UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

CARACTERIZACIÓN DE LA EDAD A LA PUBERTAD Y DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PRECOCIDAD SEXUAL EN BUBILLAS DEL NORDESTE ARGENTINO

Autora: MV, Acuña María Belén

Director: Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota

Codirector: Dr. Crudeli Gustavo Ángel

Lugar de trabajo: Cátedra de Teriogenología, FCV-UNNE

Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando Noel Dolout, IGEVET-CONICET

Laboratorio de Reproducción Animal, FCV-UNLP

Miembros del Jurado:

Dr. Jorge Cabodevila

Dr. Martin Irurueta

Dr. Luis Fazzio

Año 28 de octubre de 2020

"Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil"

Marie Curie

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

He llegado a la instancia final de agradecer a todas las personas que se cruzaron en este camino, y de alguna u otra manera me ayudaron a crecer y evolucionar en la realización de mi Doctorado.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Director a quien admiro profundamente, el Dr. Luzbel De la Sota quien confió en mí desde un principio para llevar adelante este proyecto, por enseñarme que en la vida hay que tener un "plan b" por si el "plan a" falla, por su contención y enseñanzas profesionales continuas.

A mi Director de beca doctoral, el Dr. Lirón Juan Pedro quien me recibió en el IGEVET, me enseñó la importancia del rigor científico y me guió en cada decisión tomada cuando todo parecía gris.

A mi Codirector, el Dr. Gustavo Crudeli quien me abrió las puertas de la cátedra de Teriogenología para iniciarme en el camino de la investigación y la docencia. Y a los integrantes de la cátedra, tanto docentes y alumnos que han sido de gran ayuda para poder llevar a cabo mis muestreos.

A quienes integran el laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de La Plata, principalmente a Vanina Madoz, Ramiro Rearte y María Jaureguiberry que me ayudaron desde el inicio y sobre todo a sobrellevar los resultados finales. A Lorena Migliorisi, Alejandra Stornelli, Romina Nuñez Favre, Romina Pradeiro, Maricel Compagnoni, Nadia Reme. Muchas gracias a todos ustedes por recibirme, escucharme, brindarme sus conocimientos y experiencias personales.

Al Director del IGEVET, el Dr. Guillermo Giovambattista por abrirme las puertas del instituto para que desarrolle parte de mi tesis. También a Mónica Carino, María Elena

Fernández, Nadia Castillo, Egle Villegas Castagnasso, quienes me brindaron su apoyo y enseñanzas en cada técnica e interpretación de resultados. Y principalmente, a Bruno Cecilia que fue una excelente compañera y con sus conocimientos en el laboratorio lograba solucionarme todos los inconvenientes.

A las personas que se cruzaron en este camino recorrido lo cual me permitió crecer en lo laboral y personal, sobre todo acompañándome en los buenos y malos momentos. Muchas gracias, Barbi, Vale, Majo, Martín, Marianela, Alberto, Julieta.

A la Estancia La Candelaria y su personal de trabajo que sin ellos nada de esto hubiera sido un éxito, porque realizar un muestreo cada dos semanas en el campo es una tarea muy difícil. Por eso, mi mayor reconocimiento es para Don López, Saúl y Álvarez; y al M.V. Caio Velázquez encargado de la cabaña de búfalos, quien siempre estuvo presento con su buena predisposición y amabilidad.

A la Universidad Nacional del Nordeste y a la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar mis estudios de grado y posgrado, respectivamente.

Al CONICET, por haberme becado para realizar mi doctorado.

A los jurados por sus sugerencias y correcciones que permitieron enriquecer el trabajo.

Por último, a mi familia que siempre está presente y nunca me soltó la mano. En especial, a mi madre que es incondicional y me enseñó a no bajar los brazos.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS IX

LISTA DE TABLAS XI

LISTA DE FIGURAS XIII

PUBLICACIONES REALIZADAS DE LA TESIS XV

RESUMEN XVI

SUMMARY XVII

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA EDAD A LA PUBERTAD EN BUBILLAS DEL NEA 1

INTRODUCCIÓN 1

Producción Bubalina 1

Situación productiva del búfalo en Argentina y los países de América 1

Origen del búfalo 4

Fisiología y endocrinología de la búfala 5

Desarrollo del tracto reproductivo 5

Pubertad 7

Mecanismo de control neuroendocrino de la pubertad 9

Pubertad en la hembra bubalina 12

Factores que influyen en la pubertad y fertilidad 13

Desarrollo y peso corporal 14

Nutrición 15

Estacionalidad reproductiva 16

Genética 18

OBJETIVOS 18

HIPÓTESIS 19

MATERIALES Y MÉTODOS 19

Lugar y animales 19

Caracterización del inicio de la pubertad 20

Análisis estadístico 21

RESULTADOS 22

Edad, peso y condición corporal a la pubertad 22

Peso al nacimiento, al destete, ganancias diarias predestete y posdestete en bubillas púberes 25

Correlación y selección de variables predictoras de la edad a la pubertad 26

Análisis de Riesgos proporcionales de Cox para alcanzar la pubertad 27

Sensibilidad y especificidad de la US para el diagnóstico de pubertad 30

DISCUSIÓN 31

CONCLUSIONES 35

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS EN LA PRECOCIDAD SEXUAL EN BUBILLAS DEL NORDESTE ARGENTINO 37

INTRODUCCIÓN 37

Situación actual del país de acuerdo con las nuevas tecnologías 37

La genómica y el búfalo 39

Métodos de selección para la producción 41

Regulación neuroendocrina de la pubertad 43

Selección del receptor de LH (LHr) y melatonina (MTRN1A) en búfalas 44

OBJETIVOS 46

HIPÓTESIS 46

MATERIALES Y MÉTODOS 46

Obtención de sangre periférica y pelos 46

Extracción y purificación de ADN 47

Secuenciación y búsqueda de SNPs en el gen LHr 47

Secuenciación de Fragmentos del gen LHr 50

Genotipificación del gen receptor de Melatonina tipo1A (MTRN1A) 51

Análisis estadístico 55

RESULTADOS 56

Secuenciación y búsqueda de SNPs en el exón 11 del gen LHCGR 56

Genotipificación del Polimorfismo del gen receptor de Melatonina tipo1A ... 59

DISCUSIÓN 62

CONCLUSIONES 64

CAPÍTULO III: CONCLUSIONES GENERALES 66

BIBLIOGRAFÍA 68

BIOGRAFÍA 91

LISTA DE ABREVIATURAS

A/T: Adenina/Timina
AA: Homocigota AA
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AG: Heterocigota AG
AÑO: Año de experimentación
APS: Adenosina 5 fosfosulfato
ARNm: ARN mensajero
ATP: Adenosín trifosfato
BLUP-AM: *Best Linear Unbiased Prediction- Animal Model*
CC: Condición Corporal
CL: Cuerpo lúteo
CMM: Cuadrado Medio Mínimo
CP: Categoría en Parición
CP1: Cabeza de Parición
CP2: Cuerpo de Parición
CP3: Cola de Parición
DEPs: Diferencia Esperada de Progenie
dNTPs: Nucleósido trifosfato
E_2: Estrógeno
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
EPDIAS: Edad a la Pubertad en Días
EPEST: Edad a la Pubertad en Temporada Reproductiva
EST: Estimador
F: *Foward*
F1: Fragmento 1
F2: Fragmento 2
F3: Fragmento 3
FSH: *Follicle Stimulating Hormone*
FSHR: *Follicle Stimulating Hormone receptor*
GABA: *Gamma Aminobutyric Acid*
Gbp: Giga Pares de Bases
GDPPOS: Ganancias Diarias Posdestete
GDPPRE: Ganancias Diarias Predestete
GG: Homocigota GG
GnRH: *Gonadotropin Releasing Hormone*
GPR54: Gen del Receptor 54 acoplado a Proteína G
IC95%: Intervalo de Confianza del 95%
IFG-1: *Insulin-Like Growth Factor-1*
INP: Intervalo entre Nacimiento y Pubertad
KCl: Cloruro de Potasio
KiSS1: Kisspeptina-1
LH: *Luteinizing Hormone*
LHr: *Luteinizing hormone receptor*
M: Molar
M13: cebador reverso con la secuencia de **M13** en su extremo 5´

