



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA**

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

GENOTIPIFICACIÓN PARA FSHR Y LHR EN VACAS JERSEY

TESIS

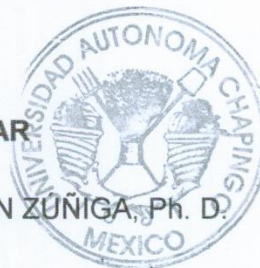
Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

VERÓNICA CAUDILLO AGUILAR

Bajo la supervisión de: **BALDOMERO ALARCÓN ZUÑIGA, Ph. D.**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, junio de 2017

GENOTIPIFICACIÓN PARA FSHR Y LHR EN BOVINOS JERSEY

Tesis realizada por VERÓNICA CAUDILLO AGUILAR bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Director:



Ph. D. Baldomero Alarcón Zúñiga

Asesor:



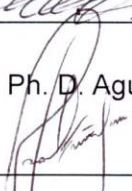
Ph. D. Rodolfo Ramírez Valverde

Asesor:



Ph. D. Agustín Ruíz Flores

Asesor:



Ph. D. Rafael Núñez Domínguez

Asesor:



Ph. D. José Guadalupe García Muñiz

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	3
2	Revisión de Literatura.....	6
2.1	Características reproductivas de bovinos lecheros	6
2.2	Heredabilidad de parámetros reproductivos	6
2.3	Factores no genéticos	7
2.4	Evaluaciones genéticas	8
2.5	Biotecnología de la reproducción	11
2.5.1	Genómica.....	11
2.5.2	GnRH	13
2.5.3	FSH.....	14
2.5.4	LH.....	14
2.6	Literatura Citada	15
3	GENOTIPIFICACIÓN PARA FSHR Y LHR EN BOVINOS JERSEY	18
3.1	Resumen	18
3.2	Abstract	19
3.3	Introducción	20
3.4	Materiales y métodos.....	21
3.4.1	Lote experimental de animales	21

3.4.2	Selección de animales	21
3.4.3	Identificación de polimorfismos de ADN en FSHR y LHR	22
3.5	Análisis de datos	24
3.5.1	Determinación de la habilidad reproductiva del hato.....	24
3.5.2	Análisis de datos genómicos.....	25
3.5.3	Predicción de habilidad reproductiva considerando información de marcadores moleculares e información de pedigrí.....	25
3.6	Resultados y discusión	26
3.7	Conclusión.....	34
3.8	Literatura citada.....	35
3.9	Apéndices.....	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de los SNPS usados para la amplificación en PCR y secuencia de ADN de FSHR y LHR.....	23
Cuadro 2. Frecuencias de partos por número de lactancia y año de parto de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.	27
Cuadro 3. Parámetros reproductivos de las vacas Jersey en producción del año 2004 a 2016, manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.....	28
Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos para los efectos de número de lactancia y tipo de semen utilizado en el servicio en la posibilidad de vacas Jersey de quedar gestantes, manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.....	29
Cuadro 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de ADN para los genes FSHR y LHR en vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.	33
Cuadro 6. Efecto de los genotipos de FSHR y LHR sobre la habilidad reproductiva de las vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México (P<0.05).....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de los días transcurridos después del parto en la probabilidad de quedar gestante de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.....	30
Figura 2. Efecto del mes de parto en la probabilidad de quedar gestante de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.	30
Figura 3. Soluciones del análisis de varianza para el efecto aleatorio de vaca, ordenadas en forma ascendente, utilizadas como proxy de la habilidad reproductiva de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.	31

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Mapa de relaciones genéticas entre individuos con base a los parámetros reproductivos.	37
Apéndice 2. Mapa de relaciones genómicas entre 7 SNPs de LHR y FHSR....	38

DEDICATORIA

A mi hija Ena Yaretzi Martínez Caudillo, el motor de mi vida, con todo mi amor e inspiración.

A mis padres Hortencia Aguilar Alegría y José Rosario Caudillo Vargas por darme las bases para aferrarme a mis objetivos.

A mis hermanos Genaro, Ricardo y Aurora, y sobrinos Sonia y Esau que me brindaron el apoyo y la confianza para concluir este proceso.

A mis amigos Pedro, Angélica, Santiago y Sonia quienes me fortalecieron cuando estuve a punto de “tirar la toalla”. Así como a la generación completa de esta etapa de formación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad de incrementar mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante la formación de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera.

Al Posgrado en Producción Animal por brindarme el espacio y la formación académica requeridos durante este proceso profesional. Así como al grupo de profesores que intervinieron en la elaboración de la presente investigación.

A mi comité asesor, por brindarme cada uno parte de su conocimiento científico y profesional.

Al rancho La Hondonada por abrir sus puertas incondicionalmente para llevar a cabo la presente investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

NOMBRE: Verónica Caudillo Aguilar

FECHA DE NACIMIENTO: 26 de junio de 1989

LUGAR DE NACIMIENTO: Ecatepec, México

CURP: CAAV890626MMCDGR00

PROFESIÓN: Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia

CÉDULA PROFESIONAL: 09133515



DESARROLLO ACADÉMICO

Bachillerato	Preparatoria Oficial 22 Tecámac, Estado de México. 2004-2007.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México. 2008-2012.
Maestría	Maestro en Ciencias en Innovación Ganadera Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México. 2015-2016.

Resumen

Los parámetros reproductivos de bovinos lecheros son difíciles de mejorar genéticamente mediante métodos tradicionales de selección. El objetivo de la presente investigación fue determinar la asociación entre la habilidad reproductiva de vacas Jersey, y los genes FSHR (receptor de hormona folículo estimulante) y LHR (receptor de la hormona luteinizante), especificados mediante polimorfismo de nucleótido simple, o por factores distintos. La población utilizada fueron 120 vacas Jersey. Mediante análisis estadísticos usando el procedimiento MIXED en SAS 9.3®, se determinó la habilidad reproductiva de la vaca para quedar gestante, definida por un estimador de la habilidad reproductiva. El análisis genómico consistió en la extracción de ADN de bulbo piloso y determinación de las variantes alélicas por medio de SNPs reportados en la base genética HapMap-NCBI, utilizando la técnica de PCR en tiempo real. El modelo utilizado para predecir la habilidad reproductiva fue $y_{ij} = \mu + X\beta_j + Au_k + e_{ij}$, en el cual β determina los efectos de los marcadores moleculares. Usando el mismo modelo, también se obtuvieron estimadores para las variables reproductivas número de días abiertos y número de servicios por concepción. La población estudiada tuvo mayor frecuencia de genotipo heterocigoto (CG) para FSHR, y en el gene LHR-1 fue 0.99 para T y 0.01 para G. Con el análisis de los marcadores moleculares se identificó a rs41256849 como monomórfico (TT). La habilidad reproductiva de las vacas Jersey se mostró más influenciada por los marcadores rs43745234 y rs449811104 para FSHR y por rs41256850 para LHR. Por lo anterior, el uso de marcados moleculares representa una herramienta que podría ser útil para el mejoramiento genético de parámetros reproductivos.

Palabras clave: estimador reproductivo, hormonas de la reproducción y análisis genómico.

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Verónica Caudillo Aguilar

Director de Tesis: Baldomero Alarcón Zúñiga

Abstract

The reproductive parameters of dairy cattle are difficult to improve genetically through traditional methods of selection. The objective of this research was to determine the association between the reproductive ability of Jersey cows with the FSHR (follicle-stimulating hormone receptor) and LHR (luteinizing hormone receptor) genes, using SNPs. The population used comprised 120 Jersey females. Statistical analysis using PROC MIXED in SAS 9.3® determined the reproductive ability of the cow to become pregnant defined by reproductive ability estimator. Genomic analysis were undertaken by extraction of hairy bulb DNA and determination of allelic variants by means of SNPs reported in the genetic base HapMap-NCBI with the real-time PCR technique. The model used to predict reproductive ability was $y_{ij} = \mu + X\beta_j + Auk + e_{ij}$, in which β represents the effects of the molecular markers. Using the same model, estimators were also obtained for the production variables days open and number of services per conception. The studied population showed higher frequency of the heterozygous genotype (CG) for FSHR, for the LHR-1 gene it was 0.99 for T and 0.01 for G. The molecular markers analysis identified rs41256849 as monomorphic (TT) for the studied population. The reproductive ability of Jersey cows was more influenced by SNP markers rs43745234 and rs449811104 for FSHR and rs41256848 for LHR. Therefore, the use of molecular markers represents a tool for genetic improvement of reproductive parameters in Jersey dairy cattle.

