

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES
CANDIDATOS ASOCIADOS A LA
FERTILIDAD Y PRODUCCIÓN DE LECHE EN
GANADO HOLSTEIN**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

L.B Mayra Alejandra Cañizares Martínez

DIRECTORES:

Dr. Juan Gabriel Magaña Monforte

Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte

Dr. José Candelario Segura Correa



Mérida, Yucatán, México, 7 de Septiembre del 2017

POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNA: LICENCIADA EN BIOLOGÍA
MAYRA ALEJANDRA CAÑIZARES MARTÍNEZ**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. RACIEL ESTRADA LEÓN
CHINÁ-CAMPECHE**

**DR. CARLOS AGUILAR PÉREZ
CCBA-UADY**

**DR. ANGEL SIERRA VÁZQUEZ
ITA-CONKAL**

**DRA. MIRIAM FERRER ORTEGA
CCBA-UADY**

**DR. CARLOS GONZÁLEZ SALAS
CCBA-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, SEPTIEMBRE DEL 2017

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por apoyarme en cada uno de mis proyectos de vida.

A la Universidad Autónoma de Yucatán y al Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa-Tamaulipas ya que con su apoyo se logró realizar este proyecto.

A CONACYT por otorgarme la beca para realizar mi estudio de posgrado.

A Santander por brindarme la beca de movilidad nacional para poder realizar este proyecto.

A la asociación de productores de leche Honduras, a la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano (EAP) y la finca El Carreto.

A mis asesores Dr. Juan Gabriel Magaña Monforte, Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamonte y Dr. José Candelario Segura Correa, a quienes agradezco sus enseñanzas no solamente en el área académica sino también por su ejemplo como calidad Humana.

A mis sínodos Dr. Carlos Aguilar Pérez, Dr. Raciél Javier Estrada León, Dr. Ángel Sierra Vásquez, Dra. Miriam Ferrer y al Dr. Carlos Gonzáles.

DEDICATORIA

Cada uno de los logros de mi vida se los dedico a mi familia. A mis padres Claudia Marcela Martínez y Rafael Humberto Cañizares, a mi Hermano David Cañizares, a mi novio Alexander Suárez, a mi prima Daniela Espeleta y a mis tías Adriana y Gina Martínez, por su inmenso amor y apoyo incondicional.

Este trabajo también se lo dedico a mis amigos, en particular a María Camila Hurtado y Katherine Castellanos quienes siempre han sido unas amigas incondicionales.

RESUMEN

Una manera de mejorar el desempeño reproductivo del ganado Holstein es mediante la implementación de programas de selección asistida por marcadores moleculares. Estos programas pueden aumentar la precisión de las estimaciones del mérito genético y acortar el intervalo generacional, especialmente para mejorar los rasgos económicamente importantes de baja heredabilidad como los reproductivos. Diferentes estudios moleculares han identificado posibles marcadores moleculares en genes candidatos asociados a características reproductivas. Dentro de éstos, se puede mencionar el gen Leptina (LEP), el gen del Factor de Transcripción Pituitaria (Pit-1) y el Gen del Receptor de Hormona Luteinizante (LHR). Bajo este precepto, se buscó establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de estos marcadores y determinar su efecto sobre las características reproductivas y de producción de leche en el ganado Holstein de Honduras. Se muestrearon un total de 147 vacas en el departamento de Francisco Morazán en Honduras, y se diseñó un análisis de PCR-RFLP para la tipificación de los polimorfismos *HinfI* del gen Pit-1, A59V del gen LEP y rs41256848 del gen LHR. Para calcular las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó el software GENEPOP v.4.2 y para estimar el efecto de los genotipos sobre las características, edad al primer parto (EPP), intervalo entre partos (IEP), intervalo parto concepción (IPC), número de servicios por concepción (NSC) y producción de leche ajustado a 305 días (PL305), se utilizaron los procedimientos GLM y MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.4. La frecuencia de los genotipos CC, CT, TT de A59V, AA, AB, BB de *HinfI* y CC, CG, GG de rs41256848, fueron 0.46, 0.33, 0.21; 0.09, 0.32, 0.58 y 0.37, 0.61, 0.02, respectivamente. Los genotipos de LEP y LHR no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg a diferencia de los genotipos del marcador *HinfI*. El polimorfismo A59V del gen LEP se encontró significativamente asociado ($P=0.04$) al IPC, siendo el genotipo CC favorable; de igual manera el polimorfismo *HinfI* del gen PIT-1 se encontró significativamente ($P=0.09$) asociado a la EPP, siendo el genotipo AA favorable. Estos resultados indican que los polimorfismos evaluados en los genes LEP y Pit-1 pueden ser utilizados en la selección asistida por marcadores para mejorar el IPC y la EPP, en ganado Holstein en Honduras.

Palabras claves: Ganado lechero, Genotipos, SNP, reproducción, PCR-RFLP.

ABSTRACT

A way to improve the reproductive performance of Holstein cattle is through marker-assisted selection programs. These programs can increase the accuracy of the estimates of genetic merit and shorten the generation interval, especially to improve economically important traits with low heritability such as reproductive traits. Different molecular studies have identified possible molecular markers in candidate genes associated with reproductive traits. Among these, it can be mentioned Leptin (LEP) gene, the Pituitary Transcription Factor (Pit-1) gene and, Luteinizing Hormone Receptor (LHR) gene. Under this precept, were as estimated the allelic and genotype frequencies of some markers in these candidate genes and to determine their effect on reproductive and milk production traits of Honduran Holstein cattle. A total of 147 cows were sampled in the department of Francisco Morazán in Honduras and a PCR-RFLP analysis was designed for the *HinfI* polymorphisms of the Pit-1 gene, A59V of the LEP gene and rs41256848 of the LHR gene. The software GENEPOP v.4.2 was used to calculate the allelic, genotypic and Hardy-Weinberg equilibrium, and the GLM and MIXED procedures of the statistical package SAS version 9.4 were used to estimate the effect of the genotypes on the characteristics Age at first calving (AFC), calving interval (CI), calving to conception interval (CCI), number of service per conception (NSC) and milk yield adjusted to 305 days (MP305). The frequencies of the CC, CT, TT genotypes of A59V, AA, AB, BB of *HinfI* and CC, CG, GG of Rs41256848, were 0.46, 0.33, 0.21; 0.09, 0.32, 0.58 and 0.37, 0.61, 0.02, respectively. The genotypes of LEP and LHR were not found in Hardy-Weinberg equilibrium in contrast to genotypes of the *HinfI* marker. The A59V polymorphism of the LEP gene showed a significantly ($P=0.04$) effect to the Parturition-to-Conception Interval, being CC the favorable genotype. The *HinfI* polymorphism of the PIT-1 gene was significantly associated ($P=0.09$) with age at first calving, with the AA genotype being favorable. These results indicate that the evaluated polymorphisms of LEP and Pit-1 genes are candidate to be used in marker-assisted selection to improve the calving to conception interval and age at first calving, in Holstein cattle in Honduras.

Key words: Dairy cattle, SNP, reproduction, PCR-RFLP

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Producción ganadera.....	3
2.2 Condiciones climatológicas para el desarrollo de la ganadería en Honduras	3
2.2.1 La producción de leche en Honduras	4
2.3 Mejoramiento genético	4
2.3.1 Selección del ganado lechero	5
2.3.2 Selección de ganado lechero basado en características de producción de leche	6
2.3.3 Selección del ganado lechero basado en su características reproductivas.....	6
2.3.4 Selección del ganado por medio de genética cuantitativa	7
2.3.5 Selección del ganado por medio de genética molecular.....	9
2.4 Genes asociados a la fertilidad.....	11
2.5. Gen Pit-1 o POU1F1	13
2.5.1 Polimorfismo <i>Hinf1</i> del Gen Pit_1 o POU1F1	14
2.6 Gen LEP.....	15
2.6.1 Polimorfismo A59V del gen Leptina	16
2.7. Gen LHR.....	17
2.7.1 Polimorfismos rs41256848 del Gen LHR.....	17
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. REFERENCIAS	20
6. ARTÍCULO CIENTÍFICO	27
6.1. Resumen.....	27
6.2. Introducción	28
6.3. Materiales y Métodos.....	30
6.3.1. Animales y datos fenotípicos	30
6.3.2. Genotipificación.....	30
6.3.3. Amplificación de ADN por medio de PCR-RFLP.....	30

6.3.4. Análisis estadístico.....	32
6.4. Resultados	33
6.4.1. Frecuencias alélicas y genotípicas.....	33
6.4.2. Asociación de los genotipos con las variables de producción de leche y fertilidad	35
6.5. Discusión	36
6.5.1. Frecuencias alélicas y genotípicas.....	36
6.5.2. Asociación de los polimorfismos con las características evaluadas	37
□ Polimorfismo <i>HinfI</i> del gen Pit-1.....	37
□ Polimorfismo A59V del LEP.....	38
□ Polimorfismo rs41256848 del gen LHR.....	40
5. Conclusiones.....	40
6. Referencias	41
7. CONCLUSIONES GENERALES	47
8. ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de cromosomas del ganado bovino (NCBI).....	11
Figura 2 Gen POU1F1, los rectángulos de color negro corresponden a los 6 exones del gen que codifican para una proteína de 291 aminoácidos, la región de abajo muestra el dominio específico (SD) y el homodominio (HD) (Romero <i>et al.</i> , 2011).....	14
Figura 3 Estructura molecular del gen de la leptina, los cuadros 1, 2 y 3 representan los exones (Modificado de Dubey <i>et al.</i> , 2007).	15
Figura 4 Gen LHR, los cuadrados enumerados del 1 al 11 indican los exones. DE: Dominio extracelular. DT: Dominio transmembranal. DI: Dominio intracelular. (Modificada de Vásquez-Marín <i>et al.</i> , 2014)	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros utilizados para determinar la eficiencia reproductiva en explotaciones lecheras.	7
Tabla 2. Registros de progenie requeridos por exactitud de valores genéticos de acuerdo a la heredabilidad.....	8
Tabla 3. Heredabilidad media para características reproductivas en ganado lechero (Holstein, Jersey, Swiss, Ayrshire, Simmental) estimadas a partir de información de 17 estudios.	10
Tabla 4. Principales genes asociados a procesos reproductivos en ganado bovino.	12
Tabla 5. Genes asociados a intervalos entre partos, intervalos parto concepción y número de servicios por concepción.....	12
Tabla 6. Estudios del polimorfismo HinfI y su efecto sobre caracteres productivos en ganado bovino	15
Tabla 7. Estudios del polimorfismo A59V asociado a características reproductivas.....	16
Tabla 8. Estudios relacionados con el polimorfismo rs41256848.....	18

1. INTRODUCCIÓN

El desempeño reproductivo de las vacas, es fundamental para la rentabilidad de los sistemas de producción de leche (Berry *et al.*, 2014), debido a que el nivel de dicho desempeño influye directamente sobre la producción de leche y sobre los animales de reemplazo. Sin embargo, en los últimos años la fertilidad del ganado lechero ha estado disminuyendo debido a una alta presión de selección de los animales para caracteres de producción de leche y al efecto de algunos factores ambientales (VanRaden *et al.*, 2004).

Esta situación se ha visto reflejada en la ganadería especializada en Honduras, ya que los índices reproductivos son bajos dentro de los hatos lecheros, principalmente en el ganado Holstein. Una medida utilizada para mejorar la baja fertilidad, es implementar programas de selección genética con mayor eficiencia y exactitud; para ello los productores se pueden valer de herramientas como los registros del rendimiento por individuo y de herramientas moleculares como los marcadores genéticos (González *et al.*, 2015; Dekkers y Hospital, 2002).

Los marcadores moleculares son herramientas que se han venido implementado a partir de la segunda mitad del siglo XX (Tirados, 2001) y entre otros beneficios, permiten reducir el intervalo generacional al seleccionar animales jóvenes, disminuir la endogamia al conocer y estimar las relaciones genómicas de parentesco, y aumentar los niveles de confianza y exactitud en 30 % a 75 % mejorando las predicciones genéticas dentro de un programa de selección genético, incluso para caracteres de baja heredabilidad (González *et al.*, 2015).

Actualmente los marcadores ampliamente utilizados son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) debido a su alta frecuencia y dispersión en el genoma. Estos polimorfismos son cambios de la secuencia de DNA que se manifiestan en más del 1% de la población y pueden asociarse favorable o desfavorablemente a algún carácter en particular (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). Por medio de la identificación de estos cambios, es posible establecer la diversidad y variabilidad genética presente en las poblaciones locales y optimizar la orientación de los programas de selección incluso desde etapas juveniles de los animales.

En el caso particular del ganado lechero, estudiar las características como intervalos entre parto, número de servicios por concepción, intervalo parto concepción y edad al primer parto permitirá tener un panorama más amplio con relación a la fertilidad de los individuos de estudio y de igual manera establecer el desarrollo en aspectos de producción de leche (Veerkamp *et al.*, 2007).

