

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

Detection of Polymorphisms Within the Coding Region of Luteinizing Hormone Receptor Gene by Single-strand Conformation Polymorphism Analysis and Sequencing in Carora Cattle

Belkys Josefina Vásquez-Marín¹, Alexis Feliciano Márques-Urdaneta², Geomar Seijas-Pedroza², Oscar De La Rosa² y José Atilio Aranguren-Méndez³

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Producción Animal. CENIAP.

² Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Laboratorio de Biotecnología Agrícola. ESAT.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. *belkysvasquez68@gmail.com

RESUMEN

Con el objeto de caracterizar los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) presentes en una región del exón 11 del gen receptor de hormona luteinizante en bovinos Carora, se analizaron 98 muestras de ADN bovino pertenecientes al banco de ADN del laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT). El ADN se extrajo mediante una metodología de precipitación salina. Las secuencias variantes fueron evidenciadas en primera instancia por amplificación del segmento de interés y análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (PCR-SSCP). Se detectaron cuatro patrones electroforéticos en el fragmento estudiado. Luego, 19 muestras representativas de cada uno de los patrones fueron amplificadas y enviadas a un servicio de secuenciación capilar estándar (Macrogen, Inc., Corea). Se detectaron dos variantes en el fragmento de ADN evaluado: rs41256848 (1410G>T) detectada previamente y una variante nueva (1337C>T). Se detectaron dos alelos (G y T) y tres genotipos (GG, GT, TT) para la variante rs41256848; y dos alelos (C y T) y dos genotipos (CC, CT) para la variante nueva. Las frecuencias alélicas para la variante rs41256848 fueron 0,852 – 0,147 para G y T, respectivamente; mientras que para la nueva variante fueron 0,964 – 0,035 para C y T, respectivamente. Las frecuencias genotípicas para rs41256848 fueron

0,7551 – 0,1938 – 0,0510 para GG, GT, TT, respectivamente; para la variante nueva fueron 0,9285 – 0,0071 para CC, CT, respectivamente. La muestra poblacional estudiada no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para la variante rs41256848. Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron la presencia de polimorfismos en el fragmento de *LHR* estudiado, en animales Carora.

Palabras clave: Polimorfismo, ADN, SNP, SSCP, hormona, bovino.

ABSTRACT

In order to characterize the simple nucleotide polymorphisms (SNPs) within of exon 11 of the luteinizing hormone receptor gene in Carora cattle, 98 bovine DNA samples belonging to the DNA Bank Agricultural Biotechnology Laboratory of the Socialist School Tropical Agriculture (ESAT) were analyzed. The DNA is extracted by salting-out methodology. The variants sequences were evidenced by amplification of the segment and single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP). Four electrophoretic patterns were detected in the studied fragment. Then, 19 representative samples of each of the patterns, were amplified and sent to a standard capillary sequencing service (Macrogen, Inc., Korea). Two variants were detected in the DNA fragment evaluated: rs41256848 (1410G> T) previously detected and a new variant (1337C> T). Two alleles (G and T) and three genotypes

(GG, GT, TT) for variant rs41256848 detected; and two alleles (C and T) and two genotypes (CC, CT) for the new variant. The allele frequencies for rs41256848 variant were 0.852 - 0.147 for G and T, respectively; while for the new variant was 0.964 - 0.035 for C and T, respectively. The genotype frequencies for rs41256848 were 0.7551 - 0.1938 - 0.0510 for GG, GT, TT, respectively; for the new variant were from 0.9285-o 0.0071 for CC, CT, respectively. The studied sample population is not in Hardy-Weinberg equilibrium for the rs41256848 variant. The results obtained in this investigation showed the presence of polymorphisms in the LHR fragment studied in Carora animals.

Key words: Polymorphism, DNA, SNP, SSCP, hormone, bovine.

INTRODUCCIÓN

La subfertilidad en los animales domésticos es una condición multifactorial compleja, difícil de diagnosticar y tratar. En el caso de la hembra puede manifestarse con un retorno tardío al estro después del parto, falla para ovular, patrones de desarrollo folicular inapropiados y la no manifestación del estro [31]. En el caso del macho, libido baja y calidad seminal pobre [30, 35].