Key words: reproductive estimator, reproductive hormones and genomic analysis

Thesis –Master of Science in Livestock Innovation. Graduate in Animal Production.
Universidad Autónoma Chapingo
Author: Verónica Caudillo Aguilar
Thesis advisor: Baldomero Alarcón Zúñiga

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La infertilidad es uno de los problemas más importantes en los hatos lecheros. Lucy (2001) menciona que en la industria lechera a nivel mundial se ha observado una reducción del porcentaje de concepción. Este autor afirma que en 1951 se lograba gestar 65% de las vacas servidas, mientras que en 2000 se obtuvo menos que 40%. Velasteguí (2012), menciona que México no ha sido ajeno a este fenómeno, hace 30 años más de 50% de las vacas servidas quedaban gestantes y actualmente es menor que 40%. Hernández (2000) determinó que la producción de leche no afectó el intervalo entre partos, servicios por concepción, ni días abiertos; sin embargo, puede ser un factor que influye la fertilidad cuando se asocia con un manejo deficiente de la alimentación.

El mejoramiento genético en hatos lecheros enfocado a incrementar la producción de leche por vaca ha desencadenado un descenso en el desempeño reproductivo de las mismas. Esta disminución significa un aspecto crítico para la mejora genética mediante selección, debido a la baja heredabilidad de las características relacionadas con la reproducción (VanRaden et al., 2004). La raza Jersey ha mostrado superioridad en fertilidad en condiciones de pastoreo comparada con Holstein (Caraviello, 2004; Vargas-Leitón, Marín-Marín & Romero-Zúñiga, 2012).

Investigaciones relacionadas con el estudio de características productivas de animales domésticos y su relación con la expresión de genes, han sido de tipo estadístico, por ser el resultado de la interacción entre factores ambientales y un elevado número de genes (Solarte & Rosero, 2008). Una manera eficiente para mejorar la fertilidad es la construcción de un índice de selección, utilizando estimadores de los parámetros genéticos y fenotípicos de las características de interés, además de sus respectivos valores económicos.

La selección mediante el uso de marcadores moleculares pretende optimizar los esquemas de selección, proporcionando información del genoma de cada animal y su relación con el desempeño fenotípico; permitiendo la selección de animales superiores incluso antes de su nacimiento, ya que los mejores animales son los que heredan segmentos de cromosomas asociados con mayor mérito genético para características de interés económico (VanRaden, 2008).

Las tecnologías moleculares permiten mejorar la selección para caracteres fenotípicos difíciles de evaluar mediante métodos tradicionales de mejoramiento, como los reproductivos y de longevidad. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) representan la variación genética que ocurre de manera natural en el genoma; consisten en una sustitución de una base nitrogenada que produce dos formas alternativas en la secuencia de ADN (Pearson & Manolio, 2008). Cuando un SNP genera un cambio en la síntesis proteica, se produce un cambio en la expresión fenotípica de un carácter, lo que involucra un cambio en la fisiología del individuo (Zhang & Hewitt, 2003).

Las funciones reproductivas engloban el funcionamiento del eje hipotálamo-glándula pituitaria-gónadas y sus interacciones, que reacciona a un estímulo interno o externo hacia el sistema nervioso central, desencadenando la liberación de un neurotransmisor al hipotálamo y con ello la liberación de GnRH, la cual estimula a la adenohipófisis para la secreción de LH y FSH. Los genes receptores de FSH y LH son expresados en las gónadas, mientras que el gen receptor de GnRH es expresado en la glándula pituitaria anterior (Themmen & Huhtaniemi, 2000). La regulación de la expresión génica en células foliculares no está completamente definida, ya que, aunque el receptor de FSH (FSHR) está regulado específicamente a través del receptor de andrógenos, los mecanismos reguladores inter e intracelulares pueden ser críticos para el crecimiento folicular normal y la selección folicular (Spicer & Aad, 2007).

En el Capítulo 2 de esta tesis se presenta una revisión de literatura más detallada acerca de las características reproductivas más importantes y sus posibilidades de mejoramiento genético, mediante técnicas tradicionales y con el apoyo de la genética molecular. En el Capítulo 3 se muestra un estudio realizado con el objetivo de determinar si la habilidad reproductiva de las vacas Jersey está relacionada con el genotipo de reproducción para los genes FSHR y LHR (receptor de la hormona luteinizante).

2 Revisión de Literatura

2.1 Características reproductivas de bovinos lecheros

El desempeño reproductivo de las vacas en los hatos lecheros, ha representado un aspecto crítico para su mejora genética mediante selección, debido a la baja heredabilidad y a la desfavorable respuesta correlacionada con el incremento en la producción de leche. VanRaden et al. (2004) mencionan que la selección de animales por alto rendimiento de leche trae como consecuencia intervalos entre partos más largos, debido a una desfavorable correlación genética (0.35) entre el rendimiento lechero y días abiertos.

Caraviello (2004) estimó un mejor comportamiento reproductivo de vacas Jersey en pastoreo comparado con Holstein, aun cuando Jersey produce más leche (corregido por energía) por unidad de peso vivo; además, este autor menciona que considerando la problemática reproductiva que se tiene en hatos lecheros, Jersey mostró 1.4 unidades puntuales menos, escala 1 a 5, para dificultad al parto. Por otra parte, Vargas-Leitón et al. (2012) reportaron para Jersey un intervalo de días abiertos de 137, mientras que para Holstein fue 150.

En cuanto a la disminución de la fertilidad a través del tiempo, razas como Shorthorn, Jersey y Ayrshire tuvieron decrementos menores que Guernsey, Brown Swiss y Holstein (VanRaden et al., 2004).

2.2 Heredabilidad de parámetros reproductivos

La heredabilidad de variables reproductivas en vacas ha sido estimada desde el siglo pasado. Para intervalo entre partos y formación del primer cuerpo lúteo (periodo del parto a la primera ovulación) se han reportado heredabilidades aproximadas a 0.13 (Darwash, Lamming & Woolliams, 1997); valores que pueden considerarse bajos. Sin embargo, los mismos autores mencionan la importancia de incluir las características reproductivas de los animales a seleccionar, ya que

solo considerar sus características productivas puede afectar la fertilidad del hato.

La heredabilidad para días al primer parto en Jersey fue reportada por VanRaden et al. (2004), 0.04 ± 0.01 , valor menor que los estimados en otras razas. Esta característica se relaciona con los días al primer celo, evento manifestado por la madurez folicular; sin embargo, la regulación de la expresión génica en células foliculares no está completamente determinada, ya que, aunque el FSHR está regulado específicamente a través del receptor de andrógenos, los mecanismos reguladores inter e intracelulares pueden ser críticos para el crecimiento folicular normal y la selección folicular (Spicer & Aad, 2007).

VanRaden et al. (2004) estimaron que la heredabilidad para largo de gestación en vacas de dos a cinco lactancias varió de 0.33 a 0.36, mientras que en vacas de primera lactancia de 0.46 a 0.47. Estos autores mencionan que esta característica influye poco en la varianza del intervalo entre partos; sin embargo, una desviación estándar de 1.6 días es un componente importante para la característica dificultad al parto. Los mismos autores reportaron la correlación de tasa de preñez de las hijas con la vida productiva de las mismas, 0.46 en Holstein y 0.23 en Jersey.

Veerkamp, Koenen, y De Jong (2001) encontraron heredabilidades para condición corporal de 0.38, fertilidad de 0.01 a 0.07, número de servicios por concepción de 0.25, y concepción al primer servicio de 0.05; así como desviaciones estándar genéticas de 9 días para días al primer servicio e intervalo entre partos.

2.3 Factores no genéticos

La infertilidad es uno de los problemas más importantes en los hatos lecheros. Lucy (2001) menciona que en la industria lechera a nivel mundial se ha observado

una reducción del porcentaje de concepción. Este autor afirma que en 1951 se lograba gestar 65% de las vacas servidas, mientras que en 2000 se obtuvo menos que 40%, este fenómeno también se ha presentado. En México, hace 30 años más de 50% de las vacas servidas quedaban gestantes, hoy día es menor que 40% (Velasquí, 2012). Hernández (2000) determinó que la producción de leche no afectó el intervalo entre partos, servicios por concepción, ni días abiertos; sin embargo, puede ser un factor que deprima la fertilidad cuando se asocia con un manejo deficiente de la alimentación.

El manejo alimenticio de los hatos lecheros es complemento importante para la fertilidad de las vacas. Veerkamp et al. (2001) mencionaron que un alto valor genético para el rendimiento lechero afecta desfavorablemente la fertilidad, aunque la correlación genética sugiere que la adecuada condición corporal en algunas etapas de la lactancia podría ayudar a reducir el efecto desfavorable de la selección para un mayor rendimiento en la fertilidad.

El incremento excesivo del número de vacas en hatos lecheros bajo condiciones sanitarias o de manejo no completamente favorables también se asocia con la baja fertilidad, afectada por la incorrecta detección de estros y mal manejo sanitario, propiciando retención de placentas, infecciones uterinas y abortos. El mal manejo hormonal para la alteración de la ovulación puede inducir a la presencia de quistes foliculares bovinos y con ello una alteración en la expresión de los receptores de gonadotropina en los folículos, debido a los cambios en el sistema de señalización para las gonadotropinas (Marelli, Diaz, Salvetty, Rey & Ortega, 2014).

