



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

BÚSQUEDA Y ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS CON LA EDAD DE PUBERTAD EN
TOROS ANGUS

María Elena Fernández

Director: Dr. Guillermo Giovambattista
Codirector: Dr. Juan Pedro Lirón
Asesor académico: Dr. Andrés Giovambattista

Año 2015

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP-CCT-La Plata-CONICET, bajo la dirección del Dr. Guillermo Giovambattista y la codirección del Dr. Juan Pedro Lirón.

*A mis queridos padres,
María Elisa y Nicanor*

AGRADECIMIENTOS

Me resulta emocionante llegar a escribir los agradecimientos y pensar en todas las personas que me han acompañado y apoyado durante los últimos 5 años. Por eso quisiera agradecer a los que de una u otra manera colaboraron con la realización de mi Doctorado.

En primer lugar, quiero expresar mi sincero y profundo agradecimiento a mis Directores, Guille y Pedro, quienes me han enseñado tanto, y quienes hicieron posible que yo haya llegado hasta acá. Guille, siempre presente, con su buena predisposición y su trato amable, siempre disponible para enseñar. Gracias por brindar tu estímulo al trabajo continuamente y contagiar tu optimismo. Pedro, todos los días dispuesto a enseñarme algo nuevo, estimulándome a querer saber siempre un poco más. Gracias por no parar nunca de enseñarme, por nuestras largas charlas, y también por hacerme reír y hacer entretenidos los días de trabajo. Muchas gracias a ambos por las posibilidades que me dieron. También quisiera agradecer al Dr. Andrés Giovambattista, por aceptar ser mi Asesor Académico.

Mi reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por otorgarme las becas que me permitieron dedicarme de manera exclusiva a mis estudios de Doctorado; a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme el ámbito para realizar mis estudios de posgrado. Gracias al IGEVET, un lugar hermoso para trabajar, y a su Directora, Pilar, por permitir mi incorporación al grupo, y por estar presente cada vez que necesité algo.

A Egle, Moni, Vero, Andrés y Diego, los primeros que me recibieron cálidamente cuando llegué al Instituto y siempre estuvieron conmigo, ayudándome tanto en lo laboral como en lo personal. Muchas gracias por sus valiosos consejos que me fueron guiando durante el camino del Doctorado; gracias por su apoyo, por su generosidad y por hacerme sentir su cariño.

A mis compañeros del Instituto, con quienes compartí todos estos años y de quienes recibí cariño y apoyo: Hernán, Nadia, Elisa, Laura, Julián, Suani, Daniel, Claudia y Agustín; y también con quienes compartí el día a día: Carlos, Analía, Juana, Gisela, Gisela, Julio, Mariana, Lucía y Betty. Todos ustedes han estado cerca mío durante estos años, y de todos aprendí algo y recibí afecto y/o ayuda. Gracias a todos ustedes.

También quiero agradecer a mis compañeros de Cátedra, Silvina y Germán, por darme la posibilidad de incorporarme a la Cátedra, y por estar dispuestos a ayudarme cuando lo necesité.

A mis amigos de siempre, Andre, Cari, Lu, Juan y Lore, gracias por estar siempre.

A mis hermanas, que siempre están conmigo, como siempre. A mi sobrino Nicanor, que saca lo mejor de mí y que me alegra la vida. Gracias porque sin saberlo me acompañaste mucho durante estos años, sacándome una sonrisa siempre. A Josefina, mi sobrinita por llegar; gracias por venir.

A Germán, gracias por acompañarme y darme tu confianza, por transmitirme tus ganas de ir hacia adelante, por tu paciencia, y sobre todo por quererme incondicionalmente.

A mis padres, gracias por darme todo, desde la vida hasta lo que soy hoy. Muchas gracias por todo su esfuerzo para que yo pueda estudiar, y por educarme con el ejemplo. A mi Papá, gracias por no irte sin enseñarme antes todo lo que necesitaba para la vida. A mi Mamá, gracias por tu amor que contagia, tu paciencia y tu bondad, por alentarme y por ser feliz con mis logros.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en:

Lirón JP, Prando A, Fernández ME, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Goszczynski DE, Posik DM, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G. 2012. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genetics* 13: 26. doi: 10.1186/1471-2156-13-26.

Fernández ME, Lirón JP, Prando A, Rogberg-Muñoz A, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G. 2014. Evidence of association of a BTA20 region peaked in ISL1 with puberty in Angus bulls. *Livestock Science* 167: 9-18. doi: 10.1016/j.livsci.2014.05.009

Fernández ME, Goszczynski DE, Prando A, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G, Lirón JP. 2014. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms in thyroglobulin gene with age of puberty in bulls. *Journal of Animal Science and Technology* 56: 17. doi:10.1186/2055-0391-56-17

Fernández ME, Prando A, Rogberg-Muñoz A, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G, Lirón JP. 2015. Association of a region of bovine chromosome 1 (BTA1) region with age at puberty in Angus bulls. *Reproduction, Fertility and Development*. En prensa.

ÍNDICE

<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	XIII
<i>RESUMEN</i>	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 PUBERTAD</i>	3
1.1.1 Regulación del desarrollo sexual en mamíferos	4
1.1.2 Integración del metabolismo y el crecimiento con la pubertad	9
1.1.3 Participación de microARNs en la regulación de la pubertad	11
<i>1.2 PUBERTAD EN BOVINOS</i>	13
1.2.1 Definición	13
1.2.2 Patrones hormonales y desarrollo del tracto reproductivo durante la maduración sexual en toros	13
1.2.3 Importancia de la pubertad en bovinos	15
1.2.4 Caracteres reproductivos y variabilidad entre razas	17
1.2.5 Factores adicionales que influyen en la pubertad en bovinos	18
1.2.6 Estudio de caracteres cuantitativos	20
1.2.7 Marcadores genéticos asociados a caracteres reproductivos en bovinos	22
<i>1.3 OBJETIVOS</i>	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Material animal	31
2.2 Datos fenotípicos	31
2.3 Extracción de sangre y ADN	32
2.4 Búsqueda y selección de genes candidatos	32
2.5 Secuenciación y búsqueda de polimorfismos	39
2.5.1 Amplificación por PCR	39

- <i>Gen del Receptor de la Hormona Luteinizante (LHR)</i>	39
- <i>Gen del receptor de Kisspeptina 1 (KISS1R)</i>	40
2.5.2 Corridas electroforéticas	41
2.5.3 Purificación de los productos de PCR	42
2.5.4 Reacción de secuenciación	42
2.5.5 Secuenciación	43
2.5.6 Análisis de las secuencias	44
2.6 Genotipificación	44
2.6.1 Pirosecuenciación	44
- <i>Purificación de los productos de PCR para pirosecuenciación</i>	45
- <i>Genotipificación del polimorfismo en LHR</i>	48
- <i>Genotipificación de polimorfismos seleccionados a partir del estudio de asociación genómica</i>	49
2.6.2 Espectrometría de masas	50
- <i>Genotipificación de polimorfismos mediante espectrometría de masas</i>	51
2.6.3 Microarreglos de SNPs	53
- <i>Genotipificación de animales mediante microarreglos de SNPs</i>	53
2.7 Análisis estadísticos	55
2.7.1 Medidas de variabilidad genética	55
2.7.2 Construcción de haplotipos	55
2.7.3 Estimación de la edad de pubertad	55
2.7.4 Estimación de peso a los 300 días	56
2.7.5 Estudio exploratorio de asociación genómica	57
- <i>Control de calidad de la genotipificación</i>	57
2.7.6 Análisis de asociación entre SNPs y edad de pubertad	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1 BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS	63
- <i>Receptor de la hormona Luteinizante (LHR)</i>	63

- <i>Receptor de Kisspeptina 1 (KISS1R)</i>	68
3.2 ESTUDIO EXPLORATORIO DE ASOCIACIÓN GENÓMICA	71
- <i>Selección de animales y genotipificación</i>	71
- <i>Control de calidad de la genotipificación</i>	72
- <i>Análisis de asociación</i>	74
- <i>Construcción de haplotipos y selección de SNPs</i>	78
3.3 ASOCIACIÓN GENÉTICA DE MARCADORES CON EDAD DE PUBERTAD	82
3.3.1 Edad de pubertad y peso a los 300 días	82
3.3.2 Medidas de variabilidad genética	83
- <i>Polimorfismo en LHR</i>	83
- <i>Polimorfismos seleccionados a partir del estudio GWAS exploratorio</i>	85
- <i>Polimorfismos en genes candidatos de grasa, crecimiento y pubertad</i>	90
3.3.3 Análisis de asociación	93
- <i>Asociación entre el marcador LHR-I499L y edad de pubertad</i>	93
- <i>Asociación de los polimorfismos seleccionados del estudio GWAS y edad de pubertad</i>	95
- <i>Detección de genes en las regiones cromosómicas asociadas</i>	102
- <i>Asociación entre polimorfismos de genes relacionados a la pubertad, el metabolismo lipídico, y el crecimiento, y pubertad de pubertad</i>	103
4. CONCLUSIONES	107
5. BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes candidatos relacionados a metabolismo lipídico, crecimiento y pubertad, y polimorfismos seleccionados para su estudio.....	34
Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen bovino LHR.....	40
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región promotora y los exones del gen KISS1R.	41
Tabla 4. Cebadores utilizados para la genotipificación del polimorfismo LHR-I499L.....	48
Tabla 5. Cebadores utilizados para genotipificar los SNPs: rs132637859, rs137573267, rs135506491 (BTA3), rs137108804 (BTA20) y rs136317366 (BTA24).....	50
Tabla 6. SNPs detectados en el exón 11 de LHR.....	64
Tabla 7. Número de SNPs incluidos en el chip de genotipificación y número de SNPs eliminados mediante los controles de calidad.....	73
Tabla 8. Polimorfismos asociados a la edad de pubertad detectados en cada cromosoma mediante el estudio GWAS exploratorio.....	76
Tabla 9. Marcadores seleccionados a partir del GWAS exploratorio seleccionados para su genotipificación en la población completa de animales.....	79
Tabla 10. Promedio de edades de pubertad estimadas y peso estimado a los 300 días para todos los animales y para los grupos extremos.....	83
Tabla 11. Medidas de variabilidad genética del SNP LHR-I499L.	85
Tabla 12. Medidas de variabilidad genética de los SNPs seleccionados a partir del estudio GWAS exploratorio.	89
Tabla 13. Medidas de variabilidad genética de los SNPs en genes candidatos para metabolismo lipídico, crecimiento y pubertad.....	91
Tabla 14. Análisis de asociación entre el SNP LHR-I499L y la edad de pubertad.....	94
Tabla 15. Análisis de asociación entre los SNPs seleccionados a partir de estudio GWAS exploratorio y la edad de pubertad.....	97
Tabla 16. Análisis de asociación entre los marcadores ubicados en el BTA1 y la edad de pubertad.....	99
Tabla 17. Resultados de la asociación entre los polimorfismos en el gen de Tiroglobulina y la edad de pubertad.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.....	6
Figura 2. Esquema representativo de la red génica involucrada en la regulación de la pubertad.....	9
Figura 3. Desarrollo del sistema reproductivo del ternero y patrón de concentraciones de hormonas sexuales durante el mismo.....	15
Figura 4. QTLs reportados para características reproductivas en toros.....	24
Figura 5. Representación esquemática del exón 11 de LHR y ubicación de los cebadores utilizados para la amplificación.....	39
Figura 6. Representación esquemática del proceso de secuenciación por terminadores fluorescentes.	43
Figura 7. Representación de las etapas de la pirosecuenciación y reacciones producidas.....	46
Figura 8. Descripción del procedimiento para marcar ADN con el cebador M13.....	47
Figura 9. Esquema representativo de la genotipificación de SNPs mediante la técnica MALDI-TOF.	52
Figura 10: Representación de la técnica de genotipificación por microarreglos de SNPs.....	54
Figura 11. Electroferogramas de la secuenciación del exón 11 de LHR.....	66
Figura 12. Mutaciones reportadas en humanos sobre el gen LHR.....	67
Figura 13. Manhattan Plot de los resultados del estudio GWAS exploratorio.....	77
Figura 14. Manhattan Plot para los cromosomas BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24.....	78
Figura 15. Análisis de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs ubicados en los cuatro cromosomas con mayor número de marcadores asociados a edad de pubertad.....	80
Figura 16. Histogramas obtenidos de la genotipificación del SNP LHR-I499L.....	84
Figura 17. Histogramas de la genotipificación de los marcadores rs132637859, rs137573267, rs13550649 (BTA3), rs137108804 (BTA20) y rs136317366 (BTA24).....	86
Figura 18. Representación esquemática de la región del cromosoma BTA20 asociada a edad de pubertad y genes detectados en dicha región.....	102

RESUMEN

La selección en bovinos se ha realizado tradicionalmente sobre la base de diversos caracteres fenotípicos como la calidad de carne, producción lechera, crecimiento, etc. Sin embargo, a pesar de su relevancia, las características relacionadas con la capacidad reproductiva no han sido usualmente incluidas en los esquemas de selección. La edad de pubertad es uno de los factores reproductivos más importantes para la producción bovina. La utilización de toros jóvenes en los rodeos reduce el tiempo de crianza y disminuye el intervalo generacional, incrementando la velocidad de mejoramiento de las demás variables de selección y haciendo que las actividades relacionadas al comercio de toros sean más rentables. Sin embargo, la mejora por selección genética de los caracteres reproductivos a escala productiva generalmente se dificulta debido a su relativamente baja heredabilidad, a su expresión fenotípica tardía y/o a la dificultad y el costo de registrar estas variables en forma rutinaria. A pesar de esto, la variabilidad inter e intra-racial existente para este carácter en los bovinos la convierten en un blanco prometedor para el mejoramiento animal mediante selección. La incorporación de marcadores genéticos asociados a la pubertad podría permitir la selección temprana de animales sexualmente precoces, colaborando con la selección para obtener una producción más eficiente en la ganadería bovina. Lamentablemente, los marcadores asociados con la edad de pubertad en toros son hasta el momento muy escasos.

Bajo la hipótesis de que la pubertad es un carácter complejo influenciado por múltiples genes, además de factores ambientales, el objetivo de este trabajo fue identificar genes y/o marcadores genéticos asociados a la edad de inicio de la pubertad en bovinos machos de la raza Angus. El estudio se llevó a cabo mediante diferentes estrategias. La primera de ellas consistió en secuenciar dos genes (LHR y KISS1R) claramente involucrados en la regulación del desarrollo sexual, con el objetivo de detectar polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) potencialmente asociados a la edad de pubertad. Además, dado que la pubertad es un proceso biológico influenciado por diversos factores, se decidió seleccionar SNPs localizados en genes candidatos relacionados al metabolismo lipídico, al crecimiento corporal y a la regulación del desarrollo sexual, con el objetivo de analizar su posible asociación a la edad de pubertad.

Por otro lado, se realizó un estudio de asociación genómica (GWAS) de tipo exploratorio con el fin de detectar regiones cromosómicas asociadas a la edad de pubertad. La población de toros disponible ($n= 276$) fue analizada durante los períodos pre- peri- y pospuberal mediante medidas mensuales de circunferencia escrotal (CE) y calidad espermática, incluyendo concentración (C) y motilidad progresiva lineal (M), a partir de las cuales se estimó la edad de pubertad de los animales mediante dos criterios: i) edad a la cual un toro alcanza una CE de 28 cm (CE28) y ii) edad a la cual un toro alcanza una concentración espermática es de 50×10^6 células por ml (C50) y una motilidad de 10% (M10). Sumado a esto, se registró el peso de los animales desde el nacimiento así como la identidad de los toros padres, dado que ambos factores tendrían una gran influencia en los análisis de asociación. Una vez realizada la genotipificación a nivel poblacional de los SNPs detectados y/o seleccionados, se realizó la evaluación de la asociación genética entre los polimorfismos y las edades de pubertad estimadas.

La búsqueda de polimorfismos en los genes candidatos permitió detectar 7 SNPs en LHR, aunque solo uno de ellos fue adecuado para llevar a cabo el análisis de asociación, puesto que fue el único detectado en la raza Angus, para la cual se contaba con datos de pubertad. No se observó asociación de este SNP con ninguna de las edades de pubertad estimadas. Con respecto a KISS1R, llamativamente, no se hallaron SNPs en ninguno de los exones analizados. A partir del estudio GWAS exploratorio se identificó una región del cromosoma BTA20 asociada a la edad de pubertad, que comprende 3 genes: ISL1, PELO y FST, y una región del BTA1, donde se detectaron 2 genes: MECOM y MIR551B. Las funciones biológicas de dichos genes permiten inferir algún grado de participación en los procesos que regulan el desarrollo sexual. Sin embargo, sería necesario estudiar de forma más minuciosa sus roles y las vías de señalización en las que participan para poder realizar una afirmación categórica acerca de estos resultados. Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al hallazgo de genes y marcadores genéticos relacionados a la variación de un carácter complejo como es la pubertad. La búsqueda de marcadores genéticos asociados a la edad de pubertad en el ganado bovino resulta de gran importancia en producción animal, dado que podrían colaborar con la mejora de la selección genética para obtener una producción más eficiente si fueran incorporados en los programas de mejoramiento.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PUBERTAD

La pubertad es una etapa clave del desarrollo reproductivo para los organismos de reproducción sexual, y se encuentra regulada coordinadamente por factores genéticos y ambientales. La pubertad ha sido definido de varias formas de acuerdo a la especie en estudio. Por ejemplo, en humanos se han empleado como criterios la aparición de las características sexuales secundarias, como el vello púbico, el crecimiento de las gónadas y estructuras como el útero, la próstata y las vesículas seminales, la aparición de la primera menstruación y la capacidad de comenzar a producir gametas (Marshall y Tanner, 1969, 1970; Witchel y Plant, 2004). En los animales domésticos usualmente se emplean como criterios la aparición del primer estro en hembras y la calidad espermática y/o desarrollo testicular en machos (Cupps, 1991).

Como muchas otras características fenotípicas complejas, los factores que intervienen en la determinación de la pubertad y los mecanismos que la regulan aún no se conocen con certeza. Sin embargo, ciertos desórdenes de su control regulatorio pueden impedir o perjudicar seriamente la maduración, lo que genera una desventaja para la aptitud general del individuo. Por ejemplo, en humanos se han detectado mutaciones que afectan la función de hormonas y receptores involucrados en el desarrollo y funcionamiento del sistema reproductivo, algunas de las cuales producen infertilidad u otras anomalías en la función reproductiva (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Achermann *et al.*, 2002; Huhtaniemi *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2010). Además, los trastornos relacionados con el inicio de la pubertad han sido asociados a varias enfermedades. Por ejemplo, la pubertad precoz en mujeres ha sido asociada con un mayor riesgo de contraer cáncer de mama, obesidad y diabetes (Sherman *et al.*, 1981; Mishra *et al.*, 2009; Pierce *et al.*, 2012), mientras que un retraso en la edad de arribo a la pubertad se ha asociado al desarrollo de osteoporosis en la vida adulta (Fox *et al.*, 1993).

Como se mencionó anteriormente, el comienzo de la pubertad se encuentra determinado por factores genéticos y ambientales, aunque no se conoce con certeza la contribución exacta de cada uno de estos mecanismos. En humanos, este carácter presenta una distribución normal y se sabe que gran parte de su variabilidad se debe a factores

genéticos. Esto se demostró mediante trabajos que reportaron similitudes en las edades de pubertad dentro de grupos raciales (Wu *et al.*, 2002; Anderson y Must, 2005), dentro de miembros de una misma familia (Sedlmeyer *et al.*, 2002; de Vries *et al.*, 2004), y principalmente en estudios realizados en gemelos (Fischbein *et al.*, 1977; Sharma *et al.*, 1983), que han permitido llegar a la conclusión de que el efecto genético explica entre el 50% y el 80% de la variación observada en la llegada a la pubertad, mientras que la varianza restante puede ser atribuida a efectos ambientales (Gajdos *et al.*, 2009; Choi y Yoo, 2013).

1.1.1 Regulación del desarrollo sexual en mamíferos

Durante la década de 1950 se llevaron a cabo los descubrimientos más importantes que revelaron que la maduración sexual está controlada por el eje neuroendócrino, siendo el hipotálamo, la glándula pituitaria y las conexiones entre ambos órganos esenciales para una maduración sexual normal. La pubertad es un proceso de maduración del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HPG), iniciado por la reactivación de las neuronas secretoras de la Hormona Liberadora de Gonadotrofina (GnRH, de *Gonadotrophin Releasing Hormone*), ubicadas en el hipotálamo. El inicio de la secreción oscilatoria de esta hormona durante la llegada a la pubertad se debe a una reactivación de señales facilitadoras de la expresión y/o a la inhibición de las vías represoras que controlan su síntesis, ya que su pulsatilidad puede observarse solo durante el desarrollo fetal y en la niñez temprana, mientras que hasta la llegada de la pubertad, durante el período de pausa juvenil, se encuentra suprimida (Grumbach, 2002; Styne *et al.*, 2011). Los cambios hormonales que dan comienzo a la pubertad son el resultado de modificaciones en el patrón de secreción pulsátil de GnRH en el hipotálamo, que a su vez produce un aumento en el patrón de frecuencia y amplitud de la secreción de las hormonas gonadotrópicas Luteinizante (LH, de *Luteinizing Hormone*) y Folículo Estimulante (FSH, de *Follicle Stimulating Hormone*) secretadas por la glándula pituitaria (Swerdloff y Odell, 1975). Estas últimas funcionan coordinadamente a nivel de las gónadas para inducir la maduración de las células germinales y estimular la producción de esteroides sexuales y otros péptidos gonadales. Además, las hormonas gonadales hacen *feedback* al hipotálamo, ejerciendo efectos positivos y/o negativos sobre diversos blancos y en

consecuencia sobre la secreción de las hormonas sexuales (Clarkson *et al.*, 2009; Figura 1).

El aumento de frecuencia y amplitud de los pulsos secretorios de GnRH está determinado a su vez por un sistema regulador que recibe señales transinápticas y gliales que, en forma de neuropéptidos y neurotransmisores, actúan en el hipotálamo para estimular o inhibir a las neuronas secretoras de esta hormona (Ojeda *et al.*, 2003; Ojeda y Terasawa, 2002; Tena-Sempere, 2012). Las señales transinápticas pueden ser excitatorias o inhibitorias. Entre las primeras se encuentran principalmente los aminoácidos estimuladores, como el glutamato (GLU) y el neuropéptido kisppeptina (Kiss), mientras que las señales inhibitorias están dadas principalmente por el ácido γ -aminobutírico (GABA, de *Gamma-Aminobutyric Acid*) y péptidos opiodes. Las señales gliales, dadas por la interacción entre las neuronas productoras de GnRH y las células gliales circundantes, son predominantemente excitatorias y se producen principalmente mediante la acción de factores de transcripción, como TGF β 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*), IGF1 (*Insulin-Like Growth Factor 1*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), TGF α (*Transforming Growth Factor alfa*), y las neuroregulinas (NRGs) y sus receptores (erbs). El efecto responsable del aumento de la secreción pulsátil de GnRH en la pubertad se produce, en términos generales, por una pérdida del tono inhibitorio transináptico y simultáneamente la activación de señales excitatorias transinápticas y gliales hacia la red de neuronas GnRH.

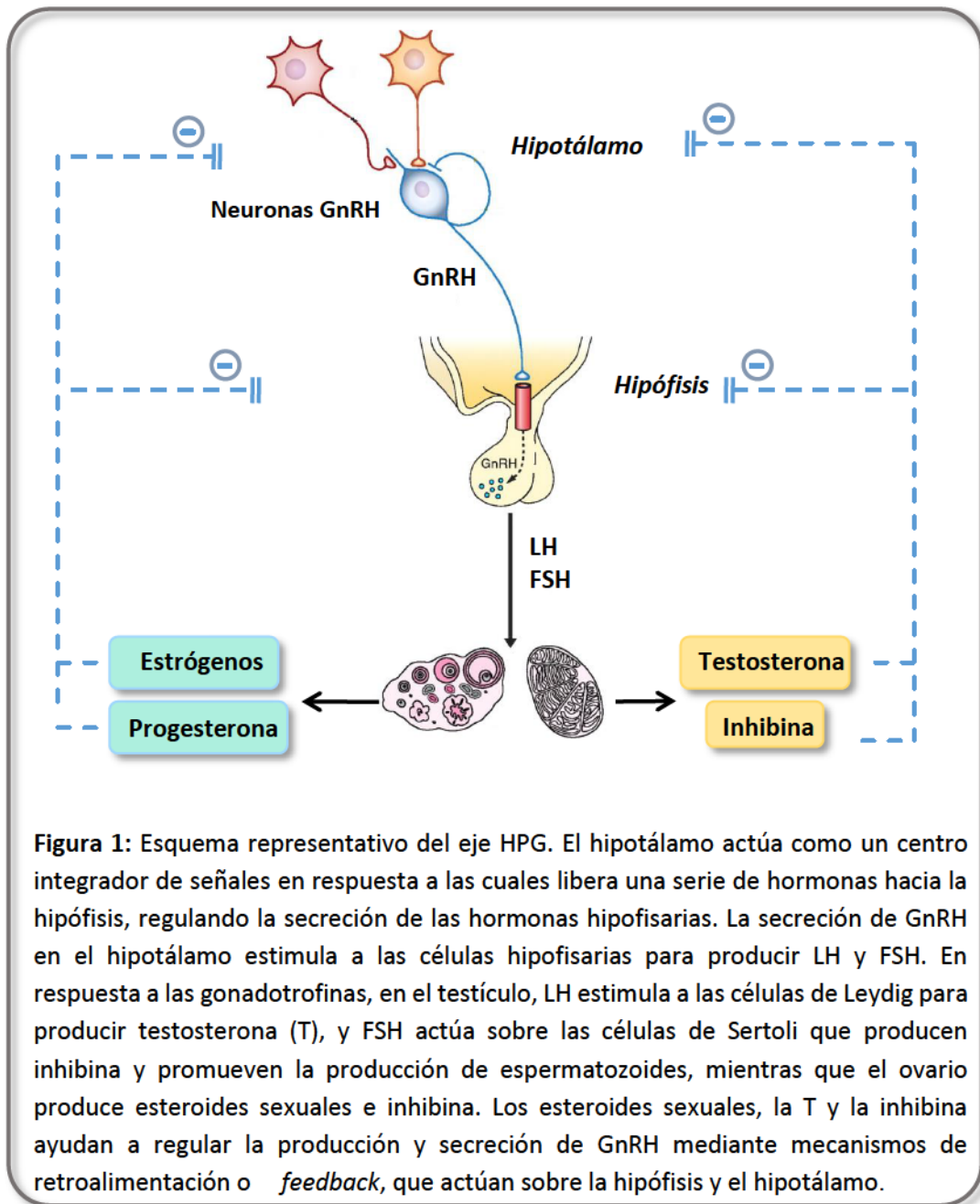


Figura 1: Esquema representativo del eje HPG. El hipotálamo actúa como un centro integrador de señales en respuesta a las cuales libera una serie de hormonas hacia la hipófisis, regulando la secreción de las hormonas hipofisarias. La secreción de GnRH en el hipotálamo estimula a las células hipofisarias para producir LH y FSH. En respuesta a las gonadotropinas, en el testículo, LH estimula a las células de Leydig para producir testosterona (T), y FSH actúa sobre las células de Sertoli que producen inhibina y promueven la producción de espermatozoides, mientras que el ovario produce esteroides sexuales e inhibina. Los esteroides sexuales, la T y la inhibina ayudan a regular la producción y secreción de GnRH mediante mecanismos de retroalimentación o *feedback*, que actúan sobre la hipófisis y el hipotálamo.

Como se mencionó anteriormente, los dos aportes excitatorios predominantes para la activación de las neuronas GnRH son las neuronas glutamatérgicas y las neuronas secretoras de kisspeptina. Las neuronas glutamatérgicas secretan el aminoácido excitatorio GLU, el cual actúa sobre los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) expresados en la superficie de las neuronas GnRH provocando la secreción de la hormona (Brann, 1995). Por otro lado, el péptido Kiss, mediante su receptor acoplado a proteínas G (GPR54, también denominado KISS1R) cumple un rol fundamental en la regulación

de la pubertad, actuando como un potente estimulador de la secreción de GnRH (Navarro y Tena-Sempere *et al.*, 2011a, 2011b). Las neuronas productoras de Kisspeptina se localizan principalmente en el núcleo arcuato del hipotálamo y se proyectan hacia las neuronas GnRH, estimulando directamente la secreción de esta hormona mediante la unión a su receptor asociado ubicado en estas últimas (Han *et al.*, 2005). Además, dependen del *feedback* realizado por las hormonas gonadales para expresar el péptido a nivel del hipotálamo (Clarkson *et al.*, 2009). Varios autores han demostrado que en ausencia del gen *KISS1* o de su receptor *KISS1R*, se produce un desarrollo sexual defectuoso y desórdenes en el arribo a la pubertad, lo que demuestra su importancia en el control central del eje reproductivo (de Roux *et al.*, 2003; Topaloglu *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de poseer un rol excitatorio de gran importancia sobre las neuronas GnRH, este péptido no se considera un iniciador sino un facilitador para el inicio de la pubertad. Otro péptido fuertemente relacionado con la red génica implicada en la regulación de la pubertad es neurokinina *B* (NKB). Se trata de un neurotransmisor que se expresa junto a *KISS1* en algunas poblaciones neuronales y actúa sobre receptores específicos para estimular la secreción de kisspeptina (Navarro *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2013). Las mutaciones que producen la pérdida de función de este gen o de su receptor conducen, al igual que con *KISS1* y *KISS1R*, a desórdenes en el desarrollo sexual (Topaloglu *et al.*, 2009; Rance *et al.*, 2010).

El efecto inhibitorio predominante sobre la activación de las neuronas GnRH proviene de las señales transinápticas enviadas mediante las neuronas GABAérgicas, que juegan un papel importante en el mantenimiento del tono inhibitorio pre-puberal (Mitsushima *et al.*, 1994). Las neuronas opioidérgicas también ejercen una función inhibitoria importante, impidiendo la liberación de GnRH directa o indirectamente mediante la producción de diferentes péptidos inhibitorios, por ejemplo el péptido opiode *dynorphin A* (Dyn A). Dyn A se coexpresa con *KISS1* y NKB en las mismas poblaciones neuronales, y se cree que el balance de las acciones de los péptidos Dyn A y NKB sería, en parte, el determinante de las acciones de Kisspeptina sobre la secreción de GnRH (Navarro *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2013). Más recientemente se ha sugerido al gen RFRP (*RFamide-Related Peptide*) como otro integrante de la red génica de la pubertad, al cual se le ha asignado un papel inhibitorio en la regulación de la secreción de GnRH. Este péptido es el ortólogo en mamíferos del péptido GnIH (*Gonadotropin-Inhibiting*

Hormone) descubierto en aves, y se cree que ejerce su función mediante la unión al receptor GPR147 localizado en las neuronas GnRH (Clarke *et al.*, 2008; Sari *et al.*, 2009).

La integración y coordinación de las señales transinápticas y gliales que regulan el proceso puberal está determinada por una compleja red de genes organizados de manera jerárquica, que funcionan coordinadamente y que se pueden clasificar en tres niveles: i) *genes subordinados*, que incluye todos los genes que contribuyen al control estimulador o inhibitor de las neuronas GnRH, independientemente de que participen en la comunicación transináptica y glial, y que serían los últimos en activarse, siendo su expresión regulada por genes superiores; ii) *genes de segundo nivel*, compuesto por genes implicados en funciones celulares necesarias para la interacción entre neuronas y células gliales; y iii) *genes reguladores superiores*, también llamados genes maestros, que controlan a nivel transcripcional la expresión de una multitud de genes clave subyacentes. Estos componentes conforman una red jerárquica estrechamente interconectada que engloba desde los niveles superiores hasta los más subordinados de control genético de la pubertad (Ojeda *et al.*, 2010). Algunos de los genes que han sido propuestos como reguladores principales ubicados en los niveles superiores de control son Oct2 (*POU-domain gene*), TTF1 (*Thyroid Transcription Factor 1*) y EAP1 (*Enhanced At Puberty 1*). Oct2 es un factor de transcripción que activa al gen TGF α en células gliales, retrasando la pubertad cuando su expresión es impedida (Ojeda *et al.*, 1999). La ausencia de TTF1 resulta normalmente en un retraso en la pubertad, reducción del ciclo estrogénico y disminución de la capacidad reproductiva (Mastronardi *et al.*, 2006), mientras que EAP1 se expresa en neuronas involucradas en el control estimulador e inhibitorio de la secreción de GnRH, como las glutamatérgicas, GABAérgicas, las neuronas productoras de kisspeptina y en las propias neuronas GnRH. La supresión hipotalámica de la expresión de EAP1, al igual que TTF1, retrasa la pubertad y afecta el ciclo estral, confirmando su importancia como un gen de alta jerarquía y necesario para la regulación neurona-neurona de la secreción de GnRH en la pubertad (Heger *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque de acuerdo a lo estudiado hasta el momento se puede afirmar que la pérdida de función de estos genes conlleva a una pubertad tardía, aun no se conoce con exactitud sus roles y mecanismos de acción durante la pubertad mamíferos. En la Figura 2 se presenta un esquema de la red génica reguladora de la pubertad en mamíferos.

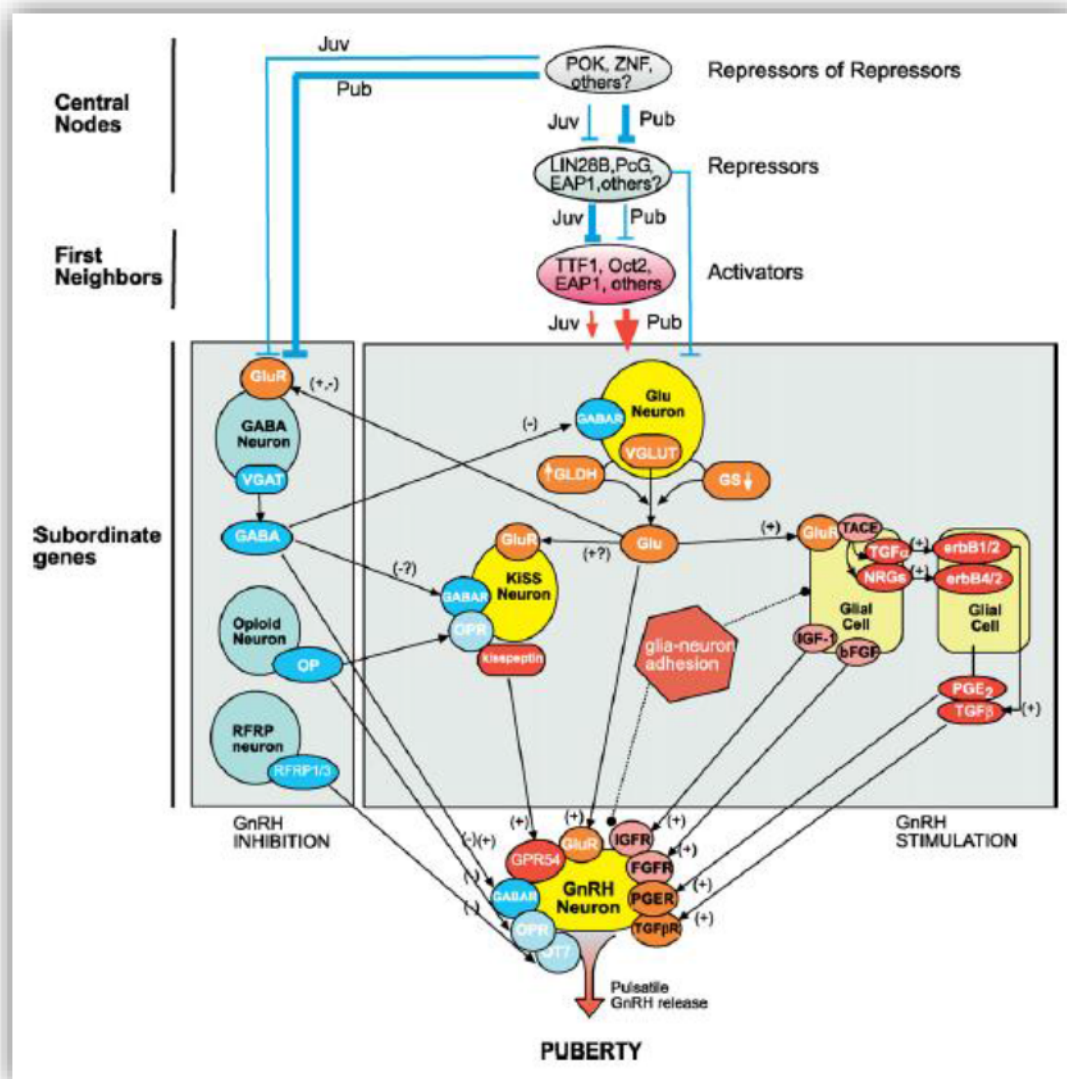


Figura 2: Esquema representativo de la estructura de la compleja red de genes que mediante señales transinápticas y gliales, actúan en la regulación neuroendócrina de la pubertad en mamíferos (Tomado de Ojeda *et al.*, 2010).

1.1.2 Integración del metabolismo y el crecimiento con la pubertad

Muchas hormonas que participan en el metabolismo energético y en el mantenimiento de la homeostasis corporal también afectan el sistema reproductivo, coordinando el estado metabólico y corporal con las funciones reproductivas. Es decir, varios genes que no pertenecen directamente al eje HPG sino regulan otros procesos, como el metabolismo y el crecimiento, tienen una influencia en el desarrollo sexual y el inicio de la pubertad (Roa *et al.*, 2010; Schneider, 2004). Estos genes son denominados permisivos, dado que su función es permitir o colaborar con la expresión de los genes

directamente relacionados con el desarrollo de la pubertad. Entre estos cabe destacar el rol de ciertas hormonas y factores de transcripción como leptina, grelina e insulina, el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1) y el neuropéptido Y (NPY) como marcadores de reservas corporales y nivel energético del organismo, los cuales actúan también sobre el sistema nervioso central para incrementar o disminuir la producción de GnRH. En términos generales, se ha observado que la secreción de GnRH es significativamente reducida en condiciones de balance energético negativo observado bajo condiciones metabólicas y/o corporales inadecuadas.