Una vía para mejorar los rasgos de fertilidad en la especie *Bos taurus* es identificar marcadores moleculares en genes que tienen efectos directos sobre aspectos específicos de la reproducción. En este sentido, el receptor de hormona luteinizante (LHR), producto de la expresión del gen *LHR*, tiene un rol fundamental en la regulación de la actividad reproductiva, ya que la acción de la hormona luteinizante (LH) se concreta por la unión de ésta a su receptor [9]. Interviene en la esteroidogénesis ovárica y ovulación en la hembra, además de la producción de testosterona en las células de Leydig del testículo [2]. La expresión de *LHR* en las células de la granulosa del folículo dominante es esencial en los estadios finales de crecimiento folicular, maduración final del oocito, ovulación y luteinización de la pared folicular [17]. Por consiguiente, *LHR* es fundamental para la foliculogénesis, desde que se establece la dominancia folicular hasta la ovulación [5, 13, 28, 29].

LHR es una proteína que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados al nucleótido Guanina (GPCRs o proteína G) [2] y debido a su habilidad para unirse con alta afinidad, tanto a LH como a la gonadotropina coriónica humana (hCG), también se ha designado con las siglas LHCGR [24], y al gen que la codifica *LHCGR*. Se han descrito variantes del ARNm de *LHR* que se producen por empalme alternativo en diferentes especies [1, 4, 21, 28, 33].

Adicionalmente, tres polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) en el exón 11 de *LHR* (rs41256848, rs41256849, rs41256850) [8] han sido identificados y asociados con rasgos de fertilidad en bovinos Holstein - Friesian [15] así como con respuestas favorables a tratamientos superovulatorios en Holstein [37]. Sin embargo, a la fecha, no se han identificado marcadores moleculares en genes de interés reproductivo en

las ganaderías locales, las cuales constituyen una fuente importante de diversidad genética.

Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue identificar la variante rs41256848 en el exón 11 de *LHR* mediante la reacción en cadena de la polimerasa seguida por análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (PCR-SSCP) y secuenciación en bovinos Carora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales analizados y obtención de ADN

Se utilizaron 98 muestras pertenecientes al banco de ADN del laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT), Maracay-Aragua; provenientes de rebaños bovinos Carora ubicados en los estados Lara y Aragua. El ADN genómico fue aislado a partir de sangre periférica obtenida por punción coccígea, refrigerada en nevera VWR™ (True Manufacturing Company, EUA) a 4°C y conservada con EDTA (ácido etilen diamino tetraacético). Se utilizó una metodología de precipitación salina [10], luego el ADN se mantuvo congelado a -56°C en ultracongelador Thermo™ (Electron Corporation, EUA) hasta la realización de los análisis.

Cebadores y amplificación de ADN por PCR

El conjunto de cebadores descritos [25] (F- CAA- ACTGACAGTCCCCGCTTT; R- CCTCCGAGCATGACTGG AATGGC) fue utilizado para amplificar mediante PCR, un fragmento de 303 pares de bases (pb) correspondiente a la región de interés del exón 11 del gen *LHR*. El sitio de amplificación y la ubicación de los cebadores utilizados se describen en la FIG. 1.

Para las reacciones de amplificación se utilizó el estuche GoTaq® Flexi (Promega, EUA), en un volumen total de reacción de 15 µL, siguiendo las proporciones de la TABLA I. Se utilizó un termociclador GenePro™ (Bioer Technology Co., China) y un programa TouchDown [19], tal y como se especifica en la TABLA II.

Técnica de marcadores SSCP

Una vez realizada la PCR, se adicionó a cada amplicón una solución desnaturante (formamida 95%: azul de bromofenol 0,5%: EDTA 25 mM) en una proporción 2:1. La mezcla fue desnaturada a 95°C durante 10 minutos (min). Esto fue seguido por un enfriamiento rápido en bloque frío. Luego, se colocaron en un congelador a -20°C (FFE24, Electrolux, Venezuela) durante 10 min; pasado este tiempo se procedió a realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida para verificar los SSCP.

El fragmento de interés del exón 11 de *LHR*, fue resuelto en geles de poliacrilamida no desnaturante (37,5:1 acrilamida/bisacrilamida, degasificada por 30 min en una bomba de vacío, BIORAD Hydrotech™), al 6%, en buffer Tris Borato EDTA 0,5x (TBE), 5% de glicerol, con medidas de 20 x 22 cm, duran-