2.4 Evaluaciones genéticas

Investigaciones relacionadas con características productivas de los animales domésticos y su relación con la expresión de genes, han sido de tipo estadístico,

por ser el resultado de la interacción entre factores ambientales y un elevado número de genes (Solarte & Rosero, 2008).

En años recientes, en el mundo ha habido un progreso genético considerable en la producción de leche. Pryce y Veerkamp (2001) señalan que los aumentos en rendimiento lechero han estado acompañados por un aparente alargamiento del intervalo entre partos, días abiertos, días al primer celo y una disminución en las tasas de concepción, aparentemente tanto a nivel genético como fenotípico. Sin embargo, Walsh, Williams y Evans (2011) mencionan que el balance energético negativo es un factor importante que contribuye a la patogénesis de infertilidad, recuperación del útero, inflamación e infección postparto; así como la detección del estro y la inseminación en el momento correcto en relación con la ovulación, considerando que para mejorar la fertilidad de las vacas lecheras en el largo plazo es necesario centrarse en soluciones genéticas para lograr la preñez de las mismas.

El cálculo de la heredabilidad de la fertilidad se determina a partir de fechas de servicio, considerándose como la parte aditiva, las cuales tienen un valor pequeño en comparación con la variación fenotípica, la cual es altamente influenciada por el ambiente; por tanto, los estimadores de heredabilidad son pequeños, generalmente menores que 0.05, aunque los coeficientes de variación genética son comparables a los de características productivas (Pryce & Veerkamp, 2001).

La forma más eficiente para mejorar la fertilidad es la construcción de un índice de selección, utilizando las estimaciones de los parámetros genéticos y fenotípicos de todas las características de interés, además de sus respectivos valores económicos. Se pueden incluir características como intervalo entre partos, días abiertos, días al primer servicio o edad al primer parto, pero también se pueden incluir las relacionadas con el balance de energía, peso vivo y cambio de condición corporal, las cuales tienen mayor heredabilidad. Para restablecer el

equilibrio entre la fertilidad y la producción, algunos países publican evaluaciones genéticas de características relacionadas con fertilidad, incluyendo: Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Israel, Países Bajos, Noruega y Suecia. Los cálculos del modelo muestran que a pesar de la relativamente baja heredabilidad de la mayoría de las variables relacionadas con fertilidad, existe una variación genética suficiente para incluirlas en un índice de mérito económico total (Pryce & Veerkamp, 2001).

Las correlaciones genéticas entre producción y fertilidad son indeseables, debido a que la fertilidad disminuye con el aumento del mérito genético para la producción de leche. El impacto de esto es que, con la selección para rendimiento lechero y un aumento del valor genético de aproximadamente 100 kg de leche año⁻¹, se espera que el intervalo entre partos aumente entre cinco y 10 días en los próximos 10 años (Pryce, Esslemont, Thompson & Veerkamp, 1998). Veerkamp et al. (2001) reportaron correlaciones fenotípicas entre la fertilidad y el rendimiento de leche de -0.15 a 0.20, mientras que las correlaciones genéticas entre estas características fueron desfavorables (0.37 a 0.74).

La selección mediante el uso de marcadores moleculares pretende optimizar los esquemas de selección mendeliana proporcionando información del genoma de cada animal para la comparación con su desempeño fenotípico. Lo anterior permite la selección de animales superiores incluso antes de su nacimiento, ya que los mejores animales son los que heredan segmentos de cromosomas asociados con mérito genético más alto para características de importancia económica (VanRaden, 2008).

La exactitud de la evaluación genética depende de la heredabilidad de la característica evaluada, el número de animales de referencia en la población y el método estadístico utilizado para estimar los efectos del SNP. El método BLUP es atractivo porque la información previa requerida es la varianza genética aditiva de la característica en cuestión. La inclusión del valor genético promedio de los

padres se recomienda para capturar cualquier variación genética no asociada con los marcadores (Hayes, Bowman, Chamberlain & Goddard, 2009).

La selección genómica se refiere a la toma de decisiones basadas en valores genómicos (GEBV), los cuales se calculan por aditividad de los efectos de los marcadores o haplotipos de estos marcadores, a través del genoma, y con ello la identificación de los *loci* de características cuantitativas (QTL) que contribuyen a la variación en un rasgo. El efecto de QTL, inferido de cualquiera de los haplotipos o polimorfismo de nucleótido simple, se estiman por primera vez en una gran población de referencia con información fenotípica, mientras que el cálculo del GEBV para las generaciones subsiguientes se hace a partir de la información proporcionada por el marcador. Esta herramienta parece ser la tecnología que ha entregado el mayor incremento en la tasa de progreso genético para la industria láctea en los últimos 20 años (Hayes et al., 2009).

2.5 Biotecnología de la reproducción

2.5.1 Genómica

Las tecnologías moleculares permiten mejorar la selección para caracteres fenotípicos difíciles de evaluar mediante métodos tradicionales de mejoramiento, como los de la canal, reproductivos y de longevidad. Los SNP representan la variación genética en el genoma por la sustitución de una base nitrogenada que produce dos formas alternativas en la secuencia de ADN (Pearson & Manolio, 2008). Cuando un SNP genera un cambio en la síntesis proteica, esto producirá a su vez un cambio en la expresión fenotípica del carácter, lo que involucra un cambio en la fisiología del individuo (Zhang & Hewitt, 2003).

El aporte de técnicas de biotecnología reproductiva desarrolladas inicialmente en bovinos como: súper ovulación, cultivo de ovocitos, fertilización *in vitro*,

maduración y congelación de embriones, han sido implementadas posteriormente en humanos (Hall, 2001).

Las funciones reproductivas engloban el funcionamiento del eje hipotálamo-glándula pituitaria-gónadas y sus interacciones, que reacciona a un estímulo interno o externo hacia el sistema nervioso central, desencadenando la liberación de un neurotransmisor al hipotálamo y con ello la liberación de GnRH, la cual estimula a la adenohipófisis para la secreción de LH y FSH. Los genes receptores de FSH y LH son expresados en las gónadas, mientras que el gen receptor de GnRH es expresado en la glándula pituitaria anterior (Themmen & Huhtaniemi, 2000).

El crecimiento folicular y la esteroidogénesis dependen de la unión de gonadotropina a sus receptores en las células granulosa y teca de los folículos ováricos. Marelli et al. (2014) han estudiado la expresión de receptores para FSH y LH en células de la granulosa y de la teca en relación con el tamaño de los folículos en vacas, mencionando que la expresión del RNA mensajero (RNAm) de FSHR en células de la granulosa, es más alta en folículos pequeños y disminuye significativamente a medida que los folículos aumentan de tamaño. Así mismo, dicha expresión se vuelve casi nula con la presencia de quistes. La expresión del ARNm de LHR en las células de la granulosa es mayor en grandes folículos antrales que en los quistes, y no se detecta en las células de la granulosa de folículos pequeños y medianos. En las células de la teca, el nivel de expresión del ARNm de LHR fue mayor en los folículos medianos que en los folículos antrales pequeños y grandes, mientras que en los quistes foliculares fue mayor en los folículos pequeños y medianos que en los grandes.

El análisis del folículo dominante en bovinos ayuda a determinar los genes identificativos de FSH, estradiol y LH que regulan su crecimiento y función, manifestando una evidencia molecular para la hipótesis de que el folículo dominante experimenta una reducción en la dependencia de FSH, pero

adquieren una mayor dependencia de LH a medida que crece bajo las ondas foliculares (Mihm et al., 2006). En vacas lecheras hay evidencia de que los genotipos para FSHR intervienen en la respuesta a los protocolos de superovulación. Cory, Price, Lefebvre y Palin (2012) encontraron que las vacas Holstein con genotipo GG para FSHR presentan un mayor porcentaje de embriones viables; además, los animales CG tienen menos ovocitos no fertilizados y los animales homocigotos AA presentan menor rendimiento embrionario después de tratamientos superovulatorios.

Li-Ping et al. (2012) relacionaron polimorfismos de los genes LHR y GnRH con la calidad espermática. Considerando un SNP (A883G) en el exon 2 de GnRH y dos SNPs (A51703G y G51656T) en el intrón 9 de LHR identificados en 274 toros, estos autores encontraron que el SNP G51656T en LHR tuvo efecto significativo en la densidad del semen, mientras que para el SNP 51703, el semen fresco de animales con genotipo AG tuvo mayor motilidad en comparación con los animales de genotipos AA y GG. La densidad de semen de animales con genotipo GG fue mayor que la de los del genotipo TT en el SNP G51656T de LHR.