MED: Medias
MgCl2: Cloruro de Magnesio
MT1: *Melatonin 1*
MT2: *Melatonin 2*
MTRN1A: *Melatonin Receptor 1A*
NaCl: Cloruro de Sodio
NaOH: Hidróxido de sodio
NEA: Nordeste Argentino
P_4: Progesterona.
Pb: par de bases
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PD: Peso al Destete
PEG: *Polyethylene Glycol*
PESO: Peso Corporal
PN: Peso al Nacimiento
PPi: Pirofosfato
PRE: Precoces
QTL: *Quantitative Trait Locus*
R: *Reverse*
SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*
TAC3: Taquicinina-3
Taq: Polimerasa Taq
TAR: Tardías
TBE: Tris/Borate/EDTA
Tris-HCl: Hidrocloruro de Tris
US: Ultrasonografía
UV: Radiación Ultravioleta

LISTADO DE TABLAS

Tabla **Página**

1.1. Edad a la pubertad en días (EPDIAS, días), peso (PESO, kg) y condición corporal (CC) al inicio de la pubertad en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE) 25

1.2. Peso al nacimiento (PN, kg), peso al destete (PD, kg), ganancia de peso predestete (GDPPRE, kg/d) y ganancia de peso posdestete (GDPPOS, kg/d) en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE)..... 26

1.3. Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables edad a la pubertad (EPDIAS, días), edad a la pubertad desde el inicio de la estación reproductiva (EPEST, días), ganancia diaria de peso predestete (GDPPRE, kg/d), ganancia diaria de peso posdestete (GDPPOS, kg/d) y peso a la pubertad (PESO, kg) 27

1.4. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y ganancia diaria peso posdestete (GDPPOS) 28

1.5. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPEST), en función de año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y ganancia diaria peso posdestete (GDPPOS) 29

1.6. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función del año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y peso (PESO)..... 29

1.7. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPEST), en función del año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y peso (PESO) 30

1.8. Relación entre el diagnóstico positivo (presencia) y negativo (ausencia) de CL mediante US y el diagnostico positivo (≥1 ng/ml) y negativo (<1 ng/ml) de P4 mediante quimioluminiscencia 30

2.1. Cebadores utilizados en la amplificación del exón 11 del gen LHr diseñados mediante el programa DNAMAN v. 4.15 (Lynnon Biosof© 1994-1999, Quebec, Canadá). T: temperatura de melting (Tm) de los mismos. F1: fragmento1; F2: fragmento2 y F3: fragmento3 (Goszczynski, 2010) 48

2.2. Cebadores utilizados para amplificar el SNPs del gen MTRN1A 51

2.3. Secuencia del cebador interno del gen MTNR1A 54

2.4. Alineamiento de los 3 fragmentos (con la base polimórfica A del fragmento 2) con el genoma del búfalo de referencia XM_006078413.1, una secuencia Murrah (KY786095.1) y el genoma bovino (NM_174381.1). En el Fragmento 2 el polimorfismo: A/T (posición 1665 en ARNm de referencia XM_006078413, XP_006078475.1 58

2.5. Frecuencias alélicas y genotípicas del locus MTRN1A 59

2.6. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de año de experimentación (AÑO) y genotipo 61

2.7. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de genotipo y año de experimentación (AÑO) 61

LISTADO DE FIGURAS

Figura **Página**

1.1. Concentraciones plasmáticas de progesterona durante el ciclo estral en búfalos (Avallone et al., 1988) 7

1.2. Cambios fisiológicos y endocrinos durante el período peripuberal en hembras. Se producen cambios endocrinos durante el período peri-púber en la pubertad en vaquillas (Day y Anderson, 1998) 11

1.3. Edad a la pubertad en días por año en bubillas del NEA (CMM ± EE; P<0,01) 23

1.4. Peso a la pubertad en kg por año en bubillas del NEA (CMM ± EE; P<0,05) 24

1.5. Condición corporal a la pubertad por año en bubillas del NEA (CMM ± EE; P<0,05) 24

1.6. Ganancias diarias predestete (GDPPRE, kg/d) y posdestete (GDPPOS, kg/d) por año en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE; P<0,05) 26

2.1. Representación esquemática de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen LHr bovino (NM_174381.1), y tamaño de los productos de amplificación. La letra F designa a los cebadores con orientación forward, mientras que R a los de orientación reverse 48

2.2. Productos amplificados por PCR correspondientes al fragmento F3 de 341pb (calles 2-8) y Fragmento F2 de 250pb (calles 9-20) del gen LHr..... 50

2.3. Producto amplificado por PCR del polimorfismo del gen MTRN1A en bubillas 53

2.4. Cromatograma de un animal donde la flecha indica la presencia del SNPs, donde se produce un cambio de base de A/T 56

2.5. Interacción año de experimentación y genotipos del polimorfismo del gen receptor de MTNR1A en bubillas púberes 60

LISTADO DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS RELATIVAS AL PRESENTE PLAN DE TESIS

Acuña MB, Montoya C, Garrido M, Konrad J, Velázquez R, Crudeli G. Datos preliminares de edad a la pubertad en bubillas en el nordeste Argentino. XXXIV Sesión de Comunicaciones Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. Corrientes: Revista Veterinaria. 2013. p. 48.

Acuña MB, Pibernus LM, Lirón JP, De La Sota RL, Crudeli GA. Puberty age in mediterranean buffalo heifers in Corrientes, Argentina. (Memories THE 11th WORLD BUFFALO CONGRESS/ Memorias del XI Congreso Mundial de Bufalos Cartagena, Colombia, 2016: Reproduction and genetics). Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2016. 11(3): 162.

Acuña MB, Fernández M, Madoz L, De la Sota R, Crudeli G. Edad a la pubertad en bubillas del Nordeste Argentino. 12 Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba. 2017. p. 414. Disponible en: http://file:///C:/Users/Vete/Downloads/263_Acu%C3%B1aMB@12SIR-IRAC2017_414_Edad%20a%20la%20pubertad%20en%20bubillas%20del%20nordeste%20argentino.pdf

Acuña MB, Crudeli G. Pubertad. In: Crudeli G, Konrad J, Patiño E. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones. 2016. p. 39-55.

TÍTULO: Caracterización de la edad a la pubertad y de genes involucrados en la precocidad sexual en bubillas del Noroeste Argentino

PALABRAS CLAVES: Pubertad, Bubillas, Cuerpo Lúteo, Polimorfismo, Genética.

RESUMEN

La fertilidad potencial de los animales se evalúa a través de algunos parámetros, uno de ellos es la edad a la pubertad, la cual se define como la plena manifestación de la capacidad reproductiva expresada en la habilidad del animal para ovular un ovocito capaz de ser fertilizado, así como la expresión de conductas sexuales. En este trabajo se caracterizó el inicio de la pubertad en bubillas criadas en sistema extensivo en Corrientes, Nordeste Argentino. Las evaluaciones se realizaron en dos años de experimentación 2015 y 2016, evaluándose las variables que nos permitan caracterizar la pubertad. El inicio de la pubertad en las bubillas nacidas en 2014 fue 52 días más temprano, pesaron 24 kg más y tuvieron 0,50 puntos más de CC a la pubertad que las bubillas nacidas en 2015. La influencia de la recría es uno de los factores más importantes para que se alcance la pubertad. En el otro ensayo, se realizó la caracterización de la variabilidad genética del exón 11 del gen LHR y el sitio polimórfico del gen MTRN1A en bubillas mediterráneas, encontrándose 3 bubillas que resultaron heterocigotas para un polimorfismo de tipo SNP en el exón 11 del gen LHCGR correspondiente a un cambio de bases de A/T. Sin embargo, el polimorfismo encontrado A/T no produjo cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Al evaluarse los genotipos del polimorfismo del gen receptor de Melatonina tipo1A en las poblaciones de los años 2015 y 2016, se encontraron en equilibrio. Además, se observó un efecto AÑO de experimentación en la edad alcanzada a la pubertad de acuerdo con los genotipos evaluados, observándose un mayor riesgo de pubertad para los genotipos heterocigota AG y homocigota GG en el año 2015.