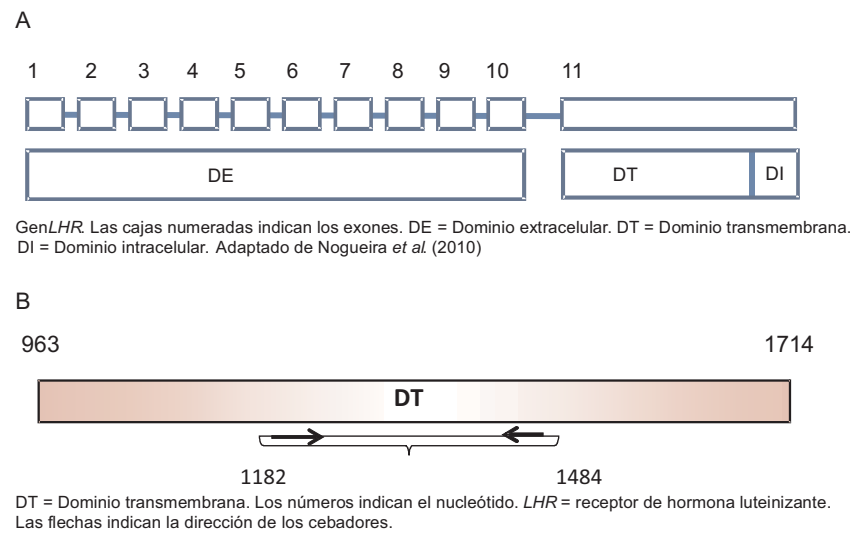


FIGURA 1. SITIO DE AMPLIFICACIÓN Y UBICACIÓN DE LOS CEBADORES EN LA ESTRUCTURA DEL GEN *LHR*.

TABLA I
CONCENTRACIONES MOLARES DE LA MEZCLA
DE REACCIÓN DE PCR PARA EL FRAGMENTO
ESTUDIADO DEL EXÓN 11 DE *LHR*

Reactivo	Concentración
Buffer (5X)	1X
MgCl ₂ (25mM)	2,1 mM
dNTPs(10mM)	0,2 mM
Oligo A(10µM)	0,2 µM
Oligo B(10µM)	0,2 µM
Taq (5U/µL)	1 U

Volumen de agua para la reacción = 7,14 µL. Cantidad de ADN genómico = 50 ng. *LHR* = receptor de hormona luteinizante.

TABLA II
PROGRAMA TOUCHDOWN PARA LA REACCION DE PCR
DEL FRAGMENTO ESTUDIADO DEL EXÓN 11 DE *LHR*

Fase PCR	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial		95°C	5min
Desnaturalización	Ciclos	95°C	30seg
Hibridación (-1°C/c)	10	61°C	30seg
Extensión		72°C	45seg
Desnaturalización	Ciclos	95°C	30seg
Hibridación	20	51°C	30seg
Extensión		72°C	45seg
Extensión final		72°C	10min

te 3 horas 30 min, a 30 mA constantes, en cámaras de electroforesis vertical duales ajustables (C.B.S Cientific, SG-400-20, EUA). Los geles fueron teñidos en una solución de TBE (0,5X)

y SYBER® safe (Invitrogen, EUA) al 0,7%, durante 25 min en agitación suave en un agitador orbital (MaxQ4000, Barnstead-International, EUA). Una vez teñidos, los patrones electroforéticos fueron visualizados a través de un digitalizador de imágenes UVIPROchemi™ (2000/26M, UVITEC, Reino Unido).

Secuenciación de ADN y genotipado

A partir de 19 muestras representativas de cada patrón electroforético diferencial, se amplificó el fragmento de interés mediante PCR. Los amplicones obtenidos fueron sometidos a un protocolo de secuenciación capilar estándar (Macrogen Inc., Corea), en ambos sentidos. Las secuencias fueron editadas y alineadas entre sí utilizando los programas DNABaser [11] y CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, EUA). La secuencia consenso fue comparada con la referencia NM_174381.1 [32]. Se compararon los SNPs detectados con aquellos existentes en la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica (NCBI) [34].

Para evaluar la estructura genética de las poblaciones bajo estudio, se determinó visualmente la correspondencia de los SNPs detectados por secuenciación con cada patrón SSCP obtenido, y de esta manera se realizó el genotipado de cada SNP, en la muestra poblacional estudiada. Una vez asignados los genotipos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP con el programa Fstat v2.9.3.2 [14], y se verificó el equilibrio de Hardy – Weinberg con el programa de análisis genético Arlequín [20], mediante una prueba de bondad de ajuste (χ^2), con una significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Patrones de movilidad electroforética obtenidos

Se detectaron cuatro patrones electroforéticos en el fragmento de *LHR* analizado por PCR-SSCP (FIG. 2). Según