Leptina es una de las hormonas más estudiadas en relación a las señales que integran el metabolismo con el inicio de la pubertad. Se trata un péptido secretado mayoritariamente por las células del tejido adiposo que actúa principalmente a nivel del sistema nervioso central sobre las áreas responsables de la regulación del comportamiento alimenticio, del balance de energía y de la regulación del peso corporal (Jéquier, 2002). Se ha demostrado que esta hormona actúa sobre un amplio espectro de funciones neuroendócrinas, entre ellas la función reproductiva, actuando no como un factor desencadenante pero sí permisivo para dar comienzo y continuidad a la pubertad si el individuo se encuentra en condiciones nutricionales adecuadas (Elias y Purohit, 2013; Tena-Sempere *et al.*, 2013a). Los mecanismos precisos de acción de esta hormona en la regulación de la pubertad no se conocen con claridad, pero existen evidencias que indican que se basan en la regulación de la secreción de GnRH mediante mecanismos directos e indirectos, con acciones preferentemente estimuladoras a nivel del hipotálamo y efectos inhibitorios sobre las gónadas (Cunningham *et al.*, 1999). Algunos trabajos han demostrado que las deficiencias en los niveles de leptina causadas por mutaciones en el gen y/o en su receptor provocan ausencia de maduración sexual, además de trastornos metabólicos como obesidad (Strobel *et al.*, 1998). La hormona grelina es otro péptido al cual se le ha asignado un rol en la integración del estado metabólico y la pubertad. Sin embargo, a diferencia de leptina, se han detectado efectos principalmente negativos sobre el eje HPG (Kluge *et al.*, 2007; Tena-Sempere *et al.*, 2013b). Ambas hormonas cumplen importantes funciones como marcadores del estado nutricional y contribuyen a la regulación del desarrollo de la pubertad y al mantenimiento de una función reproductiva normal en el estado adulto, funcionando como una conexión entre el nivel de reservas metabólicas y el sistema reproductivo.

IGF1 es otro de los genes importantes para la regulación del funcionamiento del eje reproductivo. Aunque su función principal está relacionada al crecimiento somático, su receptor se encuentra ampliamente distribuido en numerosos tejidos, permitiéndole ejercer un rol multifacético. En el caso de la función reproductiva, IGF1 ejerce un efecto directo sobre las neuronas secretoras de GnRH, así como sobre la glándula pituitaria y las gónadas. Los efectos específicos sobre estos órganos no se conocen en detalle, pero es usualmente de carácter excitatorio (Daftary y Gore, 2005). Con respecto a NPY, sus efectos sobre el eje HPG están en estrecha relación con los efectos de la hormona leptina, aunque se han reportado efectos inhibitorios de este factor sobre la secreción de GnRH (El Majdoubi *et al.*, 2000; Klenke *et al.*, 2010).

Las hormonas tiroideas tienen una amplia gama de efectos sobre el metabolismo, el crecimiento, el control de la homeostasis y otros procesos biológicos, y están conectadas funcionalmente con casi todos los sistemas endócrinos (Warner y Mittag, 2012; Mc Aninch y Bianco, 2014). Dada la complejidad del control génico de la pubertad, es esperable que estas hormonas, agrupadas en el eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT), también posean alguna influencia sobre la función sexual. De hecho, varios trabajos confirman su rol en la diferenciación sexual y en el desarrollo de las gónadas (Flood *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha reportado la presencia de enzimas y receptores tiroideos en las gónadas y su participación en la biosíntesis y señalización de hormonas sexuales (Wagner *et al.*, 2009; Duarte-Guterman *et al.*, 2014). Esto demuestra un grado de participación de las hormonas tiroideas en la regulación de la función reproductiva. Por otro lado, se han descubierto receptores de andrógenos en la glándula tiroidea y elementos de respuesta a andrógenos en los promotores de los genes que codifican las hormonas tiroideas, lo que indica que las hormonas sexuales también cumplirían un papel en la regulación de la función tiroidea (Langlois *et al.*, 2011). En conjunto, las evidencias sugieren considerable regulación cruzada entre los ejes HPG y HPT.

1.1.3 Participación de microARNs en la regulación de la pubertad

La regulación del desarrollo sexual y el inicio de la pubertad dependen no solo del control transcripcional sino también post-transcripcional de los genes involucrados en estos procesos. La regulación post-transcripcional depende de elementos regulatorios

adicionales tales como los microARNs (miARNs). Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que controlan la expresión de genes pertenecientes a casi todos los procesos biológicos a nivel post-transcripcional, uniéndose a las regiones no traducidas (3'-UTR) de los ARN mensajeros (mARN; Ambros, 2004). A pesar del gran número de miARNs identificados hasta el momento, sus mARN blanco y la función biológica que ejercen se ha atribuido sólo a algunos de ellos. Con relación a su papel en la regulación de la pubertad, la investigación realizada es aún escasa. Sin embargo, algunos trabajos reportan una alta expresión de ciertas familias de miARNs en el hipotálamo, la glándula pituitaria y las gónadas (Bak *et al.*, 2008), algunos de los cuales regulan hormonas relacionadas a la función reproductiva. Por ejemplo, Ye *et al.* (2013) demostró que algunos miARNs influyen en las vías de señalización que conducen a la liberación de GnRH. Además, Curry *et al.* (2011) observó que los genes blanco de miARNs pertenecientes a las familias *let7* y *miR*, están involucrados en procesos relacionados a la espermatogénesis y a la morfología y motilidad espermática. También ha surgido como candidato para la regulación del desarrollo sexual el gen *Lin28B*. Este gen codifica una proteína de unión a ARN cuya función principal es regular el procesamiento de miRNAs de la familia *let7*, que incluye a un grupo de pequeños ARNs estrechamente relacionados que, como se mencionó anteriormente, regulan los eventos relacionados al desarrollo puberal en mamíferos (Heo *et al.*, 2008; Piskounova *et al.*, 2011). Por otro lado, se reportó una asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNP, de *Single Nucleotide Polymorphism*) ubicados en *LIN28B* con la edad de pubertad en humanos (Ong *et al.*, 2009) y en cabras (Cao *et al.*, 2013). Además, este gen contiene sitios de reconocimiento para miRNAs en su región 3'UTR, lo que demuestra que los miARNs regulan su expresión y como consecuencia tendrían algún impacto sobre la llegada a la pubertad (Tommiska *et al.*, 2011; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2013). Todas estas evidencias sugieren que los miARNs contribuyen en alguna medida al control del desarrollo sexual y la pubertad en mamíferos. Sin embargo, para conocer con exactitud su rol en los procesos reproductivos, especialmente durante el inicio de la pubertad, sería necesario conocer con mayor certeza la función que ejercen y los genes blanco que regulan.

1.2 PUBERTAD EN BOVINOS

1.2.1 Definición

La pubertad en mamíferos ha sido definida como la fase del desarrollo durante la cual las gónadas tienen la capacidad de secretar hormonas en cantidades suficientes para provocar un crecimiento acelerado de los órganos genitales, la aparición de los caracteres sexuales secundarios y la producción de gametas (Donovan y van der Werff ten Bosch, 1965). En el caso de los bovinos, particularmente en los toros, la definición de pubertad actualmente utilizada fue propuesta por Wolf *et al.* (1965), y establece la llegada a la pubertad como el momento en el que un eyaculado contiene al menos 50 millones de células espermáticas por mililitro, con un valor mínimo de motilidad lineal de 10% (Rawlings *et al.*, 2008). Otra forma indicativa de la aparición de la pubertad es el momento en el cual la circunferencia escrotal alcanza un determinado valor (entre 26 y 30 cm, dependiendo de la raza; Lunstra *et al.*, 1978; Bagu *et al.*, 2004; Corbet *et al.*, 2009). En el caso de las hembras, el inicio de la pubertad se define generalmente como el momento de la aparición del primer cuerpo lúteo, o mediante niveles plasmáticos de progesterona (Johnston *et al.*, 2009).

1.2.2 Patrones hormonales y desarrollo del tracto reproductivo durante la maduración sexual en toros

El momento en el cual los animales pasan a ser sexualmente maduros está precedido por un período de desarrollo del sistema reproductivo, establecimiento de la espermatogénesis y la regulación hormonal de los mismos. En el caso particular de los toros, el crecimiento testicular durante el período pre-puberal sigue una curva sigmoidea, siendo lento durante las primeras 25 semanas de vida, durante las cuales aparecen las primeras células de Leydig, células de Sertoli indiferenciadas, y se establecen las primeras espermatogonias. Luego de este período de lento desarrollo, se produce un crecimiento exponencial de los testículos en tamaño y peso debido a un incremento en la cantidad de parénquima testicular, producido principalmente por el aumento del diámetro y longitud de los túbulos seminíferos. Además, se produce una alta proliferación y diferenciación de las células germinales y la aparición de los primeros espermatozoides maduros, aun no habiendo alcanzado niveles adultos en cantidad y calidad. Este período se conoce como

fase pre-puberal, y aparece luego del aumento inicial en los niveles de las hormonas LH y FSH. Por lo tanto, el período de crecimiento testicular rápido y el desarrollo de la espermatogénesis ocurren después de 20 a 25 semanas de edad, cuando las concentraciones séricas de LH y FSH han disminuido con respecto al período temprano posnatal. Una vez que el ternero ha alcanzado la pubertad, entre las 37 y 50 semanas de edad aproximadamente, dependiendo de la raza, el crecimiento testicular continúa a una velocidad menor y constante hasta la madurez sexual. Asimismo, existe un aumento constante en la cantidad y calidad del semen, a medida que el animal se acerca a la madurez sexual (Curtis y Amann, 1981; Lunstra y Echtenkamp, 1982; Coulter, 1986; Evans *et al.*, 1995; Bagu *et al.*, 2006).

Los patrones de secreción hormonal durante la maduración sexual de los terneros se producen de manera paralela al desarrollo testicular y a la proliferación y diferenciación de las células de Leydig y de Sertoli. Las concentraciones séricas de LH se mantienen bajas durante las primeras semanas de vida, pero luego aumentan hasta llegar a un pico entre las semanas 12 a 15 aproximadamente, después del cual disminuyen gradualmente hasta alrededor de las 25 semanas, manteniéndose bajas pero variables hasta la llegada de la pubertad. Este aumento temprano en la secreción de LH es provocado por un incremento en la frecuencia de los pulsos secretorios de GnRH (Rawlings *et al.*, 2008). Por otro lado, los niveles de testosterona se incrementan gradualmente desde el nacimiento hasta las semanas 20 a 25 aproximadamente, momento en el cual comienza a producirse un rápido aumento de su secreción. Este rápido aumento de las concentraciones séricas de testosterona ocurre después del aumento temprano de la secreción de LH y cuando la producción de las células de Leydig es casi completa (Evans *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 2006). El crecimiento rápido de los testículos y la proliferación y diferenciación de las células germinales producidos a partir de la semana 25 se deben principalmente a este pico de testosterona. Los patrones de concentración sérica de FSH no se conocen con exactitud, pero se sabe que existe una elevada concentración desde el nacimiento, disminuyendo gradualmente hasta las 25 semanas de edad. Como se mencionó anteriormente, la proliferación de las células de Sertoli indiferenciadas, ocurre durante el inicio del período posnatal, cuando las concentraciones séricas de FSH son elevadas, y su maduración comienza cerca del momento en que aumenta la secreción temprana de LH y continúa a pesar de que declina la secreción de gonadotrofinas. Los

niveles relativamente altos de FSH y el aumento transitorio posnatal de LH parecen ser esenciales para iniciar el proceso de maduración sexual de los terneros. La finalización del aumento posnatal temprano de secreción de LH y la disminución de la secreción de FSH se deben al *feedback* negativo realizado por los andrógenos y otros productos testiculares como la hormona inhibina, así como a un aumento del tono inhibitorio transináptico a nivel del sistema nervioso central (Figura 3).

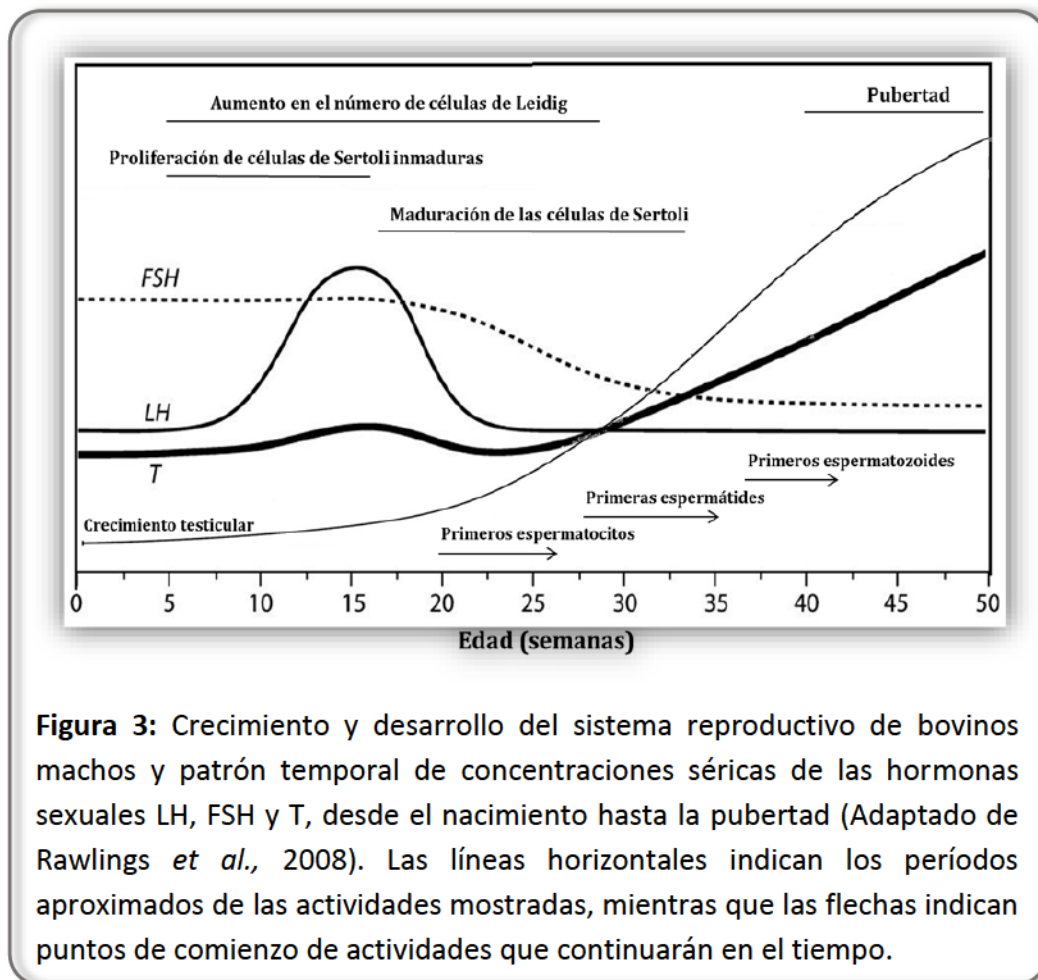


Figura 3: Crecimiento y desarrollo del sistema reproductivo de bovinos machos y patrón temporal de concentraciones séricas de las hormonas sexuales LH, FSH y T, desde el nacimiento hasta la pubertad (Adaptado de Rawlings *et al.*, 2008). Las líneas horizontales indican los períodos aproximados de las actividades mostradas, mientras que las flechas indican puntos de comienzo de actividades que continuarán en el tiempo.

1.2.3 Importancia de la pubertad en bovinos

El inicio de la pubertad constituye un evento trascendental dentro de la vida reproductiva de los bovinos dado que define la longitud del periodo improductivo de un animal y consecuentemente la eficiencia reproductiva de los rodeos; por esto debería tenerse en cuenta durante la planificación de los sistemas de manejo y en los programas

selección genética. Los caracteres reproductivos en general, tales como la edad a la primera parición, el intervalo entre partos, la tasa de ovulación y de preñez, la calidad espermática, el tamaño escrotal, la precocidad sexual, entre otros, son factores importantes en producción animal desde varios aspectos. Por ejemplo, en los sistemas de cría bovina de Argentina se registra una tasa de procreo a nivel nacional de aproximadamente 63%, nivel extremadamente bajo para las condiciones en las que se desarrolla la actividad, siendo este hecho el principal cuello de botella de la cadena de carne vacuna. Además, es común que tanto las vaquillonas como los toros no produzcan su primera progenie hasta los tres años de edad, generando una categoría de edad improductiva y una mayor ineficiencia del sistema. Es por esto que la disminución de la edad a la cual los animales alcanzan la capacidad reproductiva conllevaría a una mejora en la eficiencia de los sistemas de cría. Por otro lado, un aumento en la tasa de preñez y una disminución del intervalo entre partos, por ejemplo, generaría un aumento del número de terneros destetados, lo que redundaría en más vaquillonas para reponer y más novillos para engordar, favoreciendo el aumento del stock ganadero, la producción de carne y la rentabilidad del sector. Además, las vacas de menor edad en su primera parición tienen una vida útil mayor en los rodeos, lo que permitiría disminuir la tasa de recambio (Lesmeister *et al.*, 1973; Burns *et al.*, 2011). En el caso de los toros, la reducción de la edad a la cual los animales entran en pubertad haría posible la utilización de toros más jóvenes al momento de inicio del periodo de servicio en los rodeos, lo que redundaría en menores gastos de crianza para el cabañero y en la reducción del precio de compra para el productor comercial. Además, considerando la heredabilidad moderada de algunos caracteres reproductivos, el uso de toros sexualmente precoces permitiría aumentar la eficiencia reproductiva de todo el rodeo.

Sin embargo, a pesar de la importancia de este tipo de caracteres, los objetivos de selección genética dentro de los programas de mejoramiento bovino, han enfatizado las características de producción (crecimiento, calidad de carne, etc.), postergando la selección basada en las características reproductivas. Esto se debe principalmente a la mayor disponibilidad de información y a la facilidad de obtener medidas fenotípicas de los caracteres de producción. Además, la mayoría de los caracteres reproductivos presentan una heredabilidad baja a moderada, con una gran influencia del ambiente, de la raza y del manejo sobre las medidas realizadas (Cammack *et al.*, 2009), con lo cual la

mejora de los caracteres reproductivos a escala productiva por medio de selección genética es generalmente difícil. Sumado a esto, su expresión tardía en la vida del animal, y la dificultad y el costo de registrar estas variables en forma rutinaria, dificultan su utilización. Es por esta razón que, con la excepción de, por ejemplo, la circunferencia escrotal y la tasa de preñez, pocos caracteres reproductivos son usualmente incluidos en los esquemas de evaluación genética (Graser *et al.*, 2005).

Afortunadamente, existen correlaciones genéticas importantes entre varios caracteres reproductivos y también entre estos y algunos caracteres de producción moderada o altamente heredables, lo que hace posible considerar las características reproductivas en los programas de selección, ya sea mediante selección directa o indirecta. Por ejemplo, la circunferencia escrotal es un buen indicador de la precocidad sexual en toros y posee alta heredabilidad (Quirino y Bergmann, 1998; Brito *et al.*, 2002; Eler *et al.*, 2004). Además, se ha observado que los toros que alcanzan más tempranamente la pubertad tienden a desarrollar una mayor fertilidad (Coulter *et al.*, 1976; Aravindakshan *et al.*, 2000a), y al mismo tiempo, la edad de pubertad y la circunferencia escrotal están correlacionadas con caracteres de fertilidad en hembras, tales como la tasa de preñez y parición (Morris *et al.*, 1992; Eler *et al.*, 2004). Esto hace posible que al utilizar toros de menor edad de pubertad y mejor fertilidad en los rodeos, se obtengan hijas con características similares. En conclusión, dado que la precocidad sexual y la fertilidad son factores heredables, aunque en diferentes grados, pueden responder a los procesos de selección y sería posible lograr progreso genético tomando en cuenta estas características en los objetivos de selección de los programas de mejoramiento.

1.2.4 Caracteres reproductivos y variabilidad entre razas

Desde el punto de vista teórico, el mejoramiento genético sólo es posible cuando existe variación fenotípica en la población para las características de interés, y cuando esta variación tiene un fuerte componente genético, determinado por su grado de heredabilidad. En este sentido, la variabilidad genética de la especie, raza o población, constituye el punto de partida y es uno de los requisitos más importantes al inicio de todo programa de mejoramiento genético. Desde el punto de vista de mejoramiento genético

con orientación productiva, el componente aditivo de la variabilidad genética resulta de suma importancia, ya que es el de mayor magnitud en la mayoría de las características cuantitativas económicas en la especie bovina, y es la principal causa del parecido entre progenitores y descendientes.

En los bovinos existen importantes diferencias en la edad de arribo a la pubertad. Las más significativas se observan entre razas pertenecientes a los grandes tipos de bovinos, *Bos taurus* y *Bos indicus*, presentando las razas cebuinas una mayor edad al inicio de la pubertad (Dow *et al.*, 1982; Chenoweth *et al.*, 1996). Estas diferencias están asociadas a la selección de los sementales, que en el caso del ganado taurino ha permitido mejorar apreciablemente las características reproductivas, mientras que en las razas cebuinas la ausencia de selección es, en parte, la responsable de la mayor edad de pubertad característica de este tipo de ganado. También existen diferencias importantes en el inicio de la pubertad y en otras características reproductivas relacionadas, dentro y entre razas bovinas (Martin *et al.*, 1992; Casas *et al.*, 2007). Esta variabilidad presente en los caracteres relacionados a la pubertad hace posible el diseño de metodologías para llevar a cabo el mejoramiento genético de las razas.

1.2.5 Factores adicionales que influyen en la aparición de la pubertad en bovinos

A pesar de ser una característica regulada principalmente por factores genéticos, otros factores como la nutrición, el clima, el manejo y la condición sanitaria de los rodeos, pueden afectar el inicio y la duración de la pubertad. El nivel nutricional es uno de los factores con mayor influencia sobre la pubertad, teniendo en cuenta que una dieta balanceada favorece la maduración sexual, mientras que una alimentación pobre tiende a provocar el retraso de la misma. Esto ocurre principalmente debido a la incidencia de los factores nutricionales sobre los mecanismos endócrinos de la reproducción. Es decir, la información procedente del estado corporal y nutricional influye a nivel hipotalámico sobre la secreción de las hormonas sexuales y consecuentemente sobre la producción de las hormonas gonadales. En condiciones de subalimentación las hormonas relacionadas al estado metabólico ejercen un efecto negativo sobre la producción de las hormonas sexuales, necesarias para alcanzar en la madurez sexual (Rice, 1991; Deb *et al.*, 2014). Antes de entrar al período púber, los bovinos deben alcanzar un determinado peso y

tamaño corporal, y esto puede retrasarse en caso de restricción alimenticia. Por ejemplo, en las vaquillonas se ha observado que una alimentación restringida retrasa el inicio de la actividad ovárica, y provoca que el peso a la pubertad se incremente en relación a las vaquillonas adecuadamente alimentadas durante el crecimiento (Schillo *et al.*, 1992), mientras que en los toros existe un efecto positivo del nivel nutricional sobre la ganancia de peso corporal y sobre el desarrollo y función testicular en animales peripuberales, que conlleva a un normal desarrollo de la pubertad (Nolan *et al.*, 1990; Brito *et al.*, 2007). Por otro lado, en general, las razas con ganancia de peso rápido y mayor tamaño corporal, alcanzan la pubertad a un peso mayor que las razas con menores ganancias de peso y menor tamaño adulto, lo que demuestra que existe una interrelación entre las características de crecimiento corporal y la edad a la pubertad en el ganado bovino (Wright, 1985). Además, los animales de razas puras alcanzan la pubertad más tarde que los productos de cruzamientos, y las razas pequeñas lo logran antes que las grandes (Siddiqui *et al.*, 2008).

La condición corporal es un estimador de las reservas energéticas directamente relacionado con la eficiencia reproductiva, y funciona como un indicador del estado fisiológico y metabólico del animal, de cuya interpretación puede estimarse el potencial reproductivo. Así como el peso, la condición corporal es un factor determinante para que los animales logren un comportamiento reproductivo adecuado. Los animales que poseen una baja condición corporal suelen presentar una capacidad reproductiva reducida, con menores tasas de preñez, mayor intervalo entre partos, mayor edad al destete, etc (Vargas *et al.*, 1999; Chelikani *et al.*, 2003). También existe una correlación positiva entre el periodo del año, que implica grados de luminosidad, humedad, temperatura, disponibilidad de alimento, etc., característicos de cada época del año, y la aparición de la pubertad (Hansen *et al.*, 1983; Aravindakshan *et al.*, 2000b; Tatman *et al.*, 2004). Por todo lo mencionado, la aplicación de los conocimientos nutricionales y de manejo junto a la mejora genética, pueden colaborar con la mejora de la performance reproductiva de machos y hembras en los rodeos, y específicamente en el caso de los toros, puede hacer posible que animales más jóvenes sean sexualmente maduros como para ser utilizados en el servicio.

1.2.6 Estudio de caracteres cuantitativos

La mayoría de los caracteres más importantes en producción animal son cuantitativos, es decir que el fenotipo observado es el resultado de la interacción entre numerosos loci o regiones cromosómicas (QTL, de *Quantitative Trait Loci*), pudiendo cada uno de estos explicar solo una pequeña fracción de la varianza genética total. Existen numerosas estrategias para la identificación de genes y variantes genéticas responsables de la variación observada en las características productivas y de la predisposición genética de los individuos a un determinado carácter. El concepto de detectar marcadores asociados a caracteres productivos en animales domésticos se ha aplicado desde hace algunas décadas. Los primeros estudios fueron enfocados principalmente hacia el análisis de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos (McClure, 1952; Larsen *et al.*, 1985). Sin embargo, el poder de estos estudios se limitaba a las regiones del genoma donde se localizaban estos marcadores moleculares. Posteriormente, con el advenimiento de las tecnologías de ADN, el enfoque fue trasladado hacia la búsqueda de loci candidatos y/o hacia el rastreo del genoma mediante el uso simultáneo de un gran número de marcadores genéticos de tipo microsatélite, los cuales permitieron el desarrollo de los mapas de ligamiento bovino y con estos la identificación de los primeros QTLs para caracteres cuantitativos (Barendse *et al.*, 1994). El campo más favorecido por la aparición de los marcadores genéticos fue la genética cuantitativa, con la aparición de la selección asistida por marcadores (MAS, de *Marker Assisted Selection*), basada en el desequilibrio de ligamiento entre el QTL y el marcador (Dekkers *et al.*, 2004). Este tipo de selección, en combinación con los sistemas tradicionales de selección animal, ha permitido incrementar la precisión en los programas de mejoramiento genético, logrando avances más rápidos e incrementando la confiabilidad de la selección. Sin embargo, el éxito de su aplicación ha sido puesto en duda debido a la pequeña proporción de la varianza genética explicada por los marcadores genéticos, dado que la gran cantidad de genes con efecto pequeño sobre el carácter requiere un gran número de datos para estimar de forma precisa sus efectos.

Otra de las estrategias desarrolladas es el estudio de genes candidatos, que implica el análisis de genes cuyo rol fisiológico y/o bioquímico son conocidos. Este conocimiento es el que lleva a poner a dicho gen como el más relevante para explicar las diferencias en la expresión de las variables de interés, asumiendo que una mutación en un gen

involucrado en la fisiología del carácter podría causar la variación fenotípica en dicho carácter. Esta estrategia ha tenido algún éxito; sin embargo, aun siendo un proceso lógico, muestra algunos defectos importantes. Por ejemplo, dado que un carácter complejo está afectado por un gran número de genes, muchos de los cuales son desconocidos, la mutación causal de la variación puede encontrarse en un gen que no sea el considerado previamente como candidato para esa característica en particular. Por lo tanto, el estudio de genes candidatos en caracteres cuantitativos produce resultados insuficientes en cuanto a la capacidad de explicar la varianza genética de un carácter complejo.

Los avances generados en las últimas décadas en relación a la posibilidad de realizar secuenciaciones masivas del genoma y detectar numerosos polimorfismos de modo simultáneo, permitieron la aparición de los estudios de asociación genómica (GWAS, de *Genome Wide Association Study*) y del concepto de selección genómica (Meuwissen *et al.*, 2001; Hirschhorn *et al.*, 2005). La selección genómica es una alternativa a la MAS, donde no se busca un número limitado de QTLs a través de los marcadores, sino todos los QTLs que puedan explicar un carácter (Goddard *et al.*, 2010). La clave de esta metodología es que se utilizan miles de marcadores de tipo SNP que cubren todo el genoma de manera muy densa y por lo tanto, potencialmente, podrían explicar toda la varianza genética de un carácter. Para que la selección genómica sea posible, se necesita una densidad de marcadores suficiente que asegure que todos los QTLs estén en desequilibrio de ligamiento con uno o varios marcadores. Actualmente, gracias al desarrollo de las plataformas de genotipificación de alto rendimiento, existen chips de SNPs de alta densidad que permiten la aplicación de esta tecnología. En la especie bovina, el primer chip comercial de genotipificación de SNPs estuvo disponible en el año 2007, y fue el Bovine SNP50 de Illumina, que contiene aproximadamente 54.000 marcadores (Matukumalli *et al.*, 2009). Posteriormente se desarrollaron chips de alta densidad, que al reducir la distancia entre los marcadores a intervalos de menos de 4 kb, permiten realizar estimaciones mucho más precisas en los estudios de asociación. Actualmente, los dos tipos de plataformas de genotipificación de alto rendimiento más importantes que se encuentran disponibles para la especie bovina son las plataformas de alta densidad de Illumina (*High-Density Bovine BeadChip Array*) que contiene 777.962 SNPs y de Affymetrix (*Axiom Genome-Wide BOS 1 Array*) que incluye 648.874 SNPs, ambos con características únicas de diseño y química, cuya elección depende del objetivo y de las

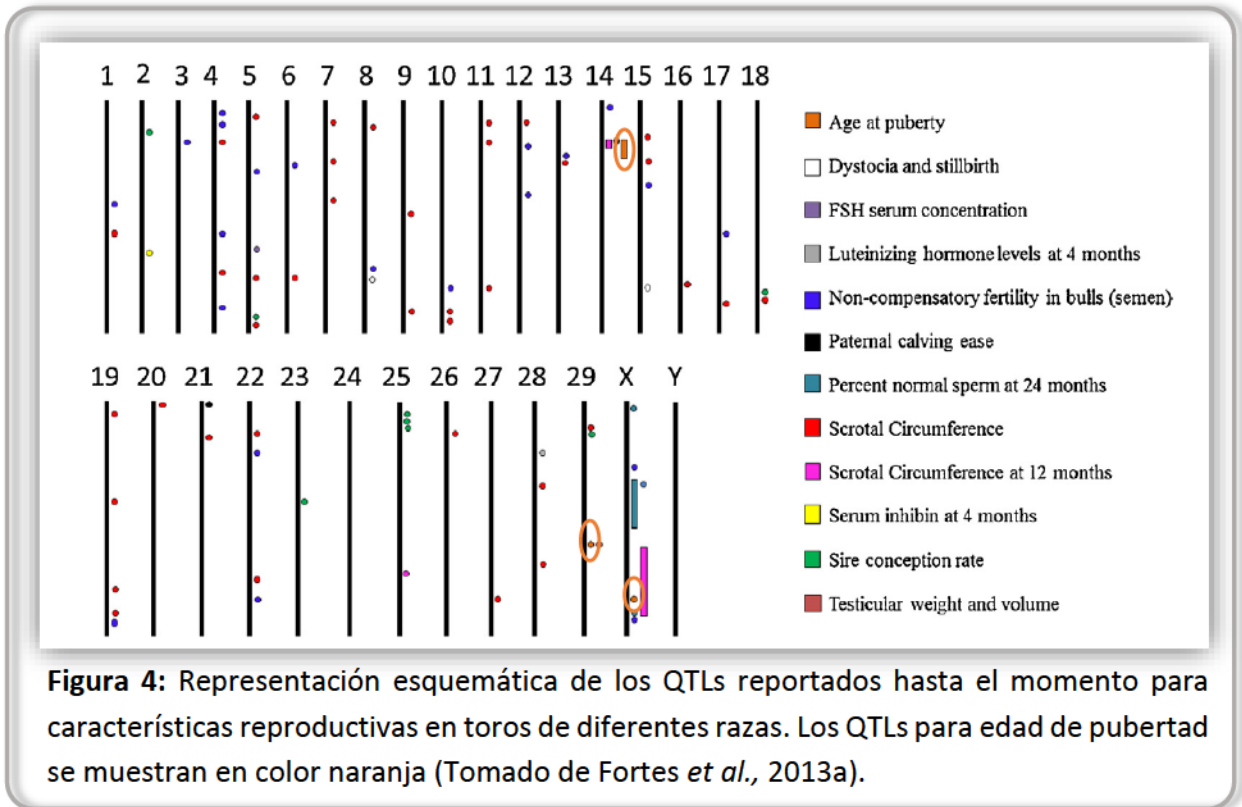
necesidades del usuario. Desde la aparición de este tipo de plataformas se han llevado a cabo numerosos avances en el campo de los estudios de asociación genómica y en la selección genómica para el mejoramiento de características productivas de importancia en ganadería.

En conclusión, actualmente existe una gran cantidad de información y herramientas que permiten realizar estudios con el fin de identificar los genes responsables de los caracteres fenotípicos complejas, y detectar los marcadores asociados a estos, con el objetivo final de incorporar la mayor cantidad de información molecular posible en los programas de mejoramiento genético animal. Los principales beneficios que produce la implementación de programas de MAS y selección genómica en la ganadería bovina están referidos al incremento de la eficiencia debido a la disminución del intervalo generacional, incremento del diferencial de selección y la exactitud en la estimación de los índices de selección, entre otros. Esto es particularmente beneficioso cuando los caracteres que se pretenden mejorar son difíciles o costosos de evaluar, tales como los expresados tardíamente en la vida del animal y los que presentan baja heredabilidad. En el caso de los caracteres reproductivos, tales como la edad de pubertad, el desarrollo de marcadores genéticos podría facilitar la predicción temprana de estos caracteres en los animales y de esta forma acelerar los programas de mejora genética. Por lo tanto, los trabajos enfocados a identificar genes y/o marcadores genéticos que puedan ser utilizados durante la selección de toros podrían colaborar con la obtención de un criterio de selección que permita lograr importantes progresos genéticos en la eficiencia reproductiva de los rodeos bovinos argentinos.

1.2.7 Marcadores genéticos asociados a caracteres reproductivos en bovinos

En las últimas décadas se han reportado numerosos QTLs para características de gran importancia en producción bovina, tales como crecimiento, calidad de carne, carcasa, cantidad y calidad de leche, etc. Una recopilación exhaustiva de los QTLs que se han identificado en el ganado bovino hasta el momento puede obtenerse en las bases de datos de internet, como *Animal QTL Database* y *Bovine QTL Viewer* (<http://www.animalgenome.org/QTLdb> y <http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl>). Actualmente se encuentran reportados más de 11.500 QTLs para distintas variables

productivas, de los cuales aproximadamente 1300 corresponden a QTLs relacionados a características reproductivas y de fertilidad. Los estudios basados en mapeo de QTLs para caracteres reproductivos han sido predominantes en hembras desde sus comienzos, siendo mucho más abundantes en este sexo que en los bovinos machos. Por ejemplo, en hembras, varios autores han reportado QTLs asociados a tasa de ovulación (Kirkpatrick *et al.*, 2000), fecundidad (Ashwell *et al.*, 2004), tasa de mellizos (Cruickshank *et al.*, 2004), edad al primer servicio, intervalo entre partos (Daetwyler *et al.*, 2008) y edad de pubertad (Hawken *et al.*, 2012), entre otros (Fortes *et al.*, 2013a). Con respecto a los toros, aunque la importancia de su contribución al éxito reproductivo está sustentada por una gran cantidad de evidencia (Martinez-Velazquez *et al.*, 2003; Holroyd *et al.*, 2002), como se mencionó antes, los estudios enfocados en caracteres reproductivos son muy escasos comparados con los realizados en hembras, sobre todo los referidos a la edad de inicio de la pubertad. De la información existente, algunos trabajos de asociación entre marcadores genéticos y caracteres relacionados a precocidad sexual y fertilidad en toros, se puede mencionar el trabajo de Casas *et al.* (2004), que ha reportado una asociación de una región del cromosoma BTA5 con los niveles de FSH en sangre y del BTA29 con la edad de pubertad y tamaño testicular en toros *B. indicus x B. taurus*. Por otro lado, un estudio utilizando microsatélites realizado en toros Angus permitió detectar QTLs para circunferencia escrotal en todos los cromosomas bovinos, a excepción de tres (McClure *et al.*, 2010). Más recientemente, mediante un estudio de tipo GWAS en toros Holstein, regiones pertenecientes a 5 cromosomas fueron asociadas con la tasa de concepción por inseminación artificial (Peñagaricano *et al.*, 2012), mientras otros dos trabajos realizados con la misma metodología permitieron identificar SNPs en los cromosomas BTA14 y BTX asociados con la edad de pubertad y características de fertilidad en las razas Brahman y Holstein (Fortes *et al.*, 2012a, b). Algunos de los SNPs mapeados en el BTX fueron asociados en estudios independientes con características de fertilidad en Holstein (Blaschek *et al.*, 2011). En la Figura 4 se muestran los QTLs para caracteres reproductivos reportados en toros hasta el momento, pudiéndose observar que los estudios relacionados a edad de pubertad son muy escasos. Una revisión completa de los QTLs para caracteres reproductivos reportados hasta la actualidad en bovinos puede obtenerse en Fortes *et al.*, 2013a.



Mediante la estrategia de genes candidatos, se han reportado trabajos basados en la identificación de polimorfismos mediante secuenciación, también predominantes en hembras. Por ejemplo, SNPs en el receptor de GnRH (GnRHR) fueron asociados con edad al primer servicio desde el destete en ganado lechero (Derecka *et al.*, 2010), y con la edad al primer cuerpo lúteo en Brahman y *Tropical Composite* (Fortes *et al.*, 2010). En toros, un SNP en el promotor de IGF1 ha sido asociado con la edad de pubertad en la raza Angus (Lirón *et al.*, 2012), lo que puede justificarse teniendo en cuenta que este gen juega un papel importante en la regulación de GnRH, mientras que SNPs ubicados en el receptor IGF1R mostraron asociación con características de fertilidad en las razas Brahman y *Tropical Composite* (Fortes *et al.*, 2013b). Pero además de los genes candidatos típicos de características reproductivas, varios genes involucrados en otras variables productivas, como producción de carne y leche, resultaron asociados a las primeras. Por ejemplo, DGAT1 (*Diacilglicerol O-aciltransferasa 1*), frecuentemente relacionado con producción de leche, fue asociado a la edad de pubertad en Brahman y *Tropical Composite* (Collis *et al.*, 2012). Los genes CAST y CAPN1, conocidos por sus efectos en la calidad de la carne, también fue asociados con caracteres de fertilidad en toros (García

et al., 2006) y con el anestro postparto en hembras (Collis *et al.*, 2012), aunque sus efectos sobre las características reproductivas son menores a sus efectos descritos originalmente. Esto indica que además de los genes que resultan candidatos obvios por estar estrechamente relacionados al desarrollo sexual, otros genes involucrados en otros tipos procesos, como metabolismo y crecimiento, también pueden ejercer un efecto sobre los caracteres reproductivos.