TITLE: Age of puberty and genes involved in sexual precocity in buffalo heifers in Northeastern Argentina

KEY WORDS: puberty, buffalo heifers, corpus luteum, polymorphism, genetics

ABSTRACT

The potential fertility of animals is evaluated through some parameters, one of them is age at puberty, which is defined as the full manifestation of the reproductive capacity expressed in the animal's ability to ovulate an oocyte capable of being fertilized, as well as the expression of sexual behavior. This work characterized the onset of puberty in buffalo heifers raised in the extensive system in Corrientes, Northeastern Argentina. The evaluations were carried out in two years of experimentation 2015 and 2016, evaluating the variables that allow us to characterize puberty. The onset of puberty in buffalo heifers born in 2014 was 52 days earlier, they weighed 24 kg more and had 0.50 points more of body condition score at puberty than buffalo heifers born in 2015. The influence of rearing is one of the factors most important for reaching puberty. In the other trial, the genetic variability of exon 11 of the LHR gene and the polymorphic site of the MTRN1A gene in Mediterranean buffalo heifers was characterized. We found three buffalo heifers that were heterozygous for an SNP-type polymorphism in exon 11 of the LHCGR gene corresponding to an A/T base change. However, the A/T polymorphism found did not change the amino acid sequences of the protein. When evaluating the polymorphisms of the Melatonin receptor type1A gene polymorphism in the populations of the years 2015 and 2016, they were found in equilibrium. In addition, a year-of-experimentation effect was observed in the age reached puberty according to the evaluated genotypes, with a higher risk of puberty being observed for the heterozygous AG and homozygous GG genotypes in 2015.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE LA EDAD A LA PUBERTAD EN BUBILLAS DEL NEA

INTRODUCCIÓN

Producción bubalina

Situación productiva del búfalo en Argentina y los países de América.

Según datos aportados por instituciones gubernamentales, asociaciones de productores, investigadores y otras fuentes en los 23 países de América, la población actual de búfalos alcanzaría aproximadamente la cifra de 5 millones de cabezas. La lista es encabezando por Brasil con 3.000.000, en segundo lugar, Venezuela con 960.000, en tercer lugar, Colombia con 868.159, y en cuarto lugar Argentina con 101.555 cabezas (Crudeli et al., 2016).

Los primeros búfalos llegaron a Argentina a principios del siglo XX, procedentes de Rumania con destino a la provincia de Entre Ríos, donde se intentó cruzarlos con bovinos para destinarlos a la producción de leche. Después de los fallidos intentos de cruzar el búfalo con el ganado bovino, por no haberse considerado la incompatibilidad cromosómica (el búfalo de río [*Bubalus bubalis fluviatilis]* posee 50 cromosomas, el búfalo del pantano [*Bubalus bubalis carabanensis*] 48 cromosomas, y los bovinos poseen 60 cromosomas), debieron pasar varios años para que recién a comienzos de la década de 1980 se reanudaran las importaciones en pequeña escala, realizadas desde Italia, Brasil y Paraguay. Los ejemplares importados pertenecían a las razas Mediterránea Murrah y Jafarabadi. Durante la década de 1990 se produjeron grandes importaciones de más de 5.000 vientres y

reproductores seleccionados desde Brasil, lo cual consolidó la cría del búfalo en el país (Maldonado Vargas, 2016).

Argentina posee actualmente la cuarta población bubalina del continente americano, encontrándose concentrada en el subtrópico húmedo de la región del nordeste argentino (NEA), integrada por las provincias de Formosa, Corrientes, Chaco y Misiones. Teniendo en cuenta la división del país por regiones, la del NEA concentra el 85% de la población bubalina del país (Maldonado Vargas, 2016).

Actualmente en nuestro país se crían tres de las razas de mayor importancia económica en el mundo, la Mediterránea que representa el 70% de la población bubalina del país, luego Murrah y finalmente la Jafarabadi que se encuentra en escasa presencia en nuestro país. Estas razas son de doble propósito, carne y leche, y a veces pueden ser de triple, como en otros países que se emplean para el trabajo. Es así, que en nuestro país los búfalos tienen principalmente importancia en la producción de carne siendo, en muy pequeña escala a la producción de leche y no son utilizadas para trabajo. El búfalo se encuentra en las regiones explotadas ineficientemente desde el punto de vista pecuario, debido a la falta de adaptación del ganado vacuno a la misma, como son los sectores bajos e inundables que totalizan unos ocho millones de hectáreas. En nuestro país esta colosal superficie es apta para soportar la carga de un búfalo cada dos hectáreas, lo que permitiría una población de 4 millones de búfalos, que no competirían con el ganado tradicional, el cual no es apto para estas zonas llamadas “marginales” (Maldonado Vargas, 2016).

Actualmente nuestro país, así como Brasil, comparten el manejo que es utilizado en esta especie, donde la mayoría de las explotaciones se realizan sobre sistemas extensivos teniendo como base nutricional los pastos naturales o pasturas implantadas, sin el agregado de alimentos o suplementación proteico-energética, siendo poco común la suplementación

en la peor época de oferta forrajera. En estas condiciones, la velocidad de desarrollo de los animales acompaña la oferta alimentaria y a la estacionalidad reproductiva de la especie, que es más acentuada en la región centro-sur a mayor distancia de la línea del Ecuador, conocido como paralelo 0° (Bernardes, 2016).

Bajo estas condiciones, los búfalos presentan en relación al bovino un mejor desempeño, ya que los partos tienden a ocurrir normalmente en el verano, en el período de mayor oferta cuantitativa y cualitativa del forraje, lo que permite que las búfalas lleguen al parto en una buena condición corporal (CC) y por ende logran volver a la ciclicidad, mucho más rápido luego de un corto puerperio, lo que produce tasas de fertilidad más elevadas que las logradas por los bovinos bajo condiciones de manejo similares; cuyos partos ocurren en invierno-primavera, un periodo de relativa escasez de forraje. Es común ver niveles de fertilidad superiores al 80% en los bubalinos, con algunos establecimientos que superan el 90% (Bernardes, 2016).

El período de amamantamiento de las búfalas en general coincide con la menor oferta forrajera, lo cual, si bien por un lado compromete la productividad, por otro, asegura al bucerro que son alimentados por la madre una buena velocidad de crecimiento hasta el destete. El destete ocurre en primavera, cuando es mayor la oferta forrajera, lo que permite que el bucerro destetado continúe su crecimiento de forma continua hasta el inicio del próximo período desfavorable, cuando llegue a una edad promedio de 10 a 15 meses.

Los países latinoamericanos dedicados a la bubalinocultura, principalmente para la producción de carne, enfrentan un problema común por falta de organización en la cadena comercial del producto, la cual se ve afectada por no crear una demanda específica, por promover faenas con baja escala comercial y con oferta irregular durante el año, debido a su estacionalidad reproductiva, entre otros factores. Por lo tanto, la mayoría de las veces se

logran valores en la cotización de los búfalos, significativamente inferiores a los obtenidos por los bovinos, resultando después de la faena, una comercialización de la carne bubalina para el consumidor a los mismos precios de la bovina (Bernardes, 2016).

Es así, que actualmente sigue en proceso de aprendizaje por parte de los productores como primer eslabón de la cadena comercial, quienes también siguen enfrentando actualmente las problemáticas de comercialización de la especie. Aun así, una parte de los productores apuestan desde el uso de genética para mejorar sus rodeos hasta las más sofisticadas biotecnologías en reproducción. Y la otra, la sigue considerando una opción ganadera debido a su gran adaptabilidad en zonas marginales, sin tener en cuenta desde medidas de manejo hasta la implementación de alguna biotecnología reproductiva.

Origen del búfalo

El conocimiento de la filogenia de la especie, es decir su origen, proceso de domesticación, selección genética y particularidades raciales, nos permiten comprender las características anatómicas, fisiológicas y morfológicas, las expresiones de conducta, de adaptación al medio, productivas y reproductivas de los animales (Patiño et al., 2016).

El búfalo tuvo su origen en Asia y data de su existencia como animal doméstico hace 4.500 años, en la región ocupada hoy por India y Pakistán. De Asia fue llevado a África, luego a Europa, a Oceanía y posteriormente a América (Nascimento, 1993).