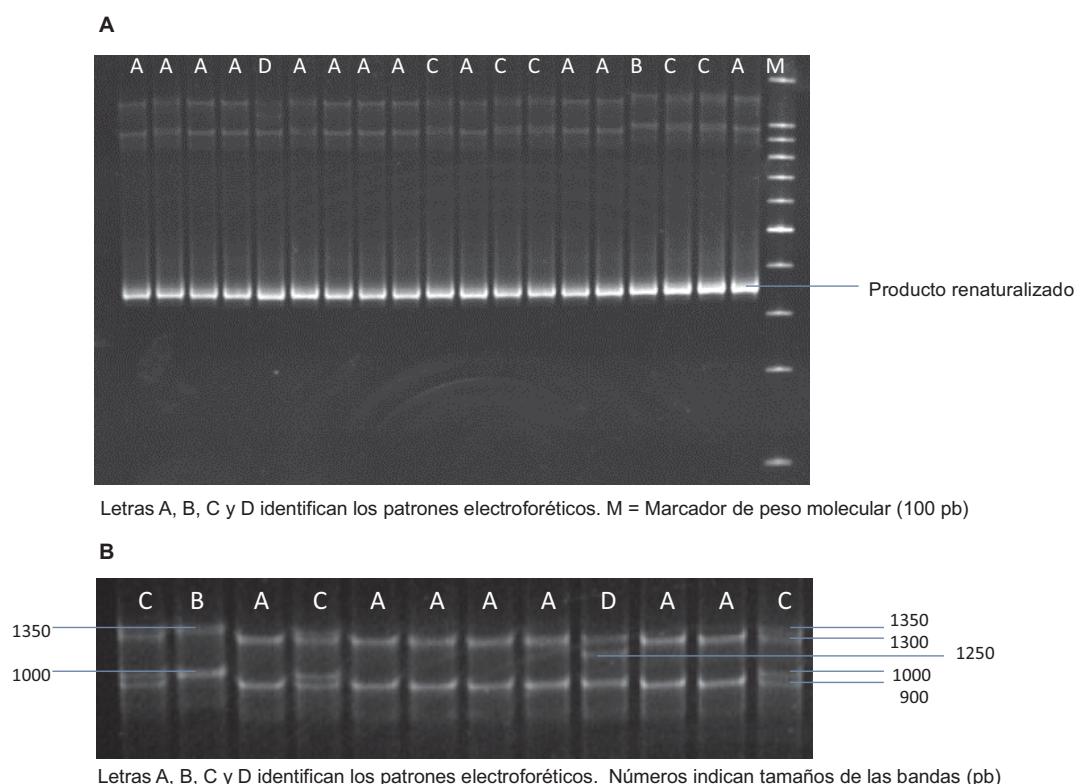


FIGURA 2. PATRONES ELECTROFORÉTICOS OBTENIDOS EN EL FRAGMENTO DE INTERÉS EN EL EXÓN 11 DE *LHR* EN ANIMALES CARORA.

la movilidad electroforética, aparecieron cinco tamaños moleculares en este fragmento (TABLA III). En el trabajo realizado por Milazzotto y col. [25] se analizó un fragmento idéntico al estudiado en la presente investigación, sin embargo, estos investigadores reportaron solamente tres patrones electroforéticos. Yu y col. [37] estudiaron la misma región de *LHR* bovino evaluada en el presente ensayo, aunque en un fragmento de menor tamaño. Estos investigadores señalan igualmente tres patrones electroforéticos. Los resultados obtenidos en el presente experimento referidos a los patrones electroforéticos A, B y C son semejantes a los obtenidos por Yu y col. [37]. Sin embargo, en la presente investigación se detectó un patrón adicional, asignado con la letra D (TABLA III).

La aparición de este patrón adicional identificado con la letra D podría indicar que, existe una variación en las cadenas simples de ADN de los animales utilizados en el presente ensayo, con respecto a los animales utilizados en experimentos anteriores [25, 37]. Esto se debe a que la ejecución de la técnica de marcadores PCR-SSCP se basa en la separación electroforética del ADN monocatenario, el cual asume una conformación tridimensional de acuerdo a su estructura primaria [26, 36], lo cual promueve diferentes velocidades de desplazamiento en la matriz electroforética.

No se puede especular en cuanto a la diferencia de los resultados obtenidos; sin embargo, el grupo racial podría contribuir a las diferencias observadas, ya que estos investigadores evaluaron animales *Bos indicus* [25] y Holstein [37].

Polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) obtenidos

El alineamiento de secuencias realizado permitió detectar la presencia de dos polimorfismos (TABLA III). De éstos, la variación rs41256848 ubicada en 1410G>T había sido reportada previamente [8, 15, 18, 37], mientras que la ubicada en 1337C>T constituye una variante nueva que no había sido reportada en la base de datos de SNP del NCBI [34]. Como resultado del presente ensayo, esta secuencia variante fue sometida a esa base de datos [34], y se le asignó el número de entrada ss974751668. El SNP rs41256848 resultó una transversión, mientras que ss974751668 fue una transición. De acuerdo a Nei y Kumar [27], las sustituciones nucleotídicas que ocurren con más frecuencia en el ADN son transiciones en comparación a las transversiones.

La variante rs41256848 fue reportada por primera vez [15], en ganado Holstein - Friesian. Constituye una mutación con cambio de sentido que promueve la aparición de un codón que codifica un aminoácido diferente. Es importante destacar que esta variante fue comprobada por re secuenciación de baja cobertura en vacas Fleckvieh [18]. En cuanto a la variante nueva, es igualmente una mutación puntual con cambio de sentido. Por otra parte, de las dos variantes, la rs41256848 constituye una mutación no conservada, es decir, el aminoácido nuevo no conserva las propiedades del anterior. Esto podría causar una pérdida, ganancia o sobre activación de la función proteica.

TABLA III
PATRONES SSCP OBTENIDOS A PARTIR DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL FRAGMENTO ESTUDIADO DEL EXÓN 11 DE *LHR* EN GANADO CARORA

Ubicación en la referencia NM_174381.1	Patrones SSCP			
	A	B	C	D
Fragmento de 303 pb ubicado entre 1182 y 1484	900/1300	1000/1350	900/1000/1300/1350	900/1250/1300
Ubicación en la referencia NM_174381.1	Polimorfismos detectados			
	Cambio nucleotídico	Cambio aminoácido	Tipo de mutación	Variante
1337	1337>CT	Ala120Val	Transición	ss974751668
1410	1410>GT	Trip144Cys	Transversión	rs41256848

Patrón SSCP (pb): Tamaño molecular de las bandas obtenidas.

Se han descrito mutaciones que producen pérdida o ganancia de la función, en los genes que codifican a los receptores de gonadotropinas [16]. Según este autor, las mutaciones con pérdida de función son inactivantes, mientras que las variaciones con ganancia de función son de naturaleza dominante. De acuerdo con esto y a la naturaleza de la variante rs41256848, se requiere realizar estudios de asociación con rasgos reproductivos para verificar los efectos de esta variante sobre el fenotipo.

Genotipado de la muestra poblacional

La determinación de la correspondencia de cada patrón SSCP con los polimorfismos detectados por secuenciación, permitió el genotipado de los SNPs detectados en la muestra poblacional estudiada. Este análisis resultó complejo, debido a la presencia de más de una variación en el fragmento.

Al analizar los patrones electroforéticos y las mutaciones presentes en el fragmento de *LHR* bajo estudio, se pudo observar que los patrones son el resultado de las combinaciones resultantes entre ambas mutaciones (TABLA IV). En este sentido, los individuos que presentaron el patrón electroforético D (900/1250/1300), son portadores de la transición 1337C>T en heterocigosis y la transversión 1410G>T en homocigosis GG. Una razón posible por la que no se haya reportado este patrón electroforético [37], es la ausencia de la mutación 1337C>T en la población estudiada por estos investigadores.

Por otra parte, los individuos que mostraron un patrón C (900/1000/1300/1350) en este mismo fragmento son portadores de la mutación 1337C>T en homocigosis CC y la transversión 1410G>T en heterocigosis. El patrón B (900/1300) lo presentaron los animales portadores del polimorfismo 1337C>T en homocigosis CC y el correspondiente a 1410G>T en homocigosis GG. Por último, aquellos individuos que presentaron el patrón A (1000/1350), alojaban la mutación 1337C>T en homocigosis CC, mientras que la correspondiente a 1410G>T, se presentó en homocigosis TT.

Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg

Se realizaron los cálculos de las frecuencias alélicas y genotípicas como estimadores de la diversidad genética en la población estudiada. Los datos obtenidos a partir de las variantes estudiadas en el fragmento de *LHR*, se describen en la TABLA V. La heterocigosidad esperada (H_e) y la observada (H_o) promedio fue $0,16133 \pm 0,1302$ y $0,13266 \pm 0,0866$, respectivamente.

Por otra parte, al observar los datos correspondientes a la verificación del equilibrio de Hardy – Weinberg, se pudo observar una desviación significativa para la variante 1410G>T ($P<0,05$). Estos resultados mostraron una H_o menor que la H_e observándose que existe un déficit de heterocigotos significativo para este locus en la muestra poblacional estudiada (TABLA V).