Considerando el impacto de las características reproductivas de los toros, especialmente la edad a la cual los animales llegan a la pubertad, en la performance de los rodeos, el trabajo realizado en la búsqueda de QTLs y los estudios de asociación que puedan brindar mayores conocimientos sobre marcadores asociados a pubertad en toros resulta sumamente importante dado que muchas de las características reproductivas evaluadas en los individuos machos son heredadas por su progenie y podrían ser beneficiadas mediante el uso de la selección, incorporándolas en los programas de mejoramiento genético. Dado el reducido número de asociaciones reportadas entre marcadores genéticos y caracteres de precocidad sexual en toros, surge la importancia de identificar nuevos genes que participen en la regulación de la edad de arribo a la pubertad y otros caracteres reproductivos, así como polimorfismos que expliquen la variabilidad observada en los mismos, que podrían ser utilizados como potenciales marcadores genéticos para la selección de toros en base a mejores características de precocidad sexual, además de contribuir valiosamente a aumentar el conocimiento sobre los mecanismos que expliquen las variaciones observadas en el inicio de la pubertad en la especie bovina.

1.3 OBJETIVOS

Bajo la hipótesis de que la pubertad es un carácter complejo influenciado por múltiples genes, y tomando en cuenta la importancia de la edad de inicio de la pubertad para la producción bovina, en particular en el caso de los toros, el objetivo general del presente Trabajo de Tesis consistió en identificar genes y/o marcadores genéticos asociados a la edad de pubertad en toros de la raza Angus, estimada a través de la circunferencia escrotal y la calidad espermática. Básicamente, el trabajo realizado y la información obtenida podrían colaborar con nuestra comprensión acerca de las bases genéticas de la regulación de la pubertad y con el desarrollo de marcadores genéticos para esta característica.

El objetivo general planteado incluye los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación fenotípica de una población de toros Angus para caracteres de pubertad, con el fin de realizar una estimación de la edad de arribo a la pubertad en dichos animales.
2. Selección de genes candidatos para pubertad, y búsqueda de SNPs en dichos genes mediante secuenciación directa.
3. Desarrollo de un panel de SNPs ubicados en genes candidatos para pubertad relacionados al metabolismo lipídico, a la regulación del crecimiento y otros genes más directamente relacionados a la pubertad.
4. Detección de regiones cromosómicas asociadas a la edad de la pubertad en toros mediante un estudio exploratorio de asociación genómica utilizando microarreglos de SNPs de alta densidad.
5. Genotipificación a nivel poblacional de los SNPs detectados en los genes candidatos, así como de los polimorfismos correspondientes al panel desarrollado y los seleccionados de las regiones cromosómicas asociadas, mediante técnicas de genotipificación de mediano y alto rendimiento (pirosecuenciación y espectrofotometría de masas).

6. Análisis de la asociación genética entre los SNPs y la edad de pubertad en la población de toros evaluadas fenotípicamente.
7. Búsqueda de potenciales genes candidatos para pubertad en las regiones cromosómicas asociadas mediante el estudio de asociación genómica exploratorio.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material animal

Para el desarrollo de las diferentes etapas de este trabajo se utilizaron muestras bovinas correspondientes a dos paneles de animales de acuerdo al tipo de análisis de realizar: detección de SNPs por re-secuenciación y estudios de asociación.

Para la detección de SNPs por re-secuenciación de genes candidatos se utilizó un panel de referencia constituido por 30 muestras de bovinos no relacionados pertenecientes a las principales razas taurinas, cebuinas o sintéticas criadas en nuestro país: Angus, Hereford, Holstein, Limousin, Wagyu, Nelore, Criollo, Brahman, Bradford y Brangus, con el objetivo de incluir la mayor parte la diversidad genética presente en los bovinos de Argentina. Por otro lado, para los estudios de asociación entre marcadores genéticos y variables fenotípicas se utilizaron 276 toros jóvenes de la raza Angus pertenecientes a dos cabañas ubicadas en la provincia de Buenos Aires. Estos animales fueron hijos de un total de 24 toros y nacieron entre los meses de Julio y Septiembre de los años 2008 y 2009. A lo largo de todo el estudio los animales se alimentaron a campo. Se midió el peso al nacimiento y a partir del destete se comenzó a realizar medidas de peso y circunferencia escrotal (CE) mensualmente. Cuando los animales alcanzaron un valor de 26 cm de CE, se añadieron medidas de calidad espermática, que incluyeron concentración espermática (C) y motilidad progresiva lineal (M). Las medidas de circunferencia escrotal y calidad espermática fueron realizadas durante los siguientes tres meses con el propósito de incluir medidas correspondientes a los períodos pre y post-puberal. Por lo tanto, se dispuso de valores de peso al nacimiento, al destete y durante la pubertad y la adultez, así como valores de CE y de calidad espermática antes, durante y después del inicio de la pubertad.

2.2 Datos fenotípicos

La circunferencia escrotal se midió con un centímetro flexible a la altura de la mayor distancia horizontal alrededor del escroto, luego de forzar manualmente los testículos hasta la base del escroto, como se describe en Kealey *et al.* (2006). Las muestras de semen se colectaron por electroeyaculación. La concentración espermática se midió usando un fotómetro SpermaCue 12300/0500 (Minitube, Tiefenbach, Alemania),

mientras que el porcentaje de motilidad progresiva lineal se estimó por duplicado en semen diluido en buffer salino (pH 7,4), empleando un microscopio (aumento x400) equipado con un baño a 37 °C (Lunstra y Echternkamp, 1982). Las mediciones de peso vivo se realizaron mediante una balanza mecánica.

2.3 Extracción de sangre y ADN

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción yugular, utilizando para su conservación el anticoagulante EDTA (0,5%). Posteriormente se transportaron en hielo hasta el laboratorio y se conservaron a -80°C. El ADN genómico se extrajo a partir de las muestras de sangre mediante la técnica de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), según las instrucciones del proveedor. El DNAzol es un detergente de isotiocianato de guanidina, altamente caotrópico, que permite el lisado de las células y la precipitación diferencial del ADN (Ausubel *et al.*, 1990). En el caso del ADN utilizado para la técnica de microarreglos de SNPs, la extracción se realizó a partir de muestras de sangre utilizando el kit Wizard Genomic (Promega, Madison, WI, USA), dados los requerimientos de concentración y pureza para este tipo de análisis. Las muestras de ADN obtenidas se guardaron en freezer a -20°C.

La cuantificación del ADN obtenido se llevó a cabo mediante espectrofotometría ultravioleta con un espectrofotómetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, USA), a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de la muestra se midió a través de la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El valor óptimo para esta relación varía entre 1,8 y 2.

2.4 Búsqueda y selección de genes candidatos

La búsqueda y selección de los genes se llevó a cabo mediante dos estrategias:

i) Selección de genes candidatos funcionales, que de acuerdo a su función biológica y antecedentes bibliográficos podrían estar involucrados, o han sido confirmados, en la determinación de la pubertad. Se seleccionaron dos genes para secuenciación directa: el receptor de la Hormona Luteinizante (LHR) y el receptor del péptido Kisspeptina 1 (KISS1R), y 39 genes seleccionados en base a la evidencia bibliográfica recopilada, algunos relacionados directamente con los mecanismos involucrados en la aparición de

la pubertad, y otros que podrían ejercer una regulación indirecta, como los genes participantes de las vías regulatorias del metabolismo lipídico y del crecimiento. A partir de estos últimos se seleccionaron 63 SNPs con el propósito de analizar su posible asociación con la edad de pubertad. En la Tabla 1 se muestran los genes candidatos y la información correspondientes a los SNPs seleccionados.

ii) Búsqueda de genes candidatos posicionales, que al encontrarse dentro o cerca de regiones cromosómicas asociadas a la edad de pubertad, puede suponerse que están involucrados en algún grado, en la determinación de este carácter. Esta estrategia se llevó a cabo utilizando los resultados de un estudio exploratorio de asociación genómica y la posterior confirmación de las asociaciones encontradas en el panel completo de toros disponible.

Tabla 1: Genes candidatos seleccionados vinculados a la regulación de la pubertad, del crecimiento y del metabolismo lipídico y polimorfismos ubicados en los mismos, seleccionados para su genotipificación mediante espectrofometría de masas MALDI-TOF utilizando la plataforma MassARRAY de Sequenom (GeneSeek Inc., Lincoln, NE, USA). Las posiciones están basadas en la versión UMD 3.1 del genoma *Bos Taurus*.

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>	<i>NCBI ID*</i>	<i>Región Génica</i>	<i>BTA</i>	<i>Posición</i>	<i>Tipo</i>	<i>Cambio</i>	<i>Referencias</i>
Pelota homolog (PELO)	Pubertad	rs110234543	upstream	20	26283462	[C/T]	-	Fernández <i>et al.</i> , 2014
		rs133688567	exón 1		26279853	[C/G]	Ala/Gly	
Inhibin Alpha Subunit (INHA)		rs136042084	exón 2	2	108229472	[A/C]	Asp/Ala	Fortes <i>et al.</i> , 2012a; Phillips, 2005.
		rs41257116	exón 1		108227049	[A/G]	NA/Arg	
Enhanced at Puberty (EAP1)		rs133353237	exón 1	10	89246422	[A/C]	Leu/Arg	Heger <i>et al.</i> , 2007
		rs136744225	exón 1		89247708	[C/G]	-	
Follistatin (FST)		rs109247499	exón 5	20	25589648	[C/G]	Pro/Ala	Phillips, 2005.
		rs110040334	upstream		25597446	[A/G]	-	
Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1)		rs134019018	intrón	21	47132757	[C/T]	-	Mastronardi <i>et al.</i> , 2006; Ojeda <i>et al.</i> , 2010
		rs135840189	upstream		47137635	[C/T]	-	
Sperm Associated Antigen (SPAG11)	rs110761761	exón 5	27	4925949	[A/G]	-	Liu <i>et al.</i> , 2011	
Insulin Gene Enhancer Protein (ISL1)	rs134992034	Intrón	20	29434264	[A/G]	-	Fernández <i>et al.</i> , 2014	
Tachykinin Receptor 3 (TAC3R)	rs109208497	intrón	6	22719484	[A/G]	-	Topaloglu <i>et al.</i> , 2009	
Tachykinin 3 (TAC3)	rs109637672	intrón	5	56744773	[A/G]	-	Rance <i>et al.</i> , 2010	

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>	<i>NCBI ID*</i>	<i>Región Génica</i>	<i>BTA</i>	<i>Posición</i>	<i>Tipo</i>	<i>Cambio</i>	<i>Referencias</i>
Octamer-Binding Transcription Factor 2 (Oct2)	Pubertad	rs41887372	upstream	18	51472675	[G/T]	-	Ojeda <i>et al.</i> , 1999
Transforming Growth Factor beta Receptor 1 (TGFBR1)		rs43564166	Intrón	8	64573838	[A/G]	-	Ojeda <i>et al.</i> , 2010
Lin-28 Homolog B (LIN28B)		rs109640880	upstream	9	45596772	[A/G]	-	Ong <i>et al.</i> , 2009
Prostaglandin E Receptor 2 (PTGER2)		rs133606975	upstream	10	11788696	[A/G]	-	Ojeda <i>et al.</i> , 2010
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)		rs42350283	upstream	22	1069344	[G/T]	-	Ojeda <i>et al.</i> , 2010
Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR)		rs208317315	exón 10	11	31116833	[A/G]	Arg/Cys	Marson <i>et al.</i> , 2008
erbB2-like		rs109941438	intrón	19	40733516	[C/T]	-	Ojeda <i>et al.</i> , 2010
Diacylglycerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1)	rs109234250	exón 8	14	1802265	[G/A]	Lys/Ala	Schneider, 2004	
Estearoil-coAdesaturasa (SCD)	c:878C>T.AB075020.1	exón 5	26		[C/T]	Ala/Val		
Leptina (LEP)	AF120500.1	exón 2	4		[C/T]	Arg/Cys	Elias <i>et al.</i> , 2013	
	UASMS2 (AB070368)	promotor			[C/T]	-		

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>	<i>NCBI ID*</i>	<i>Región Génica</i>	<i>BTA</i>	<i>Posición</i>	<i>Tipo</i>	<i>Cambio</i>	<i>Referencias</i>
Tiroglobulina (TG)		rs135751032	5'UTR	14	9509279	[C/T]	-	Flood <i>et al.</i> , 2013
		rs378215592	3'UTR		9281431	[T/C]	-	
		rs110406764	3'UTR		9281469	[G/A]	-	
		rs109662686	3'UTR		9281507	[A/G]	-	
		rs109057985	3'UTR		9281510	[T/G]	-	
Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4)	Metabolismo Lipídico	AAFC01136716.1:g.75 16G>C	3'UTR	14		[G/C]	-	Schneider, 2004
		rs110757796	exón 2		46835065	[A/G]	Ile/Val	
		rs110652478	exón 3		46834365	[G/A]	Val/Met	
		rs110383592	exón 3		46834345	[G/C]	Splicing site	
		rs111014258	intrón 3		46834042	[T/C]	-	
Fatty Acid Synthase (FASN)		rs41919985	exón 39	19	51402032	[A/G]	Thr/Ala	Schneider, 2004
Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1 (GPAM1)		rs109886010	exón 1	26	33003245	[C/T]	Leu/Ser	
Melanocortin Receptor 4 (MC4R)		rs108968214	exón	24	59670860	[C/G]	Leu/Val	Schneider, 2004

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>	<i>NCBI ID*</i>	<i>Región Génica</i>	<i>BTA</i>	<i>Posición</i>	<i>Tipo</i>	<i>Cambio</i>	<i>Referencias</i>
Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids (ELOVL5)	Metabolismo Lipídico	rs136832022	exón 8	23	25157554	[C/G]	Val/Leu	Schneider, 2004
CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha (C/EBPA)		rs210446561	exón 1	18	43929080	[C/G]	Ala/Gly	
		rs110793792	exón 1		43929570	[C/A]	Sinónima	
Hormone-Sensitive Lipase (HSL)		rs109759779	exón 6		51221527	[C/A]	Phe/Met	Schneider, 2004
		rs109598915	exón 8	18	51222827	[A/C]	Asp/Ala	
		rs41887406	exón 9		51226263	[A/G]	Glu/Arg	
Growth Hormone Secretagogue Receptor Ligand (Grelina; GHRL)		rs110968631	intrón 3	22	54945795	[A/G]	-	Tena-Sempere, 2013a,b
		rs108987641	promotor		54945642	[A/G]	-	
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG)		rs109613657	exón 7		57367375	[G/T]	Gln/His	Schneider, 2004
		PPARG 5UTR	5' UTR	22		[G/A]	-	
		rs41610552	intrón 2		57412725	[C/G]	-	
Retinoid X receptor alpha (RXRA)		rs207774429	exón 5	11	105989727	[C/T]	Arg/Gln	
		rs133517803	exón 4		105989050	[A/G]	Ser/Arg	

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>	<i>NCBI ID*</i>	<i>Región Génica</i>	<i>BTA</i>	<i>Posición</i>	<i>Tipo</i>	<i>Cambio</i>	<i>Referencias</i>
		rs136289117	exón 14		106012748	[C/T]	Sinónima	
Growth Hormone Receptor (GHR)	Crecimiento	rs135304055	exón 7	20	31909664	[T/A]	Phe/Tyr	Hull y Harvey, 2014
Growth Hormone (GH)		rs41923484	exón 8	19	48768916	[C/G]	Leu/Val	
Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1)		rs134527338	promotor	5	70895087	[C/T]	-	Daftary y Gore, 2005
Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)		rs209595810	exón 1	21	6571014	[A/C]	Leu/Ile	
Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH)		rs137760387	promotor	13	66868249	[A/C]		
Growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR)		rs134261880	exón 10	4	65798385	[T/A]	Trp/Arg	
		rs109390134	exón 6		65801936	[C/T]	Arg/Gln	
Myogenic Factor 5 (Myf5)		rs133856052	promotor	5	10338702	[G/T]		Hull y Harvey, 2014
Myogenic Differentiation 1 (MyoD1)		rs110695450	exón 1	15	33359090	[G/C]	Ser/Cys	
		rs133572166	Exón 1		33357975	[A/C]	Asp/Ala	
Myogenic Factor 6 (Myf6)	rs109285736	promotor	5	10331781	[C/G]			

* N° de identificación del dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; acceso 26 de Octubre de 2014)

2.5 Secuenciación y búsqueda de polimorfismos

2.5.1 Amplificación por PCR

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987) para amplificar secuencias específicas de los genes seleccionados. El tamaño del fragmento amplificado estuvo determinado por la ubicación de los cebadores, los cuales fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas en Genbank (National Institute of Health, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por medio del programa DNAMAN v. 4.15 (LynnonBiosof© 1994-1999, Quebec, Canadá).

Gen del Receptor de la Hormona Luteinizante (LHR)

Para la amplificación del exón 11 del gen bovino LHR, se diseñaron los cebadores utilizando la secuencia reportada en GenBank (GI: 281900; NM_174381.1). La región fue amplificada mediante cebadores externos e internos, que cubrían en total un fragmento de 925 pb del total de 1453 pb que contiene este exón (Figura 5, Tabla 2). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de $MgCl_2$, 100 mM de cada dNTP, 0,5 U de polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,4 mM de cada cebador y 25-50 ng de ADN. El programa de amplificación utilizado consistió en 1 ciclo de 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos de hibridación a 58°C y 1 minuto de polimerización a 72°C, seguido por 5 minutos de extensión final a 72°C.

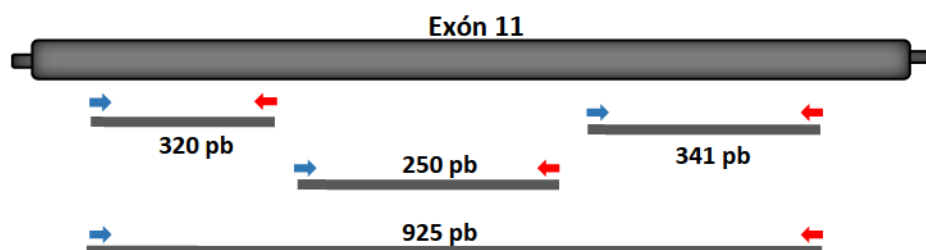


Figura 5: Representación esquemática de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen LHR bovino (GI: 281900; NM_174381.1) ubicación de los cebadores utilizados para amplificar cada fragmento, y tamaño de los productos de amplificación. El color azul designa a los cebadores con orientación *forward*, mientras que el rojo a los de orientación *reverse*.

Tabla 2: Cebadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen bovino LHR, sintetizados mediante el programa DNAMAN v. 4.15 (Lynnon Biosof© 1994-1999, Quebec, Canadá) y temperatura de melting (T) de los mismos.

	Cebadores	Secuencia	T
1	LHRe-F	5'TGAACTGAGTGGCTGGGATTA 3'	60,6
2	LHRint-R1	5'TGGCATGGTTGTAATACTGGC 3'	60,8
3	LHRi2F	5'AGACTGGCAGACAGGGAGTG 3'	60,5
4	LHRi2R	5'GGCAAATGCTGACCTTCATGT 3'	62,3
5	LHRint-F1	5'TGGAAAGCACTCTCTCACAGG 3'	60,6
6	LHRe-R	5'CCTTTGGAATGCCTTTGTGA 3'	61,0

Gen del Receptor de Kisspeptina (KISS1R)

Para amplificar los 5 exones y la región promotora del gen KISS1R, ubicado en el cromosoma BTA7, se diseñaron seis pares de cebadores a partir de la secuencia completa de ADN disponible en GenBank (GI: 528699, secuencia de referencia AC_000164). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 ul conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 100 mM de cada dNTP, 0,5 U de polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,4 mM de cada cebador, y 25-50 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: 1 minuto a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a la temperatura de annealing correspondiente para cada par de cebadores, y 60 segundos a 72 °C, con un paso de elongación final de 10 minutos a 72°C. La información de los cebadores y las temperaturas utilizadas para cada par de cebadores se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Cebadores utilizados para amplificar la región promotora y los 5 exones del gen Kiss1R bovino, tamaño de los productos obtenidos (pb) y temperatura de annealing (T) utilizada para cada par de cebadores. Los cebadores fueron sintetizados mediante el programa DNAMAN v. 4.15.

Región	Cebadores	Secuencia	pb	T
Promotor	GPR54-prom-F	5' CACCCTGAACTTTCCATGGCT 3'	586	56
	GPR54-prom- R	5' GCTGCATTGCCACCCTCTT 3'		
Exón 1	GPR54-E1-F	5' GAAAGTCACGGCAGCGAT 3'	317	58
	GPR54-E1-R	5' GGCGCTCACCGATGTAGAA 3'		
Exón 2	GPR54-E2-F	5' ATGCGCCCCACATTCAGA 3'	389	58
	GPR54-E2-R	5' ATATCTGCCCCAGCCCTACG 3'		
Exón 3	GPR54-E3-F	5' TACCCGAGTGGCTGGACAGT 3'	299	58
	GPR54-E3-R	5' AGGTGAGCACAGGGACGAA 3'		
Exón 4	Kiss-E3-F	5' TGGACCGCTGGTACGTAACA 3'	485	58
	Kiss-E4-R	5' TAGAGCGCCAGCAGGTTGTA 3'		
Exón 5	Kiss-e5-F2	5' CCAAGGTCTCGAGGCTGGTG 3'	475	60
	GPR54-E5-R	5' CGTCTTGATCCCTTCAGAGAGG 3'		

2.5.2 Corridas electroforéticas

Los productos amplificados por PCR fueron evaluados en geles de poliacrilamida al 6% en solución buffer TBE 1X (0,089 M Tris; 0,089 M Ácido Bórico; 0,002 M EDTA). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo con 2 µl de amplificado y 1 µl de colorante (4 g % sacarosa, 0,025 g % de Azul de Bromofenol). Las muestras se corrieron a 170 voltios durante 30-45 minutos, dependiendo del tamaño de los fragmentos. El ADN se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 10-15 minutos y luego se visualizaron las bandas en transiluminador con luz UV a 310 nm para corroborar la presencia de los fragmentos amplificados.

2.5.3 Purificación de los productos de PCR

Debido a que la reacción de secuenciación requiere que los productos de PCR se encuentren libres de cebadores y dNTPs procedentes de la reacción anterior, cada una de las mezclas de reacción obtenidas fue purificada mediante la técnica de precipitación diferencial con polietilenglicol (PEG) al 20% y NaCl 1M (Lis, 1980). El fundamento de esta técnica se basa en que el PEG precipita ADN de alto peso molecular, por lo que permite obtener el producto amplificado libre de cebadores y dNTPs restantes de la reacción de PCR, ya que son eliminados con el sobrenadante luego de la etapa de centrifugación. Esta técnica de purificación es simple y mucho más económica que otras técnicas comerciales, aunque su desventaja es que produce una pérdida importante de muestra cuando se utiliza para purificar ADN. Por este motivo, luego de realizar la purificación, se midió la concentración y la pureza del ADN para verificar la cantidad y calidad obtenidas.

2.5.4 Reacción de secuenciación

Los productos de amplificación purificados fueron sometidos a una reacción de amplificación lineal, o PCR de secuenciación, con el objetivo de aumentar la cantidad de ADN de cada una de las hebras por separado (Murray, 1989). El protocolo consiste básicamente en amplificar cada muestra en dos tubos, uno de los cuales contendrá el cebador *forward*, mientras el otro llevará el *reverse*. De esta manera, se consigue replicar cada una de las hebras de ADN en tubos separados, por lo que el producto obtenido en cada tubo será de cadena simple. La mezcla para esta reacción de PCR se realizó en un volumen total de 10 μ l, conteniendo 120-140 ng de ADN, 1 μ l del cebador que corresponda, 4 μ l de kit de secuenciación, que contiene dNTPs, ddNTPs y polimerasa Taq, y agua bidestilada estéril. Además, a diferencia de la PCR convencional, en esta reacción se utiliza una enzima Taq polimerasa que actúa a 60°C. El programa de amplificación consistió en un ciclo de 20 segundos a 94°C, un ciclo de 15 segundos a 50°C y un ciclo final de 1 minuto a 60 °C. Debido a que el kit de secuenciación utilizado contiene, además de dNTPs normales, los cuatro ddNTPs marcados con un fluoróforo diferente cada uno, luego de la amplificación se encontrará en cada tubo fragmentos de ADN de diferentes tamaños marcados fluorescentemente en su extremo 3'.

2.5.5 Secuenciación

Para eliminar los cebadores, los dNTPs y los ddNTPs fluorescentes remanentes de la reacción de secuenciación, que pueden interferir durante la secuenciación de las muestras, los productos obtenidos anteriormente se purificaron mediante la técnica de purificación con acetato de amonio/etanol. Luego, los productos purificados de los genes LHR y KISS1R se analizaron en un secuenciador automático MegaBACE 1000 (GE

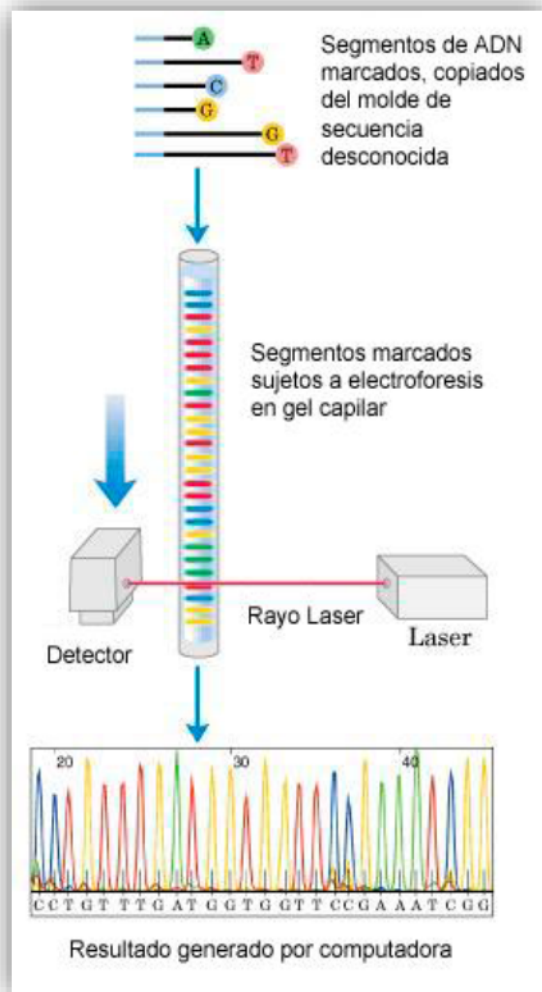


Figura 6: Esquema de un proceso de secuenciación por terminadores fluorescentes.

electroforética es indicativa de la secuencia de bases que componen al fragmento, y es informada a través un electroferograma (Figura 6).

Healthcare, USA) utilizando el kit DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare) y los mismos cebadores diseñados para su amplificación. Las secuencias obtenidas se editaron mediante el software Sequence Analyzer (GE Healthcare). En este tipo tecnología, la secuenciación de cada muestra se lleva a cabo en una sola reacción; los fragmentos obtenidos en la reacción de secuenciación, todos de diferente tamaño debido a la incorporación aleatoria de los ddNTPs durante la polimerización, y marcados en sus extremos 3' con un ddNTP fluorescente, se separan mediante electroforesis capilar, y el color asociado a cada uno de ellos se detecta utilizando un rayo láser que excita los fluorocromos. Dado que cada color se identifica con una base, la secuencia de colores registrada por el detector a lo largo de la corrida

2.5.6 Análisis de las secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas fueron chequeadas mediante el algoritmo BLAST v. 2.0.8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para corroborar su identidad. Posteriormente, se analizaron mediante los programas DNAMAN v. 4.15 (LynnonBiosof© 1994-1999, Quebec, Canadá) y Chromas Lite v. 2.3 (Technelysium Pty Ltd© 1998-2005, Eden Prairie, USA). La detección de los sitios polimórficos se llevó a cabo por comparación directa con las secuencias de referencia reportadas en Genbank para cada gen. El alineamiento de las secuencias proteicas se realizó utilizando el algoritmo BLAST.

2.6 Genotipificación

Durante la realización de este trabajo se utilizaron tres métodos de genotipificación: pirosecuenciación, espectrofotometría de masas y microarreglos de SNPs.

2.6.1 Pirosecuenciación

Para la genotipificación de los SNPs se utilizó la técnica de pirosecuenciación (Ronaghi, 2001), que se basa en la detección de la formación de pirofosfato inorgánico (PPi) como resultado de la incorporación de los dNTPs durante la polimerización del ADN. El PPi forma parte de una cascada de reacciones que comienza con la incorporación de un dNTP por la polimerasa (fragmento de Klenow de la Polimerasa I de *E. coli*), durante la cual se libera como producto. Luego de la incorporación de un dNTP, la enzima ATP sulfurilasa (proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*) genera adenosinatrifosfato (ATP) a partir de adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y del PPi liberado. El ATP formado provee la energía necesaria para la oxidación de luciferina a oxiluciferina por acción de la enzima luciferasa (de *Photinus pyralis*), con la consecuente generación de luz. Por cada adición de un dNTP en el proceso de la polimerización del ADN, se produce una molécula de PPi y consecuentemente la emisión de luz en forma proporcional. La intensidad de la luz emitida es detectada por el equipo y presentada en forma de picos en un pirograma. Como la identidad de cada dNTP incorporado se conoce por respetar un orden de inyección, la secuencia molde puede ser determinada fácilmente registrando los picos de

luz durante la reacción. Los dNTPs no incorporados y el exceso de ATP son degradados por la enzima apirasa, y de esta manera el equipo queda preparado para el próximo paso. En la Figura 7 se representa el proceso de pirosecuenciación. Para llevar a cabo la pirosecuenciación se utiliza un cebador interno diseñado especialmente de forma tal que su extremo 3' hibride una a tres bases antes de la posición polimórfica a analizar, y cada combinación alélica (homocigota o heterocigota) generará un patrón de picos específico comparado con las otras dos variantes, lo que permite distinguir claramente los distintos genotipos en el pirograma obtenido.

La pirosecuenciación no es utilizada para secuenciar fragmentos grandes debido a la limitación en la longitud de la lectura, pero resulta muy útil para genotipificación de uno o varios SNPs en un elevado número de muestras de manera exacta y rápida (Ahmadian *et al.*, 2000).

Purificación de los productos de PCR para pirosecuenciación

La pirosecuenciación requiere una única hebra de ADN en el tubo de reacción, que será la cadena secuenciada. Esto requiere una etapa de purificación previa del producto amplificado de doble cadena, que se logra biotinilando uno de los cebadores utilizados durante la amplificación por PCR. La cadena de ADN que resulta biotinilada puede ser luego separada de su complementaria no biotinilada mediante el uso de perlas de sefarosa unidas a estreptavidina. La estreptavidina es una proteína de unión a biotina, por lo que durante el proceso de purificación, donde las perlas magnéticas se sedimentan, el ADN doble cadena biotinilado permanece unido a las perlas, mientras los componentes restantes de la reacción de PCR son removidos mediante un lavado. Posteriormente, se desnaturaliza el ADN utilizando un álcali. De esta manera, la cadena simple no biotinilada es eliminada mediante un lavado posterior, obteniéndose solo la cadena biotinilada unida a las perlas. Esta forma de purificar el molde provee información de alta calidad y bajas señales de fondo.

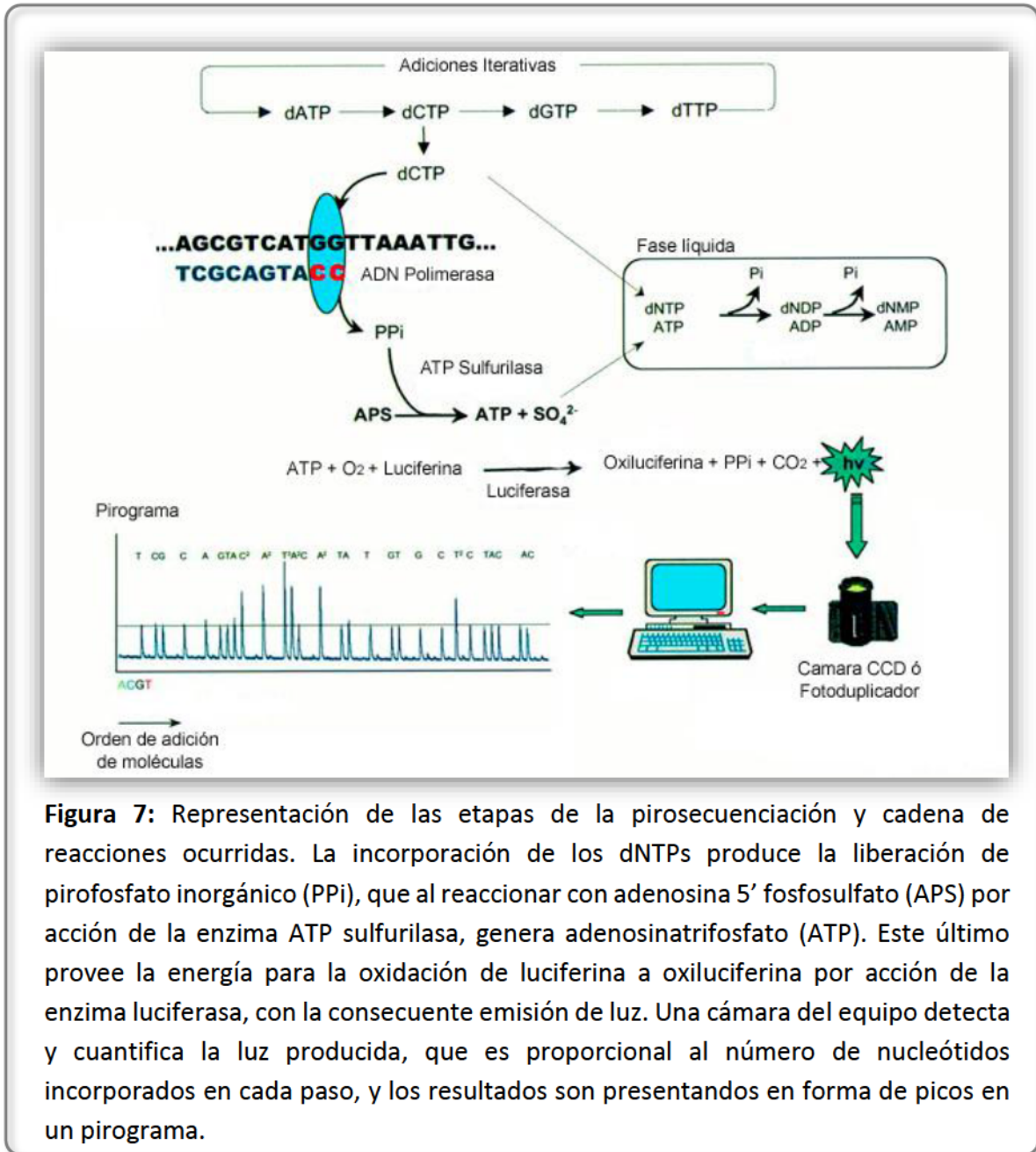


Figura 7: Representación de las etapas de la pirosecuenciación y cadena de reacciones ocurridas. La incorporación de los dNTPs produce la liberación de pirofosfato inorgánico (PPI), que al reaccionar con adenosina 5' fosfosulfato (APS) por acción de la enzima ATP sulfurilasa, genera adenosinatrifosfato (ATP). Este último provee la energía para la oxidación de luciferina a oxiluciferina por acción de la enzima luciferasa, con la consecuente emisión de luz. Una cámara del equipo detecta y cuantifica la luz producida, que es proporcional al número de nucleótidos incorporados en cada paso, y los resultados son presentados en forma de picos en un pirograma.

Dado que el marcaje con biotina de cada uno de los cebadores utilizados para genotipificar todos los SNPs resulta costoso, existe una forma alternativa de realizar la purificación de una de las cadenas de ADN. El método consiste en la utilización de un primer universal para marcar los productos de PCR, utilizando un sistema de tres cebadores, que incluye el cebador universal M13 marcado con biotina en combinación con un cebador específico (*forward* o *reverse*) modificado con una cola de M13 en su extremo 5', y un cebador específico sin marca con orientación opuesta al anterior. Las

concentraciones de los cebadores y las condiciones de ciclado se seleccionan de modo tal que durante los primeros ciclos se utilicen los dos cebadores específicos, con lo cual se añade una cola de M13 al producto de PCR. Dado que el cebador específico marcado posee una concentración menor en la mezcla de reacción, en un momento dado se agota y el producto obtenido hasta ese momento pasa a ser el blanco del cebador universal M13-biotina en el siguiente paso. En esta etapa, la temperatura de annealing se disminuye para permitir la unión del cebador universal, que comienza a funcionar reemplazando al anterior como cebador específico e incorporando la biotina al fragmento del producto en amplificación. En la Figura 8 se esquematiza el funcionamiento de este sistema. El cebador universal M13-biotina puede ser utilizado para el análisis de todos los SNPs, disminuyendo el alto costo de marcar con biotina uno de los cebadores de cada par utilizado.