La clasificación zoológica de los búfalos de agua (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) transitó por diferentes categorizaciones a partir de los conceptos de familia, subfamilia, género y especie, en dependencia del desarrollo de la citogenética y más recientemente de la biología molecular. Pertenecen al Reino *Animal*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Vertebrata*, Clase *Mammalia*, Subclase *Eutheria,* Orden *Artiodactyla*, Familia *Bovidae*,

Subfamilia *Bubalinae.* Las especies que a su vez conforman el "género bufalino" (*Syncerus, Bubalus* y *Anoa*) no puedan cruzarse con animales de los géneros *Bos*, *Poehagus* y *Bison* (con número de cromosomas 2n = 60), esto fue lo que llevó a que se propusiera que todos los búfalos, salvajes o domésticos, se clasificaran dentro de una nueva y separada subfamilia, llamada *Bubalinae* perteneciente a la familia *Bovidae* (Peary, 1990).

Fisiología y endocrinología de la búfala

Desarrollo del tracto reproductivo

Las gónadas de los animales son responsables de la producción de gametos viables que, después la fertilización, resulta en la generación de descendientes. La función de las gónadas es regulada por factores locales y endocrinos, donde la pituitaria e hipotálamo tienen roles críticos. Comprender los factores que regulan la función de la pituitaria e hipotálamo durante el periodo de madurez sexual, y como a su vez estos cambios preparan la primera ovulación en hembras, es la clave para entender los acontecimientos de desarrollo prepuberal (Evans et. al., 1994). Observaciones en vaquillas que fueron sacrificadas en intervalos mensuales mostró que el peso ovárico aumentó hasta los 4 meses de edad, se mantuvo hasta los 8 meses de edad y luego aumentó más rápido cuando las vaquillas comenzaron a ciclar y desarrollar un cuerpo lúteo (7 a 10 meses de edad; Desjardins et al., 1969). El peso de la vagina y el cérvix aumentó gradualmente hasta los 4 meses de edad, y luego más rápidamente hasta la primera ovulación, el útero sin embargo aumentó desde el nacimiento hasta la primera ovulación. En vaquillas que alcanzaron la pubertad a las 63,7±1,1 semanas de edad, los folículos antrales aparecieron a las 2 semanas de edad y el número de folículos ≥ 3 mm de diámetro y el diámetro máximo de los folículos aumentaron en un modo similar a las

dimensiones ováricas, con un aumento marcado del diámetro máximo del folículo mayor durante los 80 días antes de la primera ovulación (Honaramooz et al., 2004).

Con respecto a la morfología del aparato genital de la búfala, existen una cierta similitud con la hembra taurina y cebuina. Vale et al. (1982), encontraron un peso del ovario derecho de 4,80 g y del izquierdo de 4,66 g, con el tamaño de los cuernos uterinos ligeramente menor y más tortuosos que el de las hembras bovinas. El cuerpo del útero (CL) es más corto en centímetros, el cérvix también es de menor tamaño, posee más anillos cervicales lo que hace difícil la dilatación durante el celo y el tono uterino es más tenso que en los bovinos. Los ovarios poseen un tamaño de 3,0 cm x 1,4 cm x 1,0 cm; 2,9-6,1 g (El-Wishy, 2007) versus 3,7 cm x 2,5 cm x 1,5 cm; 5-15 g la hembra bovina (Roberts, 1986); con dimensiones promedio que varían entre 22-26 x 11-18 x 11-14 mm^3 (Fadle et al., 1974), con un peso máximo y mínimo de 6,1 y 2,9 g, respectivamente (El-Wishy, 1979). Estos valores varían de acuerdo a la raza, condición ambiental, temporada y prácticas de manejo (Drost, 2007).

El CL, es una estructura endocrina que se desarrolla luego de la ovulación y tiene un papel fundamental en el control de la reproducción en los mamíferos (Niswender y Nett, 1994; Niswender et al., 2000; Diaz et al., 2002). En búfalos en la fase media luteal es de 1 a 1,5 g (El-Sheikh et al., 1967; Ghosh y Mondal, 2006), otros autores reportan un peso máximo de 2,3 g y un diámetro máximo de 15 mm y se encuentra profundamente incrustado en el estroma ovárico, lo cual es menor en comparación con el bovino (Roy y Mullick, 1964). En los ciclos estrales regulares, el CL secreta progesterona (P_4) aproximadamente por 15 días, y las concentraciones máximas de dicha hormona oscilan entre 5 y 12 ng/ml entre el día 6 y 16 del ciclo estral (Seren et al., 1995). La regresión del CL es un proceso mucho más extendido que en el bovino, basándose en una disminución gradual de las concentraciones circulantes de P_4 (Figura 1.1; Danell, 1987; Avalloneet et al., 1988).

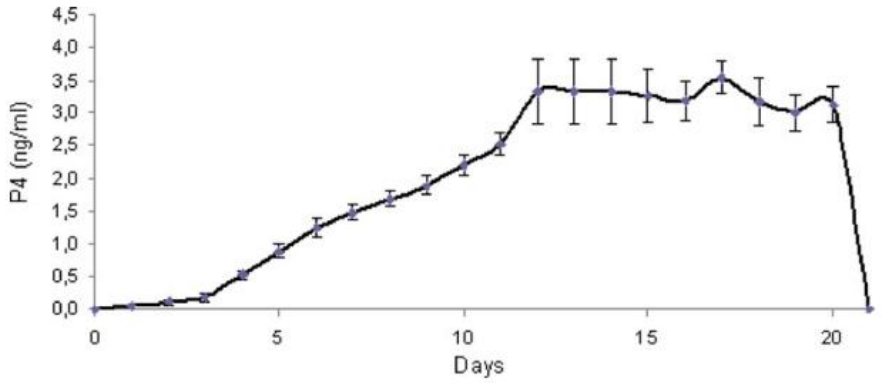

Figura 1.1. Concentraciones plasmáticas de progesterona durante el ciclo estral en búfalos (Avallone et al., 1988).

Pubertad

Si abordamos el concepto de pubertad desde un punto de vista práctico, sabemos que el inicio de la ciclicidad en las hembras marcará el comienzo de la vida reproductiva en los vientres, y dicho momento muchas veces puede encontrarse retrasado e influenciado por diferentes factores (Tortonese, 1986) e influye en la eficiencia tanto reproductiva como económica, así como en el número de crías por hembra dentro de un establecimiento (Bagley et al., 1993). Por lo tanto, definimos a la pubertad, como la plena manifestación de la capacidad reproductiva expresada en la habilidad del animal para ovular un ovocito capaz de ser fertilizado, así como la expresión de conductas sexuales. Estos eventos resultan en el desarrollo de un cuerpo lúteo de duración normal (Kinder et al., 1987) y concentración de P_4 por encima de 1 ng/ml (Vale y Ribeiro, 2005).

En las hembras ha sido asociada con variables productivas como lo son, el peso corporal (PESO), la cantidad de tejido adiposo expresada en CC, genética del animal

(Patterson et al., 1992) y la edad en la cual el animal puede soportar el término de la preñez (Valasi et al., 2012).

Sin embargo, deberíamos abordar una serie de conceptos viejos y nuevos que se siguen interrelacionando; los cuales cumplen un rol importante en los mecanismos de control de la llegada a la pubertad en las hembras. Esto es de suma importancia, debido a que la selección genética es una herramienta a tener en cuenta, así como también el estudio del medio ambiente para que los animales lleguen a una pubertad precoz (Kumar Gupta et al., 2016).

En términos estrictos, el genotipo describe el conjunto completo de los genes heredados por un individuo, y el fenotipo describe todos los aspectos de su morfología, fisiología, conducta y relaciones ecológicas. En este sentido, es muy difícil que en la naturaleza dos individuos tengan fenotipos idénticos, porque siempre existe alguna diferencia (por pequeña que sea) en su morfología o en su fisiología (Martinez Trujillo y Saenz, 2003). Por lo tanto, no se describirá en base a una clasificación estricta, sino al conjunto de factores genéticos y ambientales que afectan al fenotipo de un individuo.

Cuando se realiza la selección de hembras para la reposición en un sistema de cría, a menudo no se tiene en cuenta la edad a la pubertad de las mismas. Sin embargo, en bovinos es un carácter importante cuando se buscan hembras que se inseminan en una época de servicio determinada para parir con 2 años de edad (Ferrel, 1982). El carácter de edad a la pubertad en bovinos se ha estimado que posee una heredabilidad moderada con valores de 0,33 (Mialon et al., 2000) a 0,40 (Martin et al., 1992). Además, se ha reportado una correlación positiva entre la edad a la pubertad y la fertilidad. Por lo tanto, esta correlación y la heredabilidad revelan la importancia de la selección de animales precoces (Morris et al., 2000), ya que indirectamente estaríamos generando un impacto en la eficiencia reproductiva del rodeo (Perry, 2016).