El postulado de Hardy – Weinberg establece que las razones por la cual una población puede encontrarse en desequilibrio son: apareamientos no aleatorios, efectos de la selección, efectos marcados de la migración o mutaciones sobre las frecuencias alélicas, tamaño pequeño de la población y por último que los alelos no estén segregando siguiendo un patrón mendeliano [12].

En las especies domésticas, las deficiencias de heterocigotos pueden ser explicadas por varios factores, entre los cuales podemos mencionar la presencia de alelos no amplificados (alelos nulos), selección contra heterocigotos, subdivisión de la población (efecto Wahlund) o consanguinidad [22], otros autores añaden la deriva genética aleatoria [23].

En el caso de las muestras de ganado Carora utilizadas en este ensayo, a pesar de que provienen de dos rebaños ubicados en regiones geográficas distintas, están emparentados y los animales de uno de estos rebaños provienen directamente del otro, es decir, que han sido sometidos al mismo esquema de selección. Por otra parte, para el año 2002 se reporta que el tamaño de la población de ganado Carora es reducida y que el uso de la inseminación artificial (IA) en esta raza tiene una cobertura de más del 85% [3]; por lo que la

TABLA IV
CORRESPONDENCIA DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS EN EL FRAGMENTO ESTUDIADO
CON LAS VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS 1337C>T Y 1410G>T

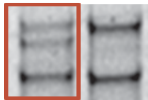
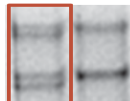
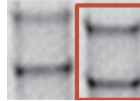
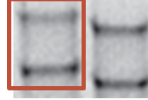
Fragmento	Patrón SSCP	1337C>T	1410G>T	
LHR	D		CT	GG
	C		CC	GT
	A		CC	GG
	B		CC	TT

TABLA V
FRECUENCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS Y EQUILIBRIO
DE HARDY-WEINBERG DE LOS SNPs DETECTADOS
EN ANIMALES CARORA

Variante	1337C>T			1410G>T	
Alelos	C	T		G	T
Frecuencia	0,964	0,035		0,852	0,147
Genotipos	CC	CT	GG	GT	TT
Frecuencia	0,9285	0,0071	0,7551	0,1938	0,0510
Equilibrio Hardy-Weinberg					
Variante	1337C>T			1410G>T	
H _e	0,0692			0,2534	
H _o	0,0714			0,1938	
P-value	1,0000			0,0334*	
s.d	0.0000			0.00018	

G = guanina, C = citosina, T = timina. H_e = heterocigosidad esperada. H_o = heterocigosidad observada. * Significativo.

baja heterocigosidad observada para la variante 1410G>T podría ser explicada por los posibles efectos de una selección artificial, acelerada por la IA y probablemente un número pequeño de reproductores.

Algunas de las variantes de LHR que han sido detectadas en trabajos previos han sido asociadas con rasgos reproductivos [15, 37]. Hasting y col. [15] lograron demostrar que, la variante rs41256848 (1410G>T) se encuentra en heterocigosis en los sementales Holstein evaluados por ellos y que la presencia del alelo T en la mutación podría tener un efecto favorable para la reproducción, en lo que refiere a la disminución del intervalo entre partos y días al primer servicio. Estos resul-

tados de investigación de la variante 1410G>T son opuestos a los presentados [37], ya que uno de los hallazgos más importantes de su trabajo, es que el alelo G y los genotipos GG y GT fueron asociados con respuestas favorables a los tratamientos de superovulación en ganado Holstein.

Al hacer una comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante rs41256848 (1410G>T) presentadas por Yu y col. [37], con las obtenidas en este estudio, se pudo observar algunas diferencias en cuanto a la frecuencia de aparición de los diferentes alelos y genotipos (TABLA VI). Esto podría explicarse por el hecho de la raza utilizada por estos investigadores fue Holstein [37] y es un hecho conocido la gran presión de selección que se ha realizado en esta raza para incrementar los índices de producción lechera [6]. En un estudio reciente realizado por Cochran y col. [7] se comprobó que, los genotipos de once SNP que resultaron favorables para el rasgo "tasa de preñez de las hijas", tenían un efecto inverso para producción de leche. A pesar de que las variantes estudiadas en la presente investigación no fueron incluidas en ese estudio [7], se podría inferir que en los animales utilizados por Yu y col. [37] han sido seleccionados para mejorar los rasgos de producción láctea, promoviendo cambios en las frecuencias genotípicas de los SNP asociados a rasgos reproductivos y en el caso particular de la presente investigación, diferencias en las frecuencias de aparición de los alelos y genotipos de la variante rs41256848 con respecto a los animales Carora.