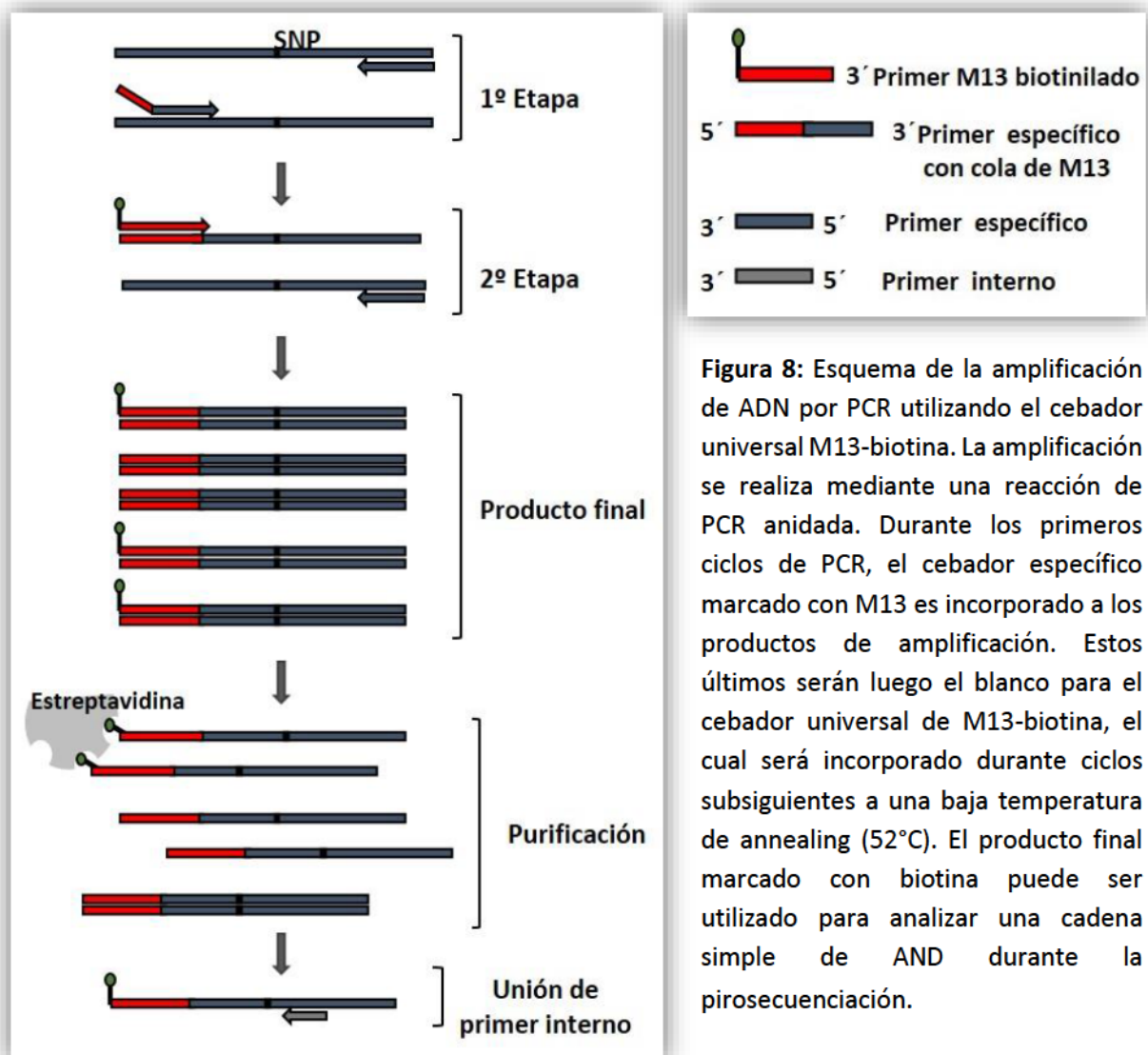


Figura 8: Esquema de la amplificación de ADN por PCR utilizando el cebador universal M13-biotina. La amplificación se realiza mediante una reacción de PCR anidada. Durante los primeros ciclos de PCR, el cebador específico marcado con M13 es incorporado a los productos de amplificación. Estos últimos serán luego el blanco para el cebador universal de M13-biotina, el cual será incorporado durante ciclos subsiguientes a una baja temperatura de annealing (52°C). El producto final marcado con biotina puede ser utilizado para analizar una cadena simple de AND durante la pirosecuenciación.

Genotipificación del polimorfismo en LHR

Para la determinación del genotipo del SNP LHR-I499L se utilizaron los mismos cebadores que los diseñados para la secuenciación del segmento del exón 11 donde se detectó este polimorfismo, que permitieron amplificar un fragmento de 251 pb. Sin embargo, en este caso el cebador *forward* fue biotinilado para permitir la purificación. Además, se sintetizó un primer interno de 17 pb ubicado a una distancia de una base de del SNP (Tabla 4). Para amplificar el fragmento se llevó a cabo una reacción de PCR en un volumen final de 25 µl empleando las siguientes condiciones: 20 mM de Tris-HCl (pH = 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 100 mM de cada dNTP, 0,75 U de polimerasa Taq (Metabion, Martinsried, Alemania), 0,15 µM de cada cebador, y 25-50 ng de ADN.

Tabla 4: Cebadores utilizados para amplificar el fragmento de ADN que contiene el SNP LHR-I499L, y cebador interno diseñado para genotipificar dicho polimorfismo.

SNP	Cebadores*	Secuencia de los cebadores	T
LHR-I499L	LHR-F-Biot	5'-AGACTGGCAGACAGGGAGTG-3'	58
	LHR-pioint-Angus	5'-GCATAGGTGATGGTGTG-3'	
	LHR-R-pyro-int	5'-AGTGAAAAAGCCAGCC-3'	

*LHR-F-Biot: cebador *forward* biotinilado; LHR-pioint-Angus: cebador *reverse* sin marca; LHR-R-pyro-int: cebador interno o de secuenciación. T: temperatura de annealing utilizada para la amplificación.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, con un paso de polimerización final de 7 minutos a 72°C. Posteriormente, las cadenas biotiniladas se purificaron a partir de 20 µl de los amplificadas; para ello se mezclaron con 40 µl de Buffer de “binding” (Biotage AB, Uppsala, Sweden), 3 µl de perlas de sefarosa cubiertas con estreptoavidina (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare, USA) y 17 µl de agua. La purificación se efectuó utilizando la plataforma de purificación PyroMark Prep Workstation (Biotage AB), mediante sucesivos lavados de 5 segundos con etanol 70%, NaOH 8 mM y Washing Buffer Workstation (Biotage AB). Las cadenas biotiniladas purificadas se utilizaron como molde de la reacción de pirosecuenciación, que se llevó a

cabo utilizando 0,3 μM del cebador de secuenciación en 45 μl de Annealing Buffer (Biotage AB) y el kit PyroMark Gold Q96 (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción se realizó utilizando el Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB) en un equipo PSQ™96 y los pirogramas se analizaron utilizando el software de pirosecuenciación PSQ 96MA 2.1.1 (Biotage AB, Uppsala, Suecia).

Genotipificación de polimorfismos seleccionados a partir del estudio de asociación genómica exploratorio

De la misma manera que para el SNP en LHR, para genotipificar los polimorfismos seleccionados a partir del estudio de asociación genómica se diseñaron 5 protocolos de pirosecuenciación. Sin embargo, en este caso la purificación del ADN se realizó utilizando el cebador universal M13, como se explicó anteriormente. Los SNPs genotipificados y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5. La reacción de PCR para cada SNP se realizó en un volumen total de 25 μl , conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH = 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl_2 , 100 mM de cada dNTP, 0,75 U de polimerasa Taq (Metabion, Martinsried, Alemania), 1 μM de primer, 0,2 μM de cebador marcado con M13, 0,8 μM de cebador M13 biotinilado y 25-50 ng de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C, y 45 segundos a 72°C, seguidos de 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 52°C, y 45 segundos a 72°C, con un paso de elongación final de 10 minutos a 72°C. La purificación de los productos amplificados biotinilados y la reacción de pirosecuenciación se llevó a cabo de la misma manera que para el SNP LHR-I499L.

Tabla 5: Cebadores y temperaturas de annealing utilizados para amplificar y genotipificar los SNPs seleccionados del estudio exploratorio de asociación genómica: rs132637859, rs137573267, rs135506491, rs137108804 y rs136317366, mediante pirosecuenciación.

SNP	BTA	Cebadores*	Secuencias de los cebadores	T
rs132637859	3	BTA3-7093-F	5'ACATCCCATGGCCTTGATAAT 3'	59
		BTA3-7093-R-M13	5'GAATGAGTGAGCTGTACTTTGGG 3'	
		BTA3-7093-Seq	5' TGAAAGGGAAGGAGGAA 3'	
rs137573267	3	BTA3-7344-F-M13	5'TCCAGTGAGATGTCAGGGTTG 3'	59
		BTA3-7344-R	5'CCAGGAGAAAGGGAAACGTC 3'	
		BTA3-7344-Seq	5'GAAAAGGTTACCAAAGTTATC 3'	
rs135506491	3	BTA3-8707-F	5'GCCATGAGGTGCTTGCTTCT 3'	59
		BTA3-8707-R-M13	5'TTCTGTTTGCTTCAGTGCCAC 3'	
		BTA3-8707-Seq	5'GAGGGCAAATTAATTCAT 3'	
rs137108804	20	BTA20-8110-F-M13	5'GAAGGACAAAGCTGGGTGG 3'	59
		BTA20-8110-R	5'CCCATCAGCCTAGTCAAGATTT 3'	
		BTA20-8110-Seq	5'ATCTGAAGACTTTTCGCC 3'	
rs136317366	24	BTA24-8409-F-M13	5'ACAACCTCTTGACAGGCCACACTT 3'	59
		BTA24-8409-R	5'GGATTGATAGCTGTGGAAGGGA 3'	
		BTA24-8409-Seq	5'GAACTAAATGCAGGCTCA 3'	

*F-13 y R-13: cebadores específicos marcados con una cola de M13 en su extremo 5';
 F y R: cebadores específicos sin marca; Seq: cebadores internos o de secuenciación;
 T: temperatura de annealing utilizada para la amplificación.

2.6.2 Espectrometría de masas

Otra técnica utilizada para la genotipificación de SNPs fue la plataforma MassARRAY® de Sequenom (GeneSeek, Inc. Lincoln, NE, USA; <http://www.sequenom.com>). Esta tecnología está basada en la espectrometría de masas, una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga. En el sistema Sequenom, los cebadores se diseñan de modo tal de amplificar por PCR multiplex pequeñas regiones genómicas que rodean a cada SNP de interés. Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de extensión alelo-específica utilizando cebadores adyacentes a los polimorfismos en estudio, que resulta en

productos específicos de diferentes masas de acuerdo al genotipo. Luego, estos fragmentos de ADN son embebidos sobre una matriz orgánica y sometidos a un rayo de luz UV que provoca su desorción de la matriz y su ionización. Las especies iónicas producidas en estado gaseoso son aceleradas y separadas en función de su relación masa/carga mediante la aplicación de un campo eléctrico. La detección de los productos se lleva a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*). El genotipo de cada SNP se identifica de acuerdo al espectro de masas, que consiste en una representación gráfica de los fragmentos obtenidos, por orden creciente de masa frente a su abundancia relativa (Gabriel *et al.*, 2009; Figura 9).

La plataforma Sequenom permite genotipificar decenas a cientos de SNPs en un gran número de muestras (cientos a miles), y su ventaja principal radica en que el resultado está basado en la masa del producto obtenido, una propiedad física intrínseca de cada molécula. Además, la preparación de las muestras y el procesamiento de los datos son completamente automatizados y es una técnica con alta sensibilidad y precisión en la determinación de los resultados. Por otro lado, posee un costo razonable y al ser altamente flexible permite crear paneles o chips personalizados según las necesidades.

Genotipificación de polimorfismos mediante espectrometría de masas

Se llevó a cabo la determinación de los genotipos de los SNPs ubicados en los cromosomas BTA1 (rs135953349 y rs110604205) y BTX (rs135795150 y rs110798626) seleccionados a partir del estudio de asociación genómica exploratorio, mediante la plataforma MassARRAY™ de Sequenom. El análisis fue realizado en el servicio de GeneSeek, Inc. (Lincoln, NE, USA). Asimismo, se genotipificaron mediante esta tecnología los 63 SNPs seleccionados de los 39 genes candidatos relacionados al metabolismo lipídico, la regulación del crecimiento y a la pubertad. En la Tabla 1 se puede observar la información detallada de estos polimorfismos.

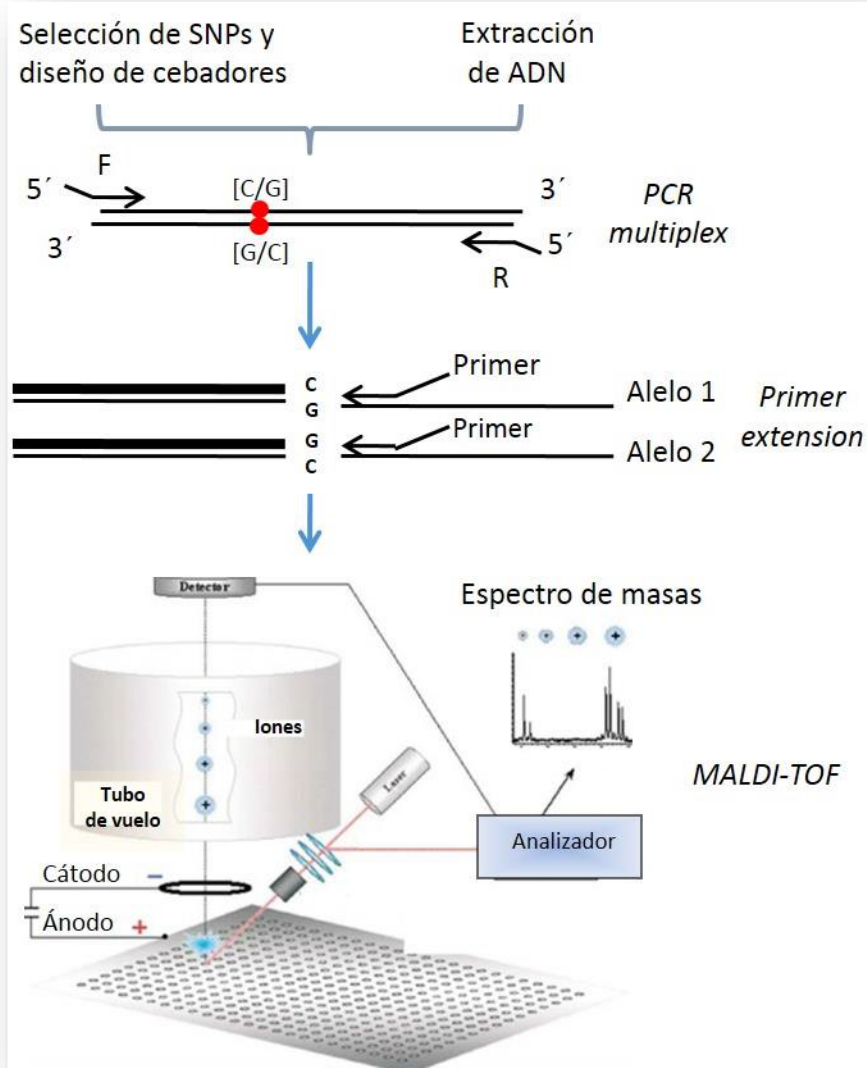


Figura 9: Esquema representativo de la genotipificación de SNPs mediante la técnica MALDI-TOF. Cebadores diseñados específicamente permiten amplificar por PCR multiplex las regiones que rodean al SNP a genotipificar. Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de extensión alelo-específica, que resulta en productos específicos de diferentes masas de acuerdo al genotipo. Los productos obtenidos son embebidos sobre una matriz orgánica y sometidos a un rayo láser que provoca su desorción de la matriz y su ionización. Luego, las especies iónicas producidas son separadas en función de su relación masa/carga mediante la aplicación de un campo eléctrico. La detección de los productos se lleva a cabo en un analizador de masas y los resultados se observan en el espectro de masas obtenido, a partir del cual se interpretan los genotipos.

2.6.3 *Microarreglos de SNPs*

La genotipificación de SNPs para el estudio de asociación genómica exploratorio se realizó mediante la tecnología de microarreglos de SNPs, utilizando el panel de SNPs de alta densidad de Illumina *BovineHD Genotyping BeadChip* (777K) (Illumina Inc., San Diego, CA, USA; <http://www.illumina.com/>), que contiene un total de 777.962 SNPs. Los microarreglos de SNPs constituyen la tecnología de más alto rendimiento para la genotipificación de miles de SNPs en miles de muestras de forma rápida y eficiente. En términos generales, un microarreglo consiste en una serie de sondas unidas a una superficie sólida, en una disposición regular y prefijada. El funcionamiento se basa en la hibridación de la sonda específica con la molécula diana; el nivel de hibridación entre ambas se revela generalmente por la fluorescencia emitida y se cuantifica mediante el análisis de imagen, que representa la presencia o ausencia de determinado alelo para cada SNP en la muestra. En el caso de la plataforma utilizada en este trabajo, la superficie de cada chip (*BeadChip*), contiene miles de perlas (*beads*), cada una de las cuales contiene múltiples copias de una sonda de oligonucleótidos específicos para determinado locus del genoma. El ADN en estudio es amplificado y luego fragmentado. Cuando estos fragmentos de ADN se depositan sobre el chip, cada sonda se unirá a su secuencia complementaria en la muestra de ADN. Las sondas están diseñadas de forma tal que la complementariedad entre el oligonucleótido y la muestra se produzca hasta una base antes del locus del SNP a genotipificar. Posteriormente se realiza una reacción de extensión alelo-específica (o extensión de base simple) utilizando dNTPs marcados con fluorescencia de diferentes colores. De acuerdo al genotipo de cada SNP, se incorporará uno (en los homocigotas) o dos (en los heterocigotas) de los cuatro dNTPs marcados. La intensidad de los colores emitida para un SNP provee la información del alelo existente en dicho locus. Las imágenes obtenidas son analizadas utilizando un software específico que transforma la señal emitida en asignación de genotipos (Figura 10).

Genotipificación de animales mediante microarreglos de SNPs

La genotipificación de los animales mediante el chip de alta densidad *BovineHD Genotyping BeadChip* de Illumina se llevó a cabo mediante una estrategia de genotipificación selectiva de individuos extremos, seleccionando los animales en base a

la determinación de dos grupos extremos para el carácter edad de pubertad; es decir, un grupo de animales llamados “precoces” y un grupo de animales “tardíos”. Estos animales se seleccionaron considerando la edad de inicio de la pubertad estimada en base a los parámetros de calidad espermática. De esta manera, se seleccionaron 36 animales machos de la raza Angus, 18 pertenecientes al extremo de menor edad de pubertad, y 18 del extremo superior de la curva de distribución. La decisión de abordar esta estrategia se tomó considerando el alto costo que implicaría genotipificar el panel completo de animales. Con respecto a esto, hay evidencias de trabajos en los que se ha implementado la estrategia de ADN selectiva, con o sin pooling, para reducir el número de muestras necesario y consecuentemente los costos de la genotipificación, resultando exitosa en estudios de mapeo de QTLs (Darvasi y Soller, 1994).

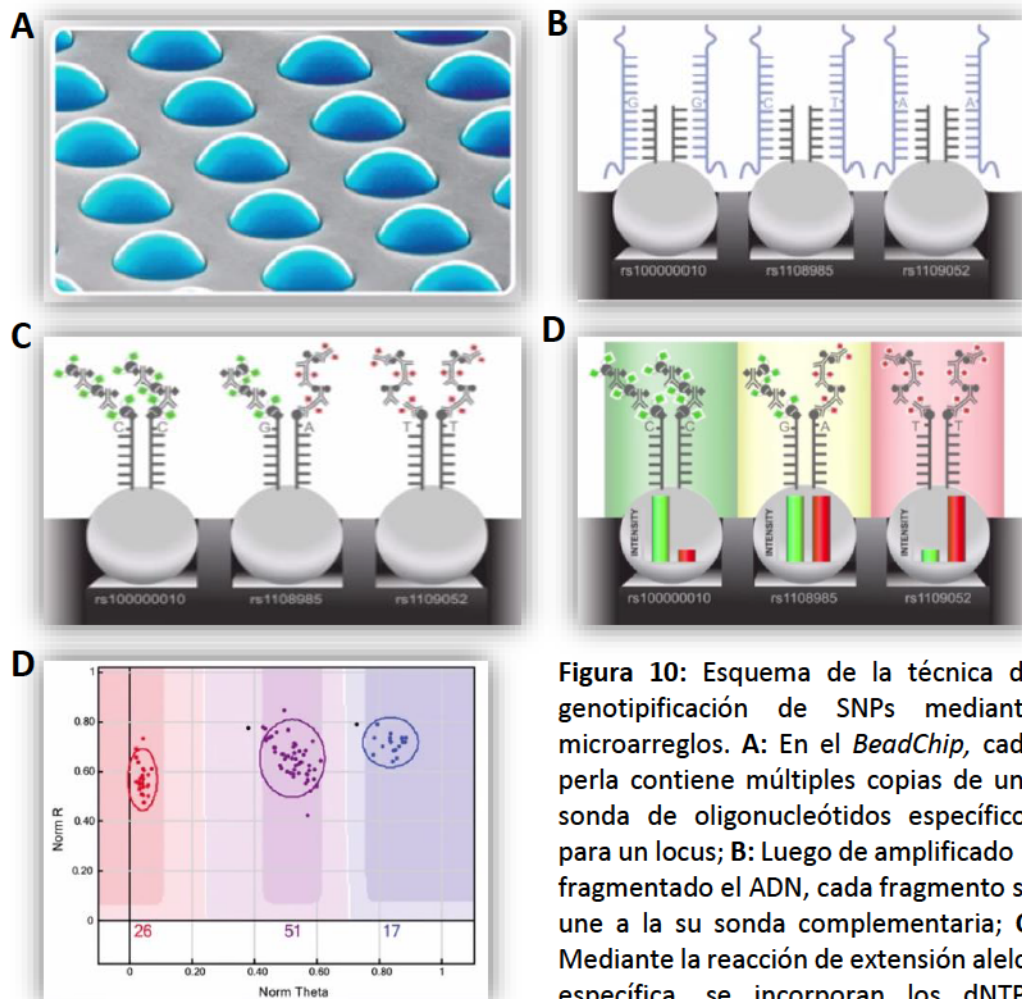


Figura 10: Esquema de la técnica de genotipificación de SNPs mediante microarreglos. **A:** En el *BeadChip*, cada perla contiene múltiples copias de una sonda de oligonucleótidos específicos para un locus; **B:** Luego de amplificado y fragmentado el ADN, cada fragmento se une a la su sonda complementaria; **C:** Mediante la reacción de extensión alelo-específica, se incorporan los dNTPs correspondientes según el genotipo del

SNP; **D:** La intensidad de los colores emitida permite diferenciar entre genotipos homocigotas y heterocigotas; **E:** Representación gráfica de los resultados para cada SNP en todos los individuos: cada color representa un genotipo (rojo y azul, homocigotas; púrpura: heterocigotas; negro: individuo sin genotipo asignado).

2.7 Análisis estadísticos

2.7.1 *Medidas de variabilidad genética*

Para el análisis de la variabilidad genética se utilizaron los programas estadísticos GenePop v. 4.0 (Rousset, 2008) y ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2007). Con estos programas se calcularon las frecuencias génicas de los SNPs y la diversidad genética de los marcadores, mediante los índices de heterocigosidad esperada (h_e). El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se utilizó para evaluar si los marcadores analizados presentaban segregación independiente, calculándose para cada marcador en cada rodeo y en la población completa. Para evaluar las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las proporciones teóricas esperadas según el HWE se utilizó el índice de fijación F_{is} (Wright, 1965) y el test exacto de Fisher incluido en GENEPOP v. 4.0 para estimar el nivel de significancia del HWE. Cuando se emplearon pruebas múltiples para el estudio del HWE, se ajustaron los niveles de significancia estadística mediante la corrección de Bonferroni.

2.7.2 *Construcción de haplotipos*

La determinación de los haplotipos y bloques de ligamiento cuando se tenían dos o más marcadores en un mismo cromosoma, se realizó a partir de los alelos observados mediante el análisis de desequilibrio de ligamiento, a través de los algoritmos implementados en los programas Phase v. 2.1.1 (Li y Stephens, 2003) y Haploview v. 4.2 (Barrett *et al.*, 2005).

2.7.3 *Estimación de la edad de pubertad*

La edad de pubertad se estimó utilizando los siguientes cuatro criterios: i) edad a la cual los toros alcanzan 28 cm de circunferencia escrotal (CE28), ii) edad a la cual la concentración espermática es 50×10^6 células espermáticas por ml y la motilidad progresiva lineal es del 10% (C50/M10), iii) edad a la cual la concentración espermática es 50×10^6 células espermáticas por ml (C50) y iv) edad a la cual la motilidad progresiva lineal es del 10% (M10). Para realizar estas estimaciones se realizó una regresión logística (Quirino *et al.*, 1999), utilizando el procedimiento NLIN implementado en el paquete

estadístico SAS v. 9.0 (SAS Inst. Inc., 2002, Cary, NC, USA), utilizando la siguiente fórmula:

$$y_i = A/[1 + b e^{(-kt)}]$$

Donde y es la observación fenotípica de las variables medidas (CE, C y M) en el individuo i ; t son los días de edad a momento de la medición; A es la variable estimada a la madurez (nivel de saturación en la curva); b es la constante de integración establecida por los valores iniciales de la variable medida y de t (proporción inicial) y k es la constante de madurez (pendiente o punto de inflexión).

Con el objetivo de disminuir el error en la estimación, se utilizó un diseño experimental especialmente planeado para este trabajo, que consistió en tomar las medidas fenotípicas en tres momentos cercanos al arribo a la pubertad de los animales. Es decir, las medidas de CE y calidad espermática se realizaron en cada animal antes, durante y después del inicio de la pubertad. Para estimar la edad a CE28, C50 y M10 se construyeron las curvas de regresión para cada animal, tomando tres edades (280, 305 y 330 días) con sus correspondientes valores de CE, C y M. En el caso de la edad a C50/M10, se calculó un único valor de edad de pubertad a partir de las edades estimadas a C50 y a M10, teniendo en cuenta que la concentración y la motilidad debían poseer simultáneamente un valor mínimo de 50×10^6 células/ml y 10%, respectivamente.

2.7.4 Estimación del Peso a los 300 días

Se estimó el peso de cada animal a los 300 días de edad mediante una regresión no lineal utilizando el procedimiento NLIN implementado en SAS v. 9.0 y la ecuación de Gompertz (Winsor, 1932), expresada de la siguiente forma:

$$y_i = A e^{-b e^{(-kt)}}$$

Donde y es el peso del individuo i a un tiempo t ; t son los días de edad al momento de la medición del peso; A es la variable peso estimada a la madurez; b es la constante de

integración establecida por los valores iniciales del peso, y k es tasa específica de crecimiento, que corresponde al punto de inflexión de la curva.

2.7.5 Estudio exploratorio de asociación genómica

El estudio de asociación genómica exploratorio (GWAS exploratorio) entre los marcadores obtenidos mediante la técnica de microarreglos de SNPs y la edad de pubertad se llevó a cabo utilizando el software Plink v.1.07 (Purcell *et al.*, 2007). La asociación se realizó mediante la comparación de las frecuencias alélicas por el método de Chi-cuadrado, simulando un estudio de tipo caso-control, considerando los dos grupos extremos de pubertad temprana (animales precoces) y tardía (animales tardíos) seleccionados como “casos” y “controles”, respectivamente. Los resultados de la asociación obtenidos se corrigieron mediante el método de Control Genómico (GC, de *Genomic Control*; Devlin *et al.*, 2001) implementado en el mismo software, con el objetivo de tener en cuenta la posible existencia de estratificación poblacional dentro del grupo de animales utilizado.

Control de calidad de la genotipificación

Los datos crudos obtenidos de la técnica de microarreglos de SNPs fueron analizados en primer lugar por el proveedor, utilizando los software iScan y BeadStudio v. 3.1 (Illumina Inc). Posteriormente, previo a la realización del análisis de asociación, los datos fueron procesados utilizando el software Plink v.1.07. Dado que la asignación de genotipos mediante microarreglos de SNPs puede contener errores de genotipificación propios de la técnica, con genotipos mal asignados o ausentes, que pueden conducir a asociaciones espurias, se aplicaron controles de calidad tanto a las muestras genotipificadas como a los SNPs obtenidos (Teo, 2008). Como primer control, se consideró el número de SNPs satisfactoriamente genotipificados por muestra (*auto calling*). Para esto se estableció un grado mínimo de genotipificación exitosa por muestra de 80%, y se excluyeron las muestras que poseían un número de SNPs correctamente genotipificados inferior a este valor. Una vez excluidas las muestras que no cumplían con el criterio anterior, se realizó el análisis individual de los SNPs para detectar probables

errores de genotipificación, para lo cual todos los marcadores fueron sometidos a diferentes criterios de evaluación y exclusión. Uno de los controles de calidad consistió en evaluar, para cada SNP, la proporción de muestras a las que se le pudo asignar su genotipo exitosamente con respecto al total de muestras bajo análisis (*call rate*). Por ejemplo, un *call rate* de 80% significa que los genotipos del SNP evaluado fueron exitosamente determinados en al menos el 80% de las muestras. El valor de corte utilizado en el presente trabajo fue de 85%.

Otro criterio consistió en eliminar los alelos que poseían una frecuencia muy baja en la población. Desafortunadamente, una gran cantidad de los SNPs genotipificados mediante las plataformas disponibles están fijados en la población en estudio o no poseen una frecuencia del alelo menos frecuente o frecuencia mínima alélica (MAF, de *Minimum Allele Frequency*) apreciable. Considerando el bajo poder de detección de asociaciones entre una determinada variable y un marcador con una MAF demasiado baja, este criterio se utilizó para filtrar los SNPs que contuvieran uno de los alelos en una frecuencia génica muy baja con respecto al otro alelo. El criterio de filtrado por MAF depende del tamaño de la población, pero por lo general varía entre 0,015 y 0,025. En este trabajo se utilizó un valor de corte de $MAF < 0,025$.

El tercer control de calidad aplicado a los marcadores fue el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). La ley de Hardy-Weinberg establece que las frecuencias génicas y genotípicas de una población tienden a permanecer constantes por generaciones, y que existe una relación fija entre ellas, siempre que no existan fuerzas perturbadoras que actúen contra ello. Al realizar un estudio de asociación, se debe chequear este principio en la población analizada, y excluir de los estudios subsiguientes los marcadores que no cumplan esta condición, ya que el hecho de que estén en desequilibrio no necesariamente implica una asociación con el carácter estudiado, sino que podría deberse a otros factores poblacionales; por ejemplo, a que dichos SNPs se encuentren en genes o regiones cromosómicas que han sido sometidas a selección. Para determinar las desviaciones del HWE de los polimorfismos en la población en estudio, se utilizó el método de Chi-cuadrado en Plink, fijando como valor de corte una significancia de 0,001.

2.7.6 *Análisis de asociación entre SNPs y edad de pubertad*

El análisis de la asociación genética entre los SNPs y la edad de pubertad se realizó teniendo en cuenta los factores que podrían modificar o afectar las variables medidas y los resultados de la asociación. El modelo elegido para evaluar la asociación entre variables fenotípicas y genotipos fue un modelo lineal mixto, utilizando el procedimiento PROC MIXED implementado en SAS v. 9.1, y expresado de la siguiente forma:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_j + S_i + B_k + O_l + \beta(X_{ijkl}-X) + e_{ijkl}$$

Donde Y_{ijkl} es la observación fenotípica de la variable edad de pubertad en un animal; μ es la media global de la edad de pubertad; G_j es el efecto fijo del genotipo del marcador individual j^{th} ; S_i es el efecto fijo del año i^{th} ; B_k es el efecto fijo del rodeo k^{th} ; O_l es el efecto aleatorio del padre l^{th} ; $\beta(X_{ijkl}-X)$ es la regresión para la covariable peso corporal a los 300 días de edad y e_{ijkl} es el error aleatorio. Para corregir el efecto de comparaciones múltiples, los P-val se ajustaron aplicando el método de Bonferroni.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran organizados en tres secciones principales. En primer lugar, se describen de los resultados de la secuenciación de dos genes candidatos, con la correspondiente discusión de los mismos. Posteriormente se exponen los resultados del estudio de asociación genómica exploratorio, y por último se muestran los resultados del análisis de asociación genética entre los marcadores seleccionados en los puntos anteriores y la edad de la pubertad.

3.1 BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS

Con el objetivo de identificar polimorfismos en genes involucrados en la regulación de la pubertad y analizar su asociación con la edad de inicio de la pubertad en la especie bovina, se seleccionaron y analizaron dos genes: el receptor de la Hormona Luteinizante (LHR) y el receptor del péptido Kisspeptina 1 (KISS1R).

Receptor de la Hormona Luteinizante (LHR)

Para la búsqueda de variabilidad genética en el gen LHR se seleccionó el exón 11, que codifica para la región transmembrana del receptor. Esta región constituye un dominio crítico para la función del receptor ya que es la zona donde se produce un cambio conformacional ante la unión de la hormona, que permite la activación de cascadas de señalización por diferentes vías, las cuales finalmente conllevan a expresar los efectos de la hormona. En humanos, han sido reportadas mutaciones en esta zona que alteran la interacción ligando/receptor, provocando enfermedades o algún tipo de desorden en la función reproductiva (Themmen y Huhtaniemi, 2000) y en esto se basó la decisión de seleccionar el exón 11 para analizar en este trabajo. En la especie bovina, el gen LHR se encuentra en el cromosoma BTA11, contiene 64 kpb y 11 exones, y codifica una proteína de 701 aminoácidos y 78 kDa, cuya estructura consiste en 7 α -hélices que atraviesan la membrana celular. Los primeros 10 exones codifican la mayor parte de dominio extracelular que contiene 366 aminoácidos (dominio N-terminal), mientras que el exón 11 (dominio C-terminal) corresponde a una porción del dominio extracelular, a la región transmembrana y al dominio intracelular de 72 aminoácidos.

Un vez seleccionada la región a estudiar se diseñaron los cebadores para amplificar el exón 11 a partir de ADN genómico en un panel de 10 razas bovinas que incluyó 30 animales, como se detalla en la sección “Materiales y Métodos”. Posteriormente, se

comprobó la presencia de los productos de amplificación mediante electroforesis. Luego, los amplificadores obtenidos se purificaron mediante la técnica de PEG y se secuenciaron con el fin de detectar la presencia de polimorfismos. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas, detectándose 7 SNPs dentro del segmento de 925 pb secuenciado (Tabla 6).

Tabla 6: Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) detectados mediante secuenciación del exón 11 del gen LHR en diferentes razas bovinas.

<i>Polimorfismo</i>	<i>Posición¹</i>	<i>Cambio aminoacídico²</i>	<i>Raza</i>	<i>Referencias</i>	<i>NCBI ID³</i>
A/G	c 1093	Asn ³⁶² Asp	Brahman, Nelore	No reportado previamente	rs436830857
G/A	c 1138	Sinónima	Brahman, Nelore	No reportado previamente	-
C/T	c 1340	Ala ⁴⁴³ Val	Brahman, Nelore	Reportado por Perez Marson, (2005)	-
G/T	c 1410	Trp ⁴⁶⁷ Cys	Angus, Hereford-Angus, Charolais	Reportado por Hastings <i>et al.</i> (2006)	rs41256848
C/T	c 1479	Sinónima	Hereford, Criollo	Reportado por Hastings <i>et al.</i> (2006)	rs41256849
A/C	c 1504	Ile ⁴⁹⁹ Leu	Angus	No reportado previamente	-
G/A	c 1510	Val ⁵⁰¹ Met	Brahman, Nelore	No reportado previamente	rs454663781

¹ El número de nucleótido es relativo al inicio de la secuencia codificante del gen (NM_174381.1, correspondiente a la secuencia de referencia AC_000168, Gene ID: 281900; ensamblado: Bos_taurus_UMD3.1, tomada de Genbank -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

² El número de aminoácido es relativo a la secuencia proteica completa de LHR (NP_776806)

³ N° de identificación del dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; acceso 26 de Octubre de

Los resultados obtenidos demuestran la existencia de un alto grado de variabilidad genética en la zona analizada. Con respecto a los polimorfismos detectados, podemos mencionar brevemente algunas características de estos cambios. Como se puede observar en la Tabla anterior, 5 de los 7 polimorfismos hallados corresponden a transiciones

nucleotídicas, mientras que los 2 restantes corresponden a transversiones. El polimorfismo c 1093 [A/G] fue hallado en animales de razas cebuinas, no había sido reportado previamente y provoca un cambio aminoacídico de Asparagina (Asn) por Ácido aspártico (Asp). Se trata de un cambio llamativo porque las propiedades de las cadenas laterales de ambos aminoácidos son marcadamente diferentes: Asn (sin carga) cambia a su derivado ácido (cargado negativamente). Por esta razón, es posible pensar que este cambio podría afectar la estructura y/o la función de la proteína. El SNP c 1340 [C/T] fue reportado anteriormente en razas cebuinas (Perez Marson, 2005), afecta a la base 1340 de la secuencia de ADN codificante reportada en Genbank y cambia Alanina (Ala) por Valina (Val), pero dado que ambos aminoácidos tienen cadenas laterales de propiedades similares, en principio no se esperaría que se produzca un cambio importante en la estructura proteica.

El polimorfismo c 1410 [G/T] fue reportado en la raza Holstein por Hastings *et al.* (2006), mientras que en este trabajo se encontró principalmente en la raza Angus, en heterocigosis en un individuo cruza Angus-Hereford y en un individuo Charolais. Este SNP provoca el cambio aminoacídico Triptofano (Trp) por Cisteína (Cys), perdiendo la propiedad aromática en la cadena lateral. Dado que se trata de un cambio importante en la estructura del aminoácido, esta variación podría modificar la estructura secundaria de la proteína. El SNP c 1510 [G/A], que produce el cambio de Valina (Val) por Metionina (Met) fue encontrado en las razas cebuinas y no ha sido reportado anteriormente. Con respecto a los SNPs c 1138 [G/A] y c 1479 [C/T], podemos mencionar que el primero fue hallado en animales cebuinos (razas Brahman y Nelore), mientras el segundo en individuos pertenecientes a las razas Hereford y Criollo. En ambos casos se trata de mutaciones sinónimas, por lo que no provocan cambios aminoacídicos y por lo tanto en la estructura y/o función de la proteína. Esto último no significa que estos SNPs no tengan ningún efecto sobre el fenotipo, dado que no puede descartarse que esten en desequilibrio de ligamiento con mutaciones ubicadas en otros exones, regiones reguladoras, zonas de splicing, etc., que puedan estar asociadas al fenotipo. En el Anexo 1 se detallan la secuencia de ADN codificante del gen LHR bovino, la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente y la ubicación de las mutaciones detectadas en el presente trabajo. Además, pueden observarse las mutaciones en el exón 11 de este gen reportadas en las bases de datos hasta el momento. Un estudio bioinformático de estos polimorfismos

podría brindar información útil acerca de sus posibles efectos sobre la estructura y función de la proteína. Sin embargo, no es este el objetivo central del presente trabajo. Como conclusión podemos mencionar que cuatro de los SNPs hallados pertenecen exclusivamente a las razas cebuinas, mientras que en las taurinas se encuentran fijados, lo que sugiere la potencial implicancia de alguna de estas mutaciones en la determinación de las diferencias observadas en la edad de pubertad de los toros de los dos tipos principales de ganado bovino.

Dado que los datos fenotípicos relacionados a la pubertad disponibles para este trabajo corresponden a ganado *Bos taurus*, los 4 SNPs observados en *B. indicus* no pudieron ser considerados para los análisis a nivel poblacional y de asociación subsiguientes. Además, debido a que las mediciones de pubertad se realizaron en la raza Angus, el SNP detectado en Hereford y Criollo (c 1479 [C/T]) tampoco pudo ser tomado en cuenta para los estudios de asociación. Afortunadamente, uno de los polimorfismos que no había sido reportado anteriormente se detectó en animales Angus. Se trata del SNP c 1504 [A/C], que produce el cambio del aminoácido Isoleucina (Ile) por Leucina (Leu). Con respecto al efecto de este cambio aminoacídico, al tratarse de aminoácidos tan emparentados, podría esperarse que la estructura de la proteína no se vea afectada. En la Figura 11 se presentan los electroferogramas obtenidos para los dos genotipos homocigotas de este polimorfismo. Este SNP resultó ser el de mayor utilidad para el presente trabajo, ya que al haber sido encontrado en los animales que poseen datos de pubertad, permitió realizar un análisis de asociación genética. De ahora en adelante lo denominaremos LHR-I499L.

