYKTGGPNSCYFSKKHTSIWKMYVT
VNAINQMGISSDPLYVHVITYIVEPEPPANLTLELKHPEDRKPYLWIKWSPPTMTDVK
SGWFIIQYEIRLKPEKATDWETHFTLKQTQLKIFNLYPGQKYLQIRCKPDHGYWSEW
SPESSIQIPNDFPVKDTSMWIFVAHLSAVICLIMVWAVALKGYSMVTCILPPVPGPKI
KGFDVHLLKGGKSEELLRALESQDFPPTSDCEDLLMEFIEVDDCEDQQLMPRPSKEHT
EQGVKPMHLDLSDSGRGSCDSPSLLSEKCDEPQAHPSKFHTPEGPEKLENPETNLTC
LQAPQSTSVEGKIPYFLANGPKSSTWPFQPPSLYSPRYSYHNIADVCELALGMAGTT
ATSLDOTDQHALKASKTIETGREGKATKQRESEGCSSKPDQDTVWPRPQDKTPEISAK
PLEYVEIHKVSQDGVLALEPKQNEKFGAPEASKEYSKVSRVTDNLLVLPDPQAQNL
TLEEPAKKAPPALP

```

Figura 3**SEQ ID NO: 6**

INICIO

```

1  ggcaaatgct gaggataactt tccaagtga ccttgagtga acctetaata tatattatttc
61  ctgtggaaag aggaaggagc caacatgaag gaaaatgcag catctagagt ggttttcatt
121 ttgtactttt ttctcagtgt cagcctttctg aatggacagt caoctoctga aaaacccaag
181 ctogttaaat gtoggtctcc tggaaaggaa acattcacct gotggtgga gccctgggga
241 gatggaggac ttctaccaca ttacacgctg acttaccaca aggaaggaga aacactcatc
301 catgaatgtc cagactacaa aaccgggggc cccaactcct gotactttag caagaagcac
361 acctccatat ggaagatgta cgtcatcaca gtaaacgcca tcaaccagat ggggaatcagt
421 tctctggatc cactttatgt gcacgtgact tacatagttg aaccagagcc tctcgcaaac
481 ctgacttttg aattaaaaca tccagaagat agaaaaccat atctatggtt aaaatggtct
541 ccaccaccca tgaactgagt aaaatctggt tggttcatta tccagtacga aattcgatta
601 aaacctgaga aagcaactga ttgggagact ctttttactc tgaagcaaac tcagcttaag
661 attttcaact tatatccagg acaaaaatac cttgtgcaga ttogctgcaa gccagaccat
721 ggatactgga gtgagtggag cccagagagc tccatccaga tacctaatga cttcccagtg
781 aaggacacaa gcatgtggat ctttgtggcc atccctttctg ctgtcatctg tttgattatg
841 gtctgggcag tggctttgaa gggttatagc atggtgacct gcactctccc accagttcca
901 gggccaaaaa taaaaggatt tgatgttcat ctgctggaga agggcaagtc cgaagaactt
961 ctgogagctc tggaaagcca agacttccc cccaactctg actgogagga cttgctgatg
1021 gaggttcatag aggtagatga ctgtgaggac cagcagctga tgcacgccc ctccaaagaa
1081 cacacggagc aaggcgtgaa gcccatgcac ctggatcttg acagtgactc tggccggggc
1141 agctgogaca gcccttcgct cttgtctgaa aagtgtgatg aacctcaggo ccatccctcc
1201 aagttccata ctcccagggg ccttgagaag ctggagaatc cggaaacaaa cttacatgt
1261 ctccaggccc ctccagagcac aagcgtggaa ggcaaaatcc cctattttct ggccaatgga
1321 cccaaatctt ccacatggcc tttccgcag ccccccagcc tatacagccc cagatattct
1381 taccacaaca ttgctgacgt gtgtgagctg gccctgggca tggccggcac cacagccact