Por último se debe mencionar que, uno de los genotipos (GG) reportados por Yu y col. [37], asociado a un gran número de embriones transferibles, se presenta con mayor frecuencia en el ganado local evaluado en la presente investigación, mientras que el menos favorable (TT) se encuentra en muy baja frecuencia (TABLA VI). Esto podría resultar ventajoso en caso de confirmarse esta asociación en los rebaños del país.

TABLA VI
COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS
Y GENOTÍPICAS OBTENIDAS PARA LA VARIANTE
1410G>T CON TRABAJOS ANTERIORES

Datos	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica		
	G	T	GG	GT	TT
Holstein*	0,398	0,602	0,150	0,496	0,354
Carora**	0,852	0,147	0,755	0,193	0,051

* (Yu *et al.*, 2012). **Datos propios.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los resultados obtenidos a partir del segmento del gen estudiado permiten demostrar la presencia de un polimorfismo que no ha sido reportado en otras razas, así como otro que ya había sido estudiado. Estos polimorfismos podrían estar asociados a fenotipos reproductivos diferenciales; sin embargo, se debe recordar que, la baja fertilidad es una condición multifactorial, compleja, difícil de diagnosticar y tratar, por lo que se requiere investigación exhaustiva en esta temática.

Por otra parte, en base a los resultados obtenidos, se recomienda incrementar la base muestral a fin de realizar una estimación más exacta de las frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos en los rebaños locales.

Se recomienda igualmente, promover y realizar estudios de asociación entre los polimorfismos identificados y rasgos de interés reproductivo, tales como edad a pubertad e intervalo entre partos, así como con rasgos de respuesta favorable a los tratamientos de sincronización de estros, superovulatorios y de inseminación artificial.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y a la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) por su apoyo financiero para la ejecución del trabajo experimental. Igualmente al personal del laboratorio de Biotecnología Agrícola de la ESAT por el apoyo técnico prestado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AATSINKI, J.; PIETILÄ, E.; LAKKAKORPI, J.; RAJANIEMI, H. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. **Molec. and cell endocrinol.** 84(1-2):127-135. 1992.

[2] ASCOLI, M.; FANELLI, F.; SEGALOFF, D. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. **Endocr. Rev.** 23(2):141-174. 2002.

[3] ASOCIACIÓN VENEZOLANA DE CRIADORES DE GANADO CARORA. Raza Carora, un logro tropical. Confe-

rencia presentada en XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera 22 al 26 de Octubre. ULA-Trujillo. 2002. En línea: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/razacaro-ra.PDF. 05-07-14.

[4] BACICH, D.; EARL, C.; O'KEEFE, D.; NORMAN, R.; RODGERS, R. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Molec. and cell endocrinol.** 147(1-2): 113-124. 1999.

[5] BARROS, C.; ERENO, R.; SIMÕES, R.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. **Reprod. ferti. and develop.** 22(1): 132-137. 2010.

[6] BERGLUND, B.; Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. **Reprod. Domest. Anim.** 43(s2): 89-95. 2008.

[7] COCHRAN, S.; COLE, J.; NULL, D.; HANSEN, P. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. **BMC Genetics.** 14: 49. 2013.

[8] DATABASE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. dbSNP accession:{rs41256848, rs41256849, rs41256850}. On line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> 06/01/2014.

[9] DAVIS, J. Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. **Curr. Opin. Obstet. Gyn.** 6:254- 261. 1994.

[10] DE LA ROSA, O.; MARQUES, A.; VÁSQUEZ, B.; SEIJAS, G.; DICKSON, L. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. **II Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación.** Caracas, 07- 10 de noviembre, Venezuela. Pp 437-438. 2013.

[11] DNA Baser, S. A. DNA Baser Sequence Assembler. 2012. Romania: Heracle BioSoft SRL. On line: <http://www.DnaBaser.com>. 06/01/2014.

[12] FREELAND, J. Genetic analysis of single population. Chapter 3. In: **Molecular ecology.** 1° Ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England. Pp 68. 2005.

[13] GINTHER, O.; BERGFELT, D.; BEG, M.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biol of Reprod.** 64(1): 197-205. 2001.

[14] GOUDET, J. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **J. Heredity** 86: 485-486. 1995. FSTAT 2.9.3.2 On line: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. 05/01/2014.