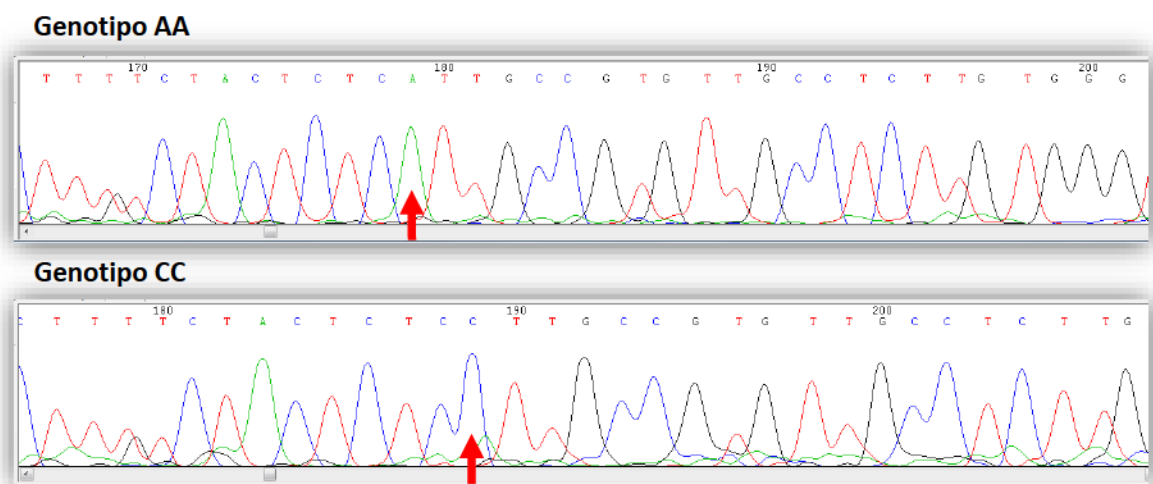


Figura 11: Electroferogramas de la secuenciación de un segmento del exón 11 de LHR donde se observan los dos genotipos del SNP LHR-I499L: AA y CC.

En humanos existe amplia información sobre la variabilidad presente en el gen LHR y se han reportado varios trabajos acerca de mutaciones activadoras e inactivadoras en el mismo, la mayoría de las cuales se localizan en el exón 11. Las mutaciones activadoras producen la activación constitutiva del gen aún en ausencia del ligando, provocando una reducción significativa de la edad de pubertad, y son mucho más frecuentes en el sexo masculino de individuos con precocidad sexual familiar asociada a este sexo, mientras que las mutaciones inactivadoras son igualmente frecuentes en ambos sexos e incluyen diferentes efectos (Huhtaniemi, 2002; Latronico *et al.*, 2000, 2012). En la Figura 12 se pueden observar las mutaciones detectadas en el gen LHR humano.

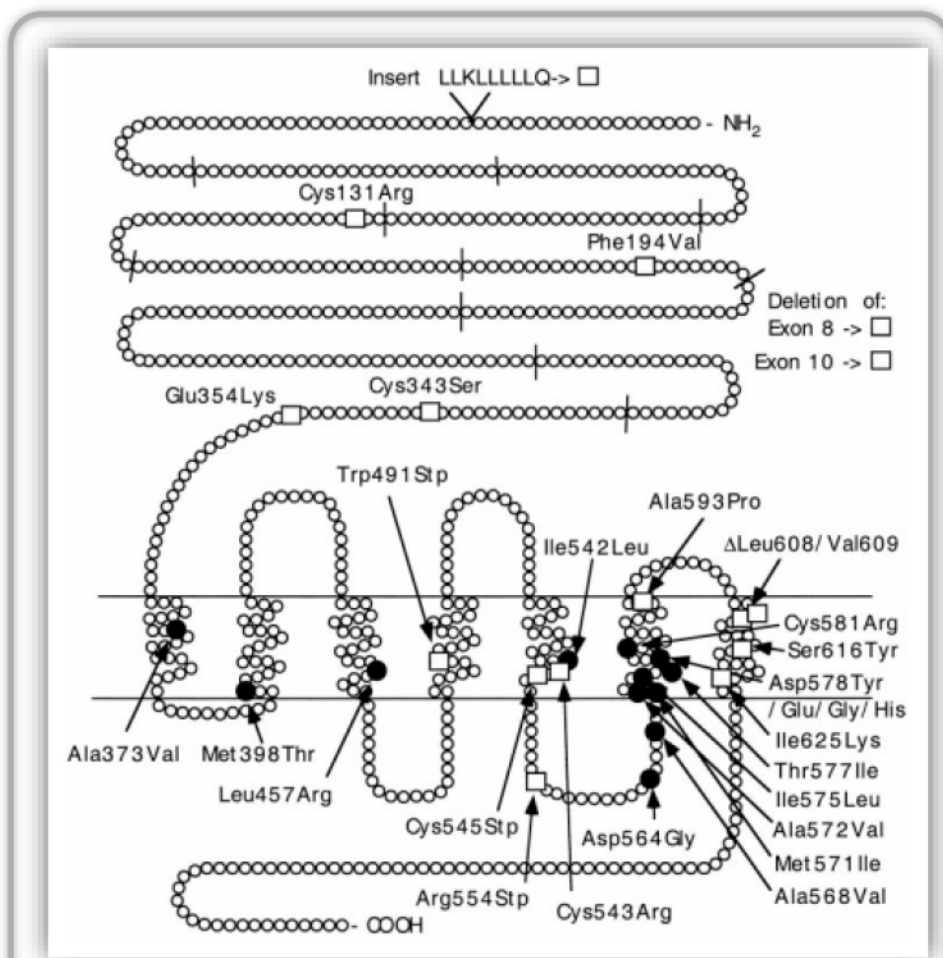


Figura 12: Esquema de la estructura del gen LHR humano donde se muestran las mutaciones existentes y otras generadas artificialmente. Las posiciones señaladas en un cuadrado indican mutaciones deletéreas, mientras que las señaladas en un círculo indican expresión constitutiva del gen (Themmen y Huhtaniemi, 2000)

Sin embargo, en el caso de los bovinos existen muy pocos trabajos que describan mutaciones en este gen, y más aún, que las mismas hayan sido asociadas a caracteres reproductivos. De los escasos trabajos, puede mencionarse a Perez Marson (2005), quien reportó polimorfismos en el exón 11 y en la región UTR 3' del gen en la raza Nelore, mientras que Hastings *et al.* (2006) reportó tres SNPs en el exón 11 en la raza Holstein asociados a caracteres reproductivos y de producción en hembras. Por otro lado, Milazzotto *et al.* (2008) detectó seis SNPs en el exón 11 y en la región 3'UTR en individuos Nelore, pero ninguno de ellos resultó asociado a fenotipos de pubertad. Sun *et al.* (2012) detectó dos polimorfismos en el exón 9 de LHR, uno de los cuales mostró una asociación con calidad espermática en toros Holstein.

Receptor de Kisspeptina 1 (KISS1R)

Para el análisis de variabilidad genética en el gen KISS1R se realizó la secuenciación directa de los segmentos correspondientes a la región promotora y a los cinco exones de este gen. Se diseñaron los cebadores para amplificar cada zona a partir de ADN genómico en un panel de 10 razas bovinas incluyendo 30 animales. Posteriormente, se comprobó la presencia de los productos de amplificación mediante electroforesis y los amplificadores obtenidos se purificaron mediante la técnica de PEG. Los productos purificados se secuenciaron con el fin de analizar la presencia de polimorfismos en dichas regiones. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas en un total de 2512 pb para cada muestra. En el Anexo 2 se muestra la secuencia nucleotídica completa del gen, la ubicación de los cebadores y las regiones analizadas.

El análisis de las secuencias no reveló ninguna variación dentro del panel estudiado, tanto en las razas taurinas como en las cebuinas, a pesar de haber secuenciado 30 muestras correspondientes a diferentes razas, número suficientemente alto como para detectar una variación en alguna de ellas. Este resultado resultó particularmente raro, dado que en la especie bovina se espera la presencia de una variación de tipo SNP cada 500 bp en *B. taurus* y un SNP cada 300 bp en *B. indicus*, aproximadamente (Bovine HapMap Consortium, 2009). Pueden plantearse diferentes explicaciones acerca de la inexistencia de variaciones en una región cromosómica o un gen. Como primera hipótesis, la falta de variabilidad podría ser esperable ya que las zonas analizadas correspondían a regiones codificantes del gen. Sin embargo, el resultado obtenido no puede ser explicado por una

restricción de los polimorfismos a los intrones, dado que la comparación con otras especies de mamíferos revela la presencia de variaciones dentro de las secuencias codificantes. Para observar cuán conservados están los aminoácidos en otras especies, la secuencia completa de la proteína KISS1R bovina se alineó con otras 10 secuencias ortólogas pertenecientes a otras especies de mamíferos: ovinos (*Orientalis aries*), caprinos (*Capra iracus*), búfalo (*Bubalus bubalis*), humanos, ratón (*Mus musculus*), porcinos (*Sus scrofa*), caninos (*Canis lupus familiaris*), y equino (*Equus caballus*). La comparación de la secuencia bovina con la de estas especies demostró un alto grado de conservación de esta proteína (más de 85%). Teniendo en cuenta esto, podría pensarse que la ausencia de variabilidad podría estar relacionada a la elevada similitud observada para esta proteína entre diferentes especies. Sin embargo, una alta homología de las proteínas ortólogas no puede explicar la ausencia de variaciones en la tercera posición de un codón, dado que una mutación en dicha posición no afectaría a la estructura y/o la función de la proteína si se tratara de una mutación sinónima. De la misma manera, teniendo en cuenta la enorme relevancia del gen KISS1 y su receptor KISS1R en la regulación de la pubertad, podría pensarse que una mutación en los mismos podría tener consecuencias importantes sobre la expresión del carácter y por lo tanto, si ocurriera una mutación en dicha zona, los animales que las presentaran serían eliminados por selección natural. Sin embargo, esto tampoco puede explicar la ausencia de una variación en el tercer codón, además de que la existencia de variabilidad en genes que son tan o más relevantes que KISS1R para el desarrollo de la pubertad, está confirmada. Por lo tanto, estas explicaciones no resultan válidas para justificar los resultados.

Como segunda hipótesis, podríamos afirmar que la deriva genética, producida en los bovinos por la utilización de pocos toros padres durante los procesos de selección, haya producido la pérdida de variabilidad genética de este gen en particular. Sin embargo, la disminución de variabilidad no se produce sobre genes o zonas específicas sino sobre el genoma completo de manera homogénea, por lo que este argumento resulta casi completamente incapaz de explicar los resultados de este trabajo. Una explicación más plausible para la ausencia de variación genética en KISS1R podría ser que en algún momento, hace no demasiado tiempo durante el proceso de domesticación, antes de la formación de las razas, los bovinos hayan sido sometidos a una fuerte selección por una mutación positiva o favorable, que haya otorgado a los individuos alguna ventaja

evolutiva; dicha selección podría haber eliminado toda la variabilidad genética de ese gen. Aunque este estado de ausencia de variabilidad no puede, en la práctica, durar demasiado tiempo, debido a que nuevas mutaciones comenzarán a aportar variación a la hipotética población carente de variación, considerando que la tasa de mutación es extremadamente baja (aproximadamente 1×10^{-9}), entonces aunque hubieran transcurrido varios años de aquel hecho, es probable que aún no haya aparecido variabilidad nuevamente en dicha región.

Dado lo extraño del caso y lo poco probables que se reconocen algunas de las explicaciones planteadas, se decidió investigar si existían mutaciones reportadas en KISS1R bovino que no hayan sido detectadas en este trabajo, para lo cual se realizó una búsqueda exhaustiva en las bases de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), y se encontró que los escasos polimorfismos reportados, no se encuentran validados sino que provienen de secuenciaciones masivas. Este tipo de secuenciaciones pueden presentar un cierto porcentaje de error (hasta aproximadamente un 5%), por lo que presumiblemente muchos de ellos puedan tratarse de artefactos producidos por los métodos de secuenciación, o al menos así puede interpretarse hasta que los mismos sean validados. Además, los resultados obtenidos se corresponden con la ausencia de trabajos que reporten variaciones en este gen en la especie bovina, y mucho menos asociadas a la edad de pubertad u otras características reproductivas en los mamíferos, a excepción de lo conocido en humanos y unos pocos trabajos realizados en cabras y cerdos (Li *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009).

El importante rol del receptor KISS1R y su ligando asociado, el péptido Kisspeptina 1, en la llegada a la pubertad ha sido extensamente estudiado y documentado en varias especies de mamíferos. Como se explicó en la sección “Introducción”, el sistema KISS–KISS1R es crucial en los procesos que conducen al inicio de la pubertad, ya que actúa principalmente a nivel del cerebro como un importante regulador de la secreción de GnRH, y existe una gran cantidad de trabajos que asocian polimorfismos en el gen y su receptor con trastornos serios en el desarrollo sexual en humanos (Han *et al.*, 2005; Topaloglu *et al.*, 2012). Desafortunadamente, la ausencia de polimorfismos en las regiones analizadas de este gen hizo que su estudio se limite a la explicación del posible motivo de la falta de variabilidad genética, imposibilitándose la realización de un estudio de asociación con la edad de pubertad en las muestras fenotipificadas.

3.2 ESTUDIO EXPLORATORIO DE ASOCIACIÓN GENÓMICA

Otra estrategia utilizada para llevar a cabo la búsqueda polimorfismos genéticos asociados a la pubertad se basó en un diseño de trabajo pensado en dos etapas. Este diseño consistió, en primer lugar, en la realización de un estudio de asociación genómica exploratorio utilizando la técnica de microarreglos de SNPs para detectar regiones cromosómicas asociadas a la edad de pubertad, y posteriormente el análisis de dichas asociaciones a nivel poblacional, con el objetivo de confirmar las asociaciones observadas en el análisis previo.

Selección de animales y genotipificación

El estudio de asociación genómica exploratorio se llevó a cabo utilizando una estrategia selectiva de individuos, que consistió en seleccionar los animales ubicados entre los más extremos para el carácter edad de pubertad. La razón por la cual se decidió utilizar esta metodología es que al permitir realizar un análisis de tipo caso-control, se logra reducir el gran número de muestras necesario a solo unas pocas, con la consecuente disminución de los costos de genotipificación y medición relacionados a este tipo de estudios. De esta manera, se seleccionaron 36 animales del panel de toros Angus que representaban los extremos de la distribución del carácter pubertad: 18 ubicados en la cola menor de la curva de distribución fenotípica, y 18 pertenecientes a la cola superior de la misma. El criterio utilizado para formar los grupos de toros extremos fue seleccionar los individuos de menor y mayor edad al momento en que su concentración y motilidad espermáticas alcanzaban valores mínimos de 50 millones de células por ml y 10%, respectivamente. Estos animales corresponden al 6,5% superior e inferior de la curva de distribución y la diferencia en la edad de pubertad entre los dos grupos fue de más de un mes y medio. Los individuos seleccionados eran hijos de 14 padres pertenecientes a diferentes linajes paternos. A la vez, esos padres representaban el 58% del total de toros padres de la población en estudio y la mayoría tenían hijos en los dos grupos extremos, lo que previene en alguna medida el efecto fijo del padre durante el análisis de asociación. En la Tabla 10 se pueden observar las edades de pubertad de cada grupo extremo.

Una vez seleccionados los individuos extremos, se extrajo el ADN mediante el kit comercial *Wizard Genomic* (Promega, Madison, WI, USA), dada la concentración y la

pureza requeridas por la técnica de microarreglos de SNPs. Las muestras se genotipificaron con el chip de alta densidad de Illumina Bovine HD BeadChip, que contiene 777.962 SNPs.

Control de calidad de los genotipos

Los datos crudos obtenidos de la genotipificación fueron analizados en primer lugar por el proveedor, utilizando los software de post-genotipado iScan y BeadStudio Genotyping Module v.3.1 (Illumina Inc.), que permiten visualizar, analizar y procesar los datos, transformando la representación gráfica de los resultados (*geneplots*) en asignación de genotipos. Del total de SNPs contenidos en el chip, el número de SNPs para los cuales no fue posible asignar sus genotipos fue 1735 (menos de 0,5%), lo que demuestra la alta eficiencia de la técnica. Una vez recibidos los datos genotípicos de los 36 animales, y previamente a la realización del análisis de asociación, los mismos se procesaron usando el software PLINK v. 1.07 (Purcell *et al.*, 2007), de acuerdo a como se detalla en la sección “Materiales y Métodos”, con el objetivo de eliminar los individuos y los SNPs que por alguna razón no superaran una determinada calidad de lectura y estadística, por lo que no podrían ser utilizados en los análisis subsiguientes. Para esto se realizaron controles de calidad sobre las muestras y los marcadores. En primer lugar, se analizó el porcentaje de genotipos perdidos en cada una de las muestras, observándose que todas presentaron más del 80% de los SNPs exitosamente genotipificados, por lo cual ninguno de los animales debió ser excluido. Posteriormente se realizó el análisis individual de los SNPs utilizando tres criterios diferentes: *call rate*, MAF y HWE. Se observó que todos los SNPs exhibieron valores de *call rate* superiores al valor establecido como aceptable (85%), por lo que no fue necesario excluir ningún marcador de los análisis posteriores. Además, de acuerdo a los valores de MAF ($< 0,025$) y HWE ($P < 0,001$) fijados, se eliminaron los marcadores que no presentaban un valor de MAF adecuado y/o que no cumplían con el HWE. Como resultado de la aplicación de los criterios mencionados, 156915 SNPs fueron eliminados, resultando en un total de 621047 marcadores adecuados para continuar los estudios siguientes. El número de marcadores obtenidos por cromosoma luego de la aplicación de los controles de calidad se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7: Número total de SNPs incluidos en el chip de genotipificación de Illumina (*Bovine High Density Genotyping BeadChip*), número de SNPs eliminados luego de aplicar los controles de calidad: marcadores con valores de *call rate* < 85%, marcadores con MAF < 0.025 y marcadores con P-val < 0,001 para el HWE, y número de SNPs obtenidos apropiados para el análisis de asociación.

Cromosoma	SNPs totales	SNPs eliminados	SNPs obtenidos
BTA1	46495	8782	37713
BTA2	40056	7378	32678
BTA3	35579	6366	29213
BTA4	34980	5891	29089
BTA5	34842	7202	27640
BTA6	35519	5854	29665
BTA7	33168	6219	26949
BTA8	33529	10798	22731
BTA9	31060	5532	25528
BTA10	30449	4465	25984
BTA11	32015	4612	27403
BTA12	26127	4743	21384
BTA13	23594	6655	16939
BTA14	24780	7284	17496
BTA15	24755	3764	20991
BTA16	24178	4049	20129
BTA17	22266	2984	19282
BTA18	19386	2187	17199
BTA19	18908	2102	16806
BTA20	21490	2705	18785
BTA21	21175	3614	17561
BTA22	18034	2019	16015
BTA23	15215	1908	13307
BTA24	18620	3143	15477
BTA25	12931	1543	11388
BTA26	15242	1865	13377
BTA27	13152	1770	11382
BTA28	13038	1385	11653
BTA29	14710	1779	12931
BTX	39367	25015	14352
BTY	1224	1224	-
mtADN	343	343	-
No asignados	1735	1735	-
Total	777962	156915	621047

Análisis de asociación

El análisis de asociación de los marcadores obtenidos del proceso de filtrado se llevó a cabo mediante la prueba de Chi-cuadrado implementada en Plink v. 1.07, considerando los dos grupos extremos mencionados anteriormente, y tomando como valor de corte para detectar una asociación un nivel de significancia estadística de $P < 0,001$. Cabe mencionar en este punto que los resultados obtenidos no fueron corregidos para las múltiples comparaciones realizadas debido a que una corrección de este tipo nos llevaría a valores de significancia extremadamente bajos para cada comparación. Por ejemplo, una corrección por el método de Bonferroni nos daría un valor de significancia de aproximadamente 1×10^{-8} para cada comparación realizada. Además, este método es considerado excesivamente conservativo, especialmente teniendo en cuenta el hecho de que en muchos casos las comparaciones realizadas no son completamente independientes unas de otras, como cuando se utilizan marcadores en desequilibrio de ligamiento (Balding, 2006). En nuestro caso, considerando que muchos de los marcadores evaluados no son independientes debido al ligamiento, el número de comparaciones se reduciría, y consecuentemente el valor de significancia podría aumentar aproximadamente hasta en un factor de 2 a 3. A pesar de esta desventaja, y teniendo en cuenta que el objetivo de esta etapa no fue encontrar asociaciones estadísticamente significativas sino realizar un análisis exploratorio o preliminar de las regiones genómicas potencialmente asociadas, se tomó la decisión de establecer un valor de corte inicial de $P < 0,001$ y seleccionar los marcadores que presentaran un $P \leq 0,001$, con la intención de confirmar su asociación en una segunda etapa utilizando la población completa de 276 animales. El método de Control Genómico (GC; Devlin *et al.*, 2001) se aplicó con el objetivo de corregir los P-val por la posible existencia de estratificación poblacional, que podría conducir a la detección de falsas asociaciones, es decir, que no se deben a una asociación verdadera entre los marcadores y la variable estudiada, sino que puede ser causada por este fenómeno.

Bajo estas consideraciones, como resultado de la asociación se obtuvieron 266 marcadores asociados con un valor de $P < 0,001$, 6 de los cuales se mostraron asociados con una significancia menor a 0,0001. Dichos polimorfismos se encuentran ubicados principalmente en cuatro cromosomas: BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24. En la Tabla 8 se muestra el número de marcadores por cromosoma que resultaron asociados a los dos

niveles de significancia mencionados, y en la Figura 13 se muestra el *Manhattan Plot*, que muestra la distribución de los P-val para todos los cromosomas.

Como se puede observar en la Tabla 8, la mayor cantidad de SNPs mostrando valores de asociación significativos ($P < 0,001$) se encontraron en el cromosoma BTA3, el cual contuvo el 30,45% (81 SNPs) del total de los marcadores asociados. De estos, 64 están ubicados en la región comprendida entre 19,07 y 23,85 Mb y dentro de estos últimos, dos SNPs mostraron un grado de significancia mayor que el resto: rs137573267 ($P = 4.85 \times 10^{-5}$) y rs136326469 ($P = 5.26 \times 10^{-5}$), ubicados en las posiciones 23.476.148 y 23.481.567 pb, respectivamente. Además, dentro del mismo cromosoma, se observó que las regiones comprendidas entre 26,40 y 26,54 Mb, y entre 31,30 y 31,54 Mb contuvieron 10 y 6 marcadores asociados ($P < 0,001$), respectivamente.

El segundo cromosoma en mostrar mayor cantidad de marcadores asociados fue el BTA24, en el cual se encontró el 29,32% (78) de los marcadores asociados a edad de pubertad ($P < 0,001$), 75 de los cuales están ubicados entre 30,79 y 32,14 Mb. Los 3 SNPs restantes comprenden un bloque pequeño localizado entre 50,985 y 50,988 Mb de este cromosoma.

En los cromosomas BTA1 y BTA20 se detectó aproximadamente el 20% de los SNPs potencialmente asociados con la edad de pubertad. En el BTA1 se encontraron 24 marcadores asociados ($P < 0,001$), 14 de los cuales se encuentran ubicados entre 99,17 y 99,99 Mb. De estos 14, dos mostraron un valor de significancia mayor al resto ($P < 0,0001$): rs135953349 y rs110604205, ubicados en 99.810.236 y 99.814.416 pb, respectivamente. Los 10 SNPs restantes se ubicaron en las regiones comprendidas entre 75,46 y 82,71 Mb y entre 31,30 y 31,54 Mb del cromosoma. Con respecto al cromosoma BTA20, también se obtuvieron 24 marcadores asociados ($P < 0,001$) distribuidos entre las posiciones 26,20 y 28,35 Mb, uno de los cuales (rs135334910) mostró un valor de $P < 0,0001$.

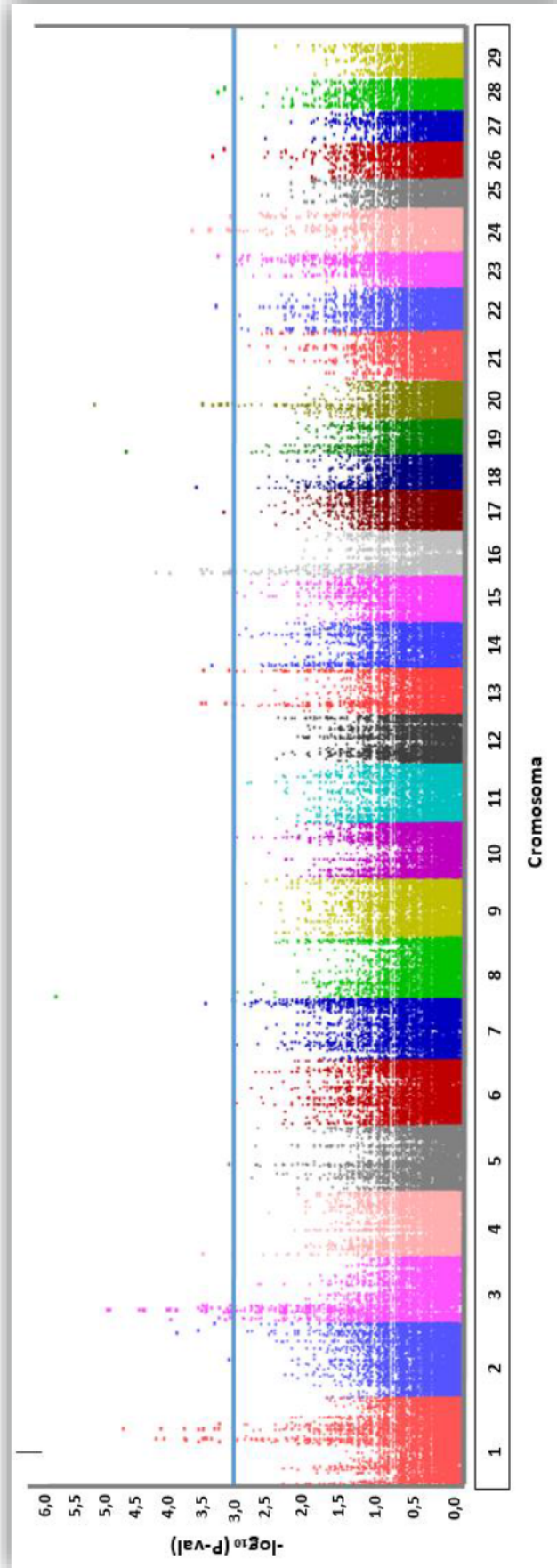
Por último, podemos mencionar que en el cromosoma BTX se detectaron solo dos marcadores asociados (rs135795150 y rs110798626; $P < 0,001$), ubicados en las posiciones 20.755.164 y 20.758.679 pb, respectivamente, mientras que los cromosomas BTA2, BTA16 y BTA22 contienen, en conjunto, el 13,53% (entre 10 y 16 SNPs) de los

Tabla 8: Marcadores asociados a la edad de pubertad detectados en cada cromosoma a dos niveles de significancia estadística: $P \leq 0,001$ y $P \leq 0,0001$, detectados mediante el estudio de asociación genómica utilizando una estrategia selectiva de individuos y un diseño de tipo caso-control.

Cromosoma	Nº total de SNPs asociados P-val $\leq 0,001$	Nº de SNPs P-val $\leq 0,001$	Nº de SNPs P-val $\leq 0,0001$
BTA1	24	22	2
BTA2	10	10	0
BTA3	81	79	2
BTA4	3	3	0
BTA5	0	0	0
BTA6	0	0	0
BTA7	2	2	0
BTA8	1	0	1
BTA9	0	0	0
BTA10	0	0	0
BTA11	0	0	0
BTA12	0	0	0
BTA13	4	4	0
BTA14	2	2	0
BTA15	2	2	0
BTA16	16	16	0
BTA17	0	0	0
BTA18	1	1	0
BTA19	1	1	0
BTA20	24	23	1
BTA21	2	2	0
BTA22	10	10	0
BTA23	2	2	0
BTA24	78	78	0
BTA25	0	0	0
BTA26	1	1	0
BTA27	0	0	0
BTA28	0	0	0
BTA29	0	0	0
BTX	2	2	0
Total	266	260	6

marcadores significativos. De los restantes 22 cromosomas, diez (BTA4, BTA7, BTA13, BTA14, BTA15, BTA18, BTA19, BTA21, BTA23 y BTA26) solo tuvieron unos pocos SNPs asociados (entre 1 y 4), mientras que los demás no mostraron ningún marcador asociado a la pubertad. En la Figura 14 se puede observar la distribución de los P-val para los marcadores en los cromosomas que presentaron mayor cantidad de SNPs asociados.

Figura 13: Gráfico de los resultados del estudio de asociación genómica exploratorio realizado con individuos extremos para edad de pubertad. El *Manhattan Plot* muestra la distribución de los P-val para cada cromosoma. La línea horizontal a $P = 1 \times 10^{-3}$ provee una referencia visual de los P-val a lo largo de los cromosomas. Los valores obtenidos para la asociación fueron corregidos mediante el método de Control Genómico (GC).



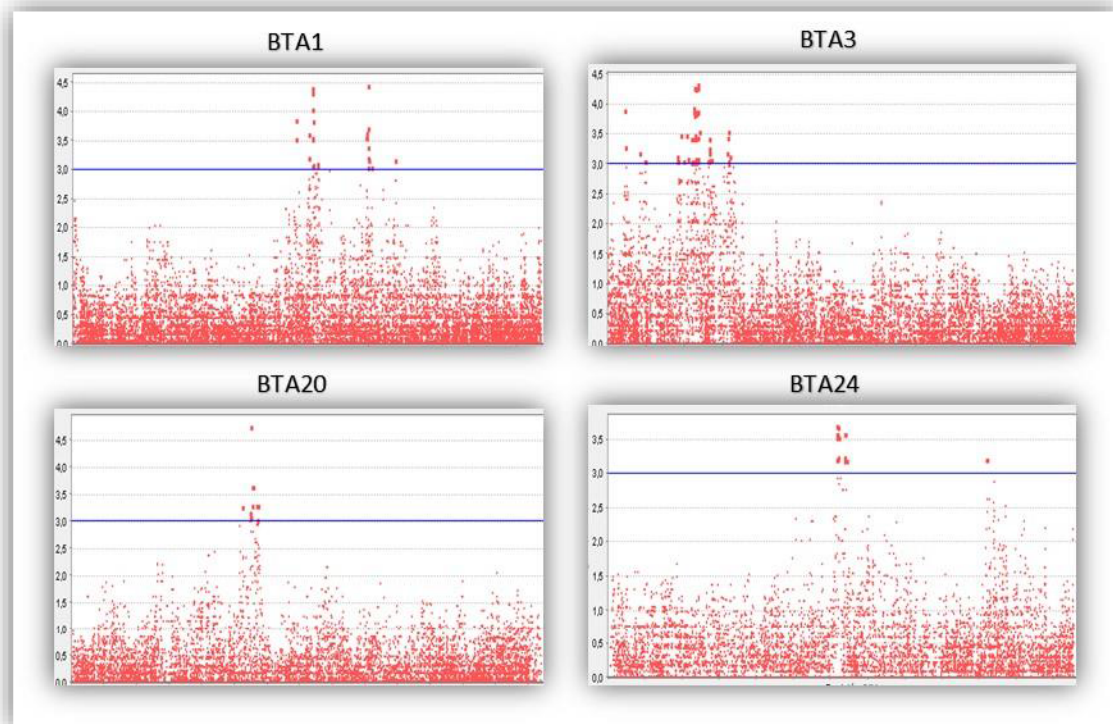


Figura 14: *Manhattan Plot* para los cuatro cromosomas que presentaron mayor cantidad de marcadores asociados a pubertad: BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24. Se muestra la inversa del logaritmo decimal ($-\text{Log}_{10}$) de los P-val obtenidos para la asociación de los SNPs con la edad de pubertad mediante el estudio GWAS exploratorio en función de la posición genómica en bp, para cada cromosoma.

Construcción de haplotipos y selección de SNPs

Finalmente, se realizó la reconstrucción de fases en desequilibrio de ligamiento entre los marcadores de cada una de las regiones cromosómicas asociadas, es decir, se construyeron los haplotipos con el fin de seleccionar los SNPs que representen a cada una de las zonas asociadas. Para esto se utilizó el programa Haploview v 3.31 (Barrett *et al.*, 2005) y el coeficiente de desequilibrio de ligamiento D' , que permite estimar el nivel de heredabilidad conjunto de dos o más marcadores. Los resultados se muestran la Figura 14. Como se puede observar, los SNPs ubicados en los cromosomas BTA1, BTA3, BTA20, y BTA24 están agrupados en bloques de ligamiento, y dado que un marcador tomado de cada bloque sería representativo de los demás marcadores ubicados en el mismo bloque, se decidió seleccionar 5 SNPs pertenecientes a los bloques principales de cada cromosoma con el objetivo de confirmar la asociación observada previamente, en la

población completa (n = 276). Los marcadores seleccionados fueron: rs132637859, rs137573267 y rs135506491 (pertenecientes al BTA3), rs137108804 (BTA20) y rs136317366 (BTA24). Además, se seleccionaron dos SNPs ubicados en el cromosoma BTA1 (rs135953349 y rs110604205) y los dos SNPs pertenecientes al BTX que mostraron un $P < 0,001$ (rs135795150 y rs110798626). Esta última elección se realizó teniendo en cuenta la gran cantidad de estudios que reportan asociaciones de regiones del BTX con características relacionadas a la edad de pubertad en bovinos (ver Figura 4; Fortes *et al.*, 2013a). En la Tabla 9 se muestra información detallada de los SNPs seleccionados para realizar la genotipificación a nivel poblacional.

Tabla 9: Marcadores seleccionados a partir del estudio GWAS exploratorio, de acuerdo sus P-val y al análisis de desequilibrio de ligamiento, para realizar la genotipificación en la población completa.

Cromosoma	Marcador		Posición ²	P-val
	NCBI ID	Illumina ID ¹		
BTA1	rs135953349	BovineHD0100028485	99.810.236	0,0001
	rs110604205	BovineHD0100028486	99.814.416	
BTA3	rs132637859	BovineHD0300007093	22.648.786	0,001
	rs137573267	BovineHD0300007344	23.476.148	0,0001
	rs135506491	BovineHD0300008707	27.387.215	0,001
BTA20	rs137108804	BovineHD2000008110	27.426.123	0,001
BTA24	rs136317366	BovineHD2400008409	30.934.156	0,001
BTX	rs135795150	BovineHD0300006789	20.755.164	0,001
	rs110798626	ARS-BFGL-NGS-84443	20.758.679	

¹ Denominación de los SNPs en el panel de Illumina.

² Posición genómica (pb) basada en la versión UMD 3.1 del genoma *Bos taurus*.

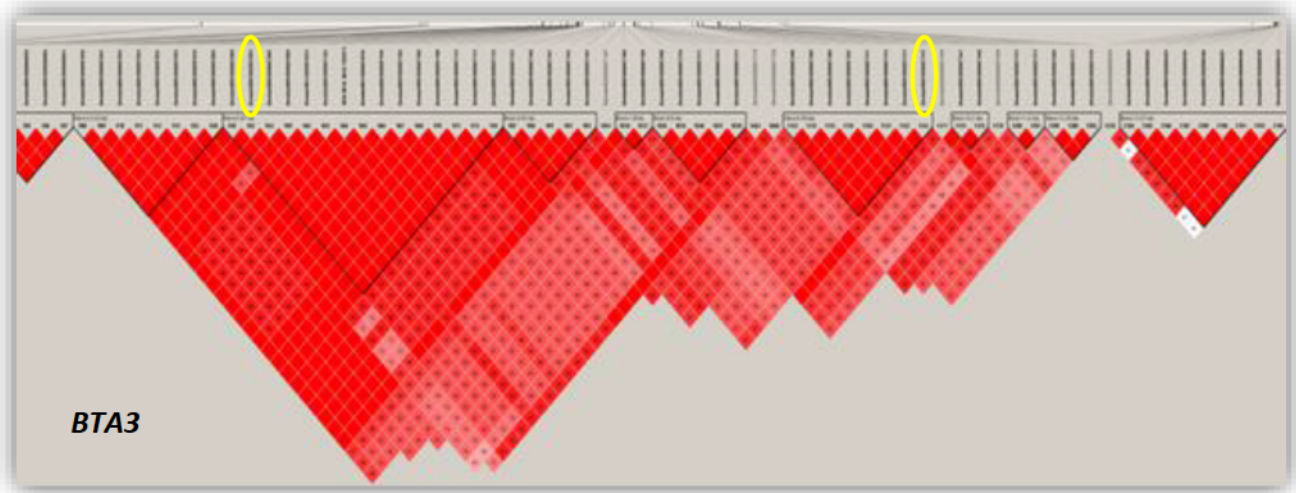
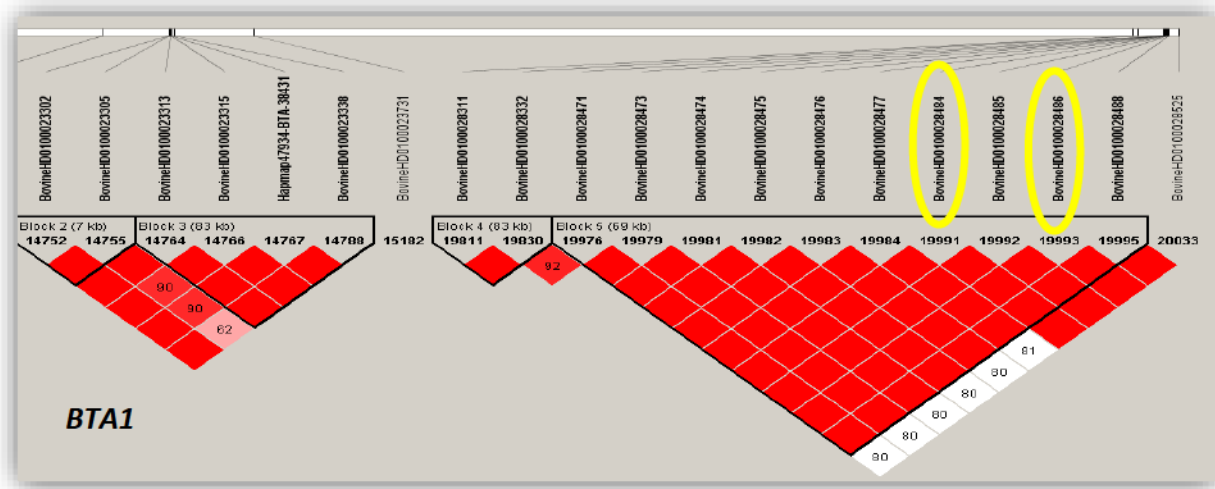


Figura 15: Análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs ubicados en los cuatro cromosomas con mayor número de marcadores asociados ($P < 0,001$) a la edad de pubertad: BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24. Los bloques fueron definidos mediante el coeficiente D' utilizando el programa Haploview v.3.1 (Barrett *et al.*, 2005). Los bloques haplotípicos se muestran enmarcados con triángulos que rodean a los marcadores, estimados bajo la norma de las cuatro gametas (Wang *et al.*, 2002). Los marcadores seleccionados se encuentran marcados en amarillo.