2.5.2 GnRH

La GnRH es secretada en el torrente sanguíneo a la glándula pituitaria, que contiene células gonadotropas donde la GnRH activa su propio receptor, lo cual propicia la activación de proteínas implicadas en la síntesis y secreción de las gonadotropinas LH y FSH. Estos procesos son controlados por el tamaño y frecuencia de los pulsos de GnRH, así como por la retroalimentación de andrógenos y estrógenos, la baja frecuencia de pulsos de GnRH conduce a la liberación de FSH, mientras que la alta frecuencia de pulsos de GnRH estimula la liberación de LH, posteriormente la GnRH es degradada por proteólisis en pocos minutos (Pérez, 2016). El gen receptor de GnRH está conformado por 3 exones y ubicado en el cromosoma 6 de *Bos taurus*, y es un gen de tipo codificador de proteína (NCBI, 2016).

2.5.3 FSH

El desarrollo folicular es inducido por FSH, mientras que en los testículos promueve el crecimiento de tubos seminíferos y con ello la espermatogénesis. El FSHR contiene 10 exones, se encuentra en el cromosoma 11 de *Bos taurus*, contiene 194,454 pares de bases y es un gen de tipo codificador de proteína (NCBI, 2016). Milazzotto et al. (2008) encontraron una correlación entre la edad a la pubertad y los cambios del genoma en la posición 2181, de timina por adenina, en 2248 de citosina por timina, y en 2249 de timina por adenina, esto para FSHR en ganado Nelore. Cory et al. (2012) sugieren que los alelos específicos del gen FSHR bovino se asocian con variaciones en el rendimiento del embrión y en el número de ovocitos no fertilizados.

2.5.4 LH

La LH promueve el desarrollo de células intersticiales, y la producción de testosterona en testículos y la de progesterona en ovarios. El gen LHR está conformado por 12 exones, se encuentra en el cromosoma 11 de *Bos taurus*, se compone de 64,581 pares de bases y es un gen codificador de proteína (NCBI, 2016).

Además, se han detectado polimorfismos en LHR. Vásquez-Marín, Márques-Urdaneta, Seijas-Pedroza, De La Rosa y Aranguren-Méndez (2014) encontraron un cambio de transversación de guanina por timina (1410G>T), lo que ya había sido reportado previamente y una variante nueva de transición de citosina por timina (1337C>T) en ganado Carora, identificando dos alelos (G y T) y tres genotipos (GG, GT, TT) para la variante reportada, y dos alelos (C y T) y dos genotipos (CC, CT) para la variante nueva.

Lirón et al. (2012) relacionaron dos SNPs de GnRHR y uno de LHR asociados con la edad a la pubertad en machos de razas cárnicas. Este trabajo se considera

la primera evidencia de marcadores asociados con la edad de la pubertad en los bovinos machos.

2.6 Literatura Citada

- Caraviello, D. Z. (2004). Cruzamientos en ganado lechero. *Novedades Lácteas, Reproducción y Genética*, 610, 1-6.
- Cory, A. T., Price, C. A., Lefebvre, R., & Palin, M. F. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Animal Genetics*, 44(2), 197-201, doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02380.x.
- Darwash, A. O., Lamming, G. E., & Woolliams, J. A. (1997). Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1227-34, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76051-X.
- Hall, C. T. (2001). Untangling biotech issues Cloning is research field entirely separate from stems cells. Consultada en <http://www.sfgate.com/cgi-bin/article.cgi?f=/c/a/2001/12/03/MN138336.DTL&type=science>. 26 de marzo de 2015.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2009). Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, 92 (2), 433–443, doi: 10.3168/jds.2008-1646.
- Hernández, C. J. (2000). Causas y Tratamientos de la Infertilidad en la Vaca Lechera. Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 2-10.
- Lirón, J. P., Prando, A. J., Fernández, M. E., Ripoli, M. V., Rogberg-Muñoz, A., Goszczynski, D. E., Posik, D. M., Peral-García, P., Baldo, A., & Giovambattista, G. (2012). Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BioMed Central Genetics*, 13, 26, doi: 10.1186/1471-2156-13-26.
- Li-Ping, S., Qing-Zhi, D., Ya-Pan, S., Jun-Na, Y., Shu-Juan, W., Lei, S., Luo-Wen, S., Yao-Min, Y., Yu-Ze, L., Sheng-Li, Z., Guo-Hua, H., Shu-Jun, Z., & Li-Guo, Y. (2012). Polymorphisms in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effects on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Molecular Biology Reports*, 39, 7117–7123, doi: 10.1007/s11033-012-1543-x.

- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1277-93, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0.
- Marelli, B. E., Diaz, P. U., Salvetti, N. R., Rey, F., & Ortega, H. H. (2014). mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reproductive Biology*, 14(4), 276-81, doi: 10.1016/j.repbio.2014.08.002.
- Mihm, M., Baker, P. J., Ireland, J. L., Smith, G. W., Coussens, P. M., Evans, A. C., & Ireland, J. J. (2006). Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of reproduction*, 74(6), 1051-9, doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045799>.
- Milazzotto, M. P., Rahal, P., Nichi, M., Miranda-Neto, T., Teixeira, L. A., Ferraz, J. B. S., Eler, J. P., Campagnari, F., & Garcia, J. F. (2008). New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nelore). *Livestock Science*, 114(1-2), 274–279, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.05.006>.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2016). *Bos taurus*. Genome. Disponible en https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_000003055.6. Consultada el 3 de noviembre de 2016.
- Pearson, T. A., & Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *Journal of the American Medical Association*, 299(11), 1335-1344, doi:10.1001/jama.299.11.1335.
- Pérez, G. (2016). Hormona estimulante del folículo (o folículo-estimulante, FSH). Disponible en http://www.gonadotropina.com/hormona_estimulante_del_folculo_o_folculo-estimulante_fsh. Consultada el 16 de febrero de 2017.
- Pryce, J. E., Esslemont, R. J., Thompson, R., & Veerkamp, R. F. (1998). Estimation of genetic parameters using health, fertility and production data from a management recording system for dairy cattle. *Animal Science*, 66(3), 577-584, doi: <https://doi.org/10.1017/S1357729800009152>.
- Pryce, J. E., & Veerkamp, R. F. (2001). The incorporation of fertility indices in genetic improvement programmes. *Fertility in the High Producing Dairy Cow*, 26: 237-250
- Solarte, P. C., & Rosero, G. C. (2008). Aplicaciones actuales y potenciales de genética en producción animal. *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas*, Universidad de Nariño, 9 (2), 109-129.

- Spicer, L. J., & Aad, P. Y. (2007). Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: Role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biology of Reproduction*, 77, 18-27, doi: 10.1095/biolreprod.106.058230.
- Themmen, A. P. N., & Huhtaniemi, I. T. (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews*, 21(5), 551-83, doi: 10.1210/edrv.21.5.0409.
- VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4414-23. doi: 10.3168/jds.2007-0980.
- VanRaden, P. M., Sanders, A. H., Tooker, M. E., Miller, R. H., Norman, H. D., Kuhn, M. T., & Wiggans, G. R. (2004). Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2285–2292, doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70049-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70049-1).
- Vargas-Leitón, B., Marín-Marín, Y., & Romero-Zúñiga, J. J. (2012). Comparación bioeconómica de grupos raciales Holstein, Jersey y Holstein × Jersey en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 329-342.
- Vásquez-Marín, B. J., Márques-Urdaneta, A. F., Seijas-Pedroza, G., De La Rosa, O., & Aranguren-Méndez, J. A. (2014). Detección de polimorfismos en la región codificante del gen receptor de hormona luteinizante mediante análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple y secuenciación en bovinos Carora. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 24(5), 428-435.
- Veerkamp, R. F., Koenen, E. P. C., & De Jong, G. (2001). Genetic correlations among body condition score, yield, and fertility in first-parity cows estimated by random regression models. *Journal of Dairy Science*, 84, 2327–2335.
- Velasteguí, C. E. E. (2012). Administración de GnRH y HCG post inseminación artificial para incrementar la fertilidad en vacas Holstein mestizas. Tesis Profesional. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Consultada en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2083/1/17T01113.pdf>.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., & Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123(3-4), 127–138, doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.12.001.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(6), 1687.

3 GENOTIPIFICACIÓN PARA FSHR Y LHR EN BOVINOS JERSEY

3.1 Resumen

Los parámetros reproductivos de bovinos lecheros son difíciles de mejorar genéticamente mediante métodos tradicionales de selección. El objetivo de la presente investigación fue determinar la asociación entre la habilidad reproductiva de vacas Jersey, y los genes FSHR (receptor de hormona folículo estimulante) y LHR (receptor de la hormona luteinizante), especificados mediante polimorfismo de nucleótido simple, o por factores distintos. La población utilizada fueron 120 vacas Jersey. Mediante análisis estadísticos usando el procedimiento MIXED en SAS 9.3®, se determinó la habilidad reproductiva de la vaca para quedar gestante, definida por un estimador de la habilidad reproductiva. El análisis genómico consistió en la extracción de ADN de bulbo piloso y determinación de las variantes alélicas por medio de SNPs reportados en la base genética HapMap-NCBI, utilizando la técnica de PCR en tiempo real. El modelo utilizado para predecir la habilidad reproductiva fue $y_{ij} = \mu + X\beta_j + A u_k + e_{ij}$, en el cual β determina los efectos de los marcadores moleculares. Usando el mismo modelo, también se obtuvieron estimadores para las variables reproductivas número de días abiertos y número de servicios por concepción. La población estudiada tuvo mayor frecuencia de genotipo heterocigoto (CG) para FSHR, y en el gene LHR-1 fue 0.99 para T y 0.01 para G. Con el análisis de los marcadores moleculares se identificó a rs41256849 como monomórfico (TT). La habilidad reproductiva de las vacas Jersey se mostró más influenciada por los marcadores rs43745234 y rs449811104 para FSHR y por rs41256850 para LHR. Por lo anterior, el uso de marcados moleculares representa una herramienta que podría ser útil para el mejoramiento genético de parámetros reproductivos.