El ganado Holstein, a pesar de su importancia para la ganadería lechera de Honduras, no cuenta con ningún programa de selección establecido. La manera que se ha venido manejando el mejoramiento en este país ha sido por medio de la compra de semen proveniente de Estados Unidos, Canadá, Francia y México, buscando favorecer el rasgo de producción leche sin considerar la mejora genética en el aspecto reproductivo (FAO, 2015).

Como una alternativa para poder realizar un adecuado programa de selección en los hatos de ganado Holstein en Honduras, se plantea evaluar la variabilidad genética de las poblaciones locales y establecer la asociación de los polimorfismos asociados a los rasgos reproductivos y de producción de leche. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo analizar polimorfismos en genes candidatos asociados a fertilidad y determinar su efecto sobre características reproductivas y de producción de leche del ganado Holstein, bajo las condiciones tropicales de la región central de Honduras.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción ganadera

Para la población humana los rumiantes tienen una gran importancia como productores de alimentos de alta calidad nutritiva. Principalmente porque son capaces de convertir en leche y carne, plantas y subproductos agrícolas (FAO, 2008). Estos productos derivados de los rumiantes tienen una alta demanda en la sociedad ya que permiten solventar las necesidades de nutrición cambiantes, dentro de límites económicos y ambientales específicos.

Dentro de este sistema principalmente la producción bovina, representa más de un tercio del producto interno bruto (PIB) agrícola en los países en desarrollo y se prevé que seguirá aumentando (Uffo, 2008). Este incremento se dará con las necesidades de requerimiento de proteína animal que crecerán junto con la población, incluso el doble para el año 2050 (FAO 2010).

2.2 Condiciones climatológicas para el desarrollo de la ganadería en Honduras

Dado que el territorio de Honduras se extiende por las bajas latitudes del hemisferio Norte, el clima de Honduras está considerado, según la clasificación del climatólogo Wladimir Köppen (1846-1940), como tropical húmedo o lluvioso tropical y templado húmedo, ya que se encuentra muy atenuado por la presencia de montañas en gran parte de la superficie nacional (FAO, 2007).

Los sistemas de producción de ganado y particularmente el lechero en los trópicos se encuentran más restringidos que aquellos de las regiones templadas, principalmente por factores como la disponibilidad y calidad de los alimentos, el manejo, trastornos fisiológicos, patologías, poca resistencia a los parásitos por las razas utilizadas y las condiciones climáticas del sector (Carvajal-Hernández *et al.*, 2002). Todos estos elementos afectan considerablemente el comportamiento productivo y reproductivo de las vacas, limitando la expresión del potencial genético de cada individuo y reduciendo, por un lado, el desempeño reproductivo hasta 50% de su potencial y por otro lado, disminuyendo 25% la producción de leche al año de las vacas lecheras (Vera *et al.*, 2015; Carvajal-Hernández *et al.*, 2002).

2.2.1 La producción de leche en Honduras

El sector lechero representa gran importancia para el país ya que contribuye con aproximadamente el 14.5 por ciento del PIB agropecuario, además de ofrecer alrededor de 100 mil empleos directos y 200 mil empleos indirectos según la Federación de Agricultores y Ganaderos de Honduras. La producción de leche proviene un 96 % de ganaderías de doble propósito y 6 % de ganaderías especializadas, generando por animal un promedio de 4 litros por día y manejando 20 cabezas de ganado por hato aproximadamente (Pérez, 2012).

La ganadería en Honduras se caracteriza por su falta de especialización, bajo nivel tecnológico y no cuenta con un sistema organizado, generando fluctuaciones en la producción de leche y una difícil competencia con los precios en el mercado, afectando su rendimiento y bajando su productividad. De igual manera, se ven afectados por las deficiencias en el manejo del ganado, la falta de registros contables, problemas con el potencial genético de los animales, los bajos índices reproductivos, sanidad animal, alimentación, nutrición y en general las condiciones climáticas por estar ubicada en zona tropical (FAO, 2005).

La mayor producción de leche a nivel nacional, se concentra en la zona norte del país, con un promedio por encima del 80 % con menos cantidad de hatos, la zona centro del país produce aproximadamente el 19 % con 21 por ciento de las fincas ganaderas nacionales incluye los Valles del Departamento de Olancho, Valle del Zamorano, y Francisco Morazán. Representa una región muy importante en términos de abastecer leche para el sector artesanal y en menor escala para el circuito industrial (Pérez, 2012).

La base genética más utilizada es *Bos indicus* (principalmente Brahman) y *Bos taurus* (usualmente razas Holstein o Pardo suizo). La base de la alimentación son los forrajes nativos y residuos de cosecha, pero su calidad y cantidad son bajas, razón por la cual la productividad de la leche es baja (1700 kg a 1980 kg por lactancia) (FAO, 2008).

2.3 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético se define como el proceso que involucra el reconocimiento de la variabilidad genética existente en una característica de interés dentro de una población para

distinguir y seleccionar a aquellos individuos que por su potencial genético pueden producir un cambio o progreso genético en un sentido favorable. La identificación de esta variabilidad para una característica no es suficiente para producir un cambio deseado, ya que estos caracteres fenotípicos son el resultado del componente genético más el ambiente y las interacciones entre los dos. Por lo tanto, para mejorar genéticamente una característica específica es necesario conocer su heredabilidad, expresada como la proporción de variabilidad genética aditiva en relación con la variabilidad total fenotípica. Lo que indica que el paquete genético puede ser manipulado adecuadamente y puede producir las ganancias deseadas (Parra y Sifuentes, 2012).

Por su parte la mejora genética de las poblaciones bovinas busca como objetivo principal obtener avances en características económicamente importantes. Esta mejora se logra generación tras generación a través de la selección de los progenitores con el mayor potencial genético lo que de manera específica corresponde al aumento de las frecuencias de genes favorables para la manifestación de una característica en particular. El aumento de las frecuencias génicas se logra valiéndose del uso continuo de reproductores superiores, cuyo germoplasma aplicado al animal comercial, es la clave para que este mejore a través de las generaciones. Para lograr estos objetivos la selección de los parentales y las condiciones ambientales son indispensables (Gasques, 2008).

2.3.1 Selección del ganado lechero

En la actualidad, el mejoramiento genético de los bovinos lecheros en muchos países, se realiza con base en la selección por múltiples características, entre las que se incluyen la producción de leche, longevidad, salud, facilidad de parto, peso corporal, consumo de alimento, temperamento y resistencia a infecciones y plagas (Fries, 1999; Posadas, 2004). Los programas de selección y mejoramiento se inician con la identificación de individuos superiores (élite) que manifiestan mejores características productivas en relación con un promedio.

Para que el avance genético sea significativo según Posadas (2004), se deben cumplir con al menos dos condiciones:

1. El nivel de superioridad de los reproductores debe ser óptimo.

2. Los caracteres a mejorar deben manejar una heredabilidad alta o media.

2.3.2 Selección de ganado lechero basado en características de producción de leche

Para seleccionar animales con altos índices de producción de leche es indispensable que el ganadero mantenga registros genealógicos y controles productivos. De acuerdo con lo descrito por Hahn (1988), los aspectos más relevantes en la toma de registros lecheros son:

- Edad al parto: edad en meses en la cual la vaca pare.
- Identificación del animal: determina la individualidad de cada animal, permitiendo así hallar la productividad de cada animal.
- Fecha de nacimiento: determina la edad exacta del animal.
- Fecha de parto y de secado: permite determinar el número de días lactantes de cada vaca.
- Producción a 305 días.
- Producción total: producción de leche desde que la vaca pare hasta que es secada.
- Días de lactancia: número de días desde el parto hasta el secado.
- Días secos: número de días que la vaca tiene sin producir leche.
- Máxima producción por lactancia.
- Días vacíos

Estos registros además permiten evaluar la eficiencia del sistema y el rendimiento de cada animal, orientan al ganadero en diferentes aspectos, un ejemplo de ello, es permitirle controlar cuántos litros de leche se producen por hectárea, o conocer cuánto forraje se invierte por leche producida.

2.3.3 Selección del ganado lechero basado en su características reproductivas

Algunas características reproductivas son utilizadas como criterios de selección en la búsqueda por incrementar la fertilidad, a pesar de la gran influencia ambiental, y su baja heredabilidad (Silva *et al.*, 2012). La inclusión y el estudio de esas características en distintos programas de mejoramiento genético son de gran importancia, principalmente el registro de eventos reproductivos de las hembras, entre los cuales destacan:

- Intervalos parto concepción o días abiertos que reflejan la eficiencia en la detección del estro y la fertilidad.
- Intervalo entre partos (IEP; días), periodo de tiempo que tarda una vaca de un parto al otro; este intervalo de tiempo incluye la gestación más el periodo seco.
- Número de servicios por concepción (SC), uno de los indicadores más importantes para estimar la eficiencia reproductiva de un hato.

Otras características que se registran comúnmente son la edad al primer parto, facilidad de partos, período de gestación, longevidad reproductiva y la probabilidad de preñez temprana (Silva *et al.*, 2012).

Para evaluar la eficiencias de los hatos lecheros se han establecido algunos parámetros ideales (Tabla 1) que permiten a los productores conocer el desarrollo de la producción y si los animales presentan rendimientos satisfactorios.

Tabla 1. Parámetros utilizados para determinar la eficiencia reproductiva en explotaciones lecheras.

Característica	Clasificación		
	Mala	Buena	Excelente
Intervalo entre partos (meses)	>13.5	13	12.5
Días abiertos	>130	100	90
Días entre parto y primer servicio,%	>90	80	70
Tasa de concepción a primer servicio %	<50	55	>63
Servicios por concepción	>2	1.8	1.6
Eficiencia de detección de calores %	<45	60	>75
Vacas en celo entre 45-60 días postparto	<50	65	>70
Edad al primer parto (meses)	>27	26	24

Tabla modificada de Fichas Técnicas sobre Actividades Agrícolas, Pecuarias y de Traspatio (Gallegos, 2003).

2.3.4 Selección del ganado por medio de genética cuantitativa

El mejoramiento genético basado en la selección de animales superiores a partir del fenotipo se implementó desde 1760 con el británico Roberto Backwell, quien seleccionó animales basados en pruebas de progenie y consanguinidad. Para el caso del ganado lechero un gran avance se realizó en dos momentos importantes; primero en 1885 gracias a la formación de la asociación de productores de leche en Dinamarca para llevar el control de la producción de hatos; y segundo en 1900 con el redescubieron de las leyes de Mendel. Para la primera mitad del siglo XX se desarrolla la teoría de la genética de poblaciones por R. A. Fisher, Sewall Wright y J.B.S. Haldane. Sesenta años después y gracias al aporte de otros investigadores (J. L. Lush, Hunt, Lanoy Nelson Hazel). Henderson (1975) desarrolla la metodología BLUP (Mejor Predicción Lineal Insegada) a partir de las ecuaciones de modelos mixtos para la estimación del EBV (Valor de Cría Estimado); quien además sugirió que se debía integrar el pedigrí completo de la población para incluir las relaciones genéticas entre individuos (Oldenbroek y van der Waaij, 2014).

Actualmente la selección de animales se basa en su mérito genético, el cual se evalúa a través de las diferencias esperadas de la progenie (DEP), calculadas a partir de las mediciones (fenotipo) de las características de interés. Los DEPs en general se calculan para características que son fáciles y con bajo costo de medición, como los pesos a diferentes edades o las ganancias de peso en diferentes períodos (Casas, 2006).

Estas evaluaciones han demostrado su eficiencia al evaluar características de media y alta heredabilidad, en la cual no se necesita una gran cantidad de animales, pero para caracteres de baja heredabilidad no son tan eficientes al menos que se tengan una muestra poblacional alta para mejorar la exactitud de la predicción (Tabla 2).

Tabla 2. Registros de progenie requeridos por exactitud de valores genéticos de acuerdo a la heredabilidad.

Registros de progenie requerido por exactitud de valores genéticos		
Exactitud	Heredabilidad baja h^2 (0.1)	Heredabilidad moderada h^2 (0.3)
0.1	1	1
0.2	2	1
0.5	4	2
0.8	8	3

0.13	13	5
0.20	22	7
0.29	38	12
0.40	70	22
0.56	167	53
0.93	1921	608
0.99	3800	1225

Modificado de Spangle y Van Eenennaam (2010).

2.3.5 Selección del ganado por medio de genética molecular

A partir del descubrimiento de la doble hélice de ADN (ácido desoxiribonucleico) por Watson y Crick en 1952 y el proyecto genoma humano en 2003, se han establecido diferentes genomas animales, entre los cuales se encuentra el bovino. Este avance ha generado el desarrollo de diferentes técnicas que ayudan a seleccionar de manera más precisa características de interés en individuos dentro de un programa de mejoramiento genético (Ortega y García, 2011).