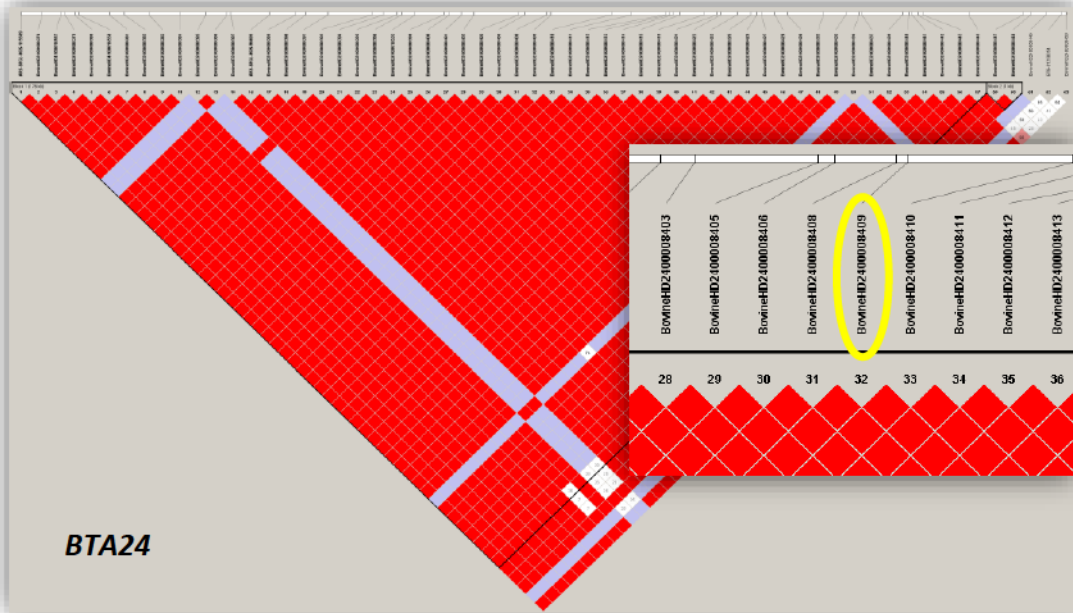
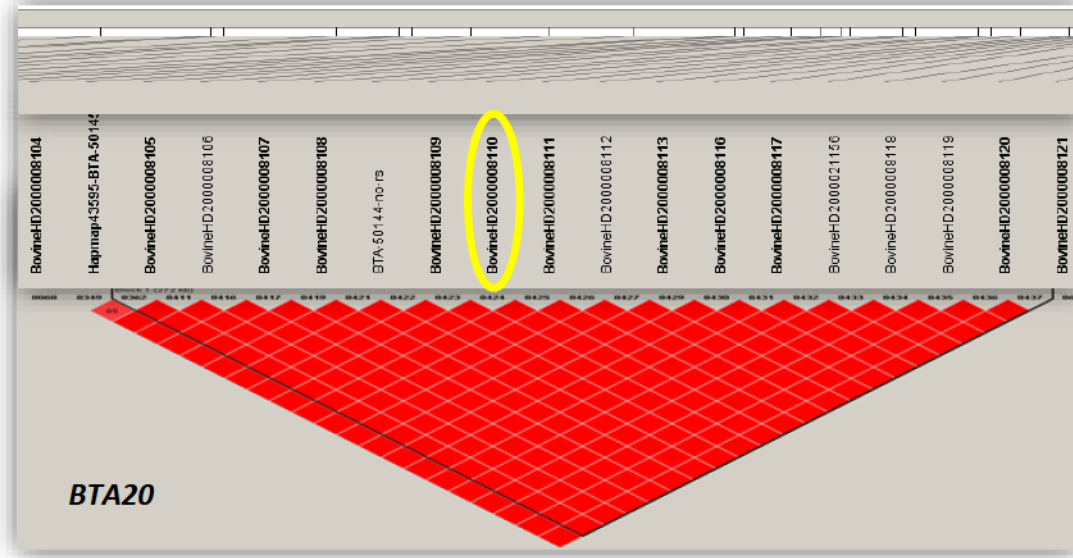


Figura 15 continuación: Análisis de disequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs ubicados en los cuatro cromosomas con mayor número de marcadores asociados ($P < 0,001$) a la edad de pubertad: BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24. Los bloques fueron definidos mediante el coeficiente D' utilizando el programa Haploview 3.31 (Barrett *et al.*, 2005). Los bloques haplotípicos se muestran enmarcados con triángulos que rodean a los marcadores, estimados bajo la norma de las cuatro gametas (Wang *et al.*, 2002). Los marcadores seleccionados se muestran en amarillo.

3.3 ASOCIACION GENÉTICA DE MARCADORES CON EDAD DE PUBERTAD

3.3.1 Edad de pubertad y peso a los 300 días

En los toros el inicio de la pubertad se considera como el momento en el que un eyaculado presenta una concentración de al menos 50 millones de espermatozoides por mililitro (C50) y un porcentaje de motilidad lineal del 10% (M10). Otro estimador de la edad de pubertad frecuentemente utilizado, es la medida de la circunferencia escrotal. En las haciendas comerciales de animales del tipo *Bos taurus* rutinariamente suele considerarse que un animal ha llegado a la pubertad cuando su circunferencia escrotal alcanza los 28 cm (CE28), aunque este valor varía de acuerdo a la raza. Como se comentó en la introducción, la circunferencia escrotal posee una alta correlación con la edad de pubertad y por esto resulta un buen estimador del inicio de la misma. A pesar de que la calidad espermática es estimador más preciso, las medidas de concentración y motilidad son difíciles de obtener y por lo tanto la circunferencia escrotal suele ser más utilizada. Dado que es plausible que diferentes genes regulen los procesos de espermatogénesis y crecimiento testicular, para este trabajo se decidió estimar cuatro edades de pubertad, basadas en cuatro criterios. En primer lugar, la edad de inicio de la pubertad se estimó mediante los dos criterios comúnmente utilizados para definirla; uno de ellos fue la edad a la cual CE es igual a 28 cm (CE28), mientras que el otro fue la edad a la cual C alcanza los 50 millones de células por ml y M es 10% (C50/M10). Adicionalmente, se decidió desglosar el segundo criterio para estimar la edad de pubertad mediante la concentración espermática (C50) y mediante la motilidad lineal (M10), por separado. Las estimaciones se realizaron mediante una regresión no lineal usando el programa estadístico SAS, como se explica en la sección “Materiales y Métodos”. Además, con el objetivo de incluir el efecto del peso corporal como covariable, dado que es uno de los factores determinantes de la manifestación de la pubertad, se estimó el peso de los animales ajustado a los 300 días de edad (P300). Este último fue calculado a partir del peso obtenido de cada animal en cada una de las medidas realizadas y el peso al destete, estableciendo como valor inicial el peso al nacimiento. En la Tabla 10 se describen los promedios y errores estándar para las variables calculadas, en los 276 toros que conforman la población completa, y en los dos grupos extremos.

Tabla 10: Promedio de las edades de pubertad estimadas y peso estimado a los 300 días de edad (P300), con sus correspondientes errores estándar (SE), en el panel de 276 animales y en cada grupo extremo (precozes y tardíos). Las edades de pubertad fueron estimadas según cuatro criterios: i) Circunferencia escrotal igual a 28 cm (CE28); ii) Concentración espermática igual a 50×10^6 de células por ml (C50); iii) Motilidad progresiva lineal igual a 10% (M10) y iv) C igual a 50×10^6 de células por ml y M igual a 10% (C50/M10).

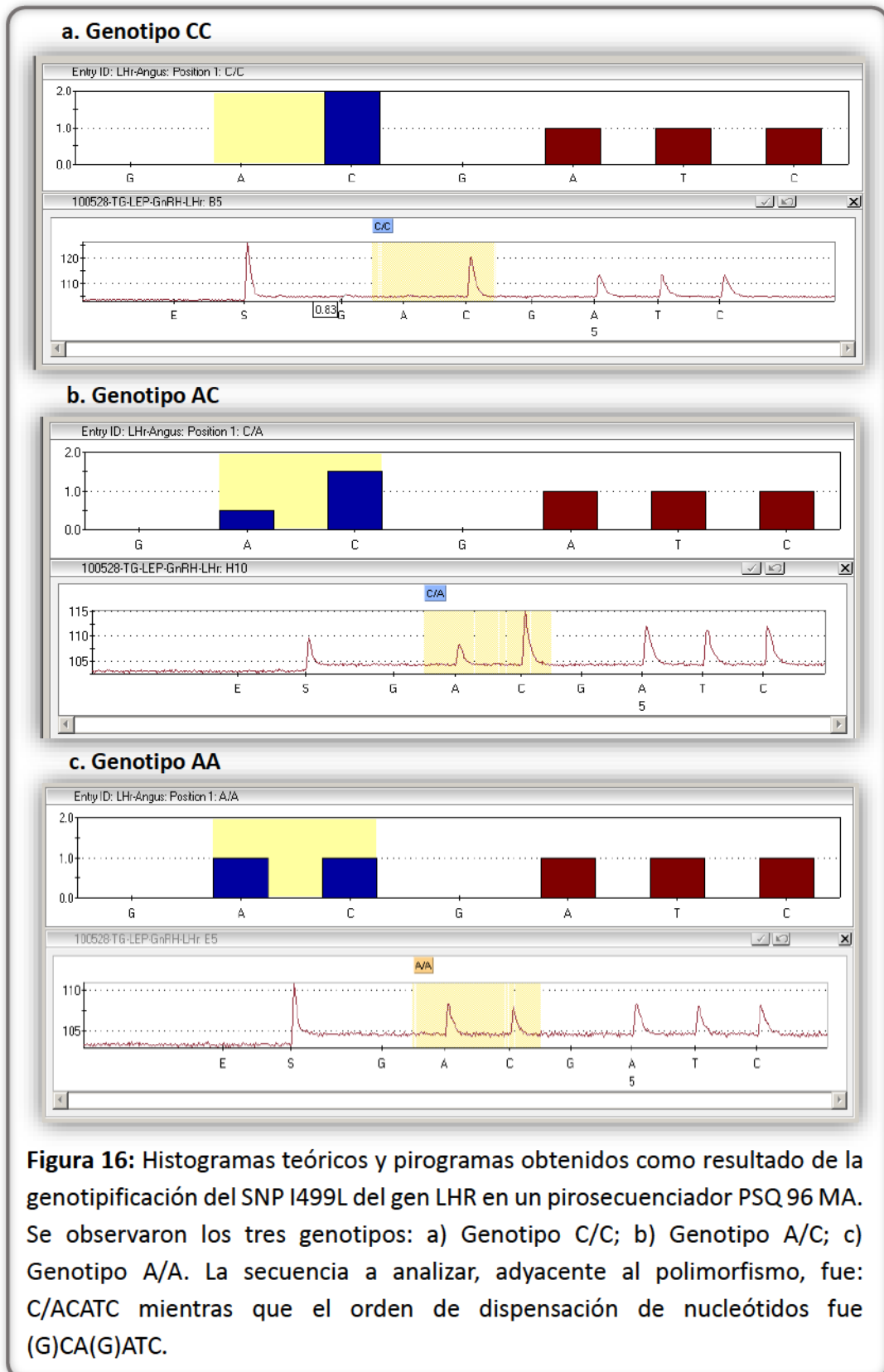
Grupo	CE28 ± SE	C50 ± SE	M10 ± SE	C50 / M10 ± SE	P300 ± SE
276	280,1 ± 30,8	271,1 ± 41,8	271,9 ± 49,3	281,0 ± 40,0	265,7 ± 30,3
Precozes	263,4 ± 26,7	207,6 ± 32,4	202,2 ± 28,9	244,0 ± 34,1	273,6 ± 22,9
Tardíos	277,0 ± 37,1	305,8 ± 47,9	317,4 ± 54,7	317,6 ± 46,1	262,8 ± 36,2

3.3.2 Medidas de variabilidad genética

Para analizar los polimorfismos encontrados y seleccionados a nivel poblacional y posteriormente determinar si existe una asociación de los mismos con la edad de pubertad, se llevó a cabo la genotipificación de los marcadores seleccionados en los puntos anteriores en la población completa mediante dos técnicas: pirosecuenciación y espectrometría de masas.

Polimorfismo en LHR

Como se explicó anteriormente, dado que el SNP LHR-I499L fue hallado en la raza Angus, para la cual se tenían datos de pubertad, la información genética obtenida de este polimorfismo podría ser utilizada para realizar un análisis de asociación. Con el fin de genotipificar este polimorfismo a nivel poblacional, se puso a punto un método de genotipificación por pirosecuenciación, y se tipificaron las 276 muestras correspondientes a los toros Angus del panel. Como resultado se detectaron los tres genotipos posibles (A/A, A/C y C/C) para esta posición. Los pirogramas obtenidos coincidieron con los histogramas teóricos predichos por el software PSQ 96MA 2.1.1 (Figura 16). Es importante considerar que el cebador *forward* se encontraba biotinilado y el cebador interno utilizado poseía orientación *reverse*, por lo que las variantes se leyeron como A/A, A/C y C/C en los pirogramas.



Luego de obtener los genotipos del SNP para la población analizada, se estimaron las frecuencias génicas, la heterocigocidad esperada (h_e) y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada rodeo y para los dos rodeos en conjunto. Los resultados de las medidas de variabilidad genética obtenidos se muestran en la Tabla 11a,b. Como se puede observar, ambos alelos estuvieron presentes en los dos rodeos con una MAF y una heterocigocidad mayores a 10% y 17,9%, respectivamente. Mediante el test de HWE se demostró que el marcador no presenta desviaciones significativas de las proporciones teóricas del equilibrio ($P > 0,05$). Estos resultados hicieron posible la utilización de este SNP en el análisis de asociación genética posterior.

Tabla 12a: Número de animales observados para cada genotipo del marcador LHR-I499L y frecuencias genotípicas en la población completa.

Genotipos	N	Frecuencias genotípicas
AA	126	0,457
AC	35	0,127
CC	115	0,417

Tabla 11b: Frecuencias génicas, equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) medido a través del índice F_{is} , y heretocigocidad esperada (h_e) para el polimorfismo LHR-I499L genotipificado por pirosecuenciación, dentro de cada rodeo y en los dos rodeos en conjunto.

SNP	Población	Frecuencias génicas		F_{is} (P-val)	h_e
		A	C		
LHR-I499L	Rodeo 1	0,28	0,72	0,865	0,407
	Rodeo 2	0,10	0,90	1,000	0,179
	Rodeo 1+2	0,24	0,76	0,618	0,366

Polimorfismos seleccionados a partir del estudio GWAS exploratorio

Para la determinación de los genotipos de los marcadores correspondientes a los cromosomas BTA1, BTA3, BTA20, BTA24 y BTX se diseñó un protocolo de genotipificación para cada variante y se utilizaron las técnicas de pirosecuenciación y espectrometría de masas. En la Figura 16 se muestran los pirogramas obtenidos para cada

marcador genotificado mediante pirosecuenciación, a excepción de los SNPs correspondientes al BTA1 (rs135953349 y rs110604205) y BTA3 (rs135795150 y rs110798626), que fueron tipificados mediante la plataforma Sequenom (GeneSeek Inc. Lincoln, NE, USA). A partir de los genotipos obtenidos, se realizaron las medidas de variabilidad genética, que se pueden observar en la Tabla 12.

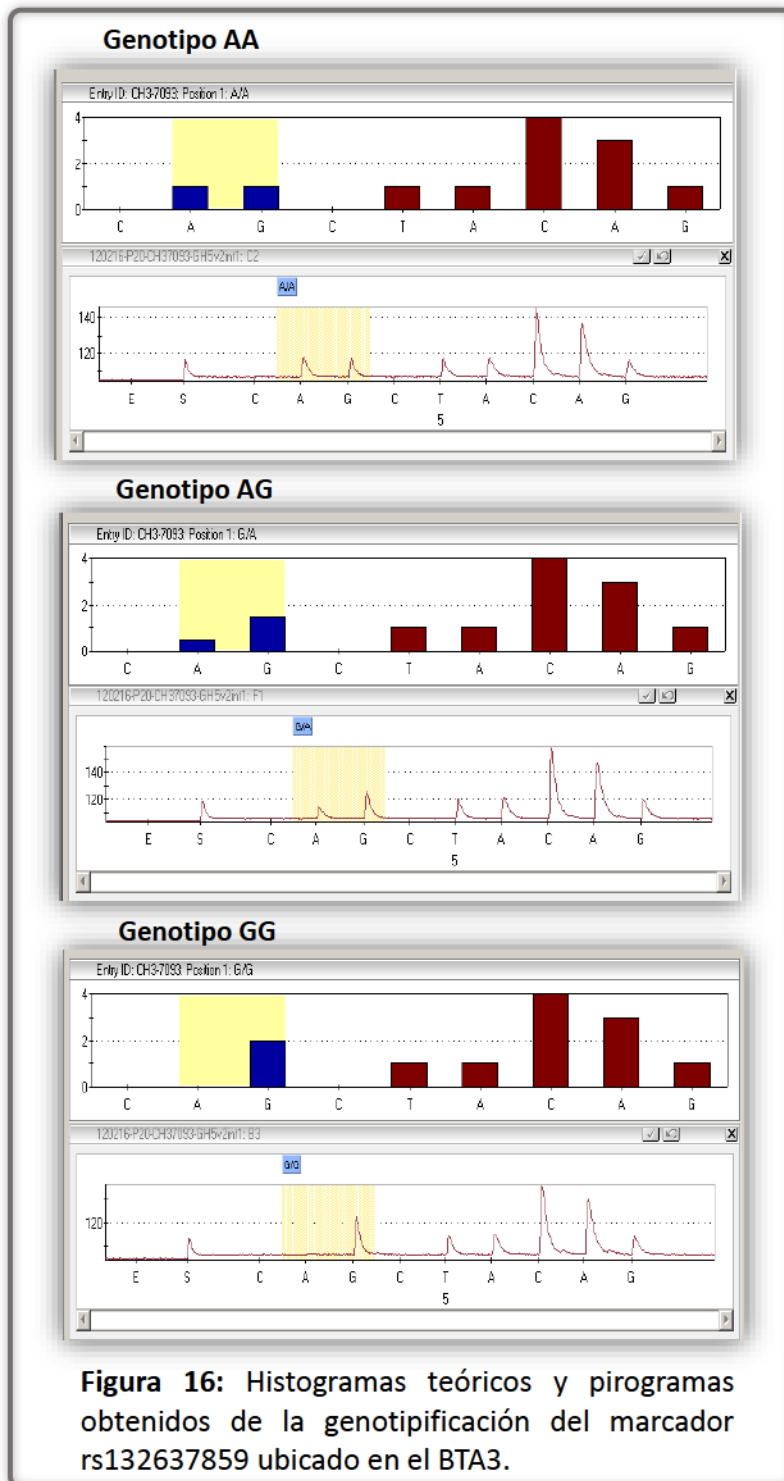


Figura 16: Histogramas teóricos y pirogramas obtenidos de la genotipificación del marcador rs132637859 ubicado en el BTA3.

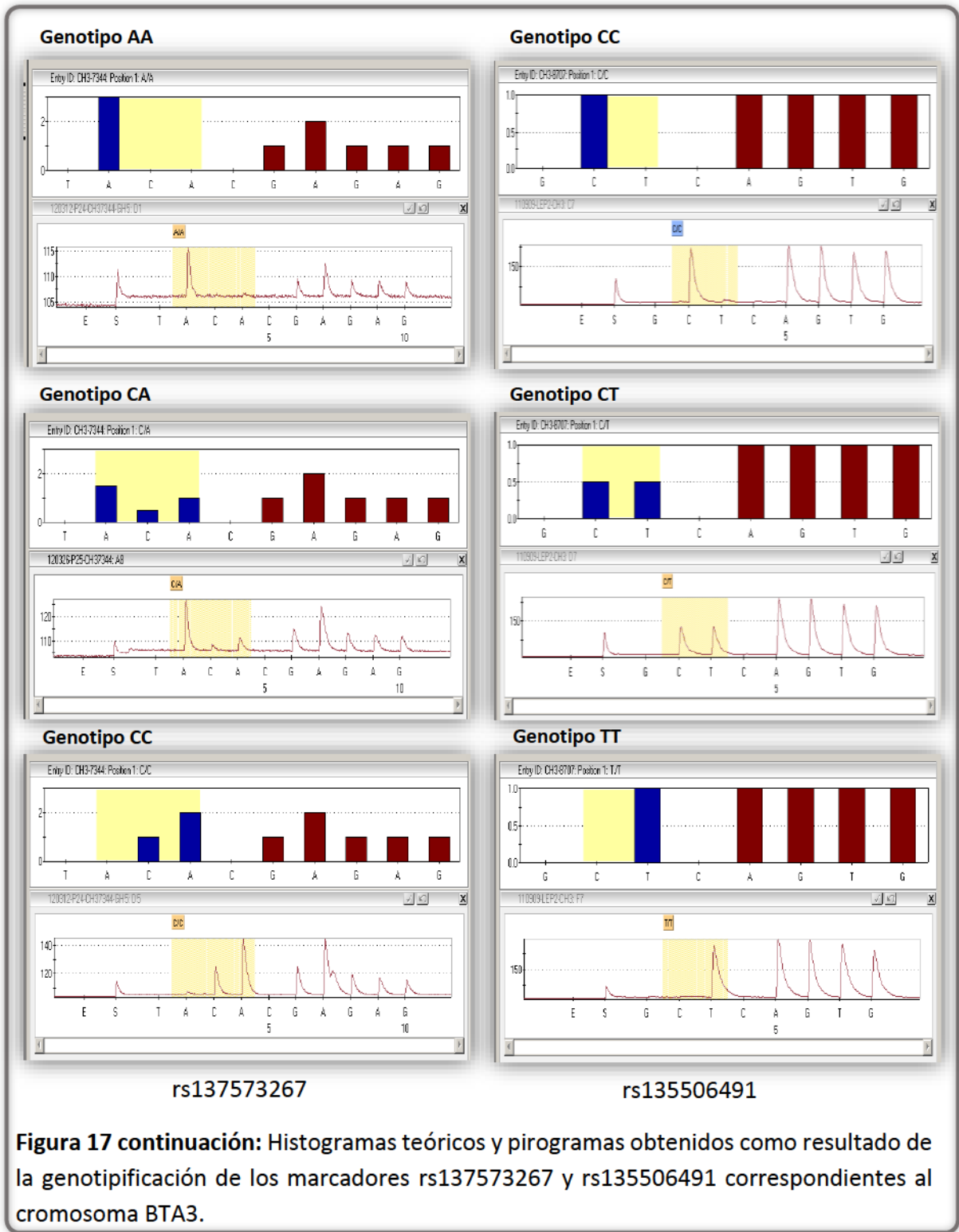


Figura 17 continuación: Histogramas teóricos y piogramas obtenidos como resultado de la genotipificación de los marcadores rs137573267 y rs135506491 correspondientes al cromosoma BTA3.

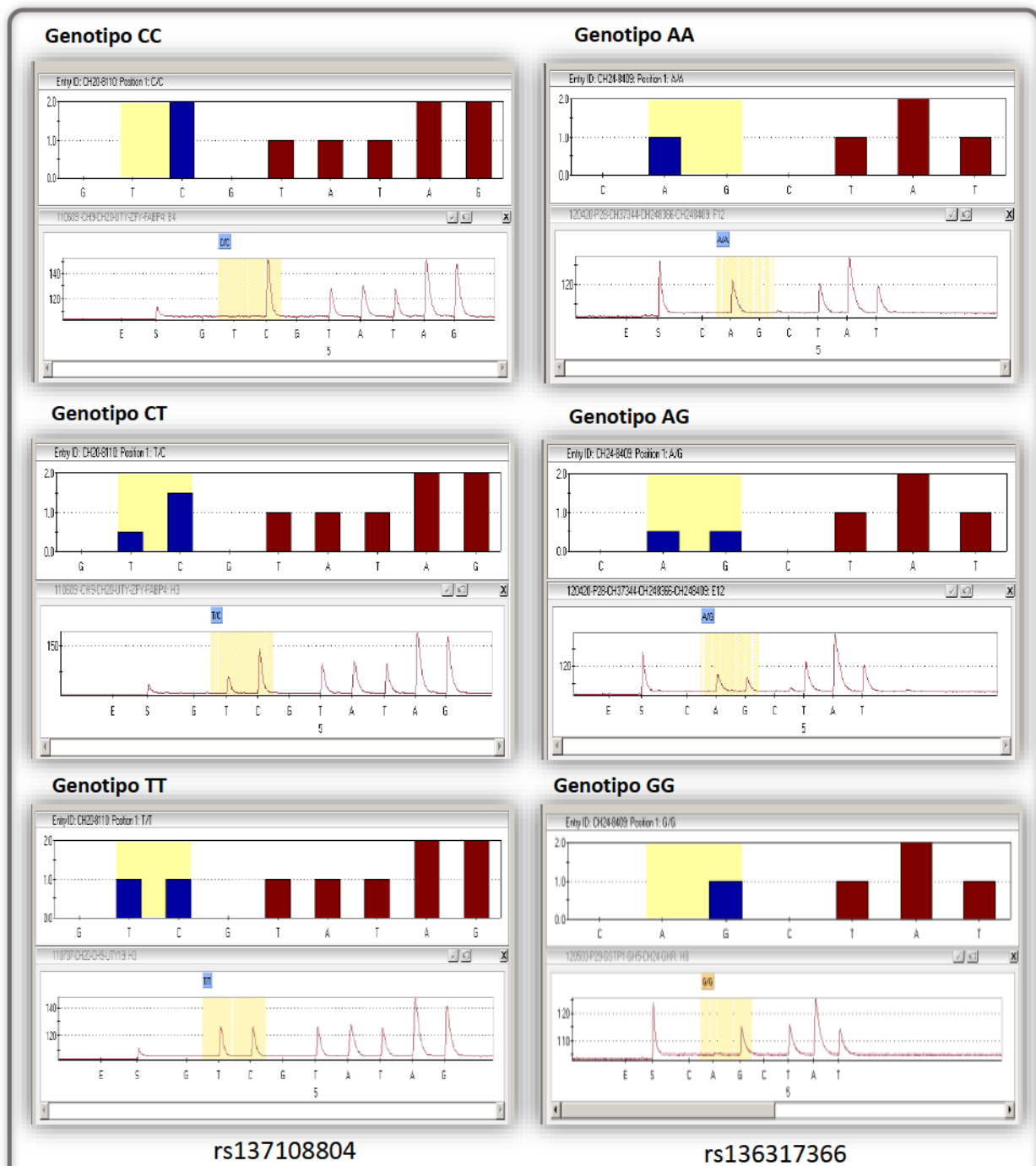


Figura 17 continuación: Histogramas teóricos y pirogramas obtenidos como resultado de la genotipificación de los marcadores rs137108804 del BTA20 y rs136317366 correspondiente al cromosoma BTA24.

Tabla 12: Variabilidad genética de los SNPs seleccionados a partir del estudio GWAS exploratorio. Se muestran las frecuencias genotípicas y génicas, la heterocigosidad esperada (h_e) y observada (h_o) y el P-val para el HWE, para cada locus en la población estudiada. Se indica también el número de animales exitosamente genotipificados en cada caso (N total). El número de animales con cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los genotipos y los alelos para cada locus están ordenados por orden alfabético.

Marcador	BTA1		BTA3			BTA20	BTA24	BTX	
	rs135953349	rs110604205	rs135506491	rs132637859	rs137573267	rs137108804	rs136317366	rs135795150	rs110798626
Genotipo	CC (156)	AA (156)	CC (102)	AA (89)	AA (120)	CC (123)	AA (92)	AA (176)	AA (174)
	CT (86)	AG (86)	CT (166)	AG (131)	AC (101)	CT (106)	AG (104)	-	-
	TT (16)	GG (16)	TT (79)	GG (53)	CC (40)	TT (46)	GG (58)	GG (87)	GG (87)
N total	258	258	275	273	261	275	254	263	265
Frecuencias genotípicas	0,604	0,604	0,371	0,326	0,460	0,447	0,362	0,674	0,674
	0,333	0,333	0,604	0,480	0,387	0,385	0,409	-	-
	0,062	0,062	0,025	0,194	0,153	0,167	0,228	0,326	0,326
Frecuencias génicas	0,771	0,771	0,673	0,566	0,653	0,640	0,567	0,674	0,674
	0,229	0,229	0,327	0,434	0,347	0,360	0,433	0,326	0,326
h_o	0,314	0,314	0,417	0,417	0,333	0,333	0,389	-	-
h_e	0,441	0,441	0,413	0,5	0,494	0,461	0,494	-	-
HWE (P-val)	0,1581	0,1581	1,0	0,4524	0,0864	0,1622	0,3033	-	-

Polimorfismos en genes candidatos de metabolismo lipídico, crecimiento y pubertad

Para la genotipificación de los 63 SNPs ubicados en los 39 genes candidatos involucrados en la regulación del metabolismo lipídico (14 genes, 31 SNPs), en el crecimiento (9 genes, 11 SNPs) y otros genes más directamente relacionados a la regulación de la pubertad (16 genes, 21 SNPs), se optó por la técnica de espectrometría de masas utilizando la plataforma MassARRAY de Sequenom, puesto que debido a su alto rendimiento permite la genotipificación de SNPs en una gran cantidad de muestras de manera rápida y automatizada. Dentro de los genes candidatos para pubertad, se encuentran 3 loci (PELO, ISL1 y FST), que fueron detectados mediante el estudio de asociación genómica exploratorio realizado previamente a este estudio, y cuya explicación se encontrará más adelante.

Como resultado de la genotipificación de estos SNPs en la población, se observaron diferentes niveles de polimorfismo para cada marcador. A pesar de haber constatado previamente la existencia de la mayoría de estos polimorfismos en la especie bovina, 7 de ellos (ubicados en los genes PELO, DGAT1, GPAM, ELOVL5, PPARG, IGF1R, MyoD1) resultaron monomórficos en nuestra población, por lo que debieron ser eliminados de los estudios siguientes. Además, 3 SNPs (ubicados en los genes EAP1, C/EBPA y GHRHR) presentaron un bajo porcentaje de genotipificación en el conjunto de muestras, por lo que también debieron ser eliminados. Por lo tanto, los marcadores que resultaron útiles para realizar el análisis de asociación con pubertad fueron 53. Las medidas de variabilidad de estos marcadores se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13: Frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada (h_e) y heterocigosidad observada (h_o) para cada SNP seleccionado a partir de los genes candidatos para metabolismo lipídico, crecimiento y pubertad. Los alelos de cada locus se presentan en orden alfabético. El símbolo – indica que el marcador fue monomórfico, mientras el símbolo ND (no detectado) significa que el locus tuvo un bajo porcentaje de genotipificación en las muestras.

Gen	Marcador	Tipo de Cambio	Frecuencias Alélicas	Heterocigosidad observada (h_o)	Heterocigosidad esperada (h_e)
PELO	rs110234543	[C/T]	0,690 0,309	0,403	0,428
	rs133688567	[C/G]	-	-	-
INHA	rs136042084	[A/C]	0,638 0,362	0,621	0,463
	rs41257116	[A/G]	0,428 0,572	0,434	0,491
EAP1	rs133353237	[A/C]	0,351 0,649	0,310	0,457
	rs136744225	[C/G]	ND	ND	ND
FST	rs109247499	[C/G]	0,935 0,065	0,109	0,123
	rs110040334	[A/G]	0,152 0,848	0,250	0,258
TTF1	rs134019018	[C/T]	0,630 0,397	0,502	0,480
	rs135840189	[C/T]	0,387 0,613	0,497	0,475
SPAG11	rs110761761	[A/G]	0,525 0,475	0,441	0,499
ISL1	rs134992034	[A/G]	0,807 0,193	0,323	0,313
TAC3R	rs109208497	[A/G]	0,692 0,308	0,448	0,427
TAC3	rs109637672	[A/G]	0,249 0,741	0,408	0,375
Oct2	rs41887372	[G/T]	0,339 0,661	0,408	0,449
TGFbR1	rs43564166	[A/G]	0,488 0,512	0,5642	0,5007
LIN28B	rs109640880	[A/G]	0,298 0,702	0,419	0,419
PTGER2	rs133606975	[A/G]	0,349 0,641	0,449	0,455
EGFR	rs42350283	[G/T]	0,768 0,232	0,363	0,358
FSHr	rs208317315	[A/G]	0,085 0,915	0,169	0,156
erbB2-like	rs109941438	[C/T]	0,906 0,094	0,181	0,171
DGAT1	rs109234250	[G/A]	-	-	-
SCD	c:878C>T- AB075020.1	[C/T]	0,436 0,564	0,703	0,493
LEP	AF120500.1	[C/T]	0,447 0,553	0,498	0,495
	UASMS2 (AB070368)	[C/T]	0,709 0,291	0,444	0,414

Tabla 13 continuación

Gen	Marcador	Tipo de Cambio	Frecuencias Alélicas	Heterocigosidad observada (h_o)	Heterocigosidad esperada (h_e)
TG	rs135751032	[C/T]	-	-	-
	rs378215592	[T/C]	0,811 0,189	0,324	0,307
	rs110406764	[G/A]	0,189 0,811	0,323	0,306
	rs109662686	[A/G]	0,355 0,645	0,496	0,459
	rs109057985	[T/G]	0,173 0,827	0,289	0,286
FABP4	AAFC01136716.1: g.7516G>C	[G/C]	0,733 0,267	0,420	0,393
	rs110757796	[A/G]	0,486 0,514	0,410	0,501
	rs110652478	[G/A]	0,111 0,889	0,053	0,197
	rs110383592	[G/C]	0,483 0,517	0,515	0,501
	rs111014258	[T/C]	0,494 0,506	0,506	0,501
FASN	rs41919985	[A/G]	0,646 0,354	0,379	0,459
GPAM	rs109886010	[C/T]	-	-	-
MC4R	rs108968214	[C/G]	0,712 0,288	0,408	0,411
ELOVL5	rs136832022	[C/G]	-	-	-
C/EBPA	rs210446561	[C/G]	0,072 0,928	0,144	0,134
	rs110793792	[C/A]	ND	ND	ND
HSL	rs109759779	[C/A]	0,738 0,262	0,361	0,388
	rs109598915	[A/C]	0,294 0,706	0,398	0,416
	rs41887406	[A/G]	0,703 0,297	0,405	0,419
GHRL	rs110968631	[A/G]	0,922 0,078	0,125	0,144
	rs108987641	[A/G]	0,99 0,01	0,004	0,004
PPARG	rs109613657	[G/T]	-	-	-
	PPARG 5UTR	[G/A]	0,03 0,97	0,060	0,059
	rs41610552	[C/G]	0,633 0,337	0,447	0,448
RXRA	rs207774429	[C/T]	0,676 0,324	0,451	0,439
	rs133517803	[A/G]	0,429 0,571	0,468	0,491
	rs136289117	[C/T]	0,996 0,004	0,008	0,008
GHR	rs135304055	[T/A]	0,111 0,889	0,199	0,198
GH	rs41923484	[C/G]	0,309 0,691	0,455	0,428
IGF1	rs134527338	[C/T]	0,024 0,976	0,049	0,048

Tabla 13 continuación

Gen	Marcador	Tipo de Cambio	Frecuencias Alélicas	Heterocigosidad observada (h_o)	Heterocigosidad esperada (h_e)
IGF1R	rs209595810	[A/C]	-	-	-
GHRH	rs137760387	[A/C]	0,058 0,942	0,051	0,109
GHRHR	rs134261880	[T/A]	ND	ND	ND
	rs109390134	[C/T]	0,917 0,083	0,143	0,152
Myf5	rs133856052	[G/T]	0,726 0,274	0,404	0,398
MyoD1	rs110695450	[G/C]	-	-	-
	rs133572166	[A/C]	0,167 0,833	0,212	0,282
Myf6	rs109285736	[C/G]	0,72 0,28	0,409	0,404

3.3.3 Análisis de asociación

Asociación entre el marcador LHR-I499L y la edad de pubertad

Con el objetivo de analizar la posible asociación entre el marcador LHR-I499L y la edad de pubertad, se utilizó el modelo lineal mixto implementado en el software SAS v. 9.0 (PROC MIXED), utilizando como efectos fijos el genotipo del SNP, el año de nacimiento de los animales y el rodeo al cual pertenecen, y como efecto aleatorio el padre. Además, se incluyó el efecto del peso corporal ajustado a los 300 días de edad (P300) como covariable, dado que es un factor incluyente en la manifestación de la pubertad. El análisis de asociación se realizó testeando los genotipos del marcador contra dos edades de pubertad estimadas: i) edad a la cual los toros alcanzan 28 cm de circunferencia escrotal (CE28) y ii) edad a la cual la concentración espermática es de 50 millones células por ml y la motilidad es del 10% (C50/M10). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 14. Como puede observarse, no se detectó ninguna asociación de este SNP con las dos edades testeadas.

Tabla 14: Resultados del análisis de asociación entre los genotipos del polimorfismo LHR-I499L y la edad de pubertad estimada mediante: i) circunferencia escrotal igual a 28 centímetros (CE28) y ii) concentración espermática igual a 50 millones de células por ml y porcentaje de motilidad lineal de 10% (C50/M10). Se muestra también el error estándar (SE) en días para las edades estimadas. Los P-val para el efecto de los genotipos fueron corregidos por el método de Bonferroni.

Genotipos	N	Edad a CE28		Edad a C50/ M10	
		Efecto del genotipo (P-val)	Edad ± SE	Efecto del genotipo (P-val)	Edad ± SE
AA	17		292,27 ± 6,84		288,73 ± 11,04
AC	94	0,456	284,87 ± 4,21	0,301	287,87 ± 6,89
CC	165		287,28 ± 3,71		279,96 ± 6,12

Los resultados aquí obtenidos coinciden con los de otros autores, que han reportado ausencia de asociación entre polimorfismos en LHR y edad de pubertad o características estrechamente relacionadas a esta. Por ejemplo, Milazzoto *et al.* (2008) analizó la posible asociación entre polimorfismos en LHR y fenotipos de pubertad en hembras Nelore, encontrando resultados negativos. Los mismos resultados obtuvo Marson *et al.* (2008) al analizar la asociación de un SNP en este receptor con una medida de precocidad sexual en hembras de razas compuestas. Por el contrario, Hastings *et al.* (2006) reportó una asociación significativa de SNPs en el exón 11 de este gen con caracteres reproductivos en hembras de la raza Holstein, mientras que Sun *et al.* (2012) detectó una asociación entre un SNP en el exón 9 de LHR con calidad espermática en toros Holstein. Observando la bibliografía disponible hasta el momento, no existen otros antecedentes de trabajos que reporten polimorfismos en el gen LHR en bovinos, sumado a que la mayoría de los SNPs estudiados no presentan asociación con los datos utilizados. Además, casi ninguno de los trabajos existentes se ha realizado en animales machos de esta especie.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar la presencia de un polimorfismo que no había sido reportado previamente en Angus ni en otras razas. A pesar de haber obtenido un resultado negativo en la asociación con la edad de pubertad, este polimorfismo podría estar asociado a otros fenotipos reproductivos diferentes, dado que la edad de pubertad es una característica compleja, que puede ser medida utilizando diferentes fenotipos y estimada mediante diferentes criterios. En base

a los resultados, sería importante incrementar el número de muestras a fin de aumentar el poder estadístico para detectar asociaciones entre el marcador y el fenotipo evaluado. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la pubertad es un carácter para el cual resulta difícil obtener medidas fenotípicas, sobre todo cuando se requieren varias mediciones seriadas. En conclusión, nuestros resultados y los surgidos de la bibliografía no permiten, hasta el momento, establecer un rol de los polimorfismos del gen LHR en la edad de pubertad en toros.