Desde el punto fisiológico, la aparición de la pubertad resulta de una secuencia compleja e integrada de eventos biológicos que conducen a una progresiva maduración de las características sexuales, para alcanzar finalmente la capacidad reproductiva total (Duittoz et al., 2016). Es el despertar de una compleja maquinaria neuroendocrina, en donde el mecanismo primario aún no está claro (Terasawa et al., 2001) y es un fenómeno clave en el desarrollo de la maduración sexual y somática (Ojeda y Skinner, 2006; Parent et al., 2003; Ojeda et al., 2010).

Mecanismo de control neuroendocrino de la pubertad

La pubertad es caracterizada por el desarrollo del eje reproductivo (hipotálamo-hipófisis-ovario) así como el metabolismo general del animal. Dichos cambios ocurren de forma gradual y se encuentran asociados a ciertos parámetros productivos como el PESO y estructura corporal del animal, así como modificaciones endocrinológicas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y en las hormonas del eje somatotrópico (hormona del crecimiento, factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina IFG-1 y sus proteínas ligadoras, Maquivar y Day, 2011).

Desde el punto de vista endócrino, la presentación de la pubertad es el resultado de la disminución en la regulación negativa hacia el hipotálamo por parte del estradiol. Esta disminución, promueve que las neuronas secretoras de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) incrementen la secreción de esta misma, que induce un incremento en la secreción de hormona luteinizante (LH) de la hipófisis, que resulta en el crecimiento y maduración del folículo dominante y finalmente en la ovulación del mismo (Day y Anderson, 1998; Figura 1.2). Previamente se ha caracterizado que estos cambios endocrinológicos (disminución del efecto negativo de los estrógenos (E_2) unido al incremento de GnRH y LH)

son los principales eventos que regularan el establecimiento de los ciclos estrales en animales prepúberes. Sin embargo, los mecanismos específicos y el momento en el cual ocurren, así como el papel que juegan los esteroides (E_2 y P_4) en la activación de las neuronas secretoras de GnRH no es completamente entendido. Por lo tanto, durante la fase de desarrollo el hipotálamo y los órganos reproductivos se encuentran en proceso de maduración; caracterizada este periodo por el incremento de la secreción de LH que a su vez causa el crecimiento de folículos que alcanzan dominancia y formación del antro. Sin embargo, la secreción de LH cesa y permanece basal durante la fase estática, caracterizado por una lenta y gradual maduración final del eje reproductivo hasta el inicio de la fase peripuberal. En esta última etapa, la regulación negativa del estradiol hacia el hipotálamo es más acentuada, asociada a un incremento en la secreción de gonadotropinas (FSH y LH) y presencia de folículos dominantes, que, a su vez, sintetizan y secretan estradiol que eventualmente estimulará la secreción preovulatoria de LH y finalmente la ovulación (Maquivar y Day, 2011).

Sin embargo, se especula que en el animal prepúber antes del establecimiento de los ciclos estrales, experimenta incrementos temporales de P_4, debido a la ocurrencia de CL de vida corta que pudieran aumentar el efecto del E_2 (Nogueira, 2004). Por lo tanto, la P_4 también puede mediar la secreción de GnRH por medio de la interacción con otros neuro-moduladores, como el ácido gama-aminobutírico (GABA), que ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH (Maquivar y Day, 2011). Carathy y Skinner (1999), a través de sus estudios en ovejas demostraron que, independientemente del efecto contrastante entre la P_4 y el E_2, a su vez existe una estrecha relación entre ambas hormonas para modular la secreción de GnRH en el animal durante el ciclo estral.

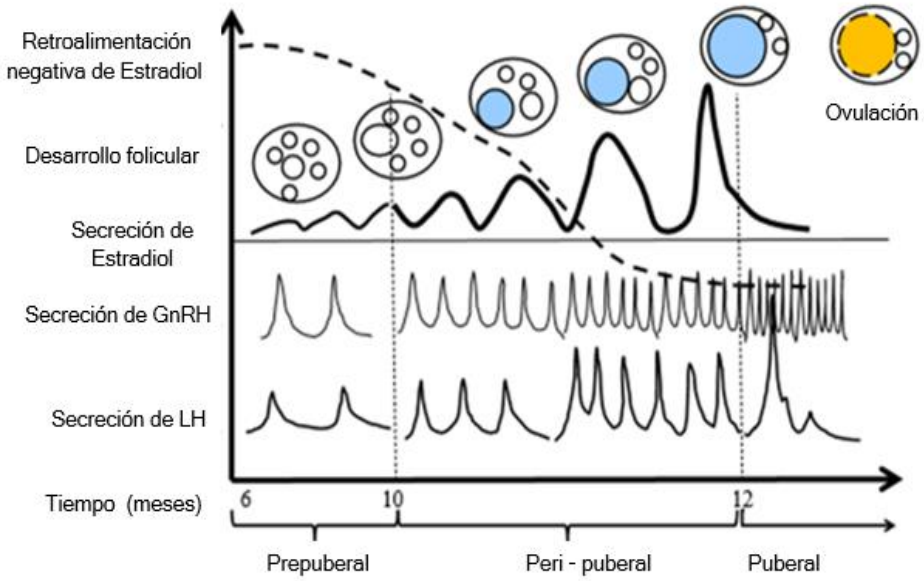

Figura. 1.2. Cambios fisiológicos y endocrinos durante el período peripuberal en hembras. Se producen cambios endocrinos durante el período peri-púber en la pubertad en vaquillas (Day y Anderson, 1998).

El período peripuberal incluye los 50 a 60 días anteriores a la pubertad. La línea discontinua representa la retroalimentación negativa de E_2 sobre la secreción de LH. La secreción de GnRH es altamente sensible al E_2 con retroalimentación negativa durante el período prepuberal. Como el período peripuberal y la consiguiente disminución de la retroalimentación negativa de E_2 comienza, la secreción de GnRH, y por lo tanto LH, aumenta, lo que resulta en un aumento del crecimiento y la secreción de E_2 por los folículos ováricos dominantes. Como resultado de la disminución progresiva de la retroalimentación negativa del E_2 y aumento de la secreción de LH durante el período peripuberal, las

concentraciones de E_2 pueden alcanzar niveles suficientes para inducir el aumento de LH en la pubertad (Day y Anderson, 1998).

En conclusión, la regulación de la secreción de GnRH es crítica para el establecimiento de los ciclos estrales en animales prepúberes. Esta regulación se encuentra mediada por los esteroides de origen ovárico (estradiol y P_4), por la GnRH misma (auto regulación) y otras hormonas como Leptina, IGF-1, GABA, glutamato, neuropéptido-Y, activina, inhibina, y el péptido (Kiss) y su receptor (GPR54) que aparentemente juega un rol importante en la activación de las neuronas de GnRH durante la transición de la pubertad (Clarkson y Herbison, 2006; Ojeda et al., 2010). El consecuente incremento en la secreción de los pulsos la GnRH, es necesaria para liberación de las gonadotropinas a nivel hipofisiario (FSH y LH). A su vez, se tiene poco conocimiento, de los mecanismos neuronales y anatómicos involucrados en la activación de las neuronas secretoras de GnRH, al igual que hallazgos recientes, lo cual sugieren la existencia de otro tipo de neuronas que establecen comunicación con las neuronas secretoras de GnRH (Ojeda et al, 2010).

Pubertad en la hembra bubalina

Existe en la literatura internacional un concepto erróneo de que el búfalo es un animal tardío y de baja eficiencia reproductiva. Debido a algunos autores anglosajones que se basan en estudios realizados en India y en Pakistán, y por ende lo caracterizan como de baja eficiencia reproductiva (Bertaudiere, 1972; Bhattacharya, 1958; Bhattacharya, 1974; McGregor, 1941; Pant y Roy, 1972; Rao y Rao, 1968; Shalash, 1958). Sin embargo, otros autores, discrepan de este atributo, prefiriendo apuntar que el fenómeno por el cual esta especie presenta índices de baja fertilidad con respecto a los bovinos está más bien relacionado con el manejo y/o la selección inadecuada. Es así que existen varias citas

bibliográficas que relatan que la hembra bubalina, en lo que se refiere a edad a la pubertad, es más tardía cuando se la compara con diferentes razas de *Bos Taurus* (Baruselli, 1993; De Franciscis, 1979; Hafez, 1952; Hafez, 1954; Hafez, 1955; Ivanov y Zachariev, 1960; Kaleff, 1942; Vale, 1988; Vale 2000; Vale et al., 1990).