Palabras clave: estimador reproductivo, hormonas de la reproducción y análisis genómico.

GENOTYPING FOR FSHR AND LHR IN JERSEY CATTLE

3.2 Abstract

The reproductive parameters of dairy cattle are difficult to improve genetically through traditional methods of selection. The objective of this research was to determine the association between the reproductive ability of Jersey cows with the FSHR (follicle-stimulating hormone receptor) and LHR (luteinizing hormone receptor) genes, using SNPs. The population used comprised 120 Jersey females. Statistical analysis using PROC MIXED in SAS 9.3® determined the reproductive ability of the cow to become pregnant defined by reproductive ability estimator. Genomic analysis were undertaken by extraction of hairy bulb DNA and determination of allelic variants by means of SNPs reported in the genetic base HapMap-NCBI with the real-time PCR technique. The model used to predict reproductive ability was $y_{ij} = \mu + X_{ij}\beta + A_{ik} + e_{ij}$, in which β represents the effects of the molecular markers. Using the same model, estimators were also obtained for the production variables days open and number of services per conception. The studied population showed higher frequency of the heterozygous genotype (CG) for FSHR, for the LHR-1 gene it was 0.99 for T and 0.01 for G. The molecular markers analysis identified rs41256849 as monomorphic (TT) for the studied population. The reproductive ability of Jersey cows was more influenced by SNPs markers rs43745234 and rs449811104 for FSHR and rs41256848 for LHR. Therefore, the use of molecular markers represents a tool for genetic improvement of reproductive parameters in Jersey dairy cattle.

Key words: reproductive estimator, reproductive hormones and genomic analysis

Thesis –Master of Science in Livestock Innovation. Graduate in Animal Production.
Universidad Autónoma Chapingo
Author: Verónica Caudillo Aguilar
Thesis advisor: Baldomero Alarcón Zúñiga

3.3 Introducción

El mejoramiento genético en hatos lecheros enfocado a incrementar la producción de leche por vaca ha desencadenado un descenso en su desempeño reproductivo, dicho desempeño significa un aspecto crítico para la mejora genética mediante selección, debido a la baja heredabilidad de estas características (VanRaden et al., 2004). La raza Jersey ha mostrado superioridad en fertilidad en condiciones de pastoreo comparada con Holstein (Caraviello, 2004; Vargas-Leitón, Marín-Marín & Romero-Zúñiga, 2012).

Las tecnologías moleculares permiten mejorar la selección para características difíciles de evaluar mediante métodos tradicionales de mejoramiento, como los reproductivos y de longevidad. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) representan la variación genética que ocurre en el genoma en una sustitución de una base nitrogenada que produce dos formas alternativas en la secuencia de ADN (Pearson & Manolio, 2008). Cuando un SNP genera un cambio en la síntesis proteica, esto producirá a su vez un cambio en la expresión fenotípica de un carácter, lo que involucra un cambio en la fisiología del individuo (Zhang & Hewitt, 2003).

Las funciones reproductivas engloban el funcionamiento del eje hipotálamo-glándula pituitaria-gónadas y sus interacciones. Este eje reacciona a un estímulo interno o externo hacia el sistema nervioso central, desencadenando la liberación de un neurotransmisor al hipotálamo y con ello la liberación de GnRH, la cual estimula a la adenohipófisis para la secreción de LH y FSH. Los genes receptores de FSH y LH son expresados en las gónadas, mientras que el gen receptor de GnRH es expresado en la glándula pituitaria anterior (Themmen & Huhtaniemi, 2000). La regulación de la expresión génica en células foliculares no está completamente definida, ya que, aunque el FSHR (receptor de hormona folículo estimulante) está regulado específicamente a través del receptor de andrógenos, los mecanismos reguladores inter e intracelulares pueden ser críticos para el

crecimiento folicular normal y la selección folicular (Spicer & Aad, 2007). La LH promueve el desarrollo de células intersticiales, y la producción de testosterona en testículos y la de progesterona en ovarios (NCBI, 2016).

En México, se ha reportado un solo estudio en cuanto a genotipos de la reproducción en vacas, Hernández (2010) obtuvo diferencias significativas en la respuesta a ovulación múltiple de acuerdo al genotipo de FSHR en 31 hembras (14 Cebú, 11 Suizo y seis híbridas).

El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la habilidad reproductiva de vacas Jersey y los genotipos para los genes de FSHR (receptor de la hormona folículo estimulante) y LHR (receptor de gonadotropinas de la hormona luteinizante), mediante el uso de SNP.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Lote experimental de animales

La población con la que se realizó esta investigación pertenece al rancho *La Hondonada*, ubicado en el municipio de Colón, Querétaro. Este rancho cuenta con una población de 1200 vacas de raza Jersey en producción a través del año, en un sistema automatizado de ordeño y registro diario de peso vivo y producción de leche individual. El sistema de producción se basa en pastoreo de praderas de ballico perenne (*Lolium perenne*), trébol blanco (*Trifolium pratensis*) y alfalfa (*Medicago sativa*), con uso de suplemento alimenticio en cada una de las dos ordeñas al día, formulado de acuerdo con la etapa reproductiva de cada animal.

3.4.2 Selección de animales

La selección de los animales para el estudio genómico inició con el análisis de los parámetros reproductivos de 985 vacas productoras de 2004 a 2016, de las cuales se tuvieron datos reproductivos dentro del hato, los cuales se analizaron mediante clases formadas por cada año; sin embargo, debido a que el hato inició

el sistema de registro en el año 2004, el periodo de 2004 a 2010 se colapsó en una sola clase, debido al número de observaciones; así como para los años 2015 y 2016, debido a que el registro para 2016 incluyó únicamente los meses de enero y febrero. Así mismo se formaron clases de días después del parto, considerando la primera clase del día uno al día 30 después del parto con el objetivo de incluir el periodo de espera voluntaria después del parto, a partir del día 31 se formaron clases cada 10 días, hasta llegar a la clase 18 la cual determina un periodo de 200 días después del parto.

También se obtuvo información relacionada con el pedigrí, su fecha de nacimiento, su edad al primer celo, servicio, gestación y parto, y la fecha de cada celo, servicio y parto, a partir de la primera lactancia. De la población total, se seleccionaron para su genotipificación 120 vacas, con base en el registro de número de lactancias (más de tres) e información de pedigrí.

3.4.3 Identificación de polimorfismos de ADN en FSHR y LHR

El análisis genómico inició con el muestreo de folículos pilosos de las vacas seleccionadas. El pelo de la cola de cada una de las vacas se recolectó y depositó en sobres de papel con la identificación del animal. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su uso en laboratorio. Posteriormente, la extracción de ADN de los bulbos pilosos de los 120 animales se realizó con la técnica propuesta por Burgos-Paz, Cerón-Muñoz y Moreno-Ochoa. (2010), con la cual se determinaron las variantes alélicas de FSHR y LHR, por medio de SNPs reportados en la base génica HapMap-NCBI (Cuadro 1), con el equipo para la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR), el producto amplificado se detecta mediante marcadores de fluorescencia que se hibridan a sondas de oligonucleótidos que se unen a una de las dos combinaciones específicas del marcador, los cuales emiten fluorescencia FAM™ o HEX™.

Cada SNP fue elegido para amplificar los exones uno, tres y siete de FSHR y el exón uno de LHR. La amplificación se realizó para cada marcador en un volumen total de 10.14 µL. La mezcla de reacción incluyó cinco µL de ADN genómico, 0.14 µL de PrimerMix y cinco µL de MasterMix. La reacción de PCR inició con 15 min a 94 °C; 10 ciclos de 94 °C por 20 segundos, y 55.6 °C por 60 segundos, para finalizar con 36 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 60 segundos, y 37 °C por 60 segundos.

Cuadro 1. Secuencia de los SNPS usados para la amplificación en PCR y secuencia de ADN de FSHR y LHR.