1441 tcgctggacc aaacagacca acatg tttt aaagcctcaa aaaccattga aactggcagg
1501 gaaggaagg caaccaagca gagggagtca gaaggctgca gttccaagcc tgaccaagac
1561 acggtgtggc caccagccca agacaaaacc ccttgatct ctgctaacc cttggaatac
1621 gtggagatcc acaaggtcag ccaagatgga gtgctggctc tgttcccaa acaaaaogag
1681 aagtttggcg cccctgaagc cagcaaggag tactcaaagg tgtccgggt gacagatagc
1741 aacatcctgg tattgggtgc ggatccgcaa gcgcaaaacc tgactctgtt agaagaacca
1801 gccaaagaag ccccgccagc cctgccatag aatccagcca aggcgacct ggcctatctc
1861 ccacacacc caggcaactg cagactccag ttgggttggg gactgggtcc cgcaggtttt
1921 atgcaactct gcagtgagag ttatggaagg atgggttcaa ttgtgatttt ccttcaggga
1981 acactacaga gtacgtgaaa tgcactctac cagagagggc tcaagaacag ggttagaatg
2041 acactaccca actcccagtt cactcttaat tctctatttt caaccagttg cctctttgtc
2101 caacagctga ttccagaaca aatcgthcca tcttgtgtga tttgtagatt tacttttttg
2161 ctattagttg tcagattata tgttcaaaga tataaaagca cattgcctag tattcttaag
2221 agacagtgc aataggtata taatctggaa aaggccttca tggtttcgta tgtgacagag
2281 ggtataagt cagtcaaaat tgtttaccat ggggaagatg tagataggag agaaatgcca
2341 tgaaaaccac tttgaagacc agttgcttaa cctttgcact cctctttt

```

Figura 4

SEQ ID NO: 7

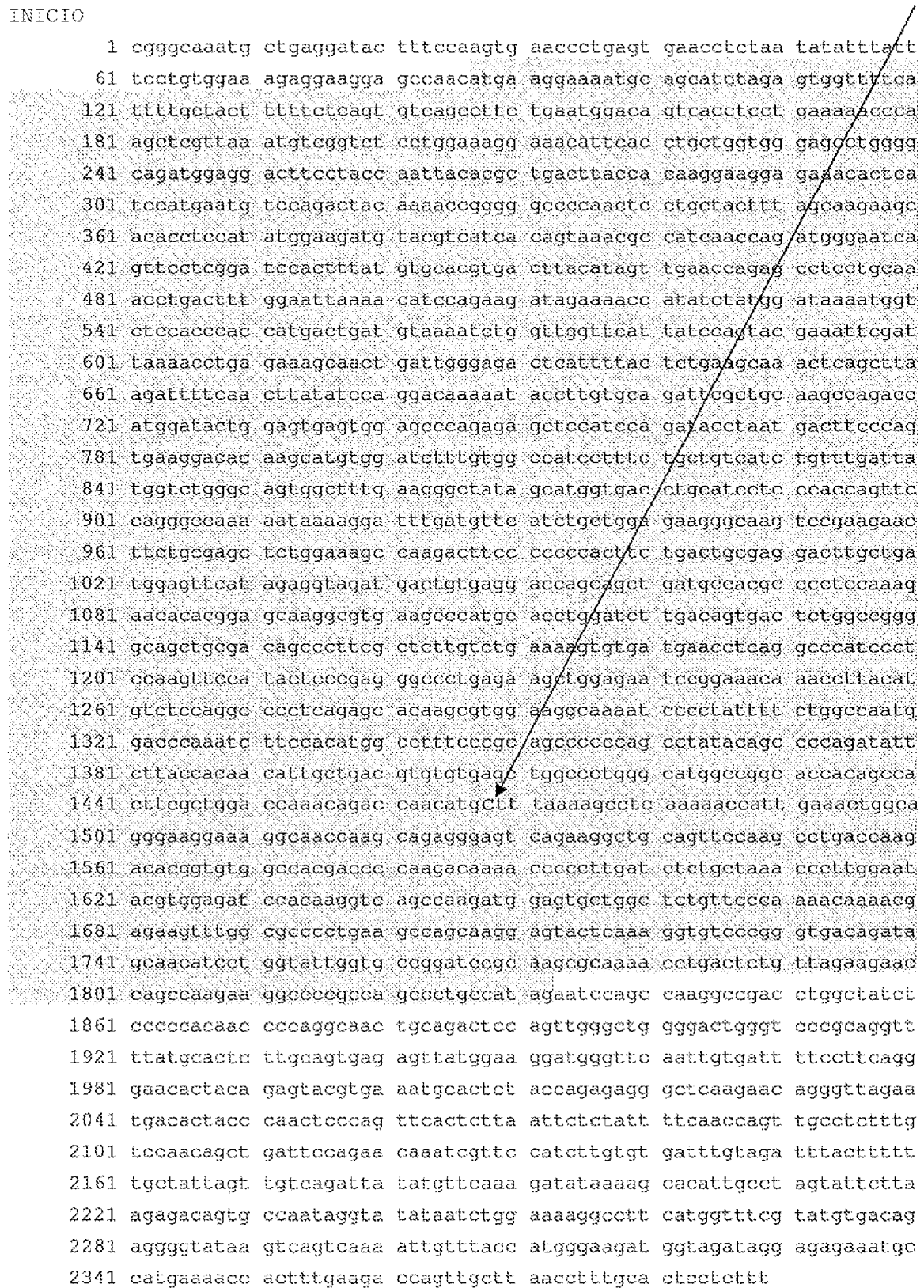
/traducción=MKENAASRVVFILLFLSVSLNGQSPPEKPKLVKCRSPGKETF

TCWWEPGADGGLPTNYTLTYHKEGETLIHECPDYKTGGPNSCYFSKKHTSIWKMYVIT
 VNAINQMGISSSDPLYVHVITYIVEPEPPANLTLELKHPEDRKPYLWIKWSPPTMTDVK
 SGWFIIQYEIRLKPEKATDWETHFTLKQTQLKIFNLYPGQKYLQIRCKPDHGYWSEW
 SPESSIQIPNDFPVKDTSMWIFVAILSAVICLIMVWAVALKGYSMVTCILPPVPGPKI
 KGFDVHLEKKGKSEELLRALESQDFPPTSDCEDLLMEFIEVDDCEDQQLMRPSKEHT
 EQGVKPMHLDLSDSGRGSCDSPSLLSEKCDEPQAHPSKFHTPEGPEKLENPETNLTC
 LQAPQSTSVEGKIPYFLANGPKSSTWPFQPPSLYSPRYSYHNIADVCELALGMAGTT
 ATSLDQTDQHV

Figura 5:

SEQ ID NO: 8

INICIO



```

1  cgggcaaatg ctgaggatac tttccaagtg aacctgagt gaacctctaa tatatttatt
61  tccctgtgaa agaggaagga gccaacatga aggaaaatgc agcatctaga gtggttttca
121 ttttgcactt ttttctcagt gtcagccttc tgaatggaca gtcacctcct gaaaaacca
181 agctcgttaa atgtcggtct cctggaaagg aaacattcac ctgctggtgg gagcctgggg
241 cagatggagg acttcctacc aattacacgc tgacttacca caaggaagga gaaacactca
301 tccatgaatg tccagactac aaaaccgggg gcccacaact ctgctacttt agcaagaagc
361 acacctccat atggaagatg tacgtcatca cagtaaaccg catcaaccag atgggaatca
421 gttcctcgga tccactttat glgcacgiya cttacatagt tgaaccagag cctcctgcaa