Asociación entre los polimorfismos seleccionados del estudio GWAS y la edad de pubertad

Con el objetivo de confirmar las asociaciones detectadas mediante el estudio de asociación genómica exploratorio, se realizó el análisis de asociación genética entre los SNPs seleccionados (ver Tabla 12) y genotipificados en la población completa de animales, y las cuatro edades de pubertad estimadas (CE28, C50/M10, C50, y M10). De la misma manera que para el SNP en LHR, se utilizó para la asociación el modelo lineal mixto considerando los mismos efectos fijos y aleatorios. En la Tabla 12 se puede observar el número de animales utilizados en el análisis de asociación de cada SNP.

Los marcadores pertenecientes a los cromosomas BTA3 (rs132637859, rs137573267 y rs135506491) y BTA24 (rs135506491 y rs136317366) no resultaron asociados con ninguna de las cuatro edades de pubertad ($P > 0,05$), mientras que el marcador rs137108804, ubicado en el cromosoma BTA20, mostró una asociación significativa con la edad de pubertad estimada a C50 ($P = 0,005$) y a C50/M10 ($P = 0,025$). Además, a pesar de no haber mostrado una asociación significativa, este mismo locus exhibió una tendencia ($P < 0,1$) con la edad de pubertad estimada a M10. Sin embargo, no se observó asociación de ninguno de estos polimorfismos con la edad de pubertad estimada a CE28 (Fernández *et al.*, 2014). Estos resultados se presentan en la Tabla 15. Al observar el efecto del genotipo del SNP rs137108804 del BTA20 en la edad de pubertad estimada a C50 podemos ver que las diferencias más significativas se encuentran entre el genotipo CC y los genotipos CT y TT. El primero exhibió una edad de pubertad promedio 10 días menor que el genotipo CT ($P = 0,19$) y 29 días menor que el genotipo y TT ($P = 0,0025$). Por otro lado, al considerar la asociación de este marcador con la edad

a M10 y la edad a C50/M10, las diferencias promedio entre los genotipos homocigotas CC y TT resultaron ser de 23 ($P = 0,044$) y 24 ($P = 0,013$) días, respectivamente. De lo estudiado hasta el momento, con respecto al cromosoma BTA20 se pueden mencionar los trabajos de McClure *et al.* (2010), que detectó un QTL para circunferencia escrotal en el cromosoma BTA20 en toros Angus, y Fortes *et al* (2013b), que reportó un gen (PIK3R1) ubicado entre 11.329.104 y 11.409.885 bp en el mismo cromosoma, perteneciente a la vía de señalización de IGF1, asociado a la edad de pubertad en hembras de la raza Brahman.

Tabla 15: Resultados del análisis de asociación entre los genotipos de los polimorfismos rs132637859, rs137573267, rs135506491, rs136317366 y rs137108804, y las edades de pubertad estimadas, y valores de significancia (P-val) para el efecto de los genotipos sobre las cuatro edades de pubertad. Se muestran las edades de pubertad promedio estimadas para los cuatro criterios utilizados (CE28, C50/M10, C50 y M10) y el error estándar (SE) en días para cada una. Las letras mayúsculas en negrita denotan las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre medias. Para comparaciones múltiples se llevó a cabo el ajuste de medias por el método de Bonferroni.

Marcador	Genotipo	N	Edad a CE28		Edad a C50		Edad a M10		Edad a C50/M10	
			Efecto del genotipo (P-val)	Edad \pm SE	Efecto del genotipo (P-val)	Edad \pm SE	Efecto del genotipo (P-val)	Edad \pm SE	Efecto del genotipo (P-val)	Edad \pm SE
rs132637859	AA	89	0,610	291,57 \pm 4,75	0,940	272,86 \pm 9,78	0,999	282,76 \pm 11,06	0,825	290,91 \pm 9,69
	AG	131		288,14 \pm 4,63		275,21 \pm 9,52		282,91 \pm 10,77		291,46 \pm 9,43
	GG	53		288,93 \pm 4,79		275,53 \pm 9,84		283,37 \pm 11,13		296,48 \pm 9,74
rs137573267	AA	120	0,373	287,21 \pm 4,84	0,935	272,82 \pm 9,93	0,959	282,82 \pm 11,24	0,978	292,94 \pm 9,82
	AC	101		287,51 \pm 4,29		274,87 \pm 8,85		281,61 \pm 10,01		292,07 \pm 8,77
	CC	40		293,93 \pm 5,16		275,91 \pm 10,59		284,60 \pm 12,02		293,85 \pm 10,48
rs135506491	CC	102	0,638	288,36 \pm 3,08	0,882	274,67 \pm 6,49	0,606	275,97 \pm 7,32	0,633	286,90 \pm 6,49
	CT	166		291,07 \pm 3,58		277,09 \pm 7,44		277,90 \pm 8,42		290,14 \pm 7,42
	TT	7		289,21 \pm 8,62		271,84 \pm 17,49		295,17 \pm 19,83		301,82 \pm 17,21
rs137108804	CC	123	0,691	291,64 \pm 4,46	0,005	261,31 \pm 9,28 A	0,070	273,11 \pm 10,48 A	0,025	282,21 \pm 9,23 A
	CT	106		290,53 \pm 4,09		271,67 \pm 8,46 A		279,38 \pm 9,56 A		290,04 \pm 8,41 A
	TT	46		286,47 \pm 5,12		290,62 \pm 10,52 B		296,54 \pm 11,93 B		306,60 \pm 10,42 B
rs136317366	AA	92	0,413	287,89 \pm 4,61	0,814	275,79 \pm 9,49	0,994	282,49 \pm 10,73	0,845	293,08 \pm 9,41
	AG	104		290,45 \pm 4,19		272,26 \pm 8,65		283,22 \pm 9,78		291,04 \pm 8,58
	GG	48		290,31 \pm 4,62		275,55 \pm 9,52		283,32 \pm 10,78		294,74 \pm 9,43

Con respecto a los SNPs del cromosoma BTX (rs135795150 y rs110798626), no se encontró ninguna asociación entre los marcadores y las edades de pubertad. Estos resultados no coinciden con un gran número de trabajos que han reportado asociaciones importantes entre marcadores ubicados en este cromosoma y diferentes fenotipos asociados al desarrollo sexual. Por ejemplo, Fortes *et al.* (2012a,b) reportó una asociación de una región del BTX (desde 69,2 hasta 93,7 Mb) con la edad de pubertad estimada a los 26 cm de circunferencia escrotal en toros Brahman. En dicho trabajo, se mostró que el pico de asociación contenía tres genes candidatos posicionales y funcionales: AR (receptor de andrógenos), TAF1 y TAF9B (ambos factores de transcripción asociados a las proteínas de unión a la caja TATA). El gen AR juega un papel importante en el desarrollo sexual de los mamíferos, afectando específicamente el tamaño testicular y la espermatogénesis, y consecuentemente la edad de inicio de la pubertad (Verhoeven *et al.*, 2010; Trakooljul *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2008). Por su parte, los factores de transcripción TAF1 y TAF9B participan en la regulación del ciclo celular y la diferenciación celular, y se ha reportado que algunas proteínas TAF específicas de testículo son relevantes para la diferenciación de células espermáticas (Hiller *et al.*, 2004), lo que podría sustender los resultados del estudio. Aunque los resultados anteriores corresponden a animales de la raza Brahman, las evidencias sugieren que estos tres genes podrían ser genes candidatos para el carácter edad de pubertad en toros de otras razas, incluidas las que pertenecen al tipo *B. taurus*. Otros autores también reportaron regiones del BTX asociadas a alguna medida de fertilidad en toros Holstein, y detectaron genes candidatos dentro de las mismas (Blaschek *et al.*, 2011; Feugang *et al.*, 2009). La discrepancia entre nuestros resultados y lo esperado según lo mencionado anteriormente podría deberse a varios factores: los fenotipos medidos, las razas utilizadas, aspectos estadísticos, y el número de animales estudiados en cada caso.

En el caso del cromosoma BTA1, los resultados permitieron confirmar la asociación del haplotipo con la edad de pubertad estimada a M10 ($P = 0,024$; Tabla 16). Sin embargo, no se observó ninguna asociación con la edad estimada a CE28, C50 y C50/M10. Recordemos que, a pesar de haber genotipificado los dos SNPs (rs135953349 y rs110604205), como era esperable dada la distancia entre ellos, ambos se encontraron completamente ligados ($r^2=1$) en la población analizada, ubicados en un bloque entre las posiciones 99,17 y 99,99 Mb. En relación a este resultado, podemos mencionar que otros

autores reportaron QTLs para circunferencia escrotal y fertilidad en toros Angus y Holstein en este mismo cromosoma (McClure *et al.*, 2010; Feugang *et al.*, 2009), resultados que aunque no estén estrechamente relacionados al aquí obtenido, pueden dar una idea de lo que se conoce hasta el momento acerca del cromosoma BTA1 en relación a características reproductivas en toros. En la Tabla 16 se muestran los resultados de la asociación de los haplotipos del BTA1 analizados con la edad de pubertad a M10.

Tabla 16: Resultados del análisis de asociación entre los haplotipos de los marcadores ubicados en el cromosoma BTA1 y la edad de pubertad estimada a motilidad lineal de 10% (M10) El P-val obtenido fue ajustado mediante la corrección de Bonferroni.

Marcador	Genotipos	N	Edad a M10	
			Efecto del genotipo (P-val)	Edad ± SE
Haplotipos de BTA1	CA/CA	156	0,024	279,61 ± 5,21
	CA/TG	86		265,49 ± 5,96
	TG/TG	16		253,27 ± 13,70

Al evaluar estos resultados debemos tener en consideración algunos factores. En primer lugar, el número de muestras con las que se contaba al momento de realizar este trabajo no permite realizar conclusiones categóricas respecto a los resultados, y los mismos deberían confirmarse utilizando un mayor número de muestras, o en una población independiente y contemporánea. El incremento en el número de animales analizados permitiría detectar asociaciones con un mayor grado de significancia y aumentar el poder estadístico para detectar nueva asociaciones con mayor certeza. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es difícil obtener medidas repetidas de calidad espermática en una gran cantidad de animales, debido a que esto conlleva un costo elevado, una gran cantidad de tiempo de trabajo y la exposición de los animales a tomas de muestras relativamente invasivas. Con respecto a esto, existen muy escasos trabajos que utilicen medidas de calidad espermática para estimar la edad de inicio de la pubertad en toros, en cambio que suelen usarse principalmente medidas de circunferencia escrotal para estimar indirectamente la edad de pubertad.

Detección de genes en las regiones cromosómica asociadas

En base a los resultados obtenidos de los análisis de asociación y con el objetivo de detectar genes que pudieran explicar las asociaciones observadas, se realizó una búsqueda en el genoma bovino mediante el buscador *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) en las regiones asociadas de los cromosomas BTA1 y BTA20.

La búsqueda de genes dentro y cerca de la región genómica del BTA1, de aproximadamente 1 Mb, permitió detectar los siguientes loci: *MECOM* (*MDS1 and EVI1 complex locus*), ubicado entre 98.516.835 y 99.144.551 pb, *LOC100337483* (*eGF-like and EMI domain containing 1 pseudogene-like*) ubicado entre 99.421.592 y 99.467.114 pb, *MIR551B* (*microARN mir-551b*), ubicado entre 99.671.696 y 99.671.790 pb, y *LOC100139843* (*mCG140927-like*, ubicado entre 99.478.228 y 100.027.341 pb. Hasta el momento, los loci *LOC100337483* y *LOC100139843* no tienen funciones conocidas reportadas y no hay evidencias que indiquen que puedan estar involucrados en los eventos relacionados a la regulación de la pubertad o a otras características reproductivas. Respecto al gen *MIR551B*, se sabe que los miARNs participan en la regulación de la expresión génica en casi todos los procesos biológicos, aunque su implicancia en los procesos relacionados al desarrollo sexual y comienzo de la pubertad aún no se ha estudiado en detalle, tanto en bovinos como los mamíferos en general (Wienholds y Plasterk, 2005). En relación a su rol en la regulación hormonal del desarrollo sexual, Ye *et al.* (2013) demostró que algunos de estos pequeños ARNs poseen una participación en la vía de señalización de GnRH y consecuentemente a través de todo el eje HPG. Otros autores demostraron que la expresión de algunos genes involucrados en la espermatogénesis y en la morfología y motilidad espermáticas, es regulada por miARNs (Curry *et al.*, 2011; Kotaja, 2014; He *et al.*, 2009). En el caso particular del miARN *MIR551B*, aún no hay información acerca de su participación en algún proceso relacionado a la pubertad, aunque Kubo *et al.* (2013) informó que podría regular la expresión de varios genes, entre ellos los pertenecientes a las vías señalización de los TGF- β , además de proliferación celular y apoptosis. Como se mencionó en la introducción, los factores de transcripción de la familia TGF- β regulan el proceso puberal en los niveles superiores de control (Itman *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2010). Con esta información, se podría hipotetizar que el miARN *MIR551B* detectado en este trabajo,

posee una función importante pero aún no estudiada, en los procesos relacionados al desarrollo sexual e inicio de la pubertad en los bovinos.

El gen *MECOM*, también denominado *EVII* (*Ecotropic Virus Integration Site*), ha sido un poco más estudiado. Se trata de un factor de transcripción oncogénico involucrado en diferentes vías de señalización, tanto activadoras como represoras, del ciclo celular, la hematopoyesis, la apoptosis, el desarrollo y la diferenciación y proliferación celular (Hirai, 1999; Wieser, 2007; Kustikova *et al.*, 2013; Bard-Chapeau *et al.*, 2013). Las funciones de este gen no están completamente dilucidadas, pero se ha observado que también está involucrado en la señalización de los genes de la familia de los TGF- β (Sood *et al.*, 1999). Más precisamente, *MECOM* reprime la actividad transcripcional de los genes *Smad2* and *Smad3*, los cuales actúan como represores a través de las vías de TGF- β (Shi *et al.*, 2003; Alliston *et al.*, 2005). Como se ha mencionado anteriormente, la familia de los TGF- β , que incluye proteínas como las inhibinas, las activinas y BMP (*Bone Morphogenic Protein*), está relacionada a la regulación del desarrollo testicular y la espermatogénesis, además de otras funciones celulares.

En el caso del BTA20, la búsqueda en la región comprendida entre 26,20 y 28,35 Mb dió como resultado la presencia tres genes: *ISL1* (*Insulin Gene Enhancer Protein 1*), *PELO* (*Pelota Homolog*) y *FST* (*Follistatin*). En la Figura 18 se puede observar la posición de los genes detectados mediante el buscador UCSC *Genome Browser*. El gen más cercano a la región asociada fue *ISL1*, ubicado desde 27.745.415 hasta 27.755.504 pb, que codifica un factor de transcripción de la familia LIM/homeodomain. Se han reportado varias funciones para este gen, principalmente relacionadas con la diferenciación celular y tejido-específica y con la regulación de la expresión de varios genes, por ejemplo los que codifican para insulina, glucagón y somatostatina (Zhang *et al.*, 2009). Además, se ha sugerido que *ISL1* podría cumplir un papel crítico en el desarrollo temprano de la glándula pituitaria, siendo crucial para la expresión tejido-específica de GnRHR y de las hormonas LH y FSH (Granger *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010), y que interactúa con receptores de estrógenos a nivel del cerebro, lo que sugiere que podría tener alguna participación en la expresión de estos receptores o en la respuesta de los mismos a estas hormonas (Gay, 2000). El otro gen mapeado en la región cromosómica asociada fue *PELO*, ubicado entre 26.278.615 y 26.280.539 pb. Este gen codifica una proteína que podría tener un rol en el control del ciclo celular, en la división

meiótica y en la espermatogénesis (Shamsadin *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2003). Además, cerca de la región en estudio se observó el gen FST (localizado desde 25.588.636 hasta 25.594.054 pb), lo cual resultó interesante, ya que dicho gen posee un rol fundamental en la inhibición de la biosíntesis y secreción de la hormona FSH y resulta esencial para mediar los efectos inhibitorios de la testosterona sobre el factor de transcripción TGF- β , por lo que también podría ser considerado un gen candidato (Meriggiola *et al.*, 1994; Padmanabhan *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2011).

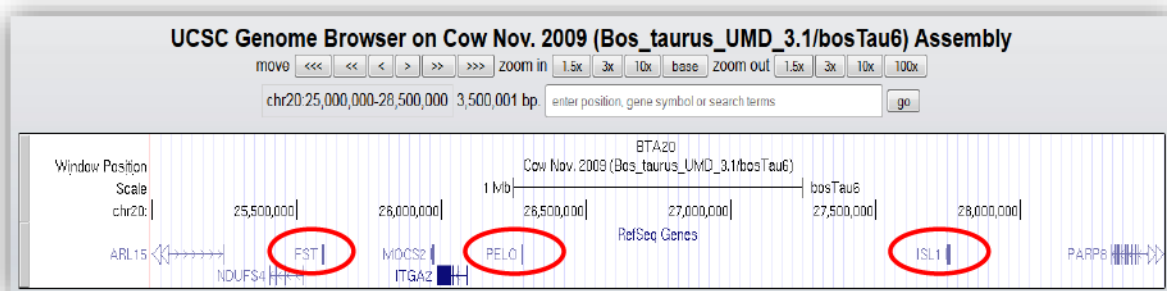


Figura 18: Representación esquemática de la región del cromosoma BTA20 asociada a edad de pubertad, donde se pueden observar los genes detectados (ISL1, PELO y FST) que podrían tener alguna conexión biológica con la pubertad. La imagen fue obtenida mediante el buscador UCSC Genome Browser (Ensamblado: Bos_Taurus_UMD3.1; <http://genome.ucsc.edu/>; acceso: 26 de Octubre de 2014).

En conclusión, el estudio de asociación genómica exploratorio, seguido de la confirmación de las asociaciones detectadas en la población completa, permitió observar genes potencialmente candidatos para pubertad, ya que de una u otra manera presentan una conexión biológica con los procesos relacionados a este fenotipo. Los resultados obtenidos de la asociación de los polimorfismos del BTA1 con la edad de pubertad permitieron detectar en esta región (99 a 100 Mb) dos loci (MIR551B y MECOM). Estos genes han sido descritos principalmente como reguladores en las vías de la superfamilia de los factores de transcripción TGF- β , que cumplen un papel importante en la regulación del desarrollo testicular y la espermatogénesis en los mamíferos. En el caso del cromosoma BTA20, los genes más cercanos a la región cromosómica asociada (ISL1 y PELO) presentan una conexión biológica con la concentración espermática. A pesar del rol putativo de todos estos en la regulación de la pubertad, se requieren estudios adicionales para comprobar sus funciones específicas.

Asociación entre polimorfismos de genes relacionados a la pubertad, el metabolismo lipídico y el crecimiento, y la edad de pubertad

Considerando la gran cantidad de evidencias sobre la conexión biológica entre el estado metabólico, el crecimiento corporal y el desarrollo sexual, y teniendo en cuenta que las hormonas involucradas en el metabolismo y el crecimiento juegan un papel importante en la regulación de la función sexual, se decidió analizar la posible asociación de polimorfismos ubicados en estos genes con la edad de pubertad. Algunos de los SNPs fueron seleccionados utilizando información de funcionalidad de los genes en relación a la pubertad (INHA, EAP1, FST, TTF1, Oct2, SPAG11, TAC3, TAC34R, TGFbR1, EGFR, FSHR, erb2-like), mientras otros están ubicados en genes pertenecientes a vías lipídicas (DGTA1, SCD, LEP, TG, FABP4, FASN, GPAM, MC4R, ELOVL5, C/EBPA, HSL, GHRL, PPARG, RXRA) y de crecimiento (GH, GHR, IGF1, IGF1R, GHRH, GHRHR, Myf5, Myf6, MyoD1). Otro criterio de selección utilizado fue la variabilidad genética de los polimorfismos en la raza Angus, que se tuvo en cuenta con el objetivo de seleccionar los SNPs que tuvieran el mayor grado de variabilidad posible en nuestra población en estudio. En el panel de SNPs formado se incluyeron además polimorfismos ubicados dentro de los genes hallados mediante el estudio GWAS exploratorio realizado previamente (PELO, ISL1 y FST) con el objetivo de confirmar la asociación observada. Una vez conformado el panel de SNPs, se realizó la genotipificación por espectrometría de masas mediante la plataforma Sequenom y posteriormente se llevó a cabo el análisis de asociación con las 4 edades de pubertad estimadas utilizando el modelo lineal mixto descrito anteriormente.

Se observó que el único gen que mostró asociación significativa con la edad de pubertad fue el que codifica para la hormona tiroglobulina (TG). La asociación se observó entre los SNPs localizados en la región 3' UTR (rs378215592, rs110406764, rs109662686, rs109057985; Hou *et al.*, 2011), con la edad de pubertad estimada a C50/M10 ($P < 0,05$). Después de analizar los resultados, el SNP rs109662686 fue removido de los siguientes estudios debido a que obtuvo un *call rate* de 57%. Por otro lado, debido a su proximidad, se decidió realizar un análisis de ligamiento, observándose que los 3 SNPs se encontraban completamente (Phase v. 2.1.1; Li y Stephens, 2003), que reconstruye esta información a partir de las posiciones de los marcadores en el cromosoma y los genotipos para cada animal. Este análisis demostró que los tres

SNPs mostró que se encontraban completamente ligados ($r^2=1$), por lo que solo dos haplotipos (TGT y CAG) de los ocho posibles fueron encontrados. Las frecuencias fueron 0,81 y 0,19 para los haplotipos TGT y CAG, respectivamente. Se asociación realizada con los haplotipos que resultaron asociados a la edad estimada a C50/M10 ($P < 0,05$). Los individuos con genotipo homocigota TGT/TGT mostraron una edad promedio de 289,74 días, mientras la edad de los homocigotas CAG/CAG resultó ser de 347,67 días, resultando en una diferencia de 57,93 días. Los heterocigotas mostraron una edad estimada promedio de 299,65 días. No se observó ninguna asociación de estos haplotipos con la edad a CE28 ($P > 0,05$). En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17a: Se muestra el número de animales para cada genotipo, las frecuencias haplotípicas y genotípicas correspondientes al gen Tiroglobulina.

	Genotipos	N	Frecuencia haplotípica	Frecuencia Genotípica
Haplotipos de TG	TGT/TGT	175	0,81	0,64
	CAG/CAG	8	0,19	0,03
	TGT/CAG	90	-	0,33

Tabla 17b: Resultados de la asociación de los haplotipos del gen TG con la edad de pubertad estimada mediante dos criterios: i) CE28 y ii) C50/M10. Se muestran las edades estimadas y el error estándar (SE) en días para cada haplotipo y el P-val para el efecto de los genotipos sobre la edad de pubertad.

Genotipos	N	Edad a CE28		Edad a C50/ M10	
		Efecto del genotipo (P-val)	Edad ± SE	Efecto del genotipo (P-val)	Edad ± SE
TGT/TGT	175		277,95 ± 23,85		289,74 ± 8,13
TGT/CAG	8	0,456	281,09 ± 25,82	0,021	299,65 ± 8,72
CAG/CAG	90		292 ± 17,76		347,67 ± 622,51

Estos resultados pueden ser explicados por la vasta cantidad de evidencia que explica la influencia de las hormonas tiroideas (THs) en la modulación de la reproducción masculina (Flood *et al.*, 2013; Duarte-Guterman *et al.*, 2014). El rol de estas hormonas en la regulación de la función reproductiva en el sexo masculino alrededor de la pubertad, es de tal importancia que cualquier alteración en su expresión produce grandes efectos en

el desarrollo reproductivo del individuo macho (Krassas *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2003). A pesar de la regulación indirecta de la maduración sexual por parte de las THs mediante sus conocidos roles en el desarrollo, el metabolismo, la regulación hormonal y otros procesos fisiológicos, también tienen efectos directos sobre el desarrollo sexual. Aunque los mecanismos específicos responsables de esta regulación no están completamente establecidos, los efectos directos de las THs podrían ser ejercidos principalmente mediante la presencia de la maquinaria de THs en los tejidos gonadales. Por ejemplo, los receptores de hormonas tiroideas están ampliamente distribuidos y se expresan en diferentes compartimientos testiculares en mamíferos en general, lo que sugiere una función regulatoria directa de las THs en el desarrollo y en la función gonadal (Jannini *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2014). Además, también se ha identificado la expresión de deiodinasas en testículos de vertebrados, cuyo rol en la función testicular ha sido explicado por Wagner *et al.* (2009). Otra evidencia de la participación de las THs en la pubertad es la presencia de elementos de respuesta a tiroideas (TREs) en los receptores de andrógenos de tejido testicular y en las regiones promotoras de los receptores de GnRH y LH (Tsai-Morris *et al.*, 1993), lo que demuestra que estas hormonas pueden regular directamente la biosíntesis de andrógenos. Además, se sabe que tanto el hiper como el hipotiroidismo o condiciones similares alteran las concentraciones de GnRH en mamíferos, afectando la producción y secreción de LH y FSH (Chiao *et al.*, 1999). Por otro lado, varios estudios demostraron una disminución en los niveles plasmáticos de testosterona en humanos con hipotiroidismo (Kumar *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, esta regulación es bidireccional y existen evidencias acerca del considerable grado de interconexión entre los ejes HPG y HPT en los vertebrados. En el caso de los bovinos, Fortes *et al.* (2012) detectó el gen SERPINA7 ubicado en el cromosoma BTX, que codifica para una proteína de unión a tiroxina, la principal proteína transportadora de hormonas tiroideas, que presenta asociación con medidas espermáticas relacionadas a la pubertad en toros Brahman. Estas evidencias refuerzan la hipótesis del papel importante de las THs en el eje reproductivo de los bovinos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis pueden resumirse en los siguientes puntos, que representan los resultados más importantes y aportes originales:

➤ La secuenciación de un segmento del exón 11 del gen LHR permitió detectar 7 SNPs en las diferentes razas analizadas, 3 de los cuales que ya habían sido reportados y otros 4 reportados por primera vez en este trabajo. Del total de los polimorfismos, 4 se hallaron en ganado cebuino y 3 en razas taurinas. Al tratarse de loci polimórficos, serían de utilidad para realizar estudiar de asociación. El polimorfismo LHR-I499L, detectado en Angus, fue el de mayor importancia para este trabajo dado que para dicha raza se tenían datos fenotípicos de pubertad, lo que permitió realizar un estudio de asociación genética.

➤ A pesar del rol fundamental de LHR y su ligando, la hormona LH, en la regulación del desarrollo sexual y de las evidencias que demuestran que la variación genética dentro de estos genes contribuye a la regulación de la pubertad en mamíferos, el análisis de asociación entre el polimorfismo LHR-I499L y la edad de pubertad no mostró valores significativos.

➤ En relación al gen KISS1R, llamativamente, aunque se espera en promedio 1 SNP cada 500 pb en *B. Taurus* y 300 bp en *B. indicus*, y a pesar de haber secuenciado 2512 bp del gen, no se encontraron polimorfismos en ninguna de las regiones analizadas (los cinco exones y la región promotora) en ninguna de las razas. La búsqueda en bases de datos así como los antecedentes en bibliografía apoyan estos resultados, ya que no existen trabajos que reporten SNPs en la raza bovina, mientras que los reportados en las bases de datos aún no están validados

➤ El estudio de asociación genómica exploratorio mediante la utilización de microarreglos de SNPs de alta densidad, permitió detectar regiones del genoma potencialmente asociadas a la edad de pubertad. Estas regiones estuvieron ubicadas en los cromosomas BTA1, BTA3, BTA20 y BTA24. En un estudio de asociación con mayor número de animales se confirmó la asociación de los cromosomas BTA1 y BTA20. La

búsqueda de genes en dichas regiones permitió detectar 5 genes (PELO, ISL1, FST, MIR551B y MECOM) que de acuerdo a su función biológica tendrían algún grado de participación en la regulación del desarrollo sexual y el arribo a la pubertad.

➤ Se diseñó un panel de SNPs con genes candidatos para pubertad. De los 63 SNPs total, 56 fueron polimórficos en la población de toros Angus estudiada. Como resultado del análisis de asociación, 3 SNPs completamente ligados ubicados en el gen de Tiroglobulina fueron significativamente asociados a la edad de pubertad en la población analizada. Esto demuestra la participación de genes pertenecientes a otros procesos biológicos, en el desarrollo de la pubertad.

➤ El trabajo realizado en esta Tesis es uno de los primeros en aportar marcadores genéticos asociados a la pubertad sexual en machos de la especie bovina. Se necesitarían trabajos adicionales para confirmar estos hallazgos en otras razas bovinas.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

- Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. 2002. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2447-2454.
- Adham IM, Sallam MA, Steding G, Korabiowska M, Brinck U, Hoyer-Fender S, Oh C, Engel W. 2003. Disruption of the *pelota* gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 23:1470-1476.
- Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A. C., Sterky F., Nyren P., Uhlen M., And Lundberg J. 2000. Single-nucleotide Polymorphism analysis by Pyrosequencing. *Anal Biochem* 280: 103-110.
- Alliston T, Ko TC, Cao Y, Liang YY, Feng XH, Chang C, Derynck R. 2005. Repression of bone morphogenetic protein and activin-inducible transcription by Evi-1. *J Biol Chem* 280: 24227-24237.
- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355.
- Anderson SE, Must A. 2005. Interpreting the continued decline in the average age at menarche: results from two nationally representative surveys of U.S. girls studied 10 years apart. *J Pediatr* 147: 753-760.
- Aravindakshan JP, A Honaramooz, PM Bartlewski AP, Beard RA, Pierson, NC, Rawliis. 2000a. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology* 54: 339-354
- Aravindakshan JP, Honaramooz A, Bartlewski PM, Beard AP, Pierson RR, Rawlings NC. 2000b. Gonadotrophin secretion in prepubertal bull calves born in spring and autumn. *J Reprod Fertil* 120: 159-167.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Struhl K. 1990. En: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 2. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Nueva York.
- Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JJ, Lewin HA. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 87: 468-475.
- Bagu ET, Madgwick S, Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DM, Huchkowsky S, Cook SJ, Rawlings NC. 2004. Effects of treatment with LH or FSH from 4 to 8

- weeks of age on the attainment of puberty in bull calves. *Theriogenology* 62: 861-873.
- Bagu ET, Cook S, Gratton CL, Rawlings NC. 2006. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction* 132: 403-411.
- Bak M, Silahtaroglu A, Møller M, Christensen M, Rath MF, Skryabin B, Tommerup N, Kauppinen S. 2008. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 14: 432-444.
- Balding DJ. 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7: 781-791.
- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neibergs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Soller M, Womack JE, Hetzel DJS. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6: 227-235.
- Bard-Chapeau EA, Gunaratne J, Kumar P, Chua BQ, Muller J, Bard FA, Blackstock W, Copeland NG, Jenkins NA. 2013. EVI1 oncoprotein interacts with a large and complex network of proteins and integrates signals through protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: E2885-2894.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2: 263-265.
- Braga M, Bhasin S, Jasuja R, Pervin S, Singh R. 2011. Testosterone inhibits transforming growth factor- β signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: Potential role of follistatin in mediating testosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 350: 39-52.
- Blaschek M, Kaya A, Zwald N, Memili E, Kirkpatrick BW. 2011. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. *J Dairy Sci* 94: 4695-4699.
- Bovine HapMap Consortium, Gibbs RA, Taylor JF, Van Tassell CP, Barendse W, Eversole KA, Gill CA, et al. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*. 324: 528-532.

- Brann DW. 1995. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61: 213-225.
- Brito LF, Silva AE, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LA, Kastelic JP. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58: 1175-1186.
- Brito LE, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Boisclair YR, Ehrhardt RA, Kastelic JP. 2007. Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction* 134: 171-181.
- Burns BM, Gazzola C, Holroyd RG, Crisp J, McGowan MR. 2011. Male reproductive traits and their relationship to reproductive traits in their female progeny: A systematic review. *Reprod Domest Anim* 46: 534-553.
- Cammack KM, Thomas MG, Enns RM. 2009. Reproductive traits and their heritabilities in beef cattle. *The Prof Anim Sci* 25: 517-528.
- Casas E, Lunstra DD, Stone RT. 2004. Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. *Anim Genet* 35: 451-453.
- Casas E, Lunstra DD, Cundiff LV, Ford JJ. 2007. Growth and pubertal development of F1 bulls from Hereford, Angus, Norwegian Red, Swedish Red and White, Friesian, and Wagyu sires. *J Anim Sci* 85: 2904-2909.
- Cao G, Liu Q, Chu M, Di R, Fang L, Feng T, Li N. 2013. Analysis on cDNA sequence, alternative splicing and polymorphisms associated with timing of puberty of Lin28B gene in goats. *Mol Biol Rep* 40: 4675-4683.
- Chelikani PK, Ambrose JD, Kennelly JJ. 2003. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. *Theriogenology* 60: 707-725.
- Chenoweth PJ, Chase CC Jr, Thatcher MJD, Wilcox CJ, Larsen RE. 1996. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. *Theriogenology* 46: 1159-1170.
- Chiao YC, Lee HY, Wang SW, Hwang JJ, Chien CH, Huang SW, Lu CC, Chen JJ, Tsai SC, Wang PS. 1999. Regulation of thyroid hormones on the production of testosterone in rats. *J Cell Biochem* 73: 554-562.

- Choi JH, Yoo HW. 2013. Control of puberty: genetics, endocrinology, and environment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20: 62-68.
- Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE. 2008. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149: 5811-5821.
- Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150: 3214-3220.
- Collis E, Fortes MRS, Zhang Y, Tier B, Schutt K, Barendse W, Hawken R. 2012. Genetic variants affecting meat and milk production traits appear to have effects on reproduction traits in cattle. *Anim Genet* 43: 442-446.
- Corbet NJ, Burns BM, Corbet DH, Johnston DJ, Crisp JM, McGowan M, Prayaga KC, Venus BK, Holroyd RG. 2009. Genetic variation in growth, hormonal and seminal traits of young tropically adapted bulls. *Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet* 18: 121-124.
- Coulter GH, Foote RH. 1976. Relationship of testicular weight to age and scrotal circumference Holstein bulls. *J Dairy Sci* 59: 730-732.
- Coulter GH. 1986. Puberty and postpubertal development of beef bulls. En: *Current Therapy in Theriogenology*. 1º Ed. Editor: Morrow, AD. Saunders, Philadelphia pág: 142-148.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60: 216-222.
- Cupps PT. 1991. *Reproduction in Domestic Animals*. 4º Ed. Academic Press Inc., San Diego.
- Curry E, Safranski TJ, Pratt SJ. 2011. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology* 76: 1532-1539.
- Curtis SK, Amann RP. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein Bulls. *J Anim Sci* 53: 1645-1657.

- Cruickshank J, Dentine MR, Berger PJ, Kirkpatrick BW. 2004. Evidence for quantitative trait loci affecting twinning rate in North American Holstein cattle. *Anim Genet* 35: 206-212.
- Daetwyler HD, Schenkel FS, Sargolzaei M, Robinson JA. 2008. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J Dairy Sci* 91: 3225-3236.
- Daftary SS, Gore AC. 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 292-306.
- Darvasi A, Soller M. 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 138: 1365-1373.
- Deb R, Chakraborty S, Mahima, Verma AK, Tiwari R, Dhama K. 2014. Nutrigenomics and its role in male puberty of cattle: a mini review. *Pak J Biol Sci* 17: 329-334.
- Dekkers JC. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci* 82: E313-328.
- Derecka K, Ahmad S, Hodgman TC, Hastings N, Royal MD, Woolliams JA, Flint APF. 2010. Sequence variants in the bovine gonadotrophin releasing hormone receptor gene and their associations with fertility. *Anim Genet* 41: 329-331.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10972-10976.
- de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. 2004. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1794-1800.
- Devlin B, Roeder K, Wasserman L. 2001. Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theor Popul Biol* 60: 155-66.
- Donovan BT, van der Werff ten Bosch JJ. 1965. *Physiology of Puberty*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Dow JS Jr, Moore JD, Bailey CM, Foote WD. 1982. Onset of puberty in heifers of diverse beef breeds and crosses. *J Anim Sci* 55: 1041-1047.

- Duarte-Guterman P, Navarro-Martín L, Trudeau VL. 2014. Mechanisms of crosstalk between endocrine systems: regulation of sex steroid hormone synthesis and action by thyroid hormones. *Gen Comp Endocrinol* 203: 69-85.
- El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM. 2000. Neuropeptide Y: a hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6179-6184.
- Eler JP, Silva JA, Evans JL, Ferraz JBS, Dias F, Golden BL. 2004. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. *J Anim Sci* 82: 2519-2527.
- Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. 2013. *Cell Mol Life Sci* 70: 841-62.
- Evans AC, Davies FJ, Nasser LF, Bowman P, Rawlings NC. 1995. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. *Theriogenology* 43: 569-578.
- Evans ACO, Pierson RA, Garcia A, McDougall LM, Hrudka E, Rawlings NC. 1996. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology* 46: 345-357.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2007. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
- Feng T, Zhao YZ, Chu MX, Zhang YJ, Fang L, Di R, Cao GL, Li N. 2009. Association between sexual precocity and alleles of KISS-1 and GPR54 genes in goats. *Anim Biotechnol* 20: 172-176.
- Fernández ME, Lirón JP, Prando A, Rogberg-Muñoz A, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G. 2014. Evidence of association of a BTA20 region peaked in ISL1 with puberty in Angus bulls. *Livest Sci* 167: 9-18
- Feugang JM, Kaya A, Page GP, Chen L, Mehta T, Hirani K, Nazareth L, Topper E, Gibbs R, Memili E. 2009. Two-stage genome-wide association study identifies integrin beta 5 as having potential role in bull fertility. *BMC Genomics* 10: 176.
- Fischbein S. 1977. Intra-pair similarity in physical growth of monozygotic and of dizygotic twins during puberty. *Ann Hum Biol* 4: 417-430.