SNP	Secuencia
FSHR-1	5'TTCTCTTTCACAGTAGAATTGAAAAGGCCAACCAACCTGCATACATCGAC(C/G)CTG ATGCCTTCCAGAACCTTCCCAACCTCCGATATCTGTAAGAACTTCTG 3'
FSHR-2	5'CCGCCTCCAGTTTGCAAAGGCACAGCAGTGGCTGGGGTAGGTGAGGCTGG(C/G) CTCCACGAGTGTGACAAATTTTCCAGACTGGGAAGCTTTTTTAAGCGGT 3'
FSHR-3	5'CATGTTGACTCTGTTCTTTTGTATTTTCTAGCTCTGACCTTCATCCA(A/G)TTT GCAACAAATCTATTTTAAGGCAAGAAGTTGATGACATGACTCAGGCT 3'
FSHR-4	5'ATGTCATCAACTTCTTGCCTTAAAA(C/T)AGATTTGTTGCAAACTGGATGAAGG 3'
FSHR-5	5'CTGGGGGGCAGTGGCCGTTCTTGGATGAAAGTTGTGGGCAGTGGATGAG(C/G) TTTCTGACCTATAGGTCTGGGCTTGCACTTCATAGCAGCCAACTTGCTC 3'
LHR-1	5'TGTTTCAGTCGCAGCTTTTGGTCCAGTTGAATAGCATAGGTGATGGTGTG(A/C)CA TCTTTCTAGTGTGATGACTGTGAGGGTGTAGACAGAGAGTTCACTTGC 3'
LHR-2	5'ACACCCACAAGAGGCAACACGGCAATGAGAGTAGAAAAGAGCCATCCTCC[A/G]A GCATGACTGGAATGGCATGTTTCAGTCGCAGCTTTTGGTCCAGTTGAAT 3'
LHR-3	5'ATGATGATGAAGGCCATCACGTTGAGAATCAGGATGGTTAAGATGTAGAC(A/C)T GTGAGAGAGTGCTTTCCACATCCATGGGGAGGCAAATGCTGACCTTCAT 3'

Fuente: NCBI (2016). FSHR-1 corresponde a rs43745234, FSHR-2 a rs458246980, FSHR-3 a rs43676006, FSHR-4 a rs449811104, FSHR-5 a rs209882669, LHR-1 a rs41256848, LHR-2 a rs41256849 y LHR-3 rs41256850.

3.5 Análisis de datos

3.5.1 Determinación de la habilidad reproductiva del hato

La determinación de la habilidad reproductiva del hato se realizó usando el procedimiento MIXED de SAS 9.3®, mediante un modelo estadístico que estima la habilidad reproductiva de cada una de las vacas para quedar gestante, dicha habilidad estuvo en función de los datos reproductivos de cada vaca en cada una de las lactancias, considerando la primera clase de días después del parto a partir del día uno al día 30 y las siguientes clases cada 10 días a parto del día 31 después del parto. El modelo consideró como característica cualitativa cada servicio, efectivo o no efectivo, además de los efectos fijos y aleatorios que se describen a continuación:

$$y_{ijklmnop} = \mu + L_i + AP_j + MP_k + AS_l + MS_m + DPC_n + SSX_o + Vaca_p \\ + b_1(EPP_p - \mu_{EPP}) + b_2(EPP_p - \mu_{EPP})^2 + e_{ijklmnop}$$

donde:

$y_{ijklmnop}$: la habilidad reproductiva de la vaca para quedar gestante;

μ : media general;

L_i : efecto fijo del i -ésimo número de lactancia de la vaca ($i = 1, \dots, 5$);

AP_j : efecto fijo del j -ésimo año de parto de la vaca ($j = 2010, \dots, 2015$);

MP_k : efecto fijo del k -ésimo mes de parto de la vaca ($k = \text{enero}, \dots, \text{diciembre}$);

AS_l : efecto fijo del l -ésimo año de inseminación o monta de la vaca ($l = 2010, \dots, 2015$);

MS_m : efecto fijo del m -ésimo mes de inseminación o monta de la vaca ($m = \text{enero}, \dots, \text{diciembre}$);

DPC_n : efecto fijo de la n -ésima clase de días posparto de la vaca ($n = 1, \dots, 18$);

SSX_o : efecto fijo de la o -ésima clase de tipo de semen utilizado (o = convencional, sexado);

$Vaca_p$: efecto aleatorio de la p -ésima vaca ($p = 1, \dots, 911$) $\sim$ NIID($0, \sigma_{vaca}^2$);

b_1 y b_2 : coeficientes de regresión del efecto lineal y cuadrático de la covariable edad de la vaca (en días) al primer parto;

EPP_p : edad (días) al primer parto de la p -ésima vaca;

μ_{EPP} : promedio de edad (días) de la vaca al parto;

$e_{ijklmnop}$: residual $\sim$ NIID($0, \sigma_e^2$).

3.5.2 Análisis de datos genómicos

Con los resultados de la PCR real-time se determinó si el animal presentó genotipo homocigoto para cada uno de los alelos especificados por el marcador molecular o heterocigoto, posteriormente se formó una matriz de dimensiones (120X7) y siguiendo la metodología de predicciones genómicas de VanRaden (2008), se procedió a codificar e imputar dicha matriz, con el objetivo de eliminar marcadores monomórficos y obtener una matriz de marcadores moleculares compatible con el programa RStudio versión 3.1.

3.5.3 Predicción de habilidad reproductiva considerando información de marcadores moleculares e información de pedigrí

El modelo utilizado para relacionar la habilidad reproductiva considerando datos de pedigrí y la información proporcionada por los marcadores moleculares fue (en notación matricial):

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ \vdots \\ Y_i \\ \vdots \\ Y_t \end{bmatrix} = \mu + [X_{(120 \times 7)}] \begin{bmatrix} B_{FSHR-1} \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ B_j \end{bmatrix} + [A_{(7 \times 120)}] \begin{bmatrix} u_1 \\ \vdots \\ u_{120} \end{bmatrix} + [e]$$

Este modelo se analizó mediante la función $\text{fm2}=\text{BGLR}(y=Y, \text{ETA}=\text{ETA})$, donde $\text{ETA}=\text{list}(\text{list}(X=X, \text{model}=\text{"FIXED"}), \text{list}(K=A, \text{model}=\text{"RKHS"}))$, de la librería "pedigreeR" y paquetería "BGLR" (Bayesian Generalized Regression) de RStudio versión 3.1.

donde:

y_{ij} : vector de estimadores (1x120) de la habilidad reproductiva de la i -ésima vaca para quedar gestante;

μ : media poblacional (120x1);

X : matriz de genotipos (120x7) de acuerdo a la información de los marcadores moleculares;

β : vector de efectos del j -ésimo marcador molecular (7x1);

A : matriz de relaciones genéticas; $u \sim N(0, \sigma_u^2 A)$;

e : vector de residuales $\sim N(0, \sigma_e^2)$ de dimensiones (7x1).

La prueba de significancia para el modelo anterior se realizó de acuerdo a intervalos de confianza para el estimador a partir del hecho que el vector de estimadores tiene una distribución normal multivariada.

3.6 Resultados y discusión

El análisis de parámetros reproductivos del hato permitió analizar el comportamiento general de las vacas, considerando los eventos durante 3101 partos, los cuales fueron avanzando a lo largo de las clases de año, manifestando que el hato aumenta el número de vientres en por lo menos 33% anual y que las

vacas van siendo reemplazadas a medida que avanza el número de lactancias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencias de partos por número de lactancia y año de parto de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

Lactancia	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
1	198	70	121	145	196	254	984
2	70	119	71	122	141	212	735
3	34	30	118	80	110	152	524
4	17	12	38	96	91	118	372
5	16	14	24	55	142	235	486
Total	335	245	372	498	680	971	3101

En promedio, las vacas en el hato tuvieron su primer parto a los 24 meses de vida y el largo de la lactancia dependió tanto de la producción como de su estado reproductivo; normalmente se manejan con un periodo seco de dos meses, obteniendo con ese manejo una condición corporal promedio de 3.2, en escala de 1 a 5 (Cuadro 3). En cuanto a los parámetros reproductivos, el hato presentó parámetros normales de acuerdo con la naturaleza biológica de las vacas y el sistema de producción (Cuadro 3). Los parámetros obtenidos son similares a los obtenidos por Washburn, Silvia, Brown, McDaniel y McAllister (2002), quienes reportaron promedios de días abiertos y servicios por concepción de 122 ± 2.8 y 1.91 ± 0.08 para Jersey.

En cuanto al primer celo después del parto algunas vacas presentaron un celo temprano y en esos casos se les dio servicio antes de los 45 días de espera, considerados biológicamente favorables; sin embargo, considerando los días a la preñez en relación al último parto este manejo es eficiente. Los números de servicios por concepción manifiestan que el primer servicio llega a ser el efectivo,

aunque se ha dado hasta 16 servicios, permitiendo periodos abiertos de hasta 700 días.