Existen grandes variaciones con relación al momento en que la hembra bubalina llega a la pubertad, en tanto se debe tener en cuenta que no solo está relacionado con factores de manejo y alimentación, sino también al hecho de que existen variaciones entre búfalos.

Como se mencionó anteriormente, algunos autores consideran que en búfalos se presentan problemas reproductivos inherentes, como ser, pubertad retrasada, edad tardía en el primer parto, largo período de anestro posparto, largo período entre partos, celo silente asociado a pobre expresión del celo, servicio estacional y tasas bajas en la concepción resultan como limitantes en la productividad de la especie (Terzano et al., 2012).

La llegada a la pubertad puede ser altamente variable, en rangos de 18 a 46 meses (Jainundeen y Hafez, 1993). Según Barile (2005), en condiciones favorables el búfalo de río podría alcanzar la pubertad de 15 a 18 meses y el búfalo de los pantanos entre los 21 a 24 meses de edad.

Factores que influyen en la pubertad y fertilidad

Una etapa biológica como lo es la pubertad está sumamente ligada a una concatenación de eventos que debemos conocer para mejorar la eficiencia reproductiva de esta especie.

Con el fin de considerar el efecto de los factores ambientales sobre técnicas que pueden ser impuestas en los animales para controlar la reproducción, es apropiado dividirlos de la siguiente manera (Vale, 2007):

a) Factores externos que actúan a través de las vías exteroceptivas (conjunto de receptores sensitivos formado por órganos terminales sensitivos especiales distribuidos por la piel y las mucosas que reciben los estímulos de origen exterior y los nervios aferentes que llevan la información sensitiva aferente al sistema nervioso central), los cuales modifican las funciones del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal (fotoperiodo, temperatura, olores, la vista y el ruido);
b) Factores que pueden afectar al organismo (nutrición, enfermedades, cambios climáticos, estacionalidad y clima);
c) La combinación de ambos, además del factor social y el encuentro con el hombre y sus acciones, y como ellos interactúan con las capacidades homeostáticas del organismo que afectan a la reproducción.

Desarrollo y peso corporal

Debemos tener en cuenta que factores genéticos y no genéticos, como ser la nutrición, hormonas, individualidad y otros factores son responsables del crecimiento corporal en los animales. Es así, que la alimentación con alta concentración proteica y/o energética, no sólo va a reducir la edad de madurez sexual, sino que también reduce el período para llegar a la edad al primer parto.

La hormona leptina, tiene un rol en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario (Williams et al., 2002; Zieba et al., 2005), la misma es producida por el tejido adiposo y regulada a largo plazo por el historial (es decir, la condición corporal) y el actual estado nutricional que atraviesen los animales (es decir, la disponibilidad de alimento; Chilliard et al., 2005). En consecuencia, una mínima variación en la CC (es decir, la reserva de grasa

corporal total) influye en el éxito de que ocurra la pubertad y, por ende, toma un rol fundamental a la hora de evaluar en conjunto con el PESO.

Otra variable que se tiene en cuenta, son los efectos nutricionales de las ganancias al predestete, que han tenido un mayor impacto en la edad de la pubertad en comparación que al posdestete (Buskirk et al., 1995; Patterson et al., 1992; Wiltbank et al., 1966), debido a que coincide con el periodo prepuberal del animal que causa un efecto positivo en la regulación del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal para que se establezca la liberación de LH.

Nutrición

Se considera la nutrición como una variable importante por la magnitud del efecto que causan tanto las deficiencias, como los desequilibrios nutricionales, con el fin de mejorar el manejo de los animales en el rodeo (Ferguson y Chalupa, 1987).

Es conocida la infertilidad nutricional en especial en animales mantenidos en condiciones adversas o ambientes desfavorables, como en condiciones climáticas externas de baja disponibilidad y calidad de alimentos. Cuando los trastornos metabólicos afectan el tracto reproductivo, se manifiesta como infertilidad con celos irregulares, repetición de celo y un mayor número de servicios por concepción (Rúgeles, 2001).

La deficiencia nutricional se presenta en estados fisiológicos de gran demanda desde el punto de vista metabólico, como lo son el final de la gestación, el inicio de la lactancia y la etapa de crecimiento, entre el destete y la pubertad en las vaquillas. En consecuencia, el plan nutricional al cual son sometidas las hembras guarda una relación directa con el PESO y la edad de presentación de la pubertad (McClure 1995).

La proteína y energía en las dietas son críticas en la influencia del crecimiento en los bucerros. Los altos niveles en las dietas lo requieren tanto los bucerros como terneros, con la diferencia que estos últimos requieren menos niveles de proteínas (Basra et al., 2003).

Estacionalidad reproductiva

Se puede definir como la respuesta fisiológica de los animales y las plantas a las variaciones de luz y oscuridad.

La relación entre la temporada de reproducción y duración de la gestación es tal, debido a que permite que el parto en una especie particular se lleve a cabo en un momento del año cuando la nutrición y la temperatura son favorables para la supervivencia tanto de la madre como de las crías.

Los cambios estacionales en el fotoperiodo son un determinante importante de la actividad reproductiva, ya que estos cambios han sido, son y serán la señal más precisa que participan en el cambio del comportamiento de los animales. Los animales con reproducción estacional alternan períodos de actividad e inactividad ovárica (anestro) durante el año.

Los búfalos, cuando son criados en regiones distantes de la línea del Ecuador, esto es, en localidades donde existe una mayor variación en la cantidad de luz diaria durante el año, presentan un comportamiento reproductivo influenciado por la disminución de las horas luz del día (Zicarelli, 2016). Debido a esta característica, es observada una mayor concentración de las manifestaciones del celo durante el periodo de otoño (Baruselli, 1992; Danev, 1997; Zicarelli, 1994). Sin embargo, la estacionalidad en la región del Amazonas es casi inexistente debido a la relación constante luz-oscuridad durante todo el año (Zicarelli, 2016).

Es posible que, como las especies originarias son de áreas del norte de Ecuador y en estas regiones la disponibilidad forrajera coincide con los meses de fotoperiodo negativo, se produjo una selección a través de las generaciones (Zicarelli, 2016).

La señal endocrina de la variación luz-oscuridad está representada en búfalos por la melatonina (Parmeggiani et al., 1994; Di Palo y Parmeggiani, 1993) así como en otras especies.

La melatonina es una hormona que se secreta por la glándula pineal durante las horas de oscuridad (Bittman et al., 1983), por lo que existe mayor cantidad de melatonina circulante en los días con más cantidad de horas de oscuridad y menor número de horas luz (días cortos), como los que se presentan en el otoño e invierno. A través de mecanismos que aún no se conocen con precisión, los cambios en el patrón de secreción de melatonina que se producen en las distintas épocas del año afectan la secreción pulsátil de la GnRH, la que a su vez influye en la secreción de las gonadotropinas, necesarias para la secreción preovulatoria de LH para la ovulación.

Además de sus efectos sobre la secreción de hormonas reproductivas, la melatonina actúa sobre la pars tuberalis de la pituitaria para inhibir la secreción de prolactina. Por lo tanto, la secreción de prolactina aumenta en los días largos, como respuesta a la reducción del periodo de secreción de melatonina (Malpaux et al., 1997). En conclusión, el fotoperiodo puede alterar los procesos fisiológicos a largo plazo, en particular la producción y la reproducción.

Genética

La edad de la pubertad es un rasgo poligénico, es decir controlada por muchos genes con efectos muy pequeños pero necesarios para que se lleve a cabo (Fortes et al., 2010; Snelling et al., 2012).

La presencia de una red jerárquica de genes controla la activación central del sistema GnRH, lo cual es perfectamente compatible con el concepto que indica que la pubertad es principalmente regulada por un reloj biológico controlado a nivel genético. Sin embargo, también es bien conocido que la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en la pubertad y su posterior funcionamiento en la edad adulta, es extremadamente sensible a diferentes señales endógenas y ambientales, que interactúan con los genes reguladores centrales para definir con precisión el momento de la pubertad (Parent et al., 2003).