Una de las principales técnicas moleculares utilizadas actualmente son los marcadores moleculares, estos son etiquetas a lo largo del genoma que indican directa o indirectamente un cambio fenotípico, los más comunes actualmente son los microsatélites y los polimorfismos de nucleótido simple o SNPs. Este polimorfismo es un cambio en la secuencia de ADN que genera una variante alélica en un locus en particular y se considera como tal cuando se encuentra al menos en el 1% de la población (Parra y Sifuentes, 2012). Al identificar los marcadores asociados a alguna característica en particular, se puede conocer en cierta proporción la varianza genética que explica la arquitectura genómica de ese carácter en particular (Van Eenennaam *et al.*, 2013).

Para el ganado lechero, se sugirió su uso, a finales de 1960 por Smith, y en particular para características de baja heredabilidad (Nasr *et al.*, 2016) como las reproductivas (Tabla 3).

Tabla 3. Heredabilidad media para características reproductivas en ganado lechero (Holstein, Jersey, Swiss, Ayrshire, Simmental) estimadas a partir de información de 17 estudios.

Característica	Heredabilidad
No-Retorno después de la primer inseminación	0.019
Concepción al primer servicio	0.027
Número de servicios por concepción	0.026
Intervalo entre partos	0.034
Días abiertos	0.024
Días al primer servicio	0.050
Intervalo desde la primera a la última inseminación	0.017

Tabla modificada de Veerkamp *et al.* (2007).

El interés en el uso de los marcadores genéticos se ha concentrado porque permiten encontrar variabilidad en el genoma a través de los polimorfismos asociados a una característica de interés, de tal manera que las variantes del polimorfismo favorables sean fijadas dentro de la población (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011; Van Eenennaam, 2006). Para la selección de estos marcadores moleculares se debe estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, que permitan determinar el comportamiento poblacional, y además, de acuerdo a las frecuencias de los alelos en la población, determinar la importancia de los polimorfismos; lo anterior para determinar su efecto y poderlo implementar en programas de selección asistida por marcadores (Rincón, 2013).

La Selección Asistida por Marcadores (SAM), es el proceso de usar los resultados de pruebas de marcadores de ADN para asistir la selección de individuos que se convertirán en progenitores de las siguientes generaciones en un programa de mejoramiento genético. Puede ser aplicada en pruebas para detectar variantes génicas asociadas con caracteres simples o complejos y su implementación puede reducir los intervalos generacionales, así como mejorar la precisión de la predicción del mérito genético de los animales seleccionados (Parra y Sifuentes, 2012; Dekkers y Hospital 2002).

Para la validación de los efectos de los marcadores se pueden utilizar dos enfoques, la búsqueda o escaneo de genoma completo (en inglés Genome Wide Scanning) y el enfoque de genes candidatos (Zhu y Zhao, 2007). El primer enfoque localiza regiones cromosomales de QTLs a un nivel de centimorgan con la ayuda de marcadores de ADN

bajo diseños de ligamiento o asociación a nivel familiar o poblacional, sin considerar la importancia de los aspectos funcionales de las características evaluadas, a menos que al utilizar marcadores del tipo SNP se identifique la mutación causal (QTN) (Zhu y Zhao, 2007).

El segundo enfoque por genes candidatos, indica posiblemente que una parte de la variabilidad genética del fenotipo de interés es causada por una mutación o gen putativo. Los genes candidatos por ende, son generalmente genes con funciones biológicas que directa o indirectamente regulan los procesos en las características estudiadas y que pueden ser confirmadas mediante una evaluación de los efectos de las variantes del gen sobre las características en particular por medio de un análisis de asociación (Zhu y Zhao, 2007; Óvilo y Rodríguez, 2012).

2.4 Genes asociados a la fertilidad

El genoma bovino está constituido por 29 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (Figura 1). La mayor diferencia cariológica entre las dos especies de ganado bovino (*Bos indicus* y *Bos taurus*) se encuentra en el cromosoma Y: en *Bos indicus* este cromosoma es acrocéntrico mientras que en *Bos taurus* es submetacéntrico (Sánchez, 2008).

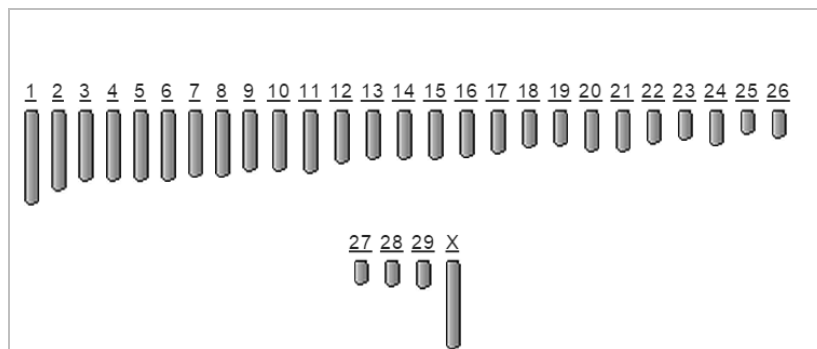


Figura 1 Mapa de cromosomas del ganado bovino (NCBI)

Los resultados de las investigaciones acerca del genoma bovino, han arrojado 1532 genes candidatos asociados a procesos reproductivos (Cochran *et al.*, 2013). Algunos de estos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4 Principales genes asociados a procesos reproductivos en ganado bovino.

Gen	Función	Referencias
PAG2, LP, PPR, IFNT2	Procesos asociados al desarrollo embrionario	Ortega y García, 2011; Elsik <i>et al.</i> , 2009; Ishiwata <i>et al.</i> , 2003
FGF2, NLRP9, ITGB5, PGR y STAT5A	Supervivencia embrionaria y fertilización in vitro	Wang <i>et al.</i> , 2009; Conductor <i>et al.</i> , 2009; Khatib <i>et al.</i> , 2008
STAR, HSD17B3, IGF-I, CYP11A1, hsd3b1, CYP17A1 y SCARB1	Esteroidogénesis	Gómez, 2011
LH, FSH Y GNRH (más sus receptores)	Desarrollo folicular	Thompson y Kaiser, 2014
BMP15, GDF9, MATER, ZAR1, VASA	Maduración de ovocitos	Pennetier <i>et al.</i> , 2004
IFNAR2, IFN6, CD34, TREM1, TREML1, FCERIA, IL23R, IL24, IL15 y LEAP2	Respuesta inmune	Elsik <i>et al.</i> , 2009
<i>OXT, AVP, GABRA6, HTR2A, DRD2, CHRM1, CHRM3, CHRNA5, CTLA4, IL1RL1, POMC, MCHR1 y TTR</i>	Regulación de la conducta sexual	Kommadath <i>et al.</i> , 2011

A partir de los estudios de los genes asociados a alguna función reproductiva, se han realizado investigaciones que han arrojado diferentes polimorfismos (Tabla 5) que poseen un efecto favorable sobre caracteres reproductivos y que son propuestos para su empleo como marcadores en programas de mejoramiento asistido.

Tabla 5. Genes asociados a intervalos entre partos, intervalos parto concepción y número de servicios por concepción

Gen	Polimorfismos	Efecto	Raza	Referencia
GnRH	T108C	Reducción en días al primer servicio e intervalos entre partos	Ganado lechero no específico	Derecka <i>et al.</i> , 2010
FSHR	rs43676359	Heterocigotos mostraron un mayor número de servicios por concepción	Holstein	Gaviria <i>et al.</i> , 2016

LEPR	T945M	Gen heterocigoto intervalo entre partos más cortos, favorable para los días abiertos	Eslovaquia manchado y Pinzgau	Trakovická <i>et al.</i> , 2013
LEPR izoforma- b	T945M	No se encontró efecto significativo para intervalos entre partos	Rojo suizo y Holstein	Asadollahpour Nan <i>et al.</i> , 2014
BGH	SNP 1547 (intrón 3)	Genotipo ++ puede llegar a ser favorable para intervalos entre partos	Holstein	Echavarría <i>et al.</i> , 2012
PAPP-A2	rs109259828 rs109952914 rs42301961	Sugerido por autores para estudio de intervalos entre partos	Ganado lechero	Luna–Nevárez <i>et al.</i> , 2012
HSP-70	G1013A G1045A C1069T A1096G G1117A T1134C T1204C A1125C G1128T C1154G	A1125C Genotipo AC G1128T Genotipo GG presentan más partos	Brahman	Rosenkrans <i>et al.</i> , 2010

Nota: La nomenclatura señalada para los polimorfismos está dada por el sitio de cambio en la secuencia, o por la posición donde se genera el cambio en los aminoácidos, o por el número de referencia establecido por NCBI

De los polimorfismos reportados hasta la fecha, tres en particular están fuertemente asociados a los intervalos entre partos, números de servicios por concepción e intervalo parto concepción y producción de leche. Estos son el polimorfismo HinfI ubicado en el gen que codifica para el factor de transcripción específico de la pituitaria (Pit₁), el polimorfismo A59V del gen Leptina y el polimorfismo rs41256848 del gen receptor de la hormona luteinizante.

2.5. Gen Pit-1 o POU1F1

El gen Pit-1 es conocido por ser un miembro de la familia de los factores de transcripción homeo-dominio, que activa la expresión genética para la prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH); pero también ejerce un rol importante en la diferenciación y proliferación de las células de la pituitaria (Corrales-Álvarez *et al.*, 2010; Vargas *et al.*

2004)). Pit-1 (nomenclatura oficial - POU1F1) genera una proteína pituitaria de 33 kilodaltones (Kd) que posee dos dominios (Figura 2) necesarios para la unión a los promotores de los genes de GH y PRL (Ozdemir, 2012; Edriss *et al.*, 2008). Durante el desarrollo, la expresión del gene Pit1 precede la expresión génica en células somatotrófico y lactótrofos de GH y PRL, lo que implica que al momento de disminuir la expresión de Pit-1 de igual manera disminuiría la expresión de la hormona del crecimiento y la prolactina. Además interviene en la regulación de los genes que codifican la prolactina y la hormona estimulante de la tiroides (Carsai *et al.*, 2012). Estos genes están implicados en una variedad de vías de señalización que son importantes para muchos procesos fisiológicos y de desarrollo; entre éstos está el desarrollo de la glándula de la hipófisis (Trakovická *et al.*, 2014; Mullis 2007), el desarrollo de la glándula mamaria, el crecimiento (Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005), la expresión de la proteína de la leche (Akers, 2006) y la producción y secreción de leche (Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005).

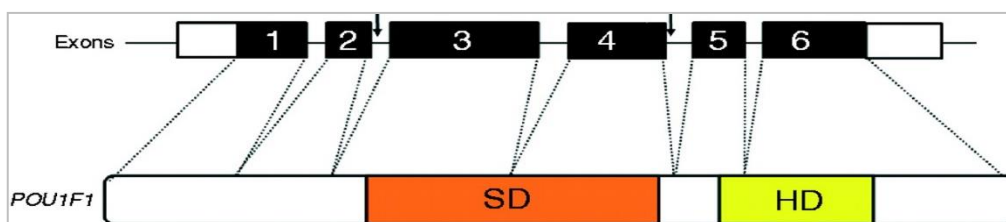


Figura 2 Gen POU1F1, los rectángulos de color negro corresponden a los 6 exones del gen que codifican para una proteína de 291 aminoácidos, la región de abajo muestra el dominio específico (SD) y el homodominio (HD) (Romero *et al.*, 2011).

2.5.1 Polimorfismo *Hinf1* del Gen Pit_1 o POU1F1

El cambio se presenta en el nucleótido 1256 en el exón 6 del cromosoma 1 (BTA1q21-22), debido a la transición de una Adenina por una Guanina y que al mutar no se genera un sitio de reconocimiento por la enzima *Hinf1* (Woollard *et al.*, 1994; Aytekin y Boztepe, 2013). El alelo A no es digerido por la enzima *Hinf1* y el B al ser digerido y usar los primers reportados por Woollard y colaboradores en 1994 se generan dos fragmentos de 244 y 207 pb. Éste polimorfismo ha sido asociado a características reproductivas, de crecimiento, desarrollo, producción y calidad de leche (Tabla 6).

Tabla 6. Estudios del polimorfismo *Hinf*I su efecto sobre caracteres productivos en ganado bovino

Estudio	Raza	Efecto
Corrales-Álvarez <i>et al.</i> , 2010	Holstein	Alelo A se asoció a mayores días abiertos
Vargas <i>et al.</i> , 2004	Holstein	El alelo A desfavorable para parámetros reproductivos
Do Amaral Grossi <i>et al.</i> , 2014	Canchim	Sin asociación
Aytekin <i>et al.</i> , 2013; Heidari <i>et al.</i> , 2012, Huang <i>et al.</i> , 2008; Carsai <i>et al.</i> , 2012, Renaville, 1997	Pardo Suizo, Holstein	Alelo A favorable para producción y calidad de leche
Zhang <i>et al.</i> , 2009	Ganado de carne	Alelo B asociado a mayor crecimiento y desarrollo

2.6 Gen LEP

El gen de la leptina se encuentra ubicado en el cromosoma 4 región q32, en el genoma bovino; posee tres exones y dos intrones que pesan 15 kb (Figura 3). Este gen codifica 167 aminoácidos que conforman la hormona polipeptídica sintetizada y secretada por las células adiposas.