481 acctgacttt ggaattaaaa catccagaag atagaaaacc atatctatgg ataaaatggt
541 ctccaccacac catgactgat gtaaaatctg gttggttcat tatccagtac gaaattcgat
601 taaaaacotga gaaagcaact gattgggaga ctcaattttac tctgaagcaa actcagctta
661 agattttcaa cttatatcca ggacaaaat accttggtgc gattcgctgc aagccagacc
721 atggatactg gactgagtg agccagaga gctccatcca gatacctaat gacttccag
781 tgaaggacac aagcatgtgg atctttgtgg ccatccttct tctgtctc tcgttgatta
841 tggctctggc agtggtcttg aagggtata geatggtgac ctgcctctcc ccaccagttc
901 cagggcocaaa aataaaagga tttgatgttc atctgctgga gaagggaag tccgaagaac
961 tttctcgagc tctggaaagc caagacttcc cccctacttc tgactcgag gacttgcctga
1021 tggagttcat agaggtagat gactgtgagg accagcagct gatgccacgc cctccaaag
1081 aacacacgga gcaaggcgtg aagcccatgc acctgcatct tgacagtgc tctggccggg
1141 gcagctgcca cagcccttcg ctcttgcttg aaaaagtgtg tgaacctcag gcccatcctt
1201 ccaagttcca tactcccgag ggccctgaga agctggagaa tccggaaca aaccttacat
1261 gtctccaggc cctcagagc acaagcgtgg aaggcaaat cccctatctt ctggccaatg
1321 gacccaaatc ttccacatgg ctttcccgag agcccccag cctatacagc ccagatattt
1381 cttaaccaaa cattgctgac gtgtgtgagg tggccctggg catggccggc accacagcca
1441 ctctgctgga ccaaacagac caacatgctt taaaagcttc aaaaaccatt gaaactggca
1501 gggaaggaaa ggaaccaag cagaggagt cagaaggctg cagttccaag cctgaccaag
1561 acacggtgtg gccacgacce caagacaaaa ccccttgat ctctgctaaa ccttggaat
1621 acgtggagat ccacaaggte agccaagatg gactgctggc tctgttccca aaacaaaacg
1681 ayaaytttgg cgcctctgaa gccagcaagg agtactcaaa ggtgtcccg gtgacagata
1741 gcaacatcct ggtattggtg ccggtccgc aagcgcaaaa cctgactctg ttagaagaac
1801 cagccaagaa ggcccgcga gcctgcatc agaatccagc caaggccgac ctggctatct
1861 cccccacaac cccaggcaac tgcagactcc agttgggctg gggactgggt ccgcaggtt
1921 ttatgcactc ttgcagtgag agttatggaa ggatgggttc aattgtgatt ttccttcagg
1981 gaacactaca gactacgtga aatgcactct accagagagg gctcaagaac aggyttagaa
2041 tgacactacc caactcccag ttactcttta attctctatt ttcaaccagt tgcctctttg
2101 tccaacagct gattccagaa caaatcgttc catcttgtgt gatttgtaga ttactttttt
2161 tgcatttagt tgtcagatta tatgttcaaa gatataaaag cacattgctt agtattctta
2221 agagacagtg ccaataggta tataatctgg aaaaggcctt catggtttcg tatgtgacag
2281 aggggtataa gtcagtcaaa attgtttacc atgggaagat ggtagatagg agagaaatgc
2341 catgaaaacc aotttgaaga ccagttgctt aacctttgca ctctctctt

```