En resumen, si bien existen varios trabajos sobre la caracterización de la pubertad en bubillas realizados en Brasil, a nuestro conocimiento no existen trabajos similares realizados en el NEA de nuestro país. Contar con información sobre el efecto de las GDPPRE, GDPPOS, PESO, y CC sobre el inicio de la pubertad en bubillas del NEA sería una información muy importante para desarrollar medidas de manejo que permitan mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de los rodeos bubalinos del NEA.

OBJETIVOS

- Caracterizar el inicio de la pubertad en bubillas del NEA.
- Evaluar el efecto de las ganancias diarias predestete, posdestete, peso vivo, y condición corporal sobre el inicio de la pubertad en bubillas del NEA.

- Determinar el grado de concordancia entre el diagnóstico del inicio de la pubertad mediante ultrasonografía y mediante mediciones de las concentraciones plasmáticas de P_4 mediante quimioluminiscencia.

HIPÓTESIS

- El inicio de la pubertad en las bubillas del NEA es similar al de los animales originarios en las regiones cercanas a la línea del Ecuador o paralelo 0°.
- Las altas ganancias diarias predestete son un mejor indicador del inicio de pubertad temprana que las altas ganancias diarias posdestete.
- El peso y la condición corporal son variables productivas asociadas a la edad a la pubertad.
- Es posible detectar el inicio de la pubertad existe un grado similar de concordancia entre la ultrasonografía US y las mediciones de concentraciones plasmáticas de P_4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y animales

Se utilizaron hembras de la raza Mediterránea pertenecientes al establecimiento La Candelaria ubicado en la región Noroeste de Corrientes. Dicha región se caracteriza por un clima subtropical húmedo, sin estación seca y con una precipitación pluvial anual de 1200 mm que se distribuye mayoritariamente en primavera y otoño.

Los animales se criaron en un sistema extensivo a campo natural compuesto principalmente por pasto horqueta (*Paspalum notatum*) y paja colorada (*Andropogon lateralis*), que son gramíneas con un ciclo productivo de primavera a otoño. El manejo sanitario incluía la administración periódica de antiparasitarios y vacunas con un plan sanitario similar al usado en los bovinos de la zona. Los animales del establecimiento contaban con el registro de los datos del padre, la fecha de nacimiento, el peso al nacimiento (PN) y el peso al destete (PD).

De un total de 103 bubillas de raza Mediterráneas nacidas y destetadas en los años 2014 y 2015, se seleccionaron al inicio de la temporada reproductiva 76 bubillas mediante palpación rectal con un puntaje de desarrollo genital ≥1 (Andersen, 1988; escala del 1 al 5, 1=inmaduro, sin tono uterino y sin folículos palpables, 5= buen tono uterino y folículos mayores a 10 mm y posible CL) y un peso ≥200 kg. Posteriormente se excluyeron 4 bubillas por no poseer los registros requeridos para ingresar al estudio. El resto de las bubillas (n=72; año 2014, n=40; año 2015, n=32) fueron seguidas durante un periodo de 5 a 6 meses.

Caracterización del inicio de la pubertad

Al grupo de bubillas seleccionadas al inicio de la temporada reproductiva (n=72) se las incluyó en un protocolo de muestreo cada 14±5 días. En cada muestreo se evaluó mediante ultrasonografía (US) de los ovarios, la presencia de folículos y CL (Pie Medical 485, Maastricht, Holanda) y se realizaron mapas con la población de dichas estructuras para caracterizar el inicio de la pubertad. Además, se registraron los datos de peso corporal (PESO; kg) y la condición corporal (CC; André Mendes ,2013; escala de 1=muy flaca a 5=muy obesa). Al finalizar el periodo de estudio, utilizando el PN, PD, y el registro de

pesadas, se calcularon las ganancias diarias predestete (GDPPRE), y las ganancias diarias posdestete (GDPPOS), hasta el evento pubertad.

Por último, se recolectaban muestras de sangre por punción en vena yugular para realizar el dosaje de P_4 cada 14±5 días. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero obtenido fue almacenado a -20º C hasta el momento de su procesamiento mediante el método de quimioluminiscencia (Progesterone II, inmunoanalizador Elecsys and Cobase.Roche®, Mannheim, Alemania). Se consideró que una bubilla había alcanzado la pubertad cuando por primera vez las concentraciones de P_4 resultaron ≥1ng/ml (Terzano et al., 2007).

A todas las bubillas se les registró los días a los cuales se alcanzó la pubertad (EPDIAS) y se clasificaron en cuartiles de acuerdo con el intervalo entre el nacimiento y el inicio de la pubertad (INP). Las bubillas del cuartil 1 (25% de la población) fueron designadas como precoces (PRE), las bubillas del cuartil 2 y 3 (50% de la población) fueron definidas como medias (MED) y las bubillas del cuartil 4 (25% de la población) fueron designadas como tardías (TAR). También se registraron los días transcurridos desde el inicio de la temporada reproductiva (1 de febrero) hasta el desarrollo de la pubertad (EPEST).

Las bubillas fueron clasificadas según las categorías de parición (CP) como cabeza de parición (CP1; parición temprana, mes de enero), cuerpo de parición (CP2, parición intermedia, mes de febrero) y cola de parición (CP3; parición tardía, meses de marzo a abril; Zava, 2005).

Análisis estadístico

Las variables de respuesta EPDIAS y EPEST, INP, PN, PD, GDPPRE y GDPPOS, PESO y CC a la pubertad fueron analizadas mediante el Procedimiento UNIVARIATE de SAS 6.0 (SAS, 1990) para examinar su distribución, normalidad, y realizar la búsqueda de

valores extremos. Luego estas mismas variables respuesta fueron analizadas mediante ANOVA utilizando el Procedimiento GLM de SAS (SAS, 1990) y año como variable independiente/explicatoria. La variabilidad del intervalo a la pubertad fue analizada por regresión logística utilizando el modelo de los riesgos proporcionales de COX mediante el Procedimiento PHREG de SAS (SAS, 1990). El modelo utilizado tuvo en cuenta, las variables de respuestas EPDIAS y EPEST, y las variables explicativas GDPPOS, PESO, AÑO y CP. Solo uno de los predictores del PESO fue incluido en cada modelo y además se incluyó la interacción entre los predictores de peso y la CP. La selección de los indicadores de peso a incluir en el modelo se realizó a partir de la estimación de los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables EPEST (días), EPDIAS (días), GDPPRE (kg/d), GDPPOS (kg/d) y PESO (kg), seleccionándose en base a la significancia estadística utilizando el Procedimiento CORR de SAS 6.0 (SAS, 1990).

El análisis de sensibilidad y especificidad de US para detectar los CL comparado con el dosaje de P_4 se realizó en base a la variable cualitativa SI/NO para la presencia del CL por el método de US y a la variable cuantitativa en base al dosaje de P_4 expresada en ng/ml (Dohoo et al., 2003).

RESULTADOS

Edad, peso y condición corporal a la pubertad

El inicio de la pubertad en las bubillas nacidas en 2014 fue 52 días más temprano que en las bubillas nacidas en 2015. En promedio, las bubillas nacidas en el 2014 alcanzaron la pubertad a los 419,20±10,25 días de edad comparado con las bubillas nacidas en 2015 que

alcanzaron la pubertad a los 471,62±13,69 días de edad (P<0,01; Figura 1.3). En el año 2015, hubo un 25% más de bubillas que alcanzaron la pubertad que en el año 2016 (P<0,05). En el año 2015, el 75% (30/40) de las bubillas alcanzó la pubertad mientras que en el año 2016 solo el 50% (16/32) alcanzó la pubertad.