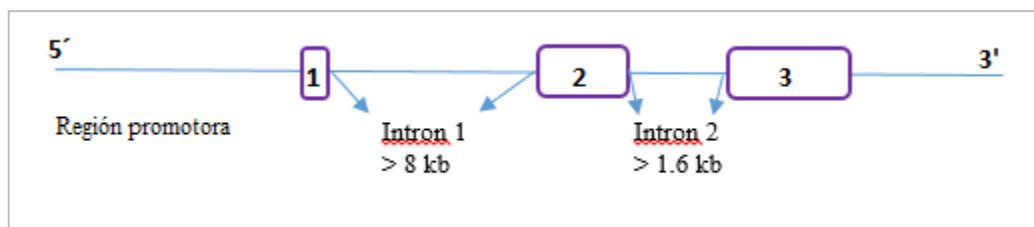


Figura 3 Estructura molecular del gen de la leptina, los cuadros 1, 2 y 3 representan los exones (Modificado de Dubey *et al.*, 2007).

A esta hormona se le atribuyen funciones tales como la participación en la secreción de insulina, regulación del apetito, movilización de las reservas de grasa e incremento de la tasa metabólica (Ruiz *et al.*, 1999), y se le atribuyen otras funciones relacionadas con el sistema neuroendocrino que regula las funciones gonadales (Clarke y Henry, 1999). Su

función en la reproducción, está enmarcada por el papel inhibitorio en la síntesis y secreción de neuropéptidos producidos por el hipotálamo y la modulación que se realiza sobre la acción de la insulina y el sistema del Factor de Crecimiento Insulínico ó IGFs. (Quintero, 2012). Los neuropéptidos hipotalámicos inhiben la secreción de GnRH, de tal forma que, cuando la leptina se encuentra en rangos normales en la sangre, coincidente con un estado de condición corporal moderado, ello favorece, la síntesis y secreción pulsátil de GnRH y la consecución de los fenómenos reproductivos (Kules *et al.*, 2005).

2.6.1 Polimorfismo A59V del gen Leptina

Este polimorfismo ocurre por una transición de citosina por timina en la posición 1863 en el exón 3 del cromosoma 4. Al ocurrir este cambio de nucleótidos de igual manera se genera un cambio en los aminoácidos en la posición 59 de una Alanina por una Valina (Komisarek *et al.*, 2007). Se han encontrado para este polimorfismo, el cambio de C > T. Para identificar esta mutación se ha utilizado la enzima *HphI* que reconoce el sitio, cuando éste se encuentra mutado, mostrando el alelo T. Este sitio ha sido estudiado por varios autores (Tabla 7), algunos de los cuales han encontrado que el genotipo TT puede ser favorable para características de fertilidad.

Tabla 7. Estudios del polimorfismo A59V asociado a características reproductivas.

Autor	Raza	Efecto
Yasdania <i>et al.</i> , 2010	Holstein Irani	No hay efecto significativo entre días abiertos e IEP. Genotipo AA preñez más larga
Komisarek <i>et al.</i> , 2010	Holstein	Genotipo TT favorable tasa de no retorno
Komisarek <i>et al.</i> , 2007	Jersey	Genotipo TT favorable para días abiertos, IEP y número de servicios por concepción
Liefers <i>et al.</i> , 2002	Holstein Freisan	No encontró diferencia significativa pero no excluye el efecto sobre IEP
Clempson <i>et al.</i> , 2011	Holstein	Genotipo CC favorable para edad al primer servicio, genotipo TT desfavorables para producción de leche.

2.7. Gen LHR

El receptor de la hormona Luteinizante (LHR), es sintetizado por la expresión del gen LHR (Figura 4). Esta proteína cumple una función importante en la regulación de la actividad reproductiva ya que esta permite la acción de la hormona Luteinizante (LH) al unirse a ella (Gilber, 2005). Esta hormona interviene en la esteroidogénesis ovárica y ovulación de la hembra, de igual manera intercede en la producción de testosterona en las células de Leyding del testículo. El Receptor de la Hormona Luteinizante cumple un papel fundamental en la foliculogénesis, desde que se establece la dominancia folicular hasta el momento de la ovulación; ya que su expresión en las células de la granula del folículo dominante es esencial en los estadios finales del crecimiento folicular, la maduración final del oocito, ovulación y la luteinización de la pared folicular (Hyttel *et al.*, 1997).

LHR es una proteína que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados al nucleótido Guanina (GPCRs o proteína G) (Ascoli, 2002) y debido a su habilidad para unirse con alta afinidad, tanto a LH como a la gonadotropina coriónica humana (hCC), también se ha designado con las siglas LHR (Vásquez-Marín *et al.*, 2014).

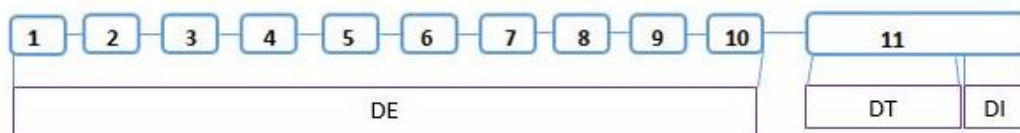


Figura 4 Gen LHR, los cuadrados enumerados del 1 al 11 indican los exones. DE: Dominio extracelular. DT: Dominio transmembranal. DI: Dominio intracelular. (Modificada de Vásquez-Marín *et al.*, 2014)

2.7.1 Polimorfismos rs41256848 del Gen LHR

Este polimorfismo se da por una transversión de una Guanina por una Timina en el nucleótido 1410 en el exón 11 del cromosoma 11, generando un cambio de aminoácido de tripsina a cisteína en la posición 144 y codifica para el dominio trans-membranal (Vásquez-

Marín *et al.*, 2014). Algunos autores, han asociado la presencia del alelo T de manera favorable para características reproductivas (Tabla 8).

Tabla 8. Estudios relacionados con el polimorfismo rs41256848

Autor	Raza	Efecto
Hastings <i>et al.</i> ,2006	Holstein	Alelo T efecto favorable disminución del intervalo entre partos y días al primer servicio
Yu <i>et al.</i> , 2012	Holstein	Alelo G favorable para tratamientos de súper-ovulación
Cochran <i>et al.</i> , 2013	Holstein	Alelo T favorable para una mejor vida productiva

3. HIPÓTESIS

Existen variaciones genómicas en genes candidatos que se asocian con características reproductivas y productivas en vacas Holstein de Honduras, que pueden contribuir a su mejoramiento genético.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar polimorfismos en genes candidatos asociados a la fertilidad y determinar su efecto sobre características reproductivas y de producción de leche en ganado Holstein de Honduras.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de marcadores de los genes candidatos LEP, PIT-1 y LHR asociados a la fertilidad en ganado Holstein de Honduras.
- Estimar el efecto de marcadores de los genes candidatos a asociados a fertilidad (LEP, PIT-1 y LHR) sobre características reproductivas y de producción de leche en ganado Holstein de Honduras.

5. REFERENCIAS

- Akers, R. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89: 1222–34.
- Asadollahpour-Nanaei, H., Ansari Mahyari, S., y M. Edriss. 2014. Effect of LEPR, ABCG2 and SCD1 Gene Polymorphisms on Reproductive Traits in the Iranian Holstein Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 49(5): 769-774.
- Ascoli, M., Fanelli, F., y D. Segaloff. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, perspective. *Endocrine reviews*. 23(2): 141-174.
- Aytekin, İ. y S. Boztepe, 2013. Associations of PIT1 gene polymorphism with milk yield and composition traits in brown swiss cattle. *Journal of Animal Plant Science*. 23(5): 1281-1289.
- Berry, D., Wall, E., y J. Pryce. 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal*. 8(s1): 105-121.
- Caratachea, M. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto nacional de enfermedades respiratorias Ismael Cosío Villegas*. 20(3): 213-221.
- Carsai, T., Balteanu, V., Vlaic, A., y V. Cosier. 2012. The Polymorphism of Pituitary Factor 1 (POU1F1) in Cattle. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 45(1): 142-146.
- Carvajal-Hernández, M., Valencia-Heredia, E., y J. Segura-Correa. 2002. Duración de la lactancia y producción de leche de vacas Holstein en el estado de Yucatán, México. *Revista Biomedica*, 13: 25-31.
- Casas, E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Arch Latinoam Prod Anim*, 14(1): 24-31.
- Clarke, J. y B. Henry, 1999. Leptin and reproduction. *Review of Reproduction*, 4:48.
- Clempson, A., Pollott, G., Brickell, J., Bourne, N., Munce, N. y D. Wathes. 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(7): 3618-3628.
- Corrales-Álvarez, J., Cerón-Muñoz, M., Cañas-Álvarez, J., Acevedo-Valladarez, C., Sepúlveda-Restrepo, J., Calvo-Cardona, S. y M. Moreno-Ochoa. 2010. Estudio del polimorfismo *HinfI* del gen *Pit-1* y su asociación con características de tipo, producción de leche y días abiertos de vacas Holstein en el departamento de Antioquia, Colombia. *Actualidades Biológicas*. 32 (93): 139-145.
- Dekkers, J. y F. Hospital. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*. 3(1): 22-32.

- Dekkers, J. 2007. Marker-assisted selection for commercial crossbred performance *Journal of Animal Science* 85: 2104-2114.
- Derecka, K., Ahmad, S., Hodgman, T., Hastings, N., Royal, M., Woolliams, J., y A. Flint. 2010. Sequence variants in the bovine gonadotrophin releasing hormone receptor gene and their associations with fertility. *Animal genetics*. 41(3): 329-331.
- do Amaral Grossi, D., Buzanskas, M., Grupioni, N., de Paz, C., de Almeida Regitano, L., de Alencar, ... y D. Munari. 2015. Effect of IGF1, GH, and PIT1 markers on the genetic parameters of growth and reproduction traits in Canchim cattle. *Molecular biology reports*. 42(1): 245-251.
- Driver AM, Huang W, Gajic S, Monson RL, Rosa GJ, Khatib H. 2009. Short communication: Effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. *Journal of Dairy Science*. 92:4082–4085.
- Dubey, P., Sharma, A. y D. Kumar. 2007. Leptin gene and its role in cattle-A review. *Agricultural Reviews*. 28(3): 207-215.
- Edriss, V., Edriss, M., Rahmani, H., y B. Sayed-Tabatabaei. 2008. Pit-1 Gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan province. *Biotechnology* 7 (2):209-212.
- Elsik, C., Tellam, R., y K. Worley. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. 324(5926): 522-528.
- FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Honduras.pdf>. Consultado 18 de Junio 2017
- FAO. 2008. Ayudando a Desarrollar una Ganadería Sustentable en Latinoamérica y el Caribe: Lecciones a Partir de Casos Exitosos.
- FAO. 2008. Conservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible: Integración cultivo-ganadería. Disponible en: http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/li/livestock.pdf. Consultado Febrero de 2017.
- FAO. 2010. Agricultural biotechnologies in developing countries: Options and opportunities in crops, forestry, livestock, fisheries and agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change (ABDC-10). FAO International Technical Conference, Guadalajara, Mexico, 1-4 March.
- FAO. 2015. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación Evaluación de la Situación de la Biodiversidad Pecuaria en Honduras.
- Fries, R. y A. Ruvinsky. 1999. The genetics of cattle. CABI Publishing.
- Gallegos, J. 2007. Manejo reproductivo en explotaciones lecheras. Secretaria de agricultura y ganadería, desarrollo rural pesca y alimentación. Subsecretaría de desarrollo rural dirección general de apoyos para el desarrollo rural. 8 p

- Gana, E., Vargas, L., y F. Escudero. 2004. Polimorfismo del gen Pit-1 en vacas lecheras de Chile central. *Archivos de zootecnia*. 53(202): 217-220.
- Gasque Gómez, R. (2008). Enciclopedia bovina. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Ciudad Universitaria México.
- Gaviria, S., Herrera, A. y J. Zuluaga, 2016. Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in Antioquia Holstein cattle. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 69(1): 7793.
- Gilbert, S. 2005. Biología del desarrollo. 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp 681-683.
- González, E., J. Dávalos. 2015. Libro técnico estado del arte sobre investigación e innovación tecnológica en ganadería bovina tropical. Redgrato CONACYT. Primera edición. 270.
- Haegeman, A., Van Zeveren, A. y L. Peelman. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics*. 31(1): 79-79.
- Hahn, M. 1988. Papel Del Registro Oficial De Producción De Leche En La Evaluación De Genotipos En Poblaciones De Doble Propósito. *Revista: Ciencias y tecnología de Venezuela*. CONICIT (Eds), Venezuela. pp. 31-35
- Hastings, N., Donn, S., Derecka, K., Flint, A. y J. Woolliams. 2006). Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal genetics*. 37(6): 583-585.
- Heidari, M., Azari, M, Hasani, S., Khanahmadi, A. y S. Zerehdaran, 2012. Effect of polymorphic variants of GH, Pit-1, and β -LG genes on milk production of Holstein cows. *Russian Journal of Genetics*. 48(4): 417-421.
- Huang, W., Maltecca, C. y H. Khatib. 2008. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. *Animal genetics*. 39(5): 554-557.
- Hurtado-Lugo, N., Cerón-Muñoz, M., y A. Gutiérrez-Valencia. 2006. Estimación de parámetros genéticos para la producción de leche en el día del control en búfalos de la Costa Atlántica Colombiana. *Livestock Research for Rural Development*. 18(3).
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., y T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47(1): 23-32.
- Ishiwata, H., Katsuma, S., Kizaki, K., Patel, O., Nakano, H., y T. Takahashi. 2003. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Mol Reprod Dev* 65, pp: 9-18.
- Komisarek, J. 2010. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 28(2).