[15] HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; FLINT, A.; WOOLLIAMS, J. Polymorphisms within the coding re-

- gion of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Anim. Genetics**. 37(6): 583-585. 2006.
- [16] HUHTANIEMI, I. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? **J. Reprod. Fertil.** 119(2): 173-186. 2000.
- [17] HYTTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T.. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenol.** 47(1): 23-32. 1997.
- [18] JANSEN, S.; AIGNER, B.; PAUSCH, H.; WYSOCKI, M.; ECK, S.; BENET-PAGÈS, A.; FRIES, R. Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. **BMC Genom.** 14(1): 446. 2013.
- [19] KORBIE, D.; MATTICK, J. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nat. Protoc.** 3(9): 1452 – 1456. 2008.
- [20] LISCHER, H.; EXCOFFIER, L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molec. Ecol. Resour.** 10: 564-567. 2010.
- [21] MADHRA, M.; GAY, E.; FRASER, H.; DUNCAN, W. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. **Molec. Human. Reprod.** 10(8): 599-603. 2004.
- [22] MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **J. Anim. Sci.** 80: 942- 950. 2002.
- [23] MELKA, M.; SHENKEL, F. Analysis of genetic diversity in Brown Swiss, Jersey and Holstein populations using genome-wide single nucleotide polymorphism markers. **BMC Res. Notes.** 5: 161. 2012.
- [24] MENON, K.; MENON, B. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors - a perspective. **Molec. and cell endocrinol.** 356(1-2): 88-97. 2012.
- [25] MILAZZOTTO, M.; RAHAL, P.; NICHI, M.; MIRANDANETO, T.; TEIXEIRA, L. A.; FERRAZ, J.; GARCIA, J. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). **Livest. Sci.** 114(2): 274-279. 2008.
- [26] NATARAJ, A.; OLIVOS-GLANDER, I.; KUSUKAWA, N.; HIGHSMITH, W. E. Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. **Electroph.** 20(6): 1177-1185. 1999.
- [27] NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Basis of Evolution. In: **Evolutionary Genetics**. Oxford University Press, Inc. Pp 9-10. 2000.
- [28] NOGUEIRA, M.; BURATINI, J.; PRICE, C.; CASTILHO, A.; PINTO, M.; BARROS, C. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molec. Reprod and Develop.** 74(6): 680–686. 2007.
- [29] NOGUEIRA, M.; FERNANDES, P.; ERENO, R.; SIMOES, R.; BURATINI, J.; BARROS, C. Luteinizing Hormone Receptor (LHR): basic concepts in cattle and other mammals. A review. **Anim. Reprod.** 7 (2): 51-64. 2010.
- [30] PARKINSON, T. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **Vet. J.** 168 (3): 215- 229. 2004.
- [31] PETER, A.; VOS, P.; AMBROSE, D. Postpartum anestrus in dairy cattle. **Theriogenol.** 71 (9): 1333- 1342. 2009.
- [32] PRUITT, K.; BROWN, G.; HIATT, S.; THIBAUD-NISSEN, F.; ASTASHYN, A.; ERMOLAEVA, O.; FARRELL, C.; HART, J.; LANDRUM, M.; MCGARVEY, K.; MURPHY, M.; O'LEARY, N.; PUJAR, S.; RAJPUT, B.; RANGWALA, S.; RIDDICK, L.; SHKEDA, A.; SUN, H.; TAMEZ, P.; TULLY, R.; WALLIN, C.; WEBB, D.; WEBER, J.; WU, W.; DICUCIO, M.; KITTS, P.; MAGLOTT, D.; MURPHY, T.; OSTELL, J. Ref. Seq: an update on mammalian reference sequences. 2013. **Nucleic Acids Res.** 42: D756-D763. On line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24259432>. 06/01/2014.
- [33] SAINT-DIZIER, M.; CHOPINEAU, M.; DUPONT, J.; DAELS, P.; COMBARNOUS, Y. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. **Biol. of Reprod.** 69(5): 1743-1749. 2003.
- [34] SHERRY, S.; WARD, M.; KHOLODOV, M.; BAKER, J.; PHAN, L.; SMIGIELSKI, E.; SIROTKIN, K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res.** 29(1):308- 311. 2001.
- [35] SMITH, MF1.; MORRIS, DL.; AMOSS, MS.; PARISH, NR.; WILLIAMS, JD.; WILTBANK, JN. Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenol.** 16(4):379-97. 1981.
- [36] TESCHAUER, W.; MUSSACK, T.; BRAUN, A.; WALDNER, H.; FINK, E. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. **Eur. J. Clin. Chem. Biochem.** 34(2), 125-131. 1996.
- [37] YU, Y.; PANG, Y.; ZHAO, H.; XU, X.; WU, Z.; AN, L.; TIAN, J. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. **J. of Anim. Sci. and Biotechnol.** 3(1): 35. 2012.