Cuadro 3. Parámetros reproductivos de las vacas Jersey en producción del año 2004 a 2016, manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México

	N	Media	Mínimo	Máximo	D. E.	C. V.
Edad al primer parto	979	737.3	531.0	1176.0	73.7	10.0
Largo de lactancia	2253	332.6	121.0	825.0	74.0	22.2
Periodo seco	1470	68.2	0.0	305.0	29.0	42.6
Días al celo	8564	114.4	7.0	700.0	84.0	73.4
Días al primer servicio	2936	64.6	14.0	265.0	30.1	46.6
Intervalo entre celos	5608	37.0	1.0	281.0	26.5	71.7
Días a IA	7509	122.1	14.0	700.0	83.6	68.4
Número de inseminaciones	7545	2.6	1.0	16.0	2.1	79.8
Intervalo entre IA	4569	38.9	1.0	311.0	28.2	72.6
Días a la preñez	2936	125.1	25.0	700.0	85.8	68.6
Intervalo entre partos	2115	401.4	277.0	985.0	83.0	20.7
Condición corporal	14115	3.2	2.0	5.0	0.4	11.0

N= número de registros; D. E.= desviación estándar; C. V.= coeficiente de variación.

El modelo que estima la habilidad reproductiva de las vacas muestra la capacidad de cada uno de los animales del hato para quedar gestante, éste tuvo influencia principalmente por el número de lactancia, tipo de semen utilizado para dar el servicio, días después del parto y mes en el que se da el servicio. Con base en un análisis de mínimos cuadrados, el cual reduce el error en la predicción del

modelo, se observó un decremento de la habilidad reproductiva mínimo del 10% en el paso de cada lactancia, y del 47% al usar semen sexado en comparación con el tradicional (Cuadro 4). Así como un incremento de acuerdo con el periodo de recuperación del sistema reproductivo de la vaca, con declives en periodos que coinciden con el ciclo estral de la especie y los servicios proporcionados en los meses de septiembre a diciembre, como se muestra en las Figuras 1 y 2.

Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos para los efectos de número de lactancia y tipo de semen utilizado en el servicio en la posibilidad de vacas Jersey de quedar gestantes, manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

Efecto	Nivel	Media $\pm$ EE
Lactancia	1	42.14 $\pm$ 2.25 ^a
	2	37.63 $\pm$ 2.52 ^b
	3	31.78 $\pm$ 2.70 ^c
	4	28.27 $\pm$ 2.97 ^c
	5	21.24 $\pm$ 3.12 ^d
Tipo de semen	Convencional	43.71 $\pm$ 1.34 ^a
	Sexado	20.71 $\pm$ 4.08 ^b

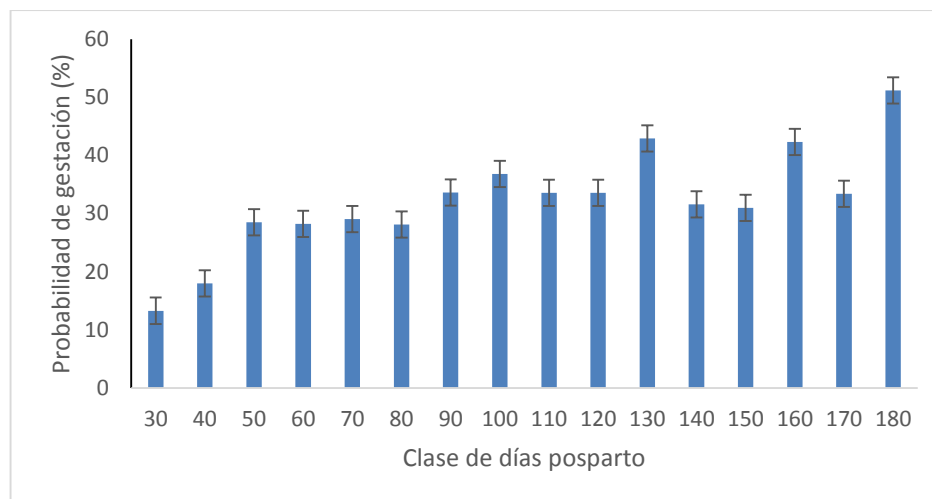


Figura 1. Efecto de los días transcurridos después del parto en la probabilidad de quedar gestante de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

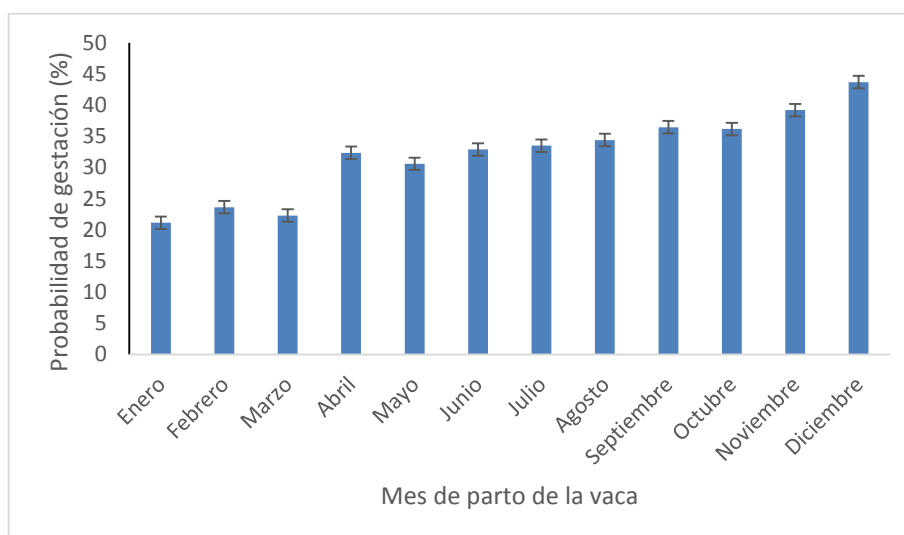


Figura 2. Efecto del mes de parto en la probabilidad de quedar gestante de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

La curva obtenida por el estimador de la habilidad reproductiva se muestra en la Figura 3. Cabe mencionar que los 120 animales seleccionados para su análisis genómico abarcan un rango de -15.79 a 17.71 de dicho estimador, por lo que se

consideraron animales con mucha y muy baja capacidad de quedar gestantes a lo largo de toda la curva.

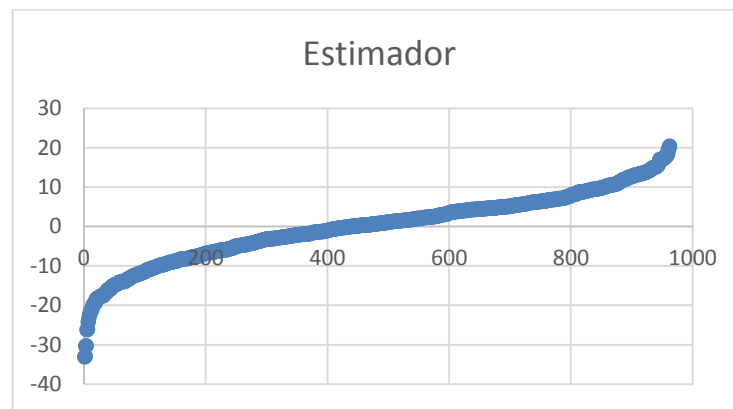


Figura 3. Soluciones del análisis de varianza para el efecto aleatorio de vaca, ordenadas en forma ascendente, utilizadas como proxi de la habilidad reproductiva de vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

En cuanto a los análisis para identificar los marcadores, la mayoría amplificaron correctamente (Cuadro 5). Las muestras de las cuales no se obtuvo un resultado puede deberse a la calidad o cantidad de ADN agregada a la PCR. La población estudiada se mostró polimórfica para los marcadores rs43745234, rs458246980, rs43676006, rs449811104, rs209882669, rs41256848 y rs41256850 y monomórfica (TT) para rs41256849, por lo que al hacer la imputación de la matriz de marcadores moleculares se eliminó para los siguientes análisis.

En el Cuadro 5 se muestra que en la población estudiada se encontraron mayores frecuencias del genotipo heterocigoto para FSHR de por lo menos 40 % en comparación con los homocigotos del mismo gen en todos los marcadores analizados. Lo estimado en este estudio no coincide con el publicado en ganado Jersey por Cory, Price, Lefebvre y Palin (2012), quienes encontraron mayor frecuencia para genotipos homocigotos CC, AA y GG, y únicamente mayores frecuencias en heterocigotos AG y CG para dos marcadores en ganado Holstein y Charolais. La variante alélica señalada (G>T) para LHR-1 coincide con la

reportada por Vásquez-Marín, Márques-Urdaneta, Seijas-Pedroza, De La Rosa y Aranguren-Méndez (2014). Sin embargo, las frecuencias alélicas reportadas para LHR-1 fueron 0.852 y 0.147 para G y T, en ganado Carora, mientras que en el presente estudio las diferencias en las frecuencias alélicas fueron mayores, 0.99 y 0.01 para T y G, respectivamente.

Los genotipos para los siete marcadores estudiados se diferenciaron en ocho grupos, aunque las relaciones genéticas de los individuos analizados genómicamente se mantienen diferenciadas (Apéndice 1 y 2).