- Flood DE, Fernandino JI, Langlois VS. 2013. Thyroid hormones in male reproductive development: evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *Gen Comp Endocrinol* 192: 2-14.
- Fortes MRS, Reverter A, Zhang Y, Collis E, Nagaraj SH, Jonsson NN, Prayaga KC, Barris W, Hawken RJ. 2010. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13642-13647.
- Fortes MR, Reverter A, Hawken RJ, Bolormaa S, Lehnert SA. 2012a. Candidate genes associated with testicular development, sperm quality, and hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in Brahman bulls. *Biol Reprod* 87(3): 58, 1-8.
- Fortes MRS, Lehnert SA, Bolormaa S, Reich C, Fordyce G, Corbet NJ, Whan V, Hawken RJ, Reverter A. 2012b. Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. *Anim Prod Sci* 52: 143-150.
- Fortes MR, Deatley KL, Lehnert SA, Burns BM, Reverter A, Hawken RJ, Boe-Hansen G, Moore SS, Thomas MG. 2013a. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high-density chips and beyond. *Anim Reprod Sci* 141: 1-19.
- Fortes MR, Li Y, Collis E, Zhang Y, Hawken RJ. 2013b. The IGF1 pathway genes and their association with age of puberty in cattle. *Anim Genet* 44: 91-95.
- Fox KM, Magaziner J, Sherwin R, Scott JC, Plato CC, Nevitt M, Cummings S. 1993. Reproductive correlates of bone mass in elderly women. Study of osteoporotic fractures research group. *J Bone and Miner Res* 8: 901-908.
- Gay F, Anglade I, Gong Z, Salbert G. 2000. The LIM/homeodomain protein islet-1 modulates estrogen receptor functions. *Mol Endocrinol* 14: 1627-1648.
- Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. 2009. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet*. Chapter 2: Unit 2.12.
- Gajdos ZK, Hirschhorn JN, Palmert MR. 2009. What controls the timing of puberty? An update on progress from genetic investigation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16: 16-24.
- Garcia MD, Michal JJ, Gaskins CT, Reeves JJ, Ott TL, Liu Y, Jiang Z. 2006. Significant association of the calpastatin gene with fertility and longevity in dairy cattle. *Anim Genet* 37, 304–305.

- Goddard ME, Hayes BJ, Meuwissen TH. 2010. Genomic selection in livestock populations. *Genet Res (Camb)* 92: 413-421.
- Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, Millar RP, Cernea M, Coolen LM, Lehman MN. 2013. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology* 154: 4259-69.
- Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverrière JN. 2006. The LIM-homeodomain proteins Isl-1 and Lhx3 act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20: 2093-2108.
- Graser HU, Tier B, Johnston DJ, Barwick SA. 2005. Genetic evaluation for the beef industry in Australia. *Aust J Exp Agric* 45: 913-921.
- Grumbach MM. 2002. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 57: 2-14.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25: 11349-11356.
- Hansen PJ, Kamwanja LA, Hauser ER. 1983. Photoperiod influences age at puberty in heifers. *J Anim Sci* 57: 985-992.
- Hastings N, Donn S, Derecka K, Flint AP, Woolliams JA. 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Anim Genet* 37: 583-585.
- Hawken RJ, Zhang YD, Fortes MRS, Collis E, Barris WC, Corbet NJ, Williams PJ, Fordyce G, Holroyd RG, Walkley JRW, Barendse W, Johnston DJ, Prayaga KC, Tier B, Reverter A, Lehnert SA. 2012. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *J Anim Sci* 90: 1398-1410.
- Heger S, Mastronardi C, Dissen GA, Lomniczi A, Cabrera R, Roth CL, Jung H, Galimi F, Sippell W, Ojeda SR. 2007. Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis. *J Clin Invest* 117: 2145-2154.

- Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. 2008. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor microRNA. *Mol Cell* 32: 276-284
- Hiller M, Chen X, Pringle MJ, Suchorolski M, Sancak Y, Viswanathan S, Bolival B, Lin TY, Marino S, Fuller MT. 2004. Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development* 131: 5297-5308.
- Hirai H. 1999. The transcription factor Evi-1. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1367-1371.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6: 95-108.
- Holroyd RG, Doogan W, De Faveri J, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Vankan DM, Fitzpatrick LA, Jayawardhana GA, Miller RG. 2002. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim Reprod Sci* 71: 67-79.
- Hou GY, Yuan ZR, Zhou HL, Zhang LP, Li JY, Gao X, Wang DJ, Gao HJ, Xu SZ. 2011. Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Mol Biol Rep* 38: 4705-4708.
- Huhtaniemi IT. 2002. The role of mutations affecting gonadotrophin secretion and action in disorders of pubertal development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 123-138.
- Hull KL, Harvey S. 2014. Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions. *Int J Endocrinol* doi: 10.1155/2014/234014.
- Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. 2006. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction* 132: 233-246.
- Jackson LM, Timmer KM, Foster DL. 2008. Sexual differentiation of the external genitalia and the timing of puberty in the presence of an antiandrogen in sheep. *Endocrinology* 149: 4200-4208.
- Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia E, d'Amati G, D'Armiento M. 2000. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3453-3457.
- Jéquier E. 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967: 379-388.
- Johnston DJ, Barwick SA, Corbet NJ, Fordyce G, Holroyd RG, Williams PJ, Burrow HM. 2009. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern

- Australia and associations with heifer- and steer-production traits. *Anim Prod Sci* 49: 399-412.
- Kealey CG, MacNeil MD, Tess MW, Geary TW, Bellows RA. 2006. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. *J Anim Sci* 84: 283–290.
- Kirkpatrick BW, Byla BM, Gregory, KE. 2000. Mapping quantitative trait loci for bovine ovulation rate. *Mamm Genome* 11: 136-139.
- Klenke U, Constantin S, Wray S. 2010. Neuropeptide Y directly inhibits neuronal activity in a subpopulation of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons via Y1 receptors. *Endocrinology* 151: 2736-2746.
- Kluge M, Schussler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A. 2007. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3202-3205.
- Kotaja N. 2014. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 101: 1552-1562.
- Krassas GE, Papadopoulou F, Tziomalos K, Zeginiadou T, Pontikides N. 2008. Hypothyroidism has an adverse effect on human spermatogenesis: A prospective, controlled study. *Thyroid* 18: 1255-1259.
- Kubo E, Hasanova N, Sasaki H, Singh DP. 2013. Dynamic and differential regulation in the microRNA expression in the developing and mature cataractous rat lens. *J Cell Mol Med* 17: 1146-1159.
- Kumar A, Shekhar S, Dhole B. 2014. Thyroid and male reproduction. *Indian J Endocr Metab* 18: 23-31.
- Kustikova OS, Schwarzer A, Stahlhut M, Brugman MH, Neumann T, Yang M, Li Z, Schambach A, Heinz N, Gerdes S, Roeder I, Ha TC, Steinemann D, Schlegelberger B, Baum C. 2013. Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 27: 1127-1138.
- Langlois VS, Duarte-Guterman P, Trudeau VL. 2011. Expression profiles of reproduction- and thyroid hormone-related transcripts in the brains of chemically induced intersex frogs. *Sex Dev* 5: 26-32.
- Larsen B, Jensen NE, Madsen P, Nielsen SM, Kalstrup O, Madsen PS. 1985. Association of the M blood group system with bovine mastitis. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 16: 165-173.

- Latronico AC, Lins TS, Brito VN, Arnhold IJ, Mendonca BB. 2000. The effect of distinct activating mutations of the luteinizing hormone receptor gene on the pituitary-gonadal axis in both sexes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53: 609-613.
- Latronico AC, Arnhold IJ. 2012. Inactivating mutations of the human luteinizing hormone receptor in both sexes. *Semin Reprod Med* 30: 382-386.
- Lesmeister JL, Burfening PJ, Blackwell RL. 1973. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. *J Anim Sci* 36: 1-6.
- Li N, Stephens M. 2003. Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using snp data. *Genetics* 165: 2213-2233.
- Li S, Ren J, Yang G, Guo Y, Huang L. 2008. Characterization of the porcine Kisspeptins receptor gene and evaluation as candidate for timing of puberty in sows. *J Anim Breed Genet* 125: 219-227.
- Liron JP, Prando A, Fernández ME, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Goszczynski DE, Posik DM, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G. 2012. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genet* 13: 26.
- Lis JT. 1980. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol* 65: 347-353.
- Liu X, Ju Z, Wang L, Zhang Y, Huang J, Li Q, Li J, Zhong J, An L, Wang C. 2011. Six novel single-nucleotide polymorphisms in SPAG11 gene and their association with sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 129: 14-21.
- Lunstra DD, Ford JJ, Echtenkamp SE. 1978. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J Anim Sci* 46: 1054-1062.
- Lunstra DD, Echtenkamp SE. 1982. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J Anim Sci* 55: 638-648.
- Marshall WA, Tanner JM. 1969. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44: 291-303.
- Marshall WA, Tanner JM. 1970. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45: 13-23.

- Marson EP, Ferraz JB, Meirelles FV, Balieiro JC, Eler JP. 2008. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. *Genet Mol Res* 7: 243-251.
- Martin LC, Brinks JS, Bourdon RM, Cundiff LV. 1992. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. *J Anim Sci* 70: 4006-4017.
- Martinez-Velazquez G, Gregory KE, Bennett GL, Van Vleck LD. 2003. Genetic relationships between scrotal circumference and female reproductive traits. *J Anim Sci* 81: 395-401.
- Mastronardi C, Smiley GG, Raber J, Kusakabe T, Kawaguchi A, Matagne V, Dietzel A, Heger S, Mungenast AE, Cabrera R, Kimura S, Ojeda SR. 2006. Deletion of the *Ttfl* gene in gifferentiated neurons disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function. *J Neurosci* 26: 13167-13179
- Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, O'Connell J, Moore SS, Smith TPL, Sonstegard TS, Van Tassell CP. 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One* 4: e5350.
- McAninch EA, Bianco AC. 2014. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1311: 77-87.
- McClure TJ. 1952. Correlation study of bovine erythrocyte antigen A and butter-fat test. *Nature* 170: 327.
- McClure MC, Morsci NS, Schnabel RD, Kim JW, Yao P, Rolf MM, McKay SD, Gregg SJ, Chapple RH, Northcutt SL, Taylor JF. 2010. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Anim Genet* 41: 597-607.
- Merigliola MC, Dahl KD, Mather JP, Bremner WJ. 1994. Follistatin decreases activin-stimulated FSH secretion with no effect on GnRH-stimulated FSH secretion in prepubertal male monkeys. *Endocrinology* 134: 1967-1970.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.
- Milazzotto MP, Rahal P, Nichi M, Miranda-Neto T, Teixeira LA, Ferraz JBS, Eler JP, Campagnari F, García JF. 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.
- Mishra GD, Cooper R, Tom SE, Kuh D. 2009. Early life circumstances and their impact on menarche and menopause. *Women's Health*, 5: 175-190.
- Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E. Gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 395-399.
- Morris CA, Baker RL, Cullen NG. 1992. Genetic correlations between pubertal traits in bulls and heifers. *Livest Prod Sci* 31: 221-234.
- Mullis K, Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol* 155: 335-350.
- Murray V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17:8889.
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29: 11859-11866.
- Navarro VM, Tena-Sempere M. 2011a. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 8: 40-53.
- Navarro VM, Tena-Sempere M. 2011b. Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 267-275.
- Nolan CJ, Neuendorff DA, Godfrey RW, Harms PG, Welsh TH Jr, McArthur NH, Randel RD. 1990. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of Brahman bulls. *J Anim Sci* 68: 1087-1096.
- Ojeda SR, Hill J, Hill DF, Costa ME, Tapia V, Cornea A, Ma YJ. 1999. The Oct-2 POU-domain gene in the neuroendocrine brain: A transcriptional regulator of mammalian puberty. *Endocrinology* 140: 3774-3789.
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A. 2003. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med* 35: 244-255.

- Ojeda SR, Terasawa E. 2002. Neuroendocrine regulation of puberty. En: *Hormones, Brain and Behavior*. Editores: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Moss R, Rubin R. Academic Press, New York, Vol 4: 589-659.
- Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, Kaidar G, Matagne V, Sandau US, Dissen GA. 2010. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol* 324: 3-11.
- Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, Bingham SA, Brage S, Smith GD, Ekelund U, Gillson CJ, Glaser B, Golding J, Hardy R, Khaw KT, Kuh D, Luben R, Marcus M, McGeehin MA, Ness AR, Northstone K, Ring SM, Rubin C, Sims MA, Song K, Strachan DP, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Wong A, Deloukas P, Barroso I, Mooser V, Loos RJ, Wareham NJ. 2009. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. *Nat Genet* 41: 729-733.
- Padmanabhan V, Battaglia D, Brown MB, Karsch FJ, Lee JS, Pan W, Phillips DJ, Van Cleeff J. 2002. Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion: II. Is follistatin-induced suppression of FSH secretion mediated via changes in activin availability and does it involve changes in gonadotropin-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 66: 1395-1402.
- Perez Marson E. 2005. Tesis de Doctorado: "Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados a precocidade sexual em novilhas compostas". Facultas de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos, Universidad de San Pablo, Pirassununga, Brasil.
- Peñagaricano F, Weigel KA, Khatib H. 2012. Genome-wide association study identifies candidate markers for bull fertility in Holstein dairy cattle. *Anim Genet* 43: 65-71.
- Phillips DJ. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol* 28: 1-16.
- Pierce MB, Kuh D, Hardy R. 2012. The role of BMI across the life course in the relationship between age at menarche and diabetes, in a British Birth Cohort. *Diabet Med* 29: 600-603.
- Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, Lapierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, Iliopoulos D, Gregory RI. 2011. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell* 147: 1066-1079.

- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81: 559-575.
- Quirino CR, Bergmann JAG. 1998. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nelore bulls, using univariate and bivariate animal models. *Theriogenology* 49: 1389-1396.
- Quirino CR, Bergmann JAG, Vale Filho VR, Andrade VJ, Pereira JCC. 1999. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. *Theriogenology* 52: 25-34.
- Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. 2010. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 1364: 116-128.
- Rawlings N, Evans ACO, Chandolia RK, Bagu ET. 2008. Sexual Maturation in the Bull. *Reprod Dom Anim* 43: 295–301.
- Rice LE. The effects of nutrition on reproductive performance of beef cattle. 1991. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 7: 1-26.
- Roa J, Garcia-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2010. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 324: 87-94.
- Ronaghi M. 2001. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* 11: 3-11.
- Rousset F. 2008. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8: 103-106.
- Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Leon S, Dieguez C, Cordido F, Matagne V, Dissen GA, Ojeda SR, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2013. Changes in Hypothalamic Expression of the Lin28/let-7 System and Related MicroRNAs During Postnatal Maturation and After Experimental Manipulations of Puberty. *Endocrinology* 154: 942-955.
- Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook A.J, Clarke IJ. 2009. Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 150: 5549-5556.
- Schillo KK, Hall JB, Hileman SM. 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci* 70: 3994-4005.

- Schneider JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81: 289-317.
- Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN, Palmert MR. 2002. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5581-5586.
- Shamsadin R, Adham IM, von Beust G, Engel W. 2000. Molecular cloning, expression and chromosome location of the human pelota gene PELO. *Cytogenet Cell Genet* 90: 75-78.
- Sharma JC. 1983. The genetic contribution to pubertal growth and development studied by longitudinal growth data on twins. *Ann Hum Biol* 10: 163-171.
- Sherman B, Wallace R, Bean J, Schlabaugh L. 1981. Relationship of body weight to menarcheal and menopausal age: Implications for breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 488-493.
- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
- Siddiqui MA, Bhattacharjee J, Das ZC, Islam MM, Islam MA, Haque MA, ParrishJJ, Shamsuddin M. 2008. Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. *Reprod Domest Anim* 43: 74-79.
- Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC. 2010. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol* 324: 30-38.
- Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G. 1999. MDS1/EVI1 enhances TGF-beta1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EVI1, product of the t(3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF-beta1. *Leukemia* 13: 348-357.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213-215.
- Sun LP, Du QZ, Song YP, Yu JN, Wang SJ, Sang L, Song LW, Yue YM, Lian YZ, Zhang SL, Hua GH, Zhang SJ, Yang LG. 2012. Polymorphisms in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effects on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Mol Biol Rep* 39: 7117-7123.
- Styne DM, Grumbach MM, Larsen PR, Kronenberg HM. 2011. Puberty: Ontogeny, neuroendocrinology, physiology, and disorders. En: *Williams Textbook of*

- Endocrinology (Capítulo 25). Editores: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. 12º Ed. Editorial: Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Swerdloff RS, Odell WD. 1975. Hormonal mechanisms in the onset of puberty. *Postgrad Med J* 51: 200-208.
- Tatman SR, Neuendorff DA, Wilson TW, Randel RD. 2004. Influence of season of birth on growth and reproductive development of Brahman bulls. *Theriogenology* 62: 93-102.
- Tena-Sempere M. 2012. Deciphering puberty: novel partners, novel mechanisms. *Eur J Endocrinol* 167: 733-747.
- Tena-Sempere M. 2013a. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis. *Horm Metab Res* 45: 919-927.
- Tena-Sempere M. 2013b. Ghrelin, the gonadal axis and the onset of puberty. *Endocr Dev* 25: 69-82.
- Teo YY. 2008. Common statistical issues in genome-wide association studies: a review on power, data quality control, genotype calling and population structure. *Curr Opin Lipidol* 19: 133-143.
- Themmen AP, Huhtaniemi IL. 2000. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocr Rev* 21: 551-583.
- Tommiska J, Sørensen K, Aksglaede L, Koivu R, Puhakka L, Juul A, Raivio T. 2011. LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. *BMC Res Notes* 22: 363.
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK. 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41: 354-358.
- Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millar RP, Yuksel B. 2012. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 366: 629-635.

- Trakooljul N, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K. 2004. Polymorphisms of the porcine androgen receptor gene affecting its amino acid sequence and expression level. *Biochim Biophys Acta* 1678: 94-101.
- Tsai-Morris CH, Xie XZ, Buczko E, Dufau ML. 1993. Promoter and regulatory regions of the rat luteinizing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 268: 4447-4452.
- Vargas CA, Olson TA, Chase CC Jr, Hammond AC, Elzo MA. 1999. Influence of frame size and body condition score on performance of Brahman cattle. *J Anim Sci* 77: 3140-3149.
- Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 1537-1556.
- Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. 2009. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microsc Res Tech* 72: 796-808.
- Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L. 2002. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am J Hum Genet* 71: 1227-1234.
- Warner A, Mittag J. 2012. Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J Mol Endocrinol* 49: 29-35.
- Weber G, Vigone MC, Stroppa L, Chiumello G. 2003. Thyroid function and puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16: 253-257.
- Wienholds E, Plasterk RH. 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005 579: 5911-5922.
- Wieser R. 2007. The oncogene and developmental regulator EVI1: expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene* 396: 346-357.
- Winsor CP. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *Proc Natl Acad Sci* 18: 1-8.
- Witchel SF, Plant TM. 2004. Puberty: gonadarche and adrenarche. En Yen & Jaffe's *Reproductive Endocrinology* (Capítulo 18). Editores: Strauss III J, Barbieri R, Yen and Jaffe's. 5° Ed. Editorial: Elsevier Saunders, Orlando.
- Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. 1965. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrition allowance. *J Anim Sci* 24:761-765.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395-420.

- Wright IA. 1985. The relationship between body condition, nutrition, and performance of beef cows. En: Emerging technology and management for ruminants. Editor: Baker FH, Winrock International, Arkansas, USA pág: 110-118.
- Wu T, Mendola P and Buck GM. 2002. Ethnic differences in the presence of secondary sex characteristics and menarche among US girls: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Pediatrics* 110: 752-757.
- Wu Y, Luo H, Liu J, Kang D, McNeilly AS, Cui S. 2010. LIM homeodomain transcription factor Isl-1 enhances follicle stimulating hormone-beta and luteinizing hormone-beta gene expression and mediates the activation of leptin on gonadotropin synthesis. *Endocrinology* 151: 4787-800.
- Ye RS, Xi QY, Qi Q, Cheng X, Chen T, Li H, Kallon S, Shu G, Wang SB, Jiang QY, Zhang YL. 2013. Differentially expressed miRNAs after GnRH treatment and their potential roles in FSH regulation in porcine anterior pituitary cell. *PLoS One* 8:e57156.
- Zhang H, Wang WP, Guo T, Yang JC, Chen P, Ma KT, Guan YF, Zhou CY. 2009. The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *J Mol Biol* 392: 566-577.

ANEXOS

Anexo 1

- a) Secuencia de ADN codificante (mRNA) correspondiente al gen LHR bovino tomada de GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ensamblado: Bos_taurus_UMD_3.1. Los once exones se encuentran resaltados en diferentes colores. Asimismo, se muestran los cebadores utilizados para amplificar una región del exón 11 (en rojo los *forward* y en azul los *reverse*), las mutaciones halladas (en rojo) y subrayado el codón al que pertenece cada cambio.

Definición: receptor de Hormona Luteinizante, mRNA (LHR, *Bos taurus*).

Locus: NM_174381.1

Gene ID: 281900

```

1  ctccgggcca tgggacggcc gtccctcgcg ctgaggctgc tgctggcgct gctgctgctg
61  ccgccgccag cgccgttgct ctgggcgctg cgcccggcgc cctgcccaaga gccctgcagc
121  tgcccggccg acggcgccct gcgctgcccc ggcccgcagg ccggcctcag ccgactatca
181  ctacactatc tcctatcaaa agtaatccca tctcaagctt tcagaggact taatgaggtc
241  ataaaaat tg aaatctctca gagtgattcc ctggaaaaga tagaagctaa tgcctttgac
301  aacctctca atttgtctga aatactgata cagaacacta aaaacctggg gcacattgag
361  gctggagcgt ttacaaatct cctcgggta aaatacctaa gcatctgtaa tacaggcctc
421  cacaagcttc cagatgttac gaagatcttc tcctctgaat ttaatttcac tctggaaatt
481  tgtgataact tacacataac caccatacca agaaatgctt ttcaagggat gaataacgaa
541  tccataacgc taaaactata tggaaatgga tttgaagaaa tacaagtca tgcattcaat
601  gggacaacgc tgatttcctt ggagctgaag gaaaatgcac gcctggagaa gatgcacaac
661  gacgccttc ggggggcccac ggggectagc attttggata tttcttcac taaactgcag
721  gcctgccta cctacgggct agagtccatt cagacactaa ttgccacac atcctattct
781  ctgaaaaaac tgccatcgag agaaaaattt accaacctcc tggatgccac actgacttac
841  cccagccact gctgtgcttt tagaaacttg ccaacaaacg agcaaaattt ttcattttcc
901  attttaaaa acttttccaa acaatgtgaa agcacagcaa ggagaccaaa taatgaaaca
961  ct ttattctg ccatctttgc tgagagtga ctgagtggtt gggatta tga ctatggtttc
1021  tgcttaccac agacactcca gtgtgctcct gaaccagatg ctttcaatcc ctgtgaagac
1081  attatgggct ac aacttctt tagagtcctg atttggctga ttaatatcct agccatc acg
1141  ggaaatgta ctgtcctctt tgttctcctg accagtcgtt acaaactgac agtccccgcg
1201  tttctcatgt gcaacctctc ctttgacagc ttctgcatgg ggctctacct gctgctcatt
1261  gcctcagtcg atgccagac caaaggccag tattacaacc atgcca taga ctggcagaca
1321  gggagtg ggt gcagcgcggc tggctttttc actgtgtttg caagtgaact ctctgtctac
1381  accctcacag tcatcacact agaaagatgg cacaccatca cctatgctat tcaactggac
1441  caaagctgc gactgaaaca tgccattcca gtcatgctcg gaggatggct cttttctact
1501  ct aattgccc tgttgctctt tgtgggtgc agcaattaca tgaaggtcag catttgctc
1561  cccatggatg tggaaagcac tctctcacag gtctacatct taacctcct gattctcaac
1621  gtgatggcct tcatcatcat ttgtgcttgc tacattaaaa tttattttgc agttcaaaat
1681  ccagagctga tggctaccac caaagataca aagattgcta agaaaatggc agtctctac
1741  ttcaccgatt tcacctgcat ggcaccaatc ttttctttg ccatctcagc tgccttcaaa
1801  gtgcccctca ttacagtaac caactcaaag gttctactgg ttctctttta tctgtcaat
1861  tcatgcgcca atccgtttct gtacgcaatt ttcacaaagg cattccaaag ggatttcttt
1921  ctgttgctga gcaattttg ctgctgtaaa tatcgagctg aactttatag gaggaaggat
1981  ttttcagctt atatctcaa ctgcaaaaat ggcttctact gatcaataa gccctcccgg
2041  tctaccttca agttgactac attacaatgt caatattcag ctgtcctgga caagacttgc
2101  tataaggaat gttaactgtg atatcagtaa acacattact gaattatact taaatattga
2161  aaaaaattta tctccaccag taatattaac aaagagttgg tttcaggaaa ttatgtgtta
2221  ggacatcag gcaaaaaga ctctctacct agctcaaaat gtggtccatg accatggccc
2281  gtctaaaaac tatttgtcaa gaatactgtt ggtagcaaga tagggattgc attgaatcta
2341  taaattgctt tgggtagtat actcattttc actatattga ttcttccaat ccatgaacat
2401  ggtatatttc tccatc

```

- b) Secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína LHR bovina tomada de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ensamblado: Bos_taurus_UMD_3.1. La zona codificada por el exón 11 se encuentra subrayada y los aminoácidos en los cuales se produce el cambio aminoacídico correspondiente a las mutaciones halladas se encuentran resaltados en color amarillo.

Locus: NP_776806.1

```

1 mgrpslalrl llallllppp apllwalrpa pcepcscpp dgalrcpgpq aglsrlsly
61 lpikvipsqa frglneviki eisqdslek ieanafdnl1 nlseiliqnt knlvhieaga
121 ftnlprkyl sictngihkl pdvtfkfsse fnfileicdn lhittiprna fggmnesit
181 lklyngfee iqshafngtt lislelkena rlekmhdaf rgatgpsild isstklqalp
241 tyglesiqtl iatssyslkk lpsrekftnl ldatltypsh ccafrnlptn eqnfsfsifk
301 nfskqcesta rrpnetlys aifaeselsg wdydygfclp ktlqcapepd afnpcedimg
361 ynflrvliwl inilaitgnv tvlfvlltsr ykltvprflm cnlsfadfcm glyllliasv
421 daqtkgqyyn haidwqtgsg csaaagfftvf aselsvytlt vitlerwhiti tyaiqldqkl
481 rlkhaipvml ggwlfstlia vlplvgvsny mkvsiclpmd vestlsqvyi ltililnvma
541 fiiicacyik iyfavqnpel matnkdtkia kkmavliftf ftcmapisff aisaafkvpl
601 itvtnskvl1 vlfypvnscanpflyaiftk afqrdfflll skfgcckyra elyrrkdfs
661 yisnckngft gsnkpsrstf klttlqcqys avldktcyke c

```

Donde **n**: Asparagina; **a**: Alanina; **w**: Triptofano; **i**: Isoleucina; **v**: Valina

- c) Secuencia nucleotídica de LHR bovino tomada de Ensemble (ENSBTAG00000016573- NM_174381), donde se muestra la región codificada por el exón 11 resaltada en rosa y la zona analizada en este trabajo delimitada por los cebadores externos utilizados. Los cambios reportados en esta región se muestran resaltados: en amarillo las mutaciones *missense*, y en verde las mutaciones sinónimas. Las mutaciones halladas en este trabajo se encuentran en color rojo y envueltas en un círculo (acceso 26 de Octubre de 2014).

```

63661 AGAATCATAGAAAAKCTCTTAAGTTTACACTGAGTCACRATATTCTYSYTACAGKTATKC
63721 TGCCRWCHTWGCTGAGAGTGRACTGAGTGGCTGGGRTTATGASSTATGGTYTCTGCTTMCC
63781 MRAGACACTCCRRKGTGCTCCTGAACCAGATGCTTCAATCCCTGTGMAGACATTATKGG
63841 CTACRoAMTHCTTMGAGTCCTGATTTGGCTGATTAATATCCTAGCCATCAoCDGGAAATGT
63901 GACTGTCCTCTTTGTTCTCCTGACCAGTCRTTACAAACTGACAGTCCCCCGCTTTCTCAT
63961 GTGCAACCTCTCCTTTGCAGACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGT
64021 CGATGCCCAGACCAAAGGCCAGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGG
64081 GTGCAGCGCoGTGGCTTTTTCACTGTGTTTGCAAGTGAACCTCTGTCTACACCCTCAC
64141 AGTCATCACACTAGAAAGATCoCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAGCT
64201 GCGACTGAAACATGCCATTCCAGTCATGCToGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCAoATTGC
64261 CoRTGTTGCCCTTTGTGGGTGTCAGCARoTTACATGAAGGTCAGCATTGCTCCCATGGA
64321 TGTGAAAGCACTCTCTCACARoGTCACATCTTAACCATCCTGATTCTCAACGTGATGGC
64381 CTTTATCATCAoWKGoGTGCTTGCTACATTAoAAATTTATTTTGCAGTToMAAATCCAGAGCT
64441 GATGGCTACCAACAAAGATACAAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTCACCGA

```

64501 **TTTCACCTGCATGGCACCAATCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCCT**
64561 **CATTACAGTAACCAACTCAAAGKTTCTACTGGTTCCTTTTATCCTGTCAATTCATGCGC**
64621 **CAATCCGTTTCTRKACGCAATTTTCACAAAGGCATCCAAAGGATTTCCTTCTGTTGCT**
64681 **KAGCAAATTTGGCTGCTKTAAATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTTTCAGC**
64741 **TTATATCTCCAAGTGCAGAAATGGCTTCACTGGATCAAATAAGCCCTCCCGGTCTACCTT**
64801 **CAAGTTGACTACATTACAATGTCAATATTCAGCTGTCTGGACAAGACTTGCTATAAGGA**
64861 **ATGTAACTGTGATATCAGTAAACACATTACTGAATTRTACTTAAATATGGAAAAAATT**
64921 **TATCTCCACCAGTAATATTAACAAAGAGTTGGTTTCAGGAAATTATGTGTTAGGCACATC**
64981 **AGGCAAAAAAAGACTCTCTACCTAGCTCAAAATGTGGTCCATGACCATGGCCCGTCTAAA**
65041 **AAATATTTGTSAAAGAATACYGTTGGTAGCTTGATAGGGATTGCATTGAATCTATAAATTG**
65101 **CYTTSGGTAGTATHCTCATTKTCACTATATTGATTCTTCCAATCCAYGAACATGGTATAT**
65161 **TTCTCCATCTATTTGTGTCCTCTTTGATTTCTTTCVCCAGTGWTTTATAGTWTTCTATAT**

Las mutaciones halladas en este trabajo son las siguientes:

R: A/G → Asn (**AAC**) / Asp (**GAC**) ; **rs436830857**

A: G/A → Sinónima Thy (**ACG**) / Thy (**ACA**)

C: C/T → Ala (**GCT**) / Val (**GTT**)

K: G/T → Trp (**TGG**) / Cys (**TGT**) ; **rs41256848**

V: C/T → Sinónima Leu (**CTC**) / Leu (**CTT**) ; **rs41256849**

A: A/C → Iso (**ATT**) / Leu (**CTT**)

R: G/A → Val (**GTG**) / Met (**ATG**) ; **rs454663781**

Anexo 2

- a) Secuencia nucleotídica perteneciente al gen KISS1R bovino tomada de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ensamblado: Bos_taurus_UMD_3.1. Los exones del gen se muestran resaltados en amarillo, mientras que en diferentes colores se muestran los pares de cebadores utilizados para amplificar cada región.

Definición: KISS1R (receptor de Kiss1; *Bos Taurus*)

Locus: AC_000164

Gen ID: 528699

```

1  ttgtccgtct gcttttcttg ttggtgagtc tcttggggta aggatggggtc cttccccggg
61  ctacagcatc ctctaggaag cctaccgctc cccctgctct gctccacact cccttcccc
121  gtccctcctg gttctcatcc ttaccttggg gggggaggac gggatgcggg agcaggggtg
181  tgctcgggtg aacagtgggc gcacaggcag gggagggagt ggccagaggc tgaaggagag
241  gcgggaaggc ggggcacggt gggatgcggg gtataaacgc gcagtggctg cagctgagga
301  ttccaggaaa gctgcgaccc agacttttga gcgcatcccc ggagggcgat ccggaaagtc
361  acggcagcga tcgcagggtg aatcccggg ggggtggctg gacgaagagg gtggcaatgc
421  agcccttgtc cgcgtctggg cctaacgcgt cctggtgggc gccggccaac acaacggtct
481  gcccgggctg tggcgccaac acctcggacg gcgcatccc tgcgccttgg cccgtggacg
541  cctggttggg gccgcttttc ttcggcgcgc tgatgctgct cggcctgaca gggaaactcac
601  tggatcatctt cgtcatctgc cgccacaagc agatgcggac ggtgaccaac ttctacatcg
661  gtgagcgcgc agcgcctcac ggtgctgagg gccattctgg gggctctacg gagggcgtag
721  tggccggggg gcgcccctag cggtagctcg gggctccttc agttgaggat ttctccgctg
781  cagggtccct ggtcctttcc ctactgtccc tgtaccttag gctggaggtc gccaaagggtg
841  gcgttgaaga gttccacctt gactggagta gttaaaaggg aggttggaga gtgtggccca
901  tggagcgctg gccactgcca ctcaaggaag atgtacgatt gaaatgtggt tcttgaatac
961  ccatgtggga tgaataaaag gagtgggggg aagactgagt ggcccgcggg ccccagttg
1021  gcaaccactg cccagaggc tcagtttatg cgtttgcgcg atgaggggtg cctagccggg
1081  tgagtgetca ctcagtcctg gttctccatt ctctgttggc tggcaccact caacttgcag
1141  atgagaaaac tgaggtcag agggcaaggg cctatttgca gtcctacag gggtagcag
1201  ggccattac tgtttgaac gctacaaagc aggtgctggg tgaggggtgt ttgaaatata
1261  aaaaagagag gaagcgcaca acttctctgc ccacggatgc tggggtttct ctgggtgctt
1321  cccgagccgc cctgctggtc agtcggaca aggcgagacc caggaggctg ggccagggcg
1381  ctgaagggtt agggcgatgc gccccacatt cagaaaccgc gcgtccccg cctgcagcca
1441  acctggcggg caccgactta acgttctctg tgtgctgctg gcccttcacc gctctgctct
1501  acccgctgcc cgcctgggtt ctgggcgact tcatgtgcaa gtttctcaac tacatccagc
1561  aggtgcgcag gttgagggca ggaggaccgg gggcggagtc tgggtgtggg cggggtcgga
1621  cccctgcag gctggtgcga gccaggggcg attgtggagg tggcggggc agaactctgg
1681  ttggggcggc aaccgcctct ctacggcgtg gtgagggcca gggaccgggt gtggaagtgg
1741  gcggggaggg cactgggtct ggggtcgtag ggctggggca gatatggga tctactagg
1801  atggtctctg ctctcctagt ctcagtcttg ggggtttcag gctaccctg aaggctcctc
1861  cctcctccac ctccctgggc tcctctctgg caccctctc tctgcccct tcaactatgg
1921  gccctggaga cttccccggg tcaggtctct cctgtaccgg agtggctgga cagtggggga
1981  cccgcaagga gggcgcggac agggaaaggc cctgacgggg cagggggcca cacgcggac
2041  tcccggtttt ccaggtctc ggtgcaggcc acgtgcgcca ccctgaccgc catgagcgtg
2101  gaccgctggg acgtaacagt gttcccgtg cgcgcctgc accaacgcac gccccgctg
2161  gcgctggcag tcagcctcgg catctgggtg ggtgagttca gcgtgggggt cgcacgggct
2221  gggggagaca agtcctcgtc cctgtgctca cctcctcata ctgcctgat cgtgcatctg
2281  ggaaatggc gactagcgc tcctgcaagg gccctgagg gcggggacc aagtggacct
2341  gcgctagca ggcctcagt ggcccgtgc ccgggaggca ccggggagac ccgggcccctc
2401  ttgcgccctt cgtcccccg ggcagggtct tcagcagggc cctgatgcag gctcggctgt
2461  cgtgtcggcg ccggtgttcg cctacatcg cctgtcgtcc ggaccgcgca cctactgcag
2521  cgaggccttc ccagccgcg cccttgagcg agcctttgcg ctcacaacc tgctggcgct
2581  ctacctgctg ccgctggtcg ccacctgtgc ctgctacggg gccatgctgc gccacttggg
2641  ccgagccgcc gtgcgcccag cgcccgcgg cggcgcctg gaggtgcgcg gctgggggag

```

2701 cggcatggtc tggctgaggg tggggggagt gaggcgcac tacggggggc ggggtggccc
2761 cgggtcgggg ggggggcgta attcgagaaa gtcaagaagg ggagcgccc aggaggggtg
2821 tagcagccg cccttcgct tccttcttc ccctcttct tcccagggg cagctgatgg
2881 cggagcgggc gggtgccgtg cgggccaagg tctcgaggct ggtggcggcc gtggctctgc
2941 tcttcgctgc ctgctgggg cccatccagc tgttcctgct gctgcaggcg ctgggcccga
3001 cgggcgctg gcatccgcg agttacacc cctacgcgt caagatctgg gcacactgca
3061 tgcctactg caactcggcg ctgaaccac tgctctacgc cttcctgggc tcccacttcc
3121 gccaggcctt ccgccgctc tgcccctgcg ctcccaggcc gctcccgcga ccctggggcg
3181 ctggaccctc ggacactgcg gccgtccacc aaaccagct gcgacgctg ggccacgcca
3241 ggcccccca agtcaggcag cggtagtccc gggctgcgca tgctgtgct tctgaggaaa
3301 cacacggtg ctctctgag cctctctgaa gggatcaaga cgggcccctc tgaagtagga
3361 gggcttaaat agcagctgct attattctgt ttttgccaa aatcataata gtgaaaaggc
3421 cttgccctct tgcaacatt gatacaaat tgctgtatg ttgccactgt tgatgctata
3481 attattatt ctgtgtttcc tgaattgaag atgctttgat gctgactttt ctggaacttt
3541 ggaggaagca tcaataggac ttttcacacg ctgccctgtg gttgactgta caattgtaag
3601 actgtacaaa tgccattttc agagatacta aaaagtgaac atgatgtaca tcttaaaatg
3661 gatgaaataa ggtattcttt ttggtacct gtgaatgagt gttcagagtc ctggctggaa
3721 aatcataggt gtcattgaat aaatagtaga gacatcact tgcagacaaa ggtcagtata
3781 gtcaaaactg gtttttgtag tagtcatgta tggatgtgag agttgcaaca atctttatag
3841 aaggctgagt accttagaat tgatgctttc gaattgcagt gctggagaag atttga