- Komisarek, J., y A. Antkowiak. 2007. The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. *Polish journal of veterinary sciences*.10: 193–197.
- Kommadath, A., Woelders, H., Beerda, B., Mulder, H., de Wit, A., Veerkamp, R. y M. Smits, 2011. Gene expression patterns in four brain areas associate with quantitative measure of estrous behavior in dairy cows. *BMC genomics*, 12(1):1.
- Kules, M., Anosi, S. Lehtolainen, T., K'atai, L., Delavaud, B., Balogh, O., Chilliard, Y., Rudas, P. y G. Huszenicza. 2005. Feedingunrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 29:214.
- Kühn, C., Leveziel, H., Renand, G., Goldammer, T., Scwerin, M., y J. Williams. 2005. Genetic markers for beef quality. In: "Indicators of milk and beef quality", J.F. Hocquette and S. Gigli (eds), EAAP Publ. 112, Wageningen Academic Publishers.
- Liefers, S., Te Pas, M., Veerkamp, R. y T. Van Der Lende. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 85(6): 1633-1638.
- Luna-Nevárez, P., Rincón, G., Medrano, J., Riley, D., Chase, J., Chad, C., Coleman, S., DeAtley, K., Islas-Trejo, C., Silver, G. y M. Thomas. 2012. Identificación de un polimorfismo del gen PAPP-A2 asociado a la fertilidad en vaquillas Romosinuano criadas en subtrópico. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(2): 185-200.
- Milazzotto, M. P., Rahal, P., Nichi, M., Miranda-Neto, T., Teixeira, L. A., Ferraz, J. B. S., y Garcia, J. F. (2008). New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livestock Science*, 114(2), 274-279.
- Mullis P. 2007. Genetics of growth hormone deficiency. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 36: 17–36.
- Nasr, M., Awad, A. y I. El Araby. 2016. Associations of Leptin and Pituitary-Specific Transcription Factor Genes' Polymorphisms with Reproduction and Production Traits in Dairy Buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4): 597-603.
- Oldenbroek, K. y L. Van der Waaij. 2014. Animal breeding and genetics for BsC students. Groen Kennisnet. Wageningen, Netherlands. p 24.
- Ortega, J. y L. García. 2011. El genoma bovino, métodos y resultados de su análisis. *Revista MVZ Córdoba*, 16, 1.Ovilo, C. y V. Rodriguez. 2012. Genetic basis and improvement of reproductive traits. In: Susana Astiz Blanco, Antonio Gonzalez Buines (Eds.) Animal Reproduction in Livestock, in Encyclopedia of Life Support Systems(EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford ,UK, [<http://www.eolss.net>]
- Ozdemir, M. 2012. Determination of pit-1/hinf1 polymorphism in Holstein and native ear cattle raised as genetic resource in Turkey. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(1):25-28.

- Parra, G., y Sifuentes, A. 2012. Mejoramiento Genético Asistido para Características Reproductivas de Animales Domésticos. Memorias Temascaltepec. Reunión Bianual sobre Reproducción Animal.
- Parra-Bracamonte, G., Sifuentes Rincón, A., Reyna, R. y W. Arellano. 2011. Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3): 1025-1037.
- Pennetier, S., Uzbekova, S., Perreau, C., Papillier, P., Mermillod, P., y R. Dalbiès-Tran. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of reproduction*, 71(4): 1359-1366.
- Pérez, G. 2012. Sanidad e Inocuidad Pecuaria en Centroamérica y República Dominicana: Una agenda prioritaria de políticas e inversiones. Concejo Agropecuario Centroamericano. Honduras.
- Posadas, M., López, F., y H. Valdenegro. 2004. Estimación de parámetros genéticos para características de longevidad y producción de leche en ganado Holstein en México. *Interciencia*, 29(1): 52-56.
- Quintero, Y. 2012. Gen de la leptina en rumiantes. Revisión. *Ciencia y Tecnología Ganadera* Vol. 6 No. 3, p. 115-122, 2012.
- Renaville, R., Gengler, N., Vrech, E., Prandi, A., Massart, S., Corradini, C., y D. Portetelle, 1997. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *Journal of Dairy Science*, 80(12): 3431-3438.
- Rincón, E., Abreu, O., Labbe, S., y T. Perozo. 1972. Efecto de la edad y producción de leche sobre el periodo vacío y número de servicios por concepción en vacas Limoneras. *Agronomía Trop.* 22(6): 579-586.
- Romero, C. Pine-Twaddell, E. y S. Radovick, S. 2011. Novel mutations associated with combined pituitary hormone deficiency. *Journal of molecular endocrinology*, 46(3): R93-R102.
- Rosenkrans, C., Banks, A., Reiter, S., y M. Looper. 2010. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with heat shock protein 70 genetic polymorphisms. *Animal reproduction science*, 119(3): 178-182.
- Ruiz, T., Murphy, Martha, O. Angel. 1999. Interacción reproducción-nutrición en los animales domésticos: es la leptina la clave. *Revista Colombiana de Ciencia. Pecuarias*. 12: 2.
- Sánchez C, y M. Bueno 2008. Introgresión genética de bos indicus (bovidae) en bovinos criollos colombianos de origen bos Taurus. *Acta Biológica Colombiana*; 13(1):131-142.
- Silva, M., Pedrosa, V., Silva, J., Herrera, L., Eler, J., y L. Albuquerque 2012. Parámetros genéticos de las características andrológicas en la especie bovina. *Archivos de medicina veterinaria*. 44(1): 1-11.

- Spangler, M., y A. Van Eenennaam. 2010. Utilizing Molecular Information in Beef Cattle Selection. *Beef Sire Selection Manual*, 79.
- Svennersten-Sjaunja K. y K. Olsson 2005. Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology*. 29, 241–58.
- Thallman, R. 2004. DNA testing and marker assisted selection. *Proc. Beef Improv. Fed. 36th Ann. Res. Symp. Ann. Meet. May 2528, Sioux Falls, DS, USA*. Pp. 20-25.
- Thompson, I., y U. Kaiser. 2014. GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 385(1): 28-35.
- Tirados, F. 2001. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. *Archivos de zootecnia*, 50(192):6.
- Trakovická, A., Moravčíková, N., Gabor, M., Miluchová, M. 2014. Genetic polymorphism of Pit-1 gene associated with milk production traits in Holstein cattle. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 18(1) 146-151.
- Trakovická, A., Moravčíková, N., y R. Kasarda. 2013. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. *Acta Biochim. Pol*, 60: 783-787.
- Uffo, O. 2008. Producción animal y biotecnologías pecuarias: nuevos retos. *Rev Salud Anim*. 2011, vol.33, n.1 [citado 2016-02-18], Khatib H, Monson RL, Schutzkus V, Kohl DM, Rosa GJ, Rutledge JJ: Mutations in the STAT5A gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *Journal of Dairy Science*, 91:784–793.
- Valencia, D., y J. Zuluaga. 2012. Efecto del polimorfismo del gen de la somatotropina (BGH) sobre características lineales en vacas Holstein. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 21-31.
- Van Eenennaam, A. 2006. DNA-Based Biotechnologies, Pages 66-73 in the National Beef Cattle Evaluation Consortium Beef Sire Selection Manual. 66-73. [Disponible en Línea: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/MyLaboratory/Publications/NBCEC-SireSelectionManualChapter.pdf>]
- VanRaden, P., Sanders, A. Tooker, M., Miller R., Norman, H., Kuhn, M., y G. Wiggans. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*. 87:2285–2292.
- Vargas, L., Gana, V., I. Escudero. 2004. Polimorfismo del gen Pit-1 en vacas lecheras de Chile central. *Archivos de Zootecnia*, 53: 217-220.
- Vásquez-Marín, B., Márques, A., Seijas, G., De La Rosa, O. y J. Arangure. 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*. 24(005).

- Veerkamp, R., B. Beerda. 2007. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*. 68: S266-S273.
- Wang X, Schutzkus V, Huang W, Rosa G, y H. Khatib. 2009. Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF2 with fertilization rate and early embryonic survival. *Animal Genetics*. 40:722–728.
- Woollard, J., Schmitz, C., Freeman, A. y C. Tuggle. 1994. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit-1 locus. *Journal of Animal Science*, 72: 3267.
- Yazdani, H., Rahmani, H., Edris, M. y E. Dirandeh. 2010. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *African Journal of Biotechnology*. 9(36): 5997-6000.
- Yu, Y., Pang, Y., Zhao, H., Xu, X., Wu, Z., An, L., y J. Tian. 2012. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. *Journal of animal science and biotechnology*. 3(1): 1.
- Zhang, C., Liu, B., Chen, H., Lan, X., Lei, C., Zhang, Z., y R. Zhang. 2009. Associations of a Hinf I PCR-RFLP of POU1F1 gene with growth traits in Qinchuan cattle. *Animal biotechnology*. 20(2): 71-74.
- Zhu, M., y S, Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: Progress and challenges. International. *Journal of Biology Science*. 3(7):420-427.

*El presente manuscrito se realizó siguiendo los lineamientos estipulados por la revista
Animal Reproduction Science, editorial ELSEVIER*

6. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Asociación de los polimorfismos de los genes *Leptina*, Factor de transcripción de la Pituitaria y Receptor de la Hormona Luteinizante con características reproductivas y producción de leche en ganado Holstein

Mayra Alejandra Cañizares Martínez.^a, Juan Gabriel Magaña Monforte^{a*}, Gaspar Manuel Parra Bracamonte^b, José Candelario Segura Correa.^a

^a Departamento de Reproducción y Mejoramiento Genético, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

^b Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México.

***Autor correspondiente: jmagana@correo.uady.mx**

Dirección postal: Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Apdo., Itzimmá, 97100 Mérida, Yuc.

Teléfono: +52 9997467160

Destacados:

- El genotipo CC del gen LEP disminuye 28.71 días el Intervalo parto concepción.
- El genotipo AA del gen Pit-1 disminuye 41.36 días la edad al primer parto aproximadamente.
- Los loci A59V y *HinfI* son SNPs candidatos para ser validados en un programa (SAM).

6.1. Resumen

El objetivo del presente estudio fue estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de marcadores de los genes LEP, PIT-1 y LHR y evaluar su efecto sobre características reproductivas y de producción de leche en ganado Holstein. Se muestrearon 147 vacas en el

departamento de Francisco Morazán en Honduras y se realizó un proceso de PCR-RFLP para la tipificación de los loci *HinfI* del gen Pit-1, A59V del gen LEP y rs41256848 del gen LHR. Para calcular las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó el software GENEPOP v.4.2 y para estimar el efecto de los genotipos sobre las características se utilizaron los procedimientos GLM y MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.4. La frecuencia de los genotipos CC, CT, TT de A59V, AA, AB, BB de *HinfI* y CC, CG, GG de Rs41256848, fueron 0.46, 0.33, 0.21; 0.09, 0.32, 0.58 y 0.37, 0.61, 0.02, respectivamente. Los genotipos de LEP y LHR no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg a diferencia de los genotipos del marcador *HinfI*. El polimorfismo A59V del gen LEP se encontró significativamente asociado al Intervalo Parto Concepción, siendo el genotipo CC favorable; de igual manera el polimorfismo *HinfI* del gen PIT-1 se encontró significativamente asociado a la edad al primer parto, siendo el genotipo AA favorable. Los polimorfismos evaluados en los genes LEP y Pit-1 son candidatos para su uso en la selección asistida por marcadores para mejorar el intervalo parto concepción y la edad al primer parto, respectivamente en el ganado Holstein en Honduras.

Palabras clave: Ganado lechero, SNP, reproducción, PCR-RFLP.

6.2. Introducción

La ganadería lechera especializada en Honduras se caracteriza por manejar principalmente ganado Holstein (*Bos taurus*). Esta raza ha disminuido sus índices reproductivos como consecuencia del antagonismo a la alta selección hacia características productivas, comprometiendo la rentabilidad en sistemas de producción de leche y animales de reemplazo (Berry et al., 2014).