En el Cuadro 6 se muestra que la habilidad reproductiva de los 120 animales se mostró más influenciada por los marcadores rs43745234 y rs449811104 para FSHR, lo cual representa un incremento en el estimador de 2.4 y 1.7 unidades, respectivamente, y por rs41256848 para LHR, con un decremento de 8 unidades ($P < 0.05$). Resultados similares fueron publicados por Duarte, Moraes y Weimer (2005), al encontrar que el intervalo entre partos fue 54 días menor para bovinos Brangus Ibagé con los mismos marcadores para FSHR. Las desviaciones estándar obtenidas en el presente estudio, de magnitud similar o superior que los efectos, puede ser una consecuencia del tamaño de muestra pequeño utilizado para el análisis.

Cuadro 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos de ADN para los genes FSHR y LHR en vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México.

Gen	Genotipo	Frecuencia genotípica	Frecuencias alélicas	NA
FSHR-1	GG	0.02	0.48	1
	GC	0.93		
	CC	0.05		
FSHR-2	GG	0.09	0.55	0
	GC	0.91		
	CC	0.00		
FSHR-3	GG	0.12	0.40	1
	GA	0.55		
	AA	0.33		
FSHR-4	AA	0.17	0.52	15
	AG	0.69		
	GG	0.02		
FSHR-5	CC	0.25	0.53	0
	CG	0.55		
	GG	0.20		
LHR-1	GG	0.00	0.01	0
	GT	0.02		
	TT	0.98		
LHR-3	GG	0.00	0.23	3
	GT	0.45		
	TT	0.53		

NA = número de muestras que no amplificaron para cada marcador. FSHR-1 corresponde a rs43745234, FSHR-2 a rs458246980, FSHR-3 a rs43676006, FSHR-4 a rs449811104, FSHR-5 a rs209882669, LHR-1 a rs41256848 y LHR-3 rs41256850.

Cuadro 6. Efecto de los genotipos de FSHR y LHR sobre la habilidad reproductiva de las vacas Jersey manejadas en pastoreo en un sistema orgánico de producción de leche en Querétaro, México ($P < 0.05$).

SNP	FSHR-1	FSHR-2	FSHR-3	FSHR-4	FSHR-5	LHR-1	LHR-3
Efecto	2.39	-0.42	-1.54	1.69	-0.16	-8.14	-0.37
Desviación estándar	2.93	2.37	1.88	1.63	1.78	6.43	1.41

FSHR-1 corresponde a rs43745234, FSHR-2 a rs458246980, FSHR-3 a rs43676006, FSHR-4 a rs449811104, FSHR-5 a rs209882669, LHR-1 a rs41256848 y LHR-3 rs41256850.

Cochran, Cole, Null y Hansen (2013) utilizaron 40 SNP, entre los que incluyeron rs43745234 y rs41256848, analizados en el presente estudio. Estos autores encontraron que los SNP se asociaron con la tasa de concepción de novillas, y la tasa de concepción y vida productiva de vacas, lo que fue similar a los resultados obtenidos con el estimador de habilidad reproductiva de este estudio. Por otra parte, 14 SNP mostraron asociación con el fenotipo reproductivo de la fecundidad en una población de toros Holstein, dentro de los cuales se incluyó rs43745234 analizado en el estudio (Ortega et al., 2017).

3.7 Conclusión

La habilidad reproductiva de vacas Jersey está influenciada por las clases genotípicas para FSHR y LHR, además de los efectos ambientales como número de lactancia, tipo de semen utilizado para dar el servicio, días después del parto y época del servicio. Para esta población se identificaron los marcadores rs43745234 y rs449811104 para FSHR y rs41256850 para LHR, como posibles candidatos para integrarlos en un índice de selección con el objetivo de determinar la habilidad reproductiva de un hato de bovinos lecheros.

El uso de marcados moleculares podría ser una herramienta útil para el mejoramiento genético de los parámetros reproductivos del hato.

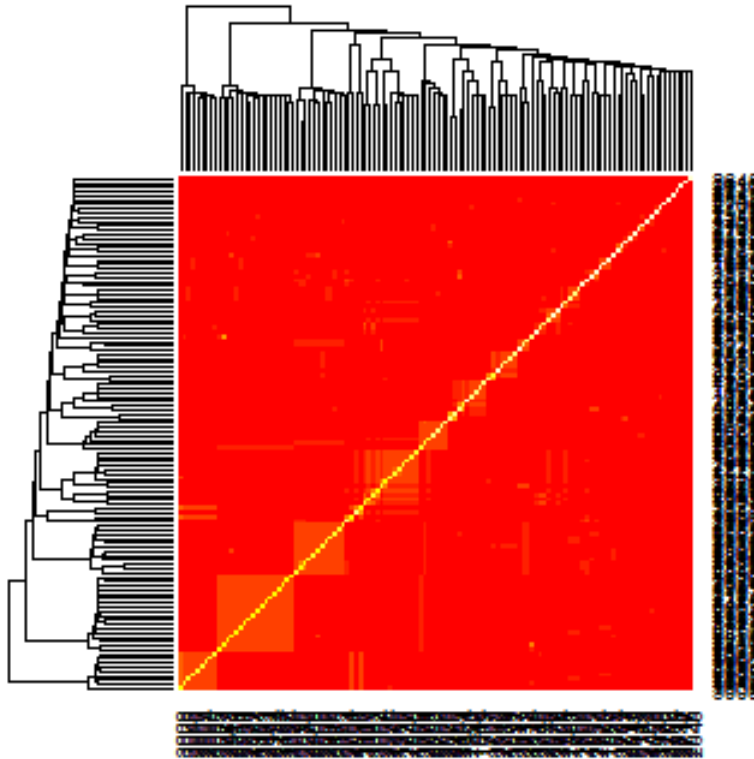
3.8 Literatura citada

- Burgos-Paz, W., Cerón-Muñoz, M., & Moreno-Ochoa, M. (2010). Comparación de métodos para la extracción de ADN en cuyes (*Cavia porcellus Rodentia caviidae*). *Livestock Research for Rural Development*, 22(4).c.
- Caraviello, D. Z. (2004). Cruzamientos en ganado lechero. *Novedades Lácteas, Reproducción y Genética*, 610, 1-6.
- Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., & Hansen, P. J. (2013). Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BioMed Central Genetics*, 14, 49, doi: 10.1186/1471-2156-14-49
- Cory, A. T., Pryce, C. A., Lefebvre, R., & Palin, M. F. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Animal Genetics*, 44, 197–201, doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02380.x
- Duarte, L. B. H., Moraes, J. C. F., & Weimer, T. A. (2005). Diversity of microsatellites linked to the FSHb gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. *Ciencia Rural*, 35(1), 145-149, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000100023.
- Hernández, C. B. C. (2010). Correlación de poliformismo del gen del receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) con la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple en bovinos. Tesis Doctoral, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2016). *Bos taurus*. Genome. Disponible en https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_000003055.6. Consultada el 3 de noviembre de 2016.
- Ortega, M. S., Denicol, A. C., Cole, J. B., Null, D. J., Taylor, J. F., Schanabel, R. D., & Hansen, P. J. (2017). Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes previously related to genetic variation in fertility with phenotypic measurements of reproductive function in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 1-10, doi: 10.3168/jds.2016-12260.
- Pearson, T. A., & Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *Journal of the American Medical Association*, 299(11), 1335-1344, doi:10.1001/jama.299.11.1335.

- Spicer, L. J., & Aad, P. Y. (2007). Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: Role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biology of Reproduction*, 77, 18-27, doi: 10.1095/biolreprod.106.058230.
- Themmen, A. P. N., & Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews*, 21(5), 551-83, doi: 10.1210/edrv.21.5.0409.
- VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4414-23. doi: 10.3168/jds.2007-0980.
- VanRaden, P. M., Sanders, A. H., Tooker, M. E., Miller, R. H., Norman, H. D., Kuhn, M. T., & Wiggans, G. R. (2004). Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2285–2292, doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70049-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70049-1).
- Vargas-Leitón, B., Marín-Marín, Y., & Romero-Zúñiga, J. J. (2012). Comparación bioeconómica de grupos raciales Holstein, Jersey y Holstein × Jersey en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 329-342.
- Vásquez-Marín, B. J., Márques-Urdaneta, A. F., Seijas-Pedroza, G., De La Rosa, O., & Aranguren-Méndez, J. A. (2014). Detección de polimorfismos en la región codificante del gen receptor de hormona luteinizante mediante análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple y secuenciación en bovinos Carora. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 24(5), 428-435.
- Washburn, S. P., Silvia, W. J., Brown, C. H., McDaniel, B. T., & McAllister, A. J. (2002) Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 244-51, doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74073-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74073-3).
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(6), 1687.

3.9 Apéndices

Apéndice 1. Mapa de relaciones genéticas entre individuos con base a los parámetros reproductivos.



Apéndice 2. Mapa de relaciones genómicas entre 7 SNPs de LHR y FHSR.