Una vía para mejorar este desempeño reproductivo, es implementar programas de selección genética apoyados de marcadores moleculares, estos permiten explicar en cierta proporción la varianza genética de un carácter en particular y con ello se podría identificar qué variante en el genoma se asocia favorablemente o no a algún rasgo de interés (Van Eenennaam et al., 2013).

Los marcadores moleculares ampliamente utilizados son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que permiten reducir los intervalos generacionales y aumentar la precisión

de las evaluaciones genéticas de los rasgos económicamente importantes, en especial a los de baja heredabilidad en programas de selección (Nasr et al., 2016). Estudios han identificado SNPs con efectos significativos sobre algunas características reproductivas, presentes en los genes de la Leptina (LEP), del Factor de transcripción de la Pituitaria (Pit-1) y del Receptor de la Hormona Luteinizante (LHR).

El gen LEP codifica 167 aminoácidos que conforman la hormona polipeptídica que desempeña funciones metabólicas, interviene en el sistema neuroendocrino que regula las funciones gonadales, modula la acción sobre la insulina y el sistema del Factor de Crecimiento Insulínico (IGFs). El SNP A59V (rs29004508) dado por un cambio C>T en la posición 3100 del exón 3, se ha asociado fuertemente a características reproductivas, como edad al primer servicio (EPS), edad temprana al primer parto (EPP), intervalos entre partos (IEP) y números de servicios por concepción (NSC) (Clempton et al., 2011).

El gen Pit-1 pertenece a la familia de los factores de transcripción homeo-dominio, que activa la expresión para la Prolactina y la Hormona del Crecimiento. Implicado en procesos de señalización del desarrollo de la hipófisis, la glándula mamaria, el crecimiento y la expresión de la proteína de la leche. El polimorfismo *Hinf*I (posición A1256G, exón 6) está asociado en varios estudios a producción de leche, aspectos reproductivos y de crecimiento (Aytekin et al., 2013; Doosti et al., 2011).

El gen LHR sintetiza una proteína que permite la acción de la Hormona Luteinizante (LH) al unirse a ella, cumple un papel fundamental en la foliculogénesis, ya que su expresión en las células de la granulosa del folículo dominante es esencial en los estadios finales del crecimiento folicular, la maduración del ovocito, ovulación y la luteinización de la pared folicular. Algunos estudios han asociado al SNP rs41256848 (posición G1410T, exón 11) con características reproductivas como IEP, NSC y tratamiento de súper ovulación (Cochran et al., 2013; Yu et al., 2012).

Estos genes son candidatos para identificar marcadores asociados a características de importancia económica. El objetivo del presente estudio fue estimar las frecuencias alélicas

y genotípicas de marcadores de los genes LEP, PIT-1 y LHR y evaluar su efecto sobre características reproductivas y de producción de leche en el ganado Holstein.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Animales y datos fenotípicos

Las muestras para este estudio se obtuvieron de un grupo 147 vacas Holstein de las lecherías de la “Escuela Agrícola Panamericana”, El Zamorano (EAP) y la finca denominada “El Carreto” ubicadas en el departamento de Francisco Morazán, en la zona centro-oriental de Honduras.

El manejo nutricional de los animales en ambas lecherías consiste de un sistema intensivo en la época de secas, con confinamiento para suministrar alimentación balanceada, y durante la época de lluvias los animales realizan pastoreo rotacional acompañado de un suplemento estratégico.

El manejo reproductivo que se emplea consiste en inseminación artificial con semen proveniente principalmente de Estados Unidos y Canadá. Los registros en ambas fincas se capturaban en el software VAMPP®. Se obtuvieron los datos de características reproductivas como edad al primer parto (EPP), intervalo entre partos (IEP), intervalo parto concepción (IPC), número de servicio por concepción (NSC) y producción de leche ajustada a 305 días (PL305).

6.3.2. Genotipificación

Se extrajo ADN a partir de muestras de folículos capilares de la borla de la cola (~60 folículos), de acuerdo al protocolo del kit Genelute Mammalian Genomic DNA. La calidad del ADN se evaluó por medio de geles de agarosa al 1.5% y cuantificó por medio del programa Kodak Molecular Imaging Software Standard Edition V5.0.

6.3.3. Amplificación de ADN por medio de PCR-RFLP

Los ensayos de PCR-RFL se diseñaron utilizando primers específicos para cada gen, previamente reportados, de acuerdo a las secuencias ubicadas en el GenBank. Las enzimas para los polimorfismos de los genes Pit-1 y LEP se encontraron en la literatura y para el polimorfismo del gen LHR se identificó por medio de Watcut, una herramienta en línea de la Universidad de Waterloo (2014) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de secuencia, primers, programas y enzimas para cada gen.

Gen	GenBank	Enzima	Primers	Referencia
Pit-1	EF090615.2	<i>Hinf</i> 1	Fw5´AAACCATCATCTCCCTTCTT3´ Rv5´AATGTACAATGTGCCTTCTGAG3´	Woollard et al., 1994
LEP	U50365.1	<i>Hph</i> I 1	FW 5´GGG AAG GGC AGA AAG ATA G3´ RV 5´-TGG CAG ACTGTTGAG GATC3´	Haegeman, 2000
LHR	NM_174381.1	<i>Tsp</i> 451	FW 5´CAAACCTGACAGTCCCCCGCTTT3´ RV 5´CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC3´	Milazzotto et al., 2008

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 15 µL con 25 ng de ADN, *buffer* de reacción 1X, 1 mM de MgCl₂; 0,4 mM de cada dNTP; 0.3 µM de primer y 1 U Taq DNA polimerasa y se procesaron en un Termociclador MJ Research.

Las condiciones de PCR touchdown (TD) iniciaron con la desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 5 ciclos de incubación a 95 °C por 45 seg; alineamiento a 62°C (disminuyendo 2°C cada ciclo) por 45 seg y una extensión a 72°C por 45 seg. Posteriormente se dio una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos, alineamiento a 55 °C o 60 °C (de acuerdo a si es TD55 o TD60) por 45 seg, una extensión a 72 °C por 45 seg y otra extensión final por 10 minutos a 72 °C.

Las reacciones de RFLP se llevaron a cabo en un volumen de 15 µL con 1 unidad de enzima para cada gen. La temperatura y tiempo de digestión para las enzimas *Hinf*1 y *Hph*I 1 fue de 37°C por 8 horas y para la enzima *Tsp*451 fue de 65 °C por 1 hora.

Para la evaluación de los productos de PCR, se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% por 45 minutos y las digestiones RFLP se visualizaron en geles de agarosa al 2.5 % dejando correr los geles de 2 a 4 horas de acuerdo al producto de corte. El marco de referencia utilizado fue un marcador de 50 pares de bases (pb) y se utilizó en todos los geles el SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain

6.3.4. Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo fueron analizadas para identificar el equilibrio Hardy-Weinberg (HW) por medio del software GENEPOP versión 4.2 (Rousset, 2008).

Para estimar el efecto de los genotipos sobre las variables IEP, IPC, NSC, y PL305 se ajustó un modelo mixto con medidas repetidas incluyendo un arreglo de covarianzas Compound Symmetry (CS), utilizando el procedimiento MIXED en el paquete estadístico SAS versión 9.4, (SAS 2013). El modelo estadístico incluyó los efectos fijos de hato, época de parto, número de parto, el año de parto y los genotipos de los genes LEP, Pit-1 y LHR, considerando como variable aleatoria el efecto de la vaca. La variable número de parto se agrupó en vacas con un parto y vacas con más de un parto y el año de parto se agrupó en individuos que parieron antes del 2011 y después del 2012. Los datos de las variables se transformaron utilizando la función el logaritmo base 10, para aproximarlos a la normalidad; aunque se presentan las medias de los datos originales para un mejor entendimiento y el valor significativo de referencia para la probabilidad de $P < 10^{-1}$.

$$Y_{ijklmno} = \mu + G_i + H_j + EP_k + NP_l + AP_m + ID_n + \epsilon_{ijklmno}$$

Donde $Y_{ijklmno}$ corresponde a cada una de las variables analizadas IEP, IPC, NSC, LL o PL305 de la n-ésima vaca, μ media observada, G_i corresponde al i-ésimo genotipos de Pit-1, LEP y LHR, H_j corresponde al j-ésimo hato, EP_k es la k-ésima época de parto, NP_l es el l-ésimo número de parto, AP_m corresponde al m-ésima año de parto, ID corresponde al n-ésimo efecto de la vaca y $\epsilon_{ijklmno}$ error residual aleatorio.

Para la variable EPP se utilizó un modelo GLM teniendo en cuenta los efectos fijos de hato, época de nacimiento, año del primer parto y cada gen. Los datos de la EPP también se evaluaron transformados a la normalidad $1/(x)$.

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + H_j + EN_k + AP1_l + \epsilon_{ijklm}$$

Donde Y_{ijklm} corresponde a la variable EPP de la m-ésima vaca, G_i es la i-ésimo genotipo de Pit-1, LEP y LHR, μ media observada, H_j corresponde al j-ésimo hato, EN_k corresponde

a la k-ésima época de nacimiento de la vaca y $AP1_l$ es el l-ésimo año del primer parto ϵ_{ijklm} error residual aleatorio.

Para determinar la influencia de los diferentes genotipos sobre los rasgos evaluados se empleó la metodología implementada por Clempson et al. (2011) donde se utilizaron a los animales heterocigotos como referencia para calcular los efectos de ambos homocigotos, tomando como referencia el valor estimado de las diferencias de las medias de los mínimos cuadrados. Las diferencias significativas de la predicción de los genotipos se estimaron utilizando la prueba de T-student y los errores estándar de las diferencias fueron calculados para cada una de las medias probadas.

En esta parte del estudio para el polimorfismo rs41256848 no se tomaron en cuenta los animales con el genotipo TT ya que solo se encontraron 2 individuos.

6.4. Resultados

6.4.1. Frecuencias alélicas y genotípicas

Se amplificaron 147 muestras para cada uno de los genes (Pit-1, LEP, LHR). Para el gen Pit-1 se identificaron los alelos A y B (Figura.1), el alelo B se observó en el patrón electroforético con dos bandas (227 y 204 pares de bases) y la presencia de una sola banda permitió identificar al alelo A por la ausencia del sitio de restricción para la enzima *Hinf*I. Dentro de la población se encontraron 13 individuos con genotipo AA, 48 con genotipo AB y 86 con genotipo BB, las frecuencias alélicas y genotípicas se presentan en la Tabla 2.

Los alelos C y T identificados por medio del RFLP *Hph*I para el gen LEP presentaron un patrón electroforético en presencia del sitio de restricción para el alelo mutado T (311 y 20pb) y en ausencia del lugar de reconocimiento de la enzima se observó el alelo C (331pb) (Figura 1). En esta población se encontraron 67 individuos con genotipo CC, 49 con genotipo CT y 31 con genotipo TT las frecuencias alélicas y genotípicas se presentan en la Tabla 2.

Los alelos G y T identificados por la enzima *Tsp*451 muestran un patrón electroforético que previamente no se había reportado con esta técnica para el gen LHR (Figura 1). En

presencia del sitio de reconocimiento de la enzima se identificó el alelo mutado T (228 y 75pb) y en ausencia se observó el alelo G (303pb). Dentro de la población se encontraron 54 individuos con genotipo GG, 91 con genotipo GT y 2 con genotipo TT las frecuencias alélicas y genotípicas se presentan en la Tabla 2. Los resultados de la prueba χ^2 obtenidos del software GENPOP, mostraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas encontradas y las esperadas ($P < 0.05$) en los genes LEP y LHR, lo que indica que la población en estudio no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Por su parte, para el gen Pit-1 no se encontró una diferencia significativa entre las frecuencias observadas y esperadas, indicando que las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio de HW.

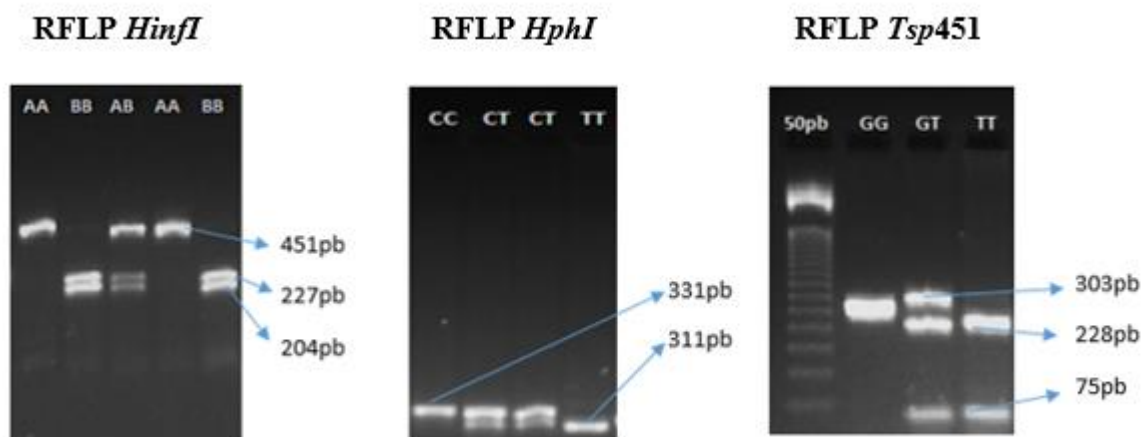


Figura 1. Patrones electroforéticos de los tres ensayos de RFLP estudiados, con los tamaños esperados para los genes Pit-1, LEP y LHR.

Tabla 2. Frecuencias alélicas, genotípicas de los polimorfismos evaluados, heterocigotos esperados y valor de probabilidad Hardy-Weinberg.

GEN (RFLP)	Frecuencias alélicas		Frecuencia genotípicas			Heterocigoto esperado	HW (<i>valor P</i>)
	A	B	AA	AB	BB	AB	
	0.25	0.75	0.09	0.33	0.58	0.37	0.1231
	C	T	CC	CT	TT	CT	
	0.62	0.38	0.46	0.33	0.21	0.47	0.003

LHR (<i>Tsp451</i>)	G	T	GG	GT	TT	GT	0.000
	0.68	0.32	0.37	0.62	0.01	0.44	

Valor significativo $P < 0.05$ para la determinación del equilibrio Hardy-Weinberg (HW)

6.4.2. Asociación de los genotipos con las variables de producción de leche y fertilidad

El polimorfismo A59V del gen LEP se asoció significativamente con la característica de Intervalo Parto Concepción, $P < 0.04$ (Tabla3) donde el genotipo favorable fue el CC, disminuyendo 28.71 días aproximadamente en comparación con animales heterocigotos CT; de igual manera este genotipo presenta una diferencia significativa favorable con relación al homocigoto TT (Tabla 4).

El polimorfismo *HinfI* del gen Pit-1 se asoció significativamente a la edad al primer parto, $P < 0.09$ (Tabla3). El genotipo favorable para esta característica fue el AA ya que la EPP disminuyó 41.36 días en comparación con la media para el heterocigoto AB (Tabla 4).

El SNP rs41256848 no se encontró asociado significativamente con ninguna de las características evaluadas, sin embargo presentó una tendencia a estar asociada a la edad al primer parto (Tabla 3).

Tabla 3. Probabilidad de asociación de los SNPs con características de fertilidad y producción de leche.

Característica	LEP	PIT	LHR
EPP	0.54	0.09*	0.13
IEP	0.27	0.88	0.67
IPC	0.04*	0.47	0.37
NSC	0.18	0.22	0.63
PL305	0.44	0.77	0.38

* Valor significativo $P < 0.10$

Edad al primer parto (EPP), Intervalos entre partos (IEP), Intervalos parto concepción (IPC), Número de servicios por concepción, Producción de leche ajustada a 305 días, genes Leptina (LEP), Factor de transcripción de la Pituitaria (PIT) y Receptor de la hormona Luteinizante (LHR).

Tabla 4. Efectos de sustitución genotípica entre heterocigotos y homocigotos para asociaciones significativas de los SNPs en las características reproductivas y de producción de leche.

RFLP	Genotipo	EPP (días)	IPC (días)	IEP (días)	NSC (días)	PL305 (LL)
<i>HphI</i>	CC	5.82± (36.21)	-28.71 ± (14.47) ^{a,b}	-16.79 ± (19.79)	-0.18 ± (0.19)	230.40± (179.03)
	TT	-26.41± (43.99)	7.00 ± (16.64)	16.61 ±(22.27)	0.19 ± (0.22)	120.18± (207.75)
<i>HinfI</i>	AA	-41.36± (60.35) ^b	34.64 ± (30.23)	3.17 ± (39.14)	0.35 ± (0.35)	230.11 ± (338.05)
	BB	56.25± (33.89)	-0.99 ± (13.79)	-8.10 ± (18.39)	-0.16 ± (0.17)	74.13 ± (173.08)
<i>Tsp451</i>	GG	-55.08± (33.72)	11.73 ± (13.05)	7.47 ± (17.56)	0.08 ± (0.17)	142.91 ± (162.19)

^a Diferencia significativa en relación al heterocigoto (P < 0.05)

^b Diferencia significativa entre los dos homocigotos (P < 0.05)

Valor estimado de las diferencias de las medias de los mínimos cuadrados ± (error estándar de la diferencia de las media.

6.5. Discusión

6.5.1. Frecuencias alélicas y genotípicas

La frecuencia del alelo A del polimorfismo *HinfI* del gen Pit-1 en ganado Holstein es superior en este estudio en relación a lo reportado por Wollard et al. (1994), Renaville et al. (1997), Hor-Oshima y Barreras-Serrano (2003), Yan et al. (2006), Zakizadeh et al (2007), Jawasreh et al (2009) y Ozdemir (2012) y similar a la reportada en ganado Holstein por Oprzadek et al. (2003), Dybus et al. (2004), Vargas et al. (2004), Edriss et al. (2008), Misriantia et al. (2010) y Corrales-Álvarez et al. (2010); en estos estudios la frecuencia del alelo B se encontraba en mayor proporción que el alelo A al igual que en esta población. Se ha reportado que en ganado Holstein Iraní y Toros Gyr de Brasil este alelo al encontrarse de manera homocigótica (BB) puede favorecer la producción y calidad de la leche (Ahmadi et al., 2015; Mattos et al., 2004).

En el caso del polimorfismo A59V del gen Leptina, las frecuencias alélicas para C y T encontradas en este estudio son similares a las descritas por Madeja et al. (2004) en ganado Holstein. La frecuencia del homocigoto TT en esta población es superior a la reportada por Haegeman et al. (2000), Liefer et al. (2002, 2003), Almeida et al. (2003), Kulig (2005),

Komisarek (2010) y Yasdania et al. (2010), ya que los valores de frecuencias oscilan entre 0,02 a 0,09 en estos estudios. Este genotipo se ha asociado de manera favorable en ganado Holstein en el conteo de células somáticas, proteína, grasas en leche y tasa de no retorno de las vacas (Komisarek, 2010; Kulig, 2005), y en ganado Jersey la presencia del genotipo (TT) se ha asociado a menores IEP, NSC e IPC (Komisarek et al., 2007).

Por otro lado, las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas para el polimorfismo rs41256848 del gen LHR en este estudio son diferentes de las frecuencias reportadas, ya que la frecuencia del alelo mutado T es mayor a las descritas por Vásquez-Marin et al. (2010), pero inferiores a la reportada por Yu et al. (2012). El genotipo TT se ha asociado favorablemente a la disminución del intervalo entre partos, días al primer servicio y una mayor vida productiva en ganado Holstein (Cochran et al., 2013; Hastings *et al.*, 2006)

El desequilibrio Hardy-Weinberg para los locus A59V del gen Lep y rs41256848 del gen LHR pudo deberse al flujo genético como consecuencia de la compra de semen proveniente de Estados Unidos y Canadá o al uso no aleatorio de toros de estos países sometidos a programas de selección que han favorecido el aumento de algunos alelos en búsqueda de beneficiar rasgos de interés económico. De igual manera, dado que la muestra poblacional es pequeña la propiedad de estabilidad casi no se cumple, debido a que las frecuencias génicas están sujetas a fluctuaciones aleatorias producto del muestreo gamético constituyendo un proceso dispersivo (Falconer y Mackay, 1996).

Para el caso del SNP del gen Pit-1, el equilibrio Hardy-Weinberg puede atribuirse, a que no se ha dado un proceso de selección específico para este polimorfismo en las poblaciones parentales y por ende se mantienen estables las frecuencias alélicas de una generación a la otra, un reflejo de este patrón se observa en las frecuencias alélicas encontradas en la tabla 2 (Falconer y Mackay, 1996).

6.5.2. Asociación de los polimorfismos con las características evaluadas

- **Polimorfismo *HinfI* del gen Pit-1**

La edad al primer parto refleja la velocidad de crecimiento de la hembra y su edad a la pubertad, la asociación significativa con el SNPs del gen Pit-1 puede deberse a la participación de este gen en la expresión de la hormona del crecimiento. Un estudio previo

en ganado Holstein, encontró que este polimorfismo está significativamente asociado con aspectos de crecimiento y desarrollo (Doosti et al., 2011), en particular el alelo A. Este alelo no sólo se ha asociado a características de desarrollo sino también se ha asociado favorablemente con la producción de leche, cuerpos más profundos y la angularidad en vacas Holstein (Renaville et al., 1997; Huang et al., 2008; Corrales-Alvarez et al., 2010; Aitekin et al., 2012; Heidari et al., 2012; Carsai et al., 2012).

Según este estudio seleccionar animales con la presencia del genotipo AA reduciría 41.36 días la EPP. La disminución de esta característica podría resultar en un mayor número de terneros y leche producida por año de vida de la vaca (Salazar-Carranza et al., 2013), además de disminuir los costos de producción y aumentar la productividad del hato (Pirlo et al. 2000; Radostits 2003).

El alelo B de este gen no se encontró significativamente asociado con algunas características de fertilidad; sin embargo, este loci podría estar sufriendo algún efecto epistático con los genes TGLA57 y RM95 (Moody et al., 1995) o estar en desequilibrio de ligamiento con otro loci en particular.

- **Polimorfismo A59V del LEP**

El polimorfismo A59V también conocido como A80V, C3100T, C1864T, *LepHphI* o rs29004508 es una mutación no sinónima debido a que presenta un cambio de aminoácido de una Alanina por una Valina en la posición 80, en una región conservada del gen LEP (Komisarek et al., 2007). Su asociación en este estudio con la característica IPC puede estar dada por la participación de este gen en el sistema neuroendocrino que regula las funciones a nivel ovárico. Se conoce que los receptores de esta hormona en los rumiantes están presentes tanto en el folículo como en el cuerpo lúteo (Spicer, 2001; Muñoz-Gutiérrez et al., 2005; Nicklin et al., 2007) y una serie de estudios en ratones (Ye et al., 2009), cerdos (Craig et al., 2004) y ganado bovino (Boelhauve et al., 2005) han informado de los efectos de la Leptina sobre la mejora de la maduración de los ovocitos, la tasa de fertilización in vitro y el aumento de la proporción de embriones que se desarrollan a la fase de blastocisto.

Existen dos planteamientos acerca de la participación de esta hormona en la ovulación, la primera sugiere que durante el periodo posparto la mayoría de las vacas están en un balance

energético negativo y los bajos niveles de Leptina en este momento pueden estar asociados con la secreción reducida de gonadotropina, lo que prolongaría el intervalo hasta la primera ovulación (Liefers et al., 2005). Apoyando esta teoría, se identificó que la administración de leptina recombinante exógena durante el anestro posparto, aumenta la concentración de estrógeno y los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) ayudando en el desarrollo del folículo ovárico, logrando acelerar la aparición del estro en vacas Bali (Pradnyana et al., 2016a, 2016b).

Un segundo planteamiento sugiere que altas concentraciones de Leptina aumentan las concentraciones de la hormona de crecimiento GH que antagonizan el efecto del factor de crecimiento insulínico IGF-I y la hormona insulina, disminuyendo la producción de estradiol e interfiriendo en el desarrollo de los folículos dominantes y la maduración oocítica (Spicer, 2001). Apoyando este planteamiento, un estudio realizado en vacas Holstein- Friesian por Wathes et al. (2007) encontró que altas concentraciones de leptina y bajas concentraciones de IGF-I antes del parto e inmediatamente después del parto prolongan los IPC y los Intervalos al primer servicio en vacas multíparas. De igual manera, estudios previos asociaron las bajas concentraciones de IGF-I en vacas post-parto, con el aumento en el tiempo que tarda una vaca en reanudar el estro (Beam y Butler, 1999; Pushpakumara et al., 2003).

Por ende, si el SNP A59V del gen leptina puede modular la actividad de la leptina antes del parto y después de este, su acción en el folículo en desarrollo y en el ovocito se daría de manera adecuada y esto podría influir en las tasas de concepción tanto en vacas nulíparas como en vacas multíparas (Clempton et al., 2011).

El genotipo CC del SNP A59V asociado a IPC en este estudio, también ha sido asociado con edad temprana al primer parto y vacas más jóvenes al primer servicio (Clempton et al., 2011; De Matteis et al., 2012). Clempton et al. (2011), sugieren que este SNP puede tener un efecto conjunto con otros SNPs de este mismo gen como el UASMS1 y el A1457G, que se han reportado que tienen efectos significativos sobre NSC e IEP.

- **Polimorfismo rs41256848 del gen LHR**

Este polimorfismo que es una mutación no sinónima por generar un cambio de aminoácido de tripsina a cisteína en la posición 144, no se encontró asociado a ninguna de las características evaluadas en este estudio, sin embargo, podría estar asociado con la edad al primer parto, aunque es necesario incrementar la muestra poblacional y el número de registros. Este SNP se ha asociado previamente a características de fertilidad, tratamientos de súper-ovulación y vida productiva (Cochran et al., 2013; Hastings et al., 2006; Yu et al., 2012). En adición, se ha comprobado que tiene un efecto significativo asociado a IEP y días al primer servicio, al evaluarlo como haplotipo, en particular con el SNP rs41256850 (Hostings et al., 2006); de igual manera podría estar en desequilibrio de ligamiento con algún otro loci.

5. Conclusiones

Los resultados de este estudio sugieren que los SNPs de los genes LEP y Pit-1 podrían ser utilizados en la selección asistida por marcadores para mejorar el intervalo parto concepción y la edad al primer parto, respectivamente, en el ganado Holstein en Honduras.

Expresiones de gratitud:

A la Universidad Autónoma de Yucatán y al Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa-Tamaulipas.

A la asociación de productores de leche Honduras, a la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano (EAP) y la finca El Carreto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Fuentes de financiación: Este trabajo fue apoyado por la Universidad Autónoma de Yucatán y por Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

Conflicto de interés: los autores declaran que no hay ningún conflicto de interés.

6. Referencias

- Ahmadi, M. M., Mirzaei, A., Sharifiyazdi, H., Hajibemani, A., y Ghasrodashti, A. R. 2015. Pituitary-specific transcription factor 1 (Pit-1) polymorphism and its association on milk production and some reproductive performance in Holstein dairy cows. *Rev.Med.Vet.* 166, 127-131.
- Almeida, S. E. M., Almeida, E. A., Moraes, J. C. F., Weimer, T. A., 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 106-113.
- Aytekin, İ., Boztepe, S. 2013. Associations of PIT1 gene polymorphism with milk yield and composition traits in brown swiss cattle. *J Anim Plant Sci.* 23, 1281-1289.
- Beam, S. W., y Butler, W. R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54,411-424.
- Berry, D. P., Wall, E., Pryce, J. E., 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal.* 8, 105-121.
- Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F. F., 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* 73, 737-744.
- Carsai, T. C., Balteanu, V. A., Vlaic, A., Cosier, V., 2012. The polymorphism of pituitary factor 1 (POU1F1) in cattle. *Lucrari Stiintifice.* 45, 142-146.
- Clempson, A. M., Pollott, G. E., Brickell, J. S., Bourne, N. E., Munce, N., Wathes, D. C., 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94, 3618-3628.
- 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. *BMC Genet.* 14, 49.
- Corrales-Álvarez, J. D., Cerón-Muñoz, M. F., Cañas-Álvarez, J. J., Acevedo-Valladarez, C., Sepúlveda-Restrepo, J. C., Calvo-Cardona, S. J., Moreno-Ochoa, M., 2010. Estudio del

polimorfismo *HinfI* del gen Pit-1 y su asociación con características de tipo, producción de leche y días abiertos de vacas Holstein en el departamento de Antioquia, Colombia. Actual Biol 32(93), 139-145.

Craig, J., Zhu, H., Dyce, P. W., Petrik, J., Li, J., 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology, 145, 5355-5363.

De Matteis, G., Scatà, M., Grandoni, F., Petrera, F., Abeni, F., Catillo, G., y Moioli, B. 2012. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. Open J Anim Sci. 2, 174-182.

Doosti, A., Arshi, A., Momeni, B., 2011. Molecular study of PIT1 gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. Afr J Agric Res. 6, 4467-4470.

Dybus, A., Szatkowska, I., Czerniawska-Piatkowska, E., Grzesiak, W., Wojcik, J., Rzewucka, E., Zych, S. 2004. PIT1-*HinfI* gene polymorphism and its associations with milk production traits in polish Black-and-White cattle. Arch. Tierz. 47, 557-564.

Edriss, V., Edriss, M. A., Rahmani, H. R., Sayed-Tabatabaei, B. E. 2008. Pit-1 gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan Province. Biotechnology. 7, 209-212.

Falconer, D., Mackay. T., 199660. Introducción a la Genética Cuantitativa. Cuarta ed. ACRIBIA, S.A. Zaragoza España.

Haegeman, A., Van Zeveren, A., Peelman, L. J., 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Anim. Genet. 31, 79-79.

Hastings, N., Donn, S., Derecka, K., Flint, A. P., Woolliams, J. A., 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. Anim. Genet. 37, 583-585.

Heidari, M., Azari, M. A., Hasani, S., Khanahmadi, A., Zerehdaran, S., 2012. Effect of polymorphic variants of GH, Pit-1, and β -LG genes on milk production of Holstein cows. Russ. J. Genet. 48, 417-421.

Huang, W., Maltecca, C., Khatib, H., 2008. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. *Anim. Genet.* 39, 554-557.

Javanmard, A., Asadzadeh, N., Banabazi, M. H., Tavakolian, J., 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Iran. J. Biotechnol.* 3, 104-108.

Komisarek, J., 2010. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 28, 133-141.

Komisarek, J., Antkowiak, A., 2007. The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 10, 193-197.

Kulig, H., 2005. Association between leptin combined genotypes and milk performance traits of Polish Black-and-White cows. *Arch. Tierz.* 48, 547.

Kulig, H., Kmiec, M., Luczak, I. K., Andziak, G., 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on milk production traits of Jersey cows. *Turk J Vet Anim Sci.* 33, 143-146.

Liefers, S. C., Te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F., Van Der Lende, T., 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 85, 1633-1638.

Liefers, S. C., Te Pas, M. F., Veerkamp, R. F., Chilliard, Y., Delavaud, C., Gerritsen, R., van der Lende, T., 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mamm. Genome.* 14, 657-663.

Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., Te Pas, M. F. W., Chilliard, Y., Van der Lende, T., 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 227-238.

Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M., Strabel, T. 2004. Short communication: effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. *J. Dairy Sci.* 87, 3925-3927.

Mattos, K. K. D., Del Lama, S. N., Martínez, M. L., y Freitas, A. F. 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. *Pesq. agropec. Bras.* 39, 147-150.

Milazzotto, M. P., Rahal, P., Nichi, M., Miranda-Neto, T., Teixeira, L. A., Ferraz, J. B. S., Garcia, J. F., 2008. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livest Sci.* 114, 274-279.

Misrianti, R., Sumantri, C., Farajallah, A., 2011. Polymorphism identification of Pit1 gene in Indonesian buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein-Friesian cows. *Media Peternakan*, 33, 131.

Moody, D. E., Pomp, D., Barendse, W., 1995. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1. *Anim Genet*, 26, 45-47.

Munoz-Gutierrez, M., Findlay, P. A., Adam, C. L., Wax, G., Campbell, B. K., Kendall, N. R., Scaramuzzi, R. J., 2005. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2,-4 and-5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction*, 130, 869-881.

Nasr, M. A. F., Awad, A., El Araby, I. E., 2016. Associations of Leptin and Pituitary-Specific Transcription Factor Genes' Polymorphisms with reproduction and production traits in dairy buffalo. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 597-603.

Nicklin, L. T., Robinson, R. S., Marsters, P., Campbell, B. K., Mann, G. E., Hunter, M. G., 2007. Leptin in the bovine corpus luteum: receptor expression and effects on progesterone production. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 724-729.

Oprzadek, J., Flisikowski, K., Zwierzchowski, L., Dymnicki, E., 2003. Polymorphisms at loci of leptin [LEP], Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 3.

Ozdemir, M., 2012. Determination of PIT-1/HINF1 polymorphism in Holstein and native ear cattle raised as genetic resource in Turkey. *J Anim Plant Sci.* 22, 25-28.

Pirlo, G., Miglior, F., Speroni, M., 2000. Effect of age at first calving on production traits and on difference between milk yield returns and rearing costs in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 83, 603-608.

- Pradnyana, D. I. L., Pemayun, T. G., Damriyasa, I., y Dharmawan, N. S., 2016a. Administration of Leptin increases the level of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and development of ovarian follicles in postpartum anestrus of Bali cattle. *Bali Med J.* 5, 69-73.
- Pradnyana, D. I. L., Pemayun, T. G., Damriyasa, I., y Dharmawan, N. S., 2016b. Administration of Leptin increased concentration of estrogen and accelerate the emergence of estrus in post partum anestrus of Bali cattle. *Glob Vet.* 17, 482-486.
- Pushpakumara, P. G. A., N. H. Gardner, C. K. Reynolds, D. E. Beaver, y Wathes, D. C. 2003. Relationships between transition diet, metabolic parameters and fertility in lactating cows. *Theriogenology.* 60:1165–1185
- Radostits, O. 2003. Herd health: food animal production medicine. tercera ed. Pensilvania, United States, W.B. Saunders Company.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 4.6): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity.* 86:248-249.
- Renaville, R., Gengler, N., Vrech, E., Prandi, A., Massart, S., Corradini, C., Portetelle, D., 1997. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 80, 3431-3438.
- Sahana, G., Guldbbrandtsen, B., Bendixen, C., Lund, M. S., 2010. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Anim Genet.* 41, 579-588.
- Salazar-Carranza, M., Castillo-Badilla, G., Murillo-Herrera, J., Hueckmann-Voss, F., Romero-Zúñiga, J. J., 2013. Edad al primer parto en vacas Holstein de lechería especializada en Costa Rica. *Agron Mesoam.* 24, 233-243.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2013. Statistical Analysis Systems. SAS® (versión 9.4) para Windows. SAS Institute Inc Cary (North Carolina) 27513 USA.
- Spicer, L. J. 2001. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinolo.* 21, 251-270.

- Van Eenennaam, A. L., Weigel, K. A., Young, A. E., Cleveland, M. A., Dekkers, J. C., 2014. Applied animal genomics: results from the field. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2, 105-139.
- Vargas, L. D., Gana, V. E., Escudero, I. F., 2004. Pit-1 gene polymorphism in dairy cows from Central Chile. *Arch Zootec.* 53, 217-220.
- WatCut. 2014. An on-line tool for restriction analysis, silent mutation scanning, and SNP-RFLP analysis. <http://watcut.uwaterloo.ca/template.php>.
- Wathes, D. C., Bourne, N., Cheng, Z., Mann, G. E., Taylor, V. J., Coffey, M. P., 2007. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1310-1325.
- Woollard, J., Schmitz, C. B., Freeman, A. E., Tuggle, C. K., 1994. Rapid communication: *HinfI* polymorphism at the bovine Pit-1 locus. *J. Anim Sci.* 72, 3267.
- Yan, L. J., Liu, B., Fang, X. T., Chen, H., Zhang, R. F., Bao, B., Zhang, H. J., 2006. Analysis of POU1F1 gene polymorphisms in Qinchuan cattle and Chinese Holstein cattle. *Yi Chuan.* 28, 1371-1375.
- Yazdani, H., Rahmani, H. R., Edris, M. A., Dirandeh, E., 2010. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *Afr. J. Biotechnol.* 9(36).
- Ye, Y., Kawamura, K., Sasaki, M., Kawamura, N., Groenen, P., Gelpke, M. D. S. Tanaka, T., 2009. Leptin and ObRa/MEK signalling in mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Reprod. Biomed. Online.* 19, 181-190.
- Yu, Y., Pang, Y., Zhao, H., Xu, X., Wu, Z., An, L., Tian, J., 2012. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. *J Anim Sci Biotechnol.* 3, 35.
- Zakizadeh, S., Reissmann, M., Rahimi, G., Javaremi, A. N., Reinecke, P., Mirae-Ashtiani, S. R., Shahrabak, M. M., 2007. Polymorphism of the bovine POU1F1 gene: allele frequencies and effects on milk production in three Iranian native breeds and Holstein cattle of Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 10, 2575-2578.

7. CONCLUSIONES GENERALES

- Se identificaron 3 polimorfismos en genes candidatos asociados a la fertilidad, el polimorfismo A59V del gen Leptina (LEP), el polimorfismo HinfI del gen Factor de transcripción de la pituitaria (Pit-1) y el SNP rs41256850 del gen del receptor de la hormona Luteinizante.
- Se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas para los genes candidatos LEP, PIT-1 y LHR.
- Se estimó los efectos de los marcadores de los genes candidatos asociados a fertilidad sobre las características evaluadas, donde el genotipo CC del gen LEP se asoció favorablemente con la característica intervalo parto concepción y el genotipo AA del gen Pit-1 con la característica edad al primer parto.

8. ANEXOS

Estadística descriptiva de las variables evaluadas

Variables	Número	Media	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
EPP (días)	145	908.296552	196.411774	518	1776
IPC(días)	254	153.362205	89.1657132	41	446
IEP(días)	185	434.859459	80.8610707	309	673
NSC	320	2.240625	1.43672376	1	10
PL305	266	5377.8985	1380.09508	1974	9720