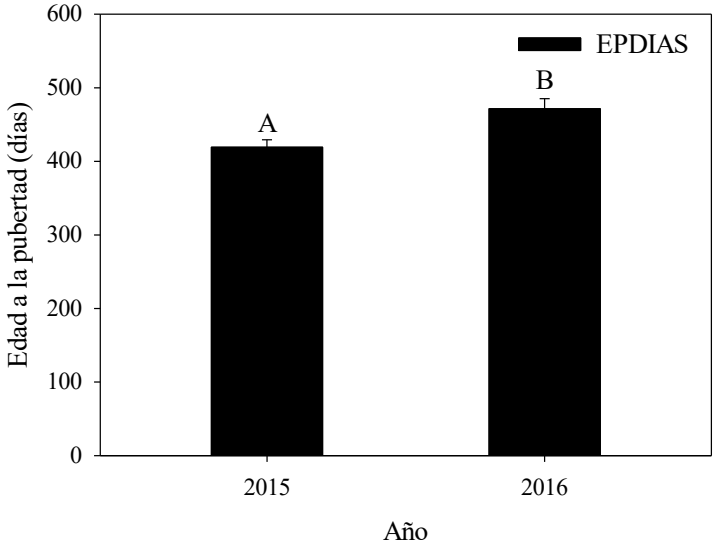

Figura 1.3. Edad a la pubertad en días por año en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE; P<0,01).

El peso y la CC a la pubertad también estuvieron influenciados por el año (P<0,04 y P<0,06 respectivamente). Las bubillas nacidas en 2014 pesaron 24 kg más y tuvieron 0,50 puntos más de CC a la pubertad que las nacidas en 2015 (P<0,04, Figura 1.4; P<0,06, Figura 1.5).

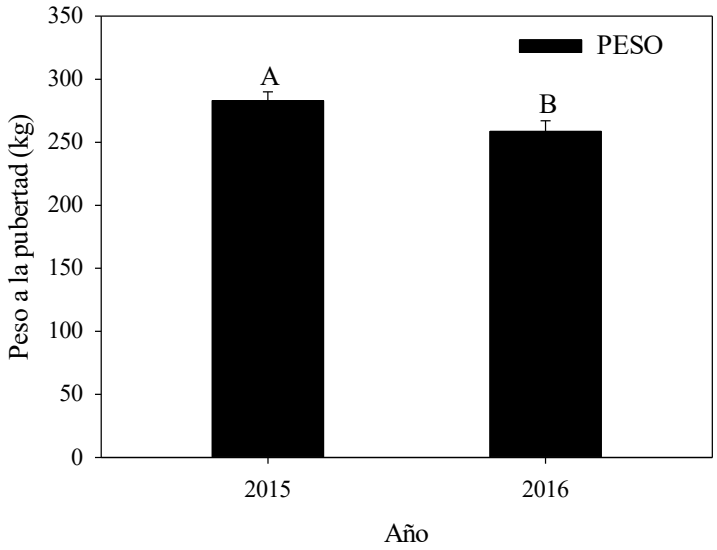

Figura 1.4. Peso a la pubertad en kg por año en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE; P<0,05).

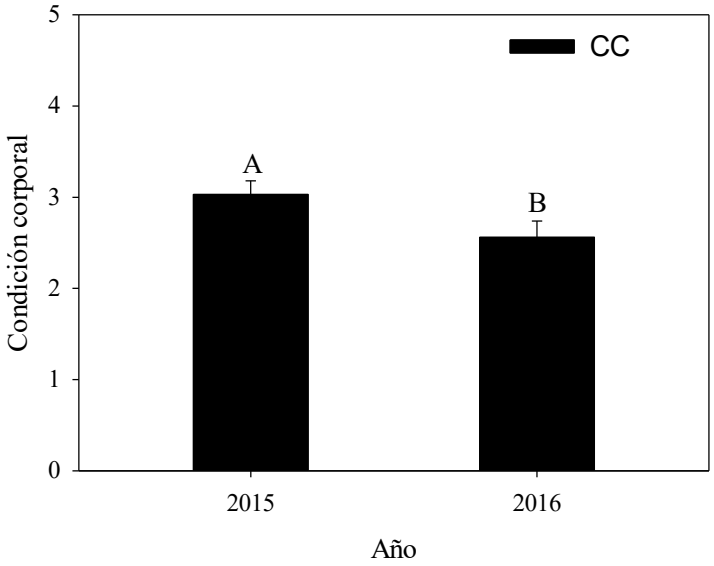

Figura 1.5. Condición corporal a la pubertad por año en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE; P<0,05).

Cuando se observan los resultados de PESO a la pubertad y CC luego de estratificar por cuartiles de edad de pubertad, se puede observar que las bubillas precoces (25% cuartil superior) tuvieron un peso inferior que las bubillas tardías (25% cuartil inferior; P<0,05;

Tabla 1.1). La edad a la pubertad fue diferente entre los grupos PRE, MED, y TAR (p<0,001), Sin embargo, al evaluar la CC no hubo diferencias significativas entre los tres grupos (p>0,88; Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Edad a la pubertad en días (EPDIAS, días), peso (PESO, kg) y condición corporal (CC) al inicio de la pubertad en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE).

	EPDIAS	PESO	CC
PRE (25%; precoz), n=13	368±6,6^{A}	256±10,2^{D}	2,9±0,2
MED (50%; media), n=20	432±5,3^{B}	275±8,2	2,8±0,2
TAR (25%; tardía), n=13	515±6,6^{C}	292±10,2^{E}	2,9±0,2

A, B y C difieren (p≤0,001).
D y E difieren (p≤0,05).

Peso al nacimiento, al destete, ganancias diarias predestete y posdestete en bubillas púberes

El PN, el PD y la GDPPRE fueron similares entre las bubillas nacidas en los años 2014 y 2015 (36,70±0,79 vs. 37,18±0,94 kg, p>0,70; 230,73±5,18 vs. 226,12±6,84 kg, p>0,59; 0,763±0,03 vs. 0,792±0,02 kg, p>0,62). Por el contrario, las GDPPOS fueron 0,102 kg superiores para las bubillas nacidas en el año 2014 que para las nacidas en el año 2015 (p<0,05). Mientras que las bubillas nacidas en el año 2014 tuvieron una GDPPOS de 0,280±0,03 kg, las bubillas nacidas en el año 2015 tuvieron una GDPPOS de 0,178±0,02 kg (P<0,05; Figura 1.6).

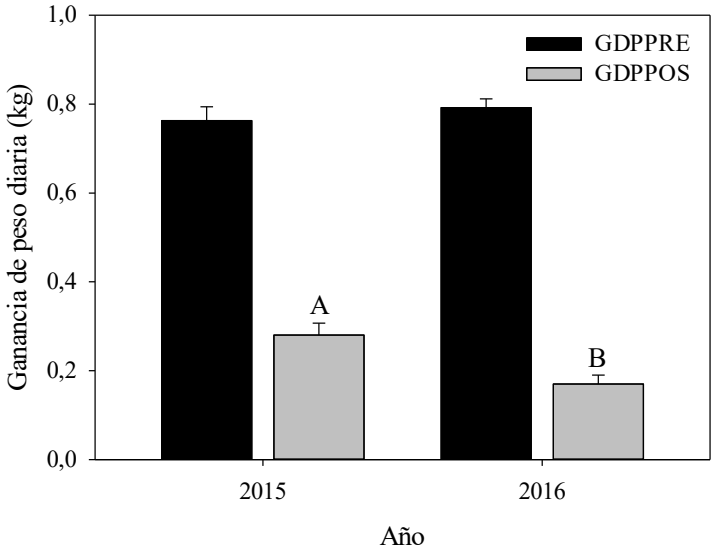

Figura 1.6. Ganancias diarias predestete (GDPPRE, kg/d) y posdestete (GDPPOS, kg/d) por año Mediterráneas del NEA (CMM ± EE; P<0,05).

Cuando se observan los resultados de PD luego de estratificar por cuartiles de edad de pubertad, se puede observar que las bubillas precoces (25% cuartil superior) tuvieron un PD inferior que las bubillas tardías (25% cuartil inferior; P<0,05; Tabla 1.2). Por el contrario, las GDPPRE y GDPPOS fueron similares entre las bubillas del grupo precoz, las bubillas del grupo medio y las del grupo tardío (P>0,56 y 0,76; Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Peso al nacimiento (PN, kg), peso al destete (PD, kg), ganancia de peso predestete (GDPPRE, kg/d) y ganancia de peso posdestete (GDPPOS, kg/d) en bubillas Mediterráneas del NEA (CMM ± EE).

	PN	PD	GDPPRE	GDPPOST
PRE (25%; precoz), n=13	36,0±1,0	218,7±7,8^{A}	0,803±0,02	0,250±0,02
MED (50%; media), n=20	37,2±1,0	226,0±6,3	0,743±0,05	0,259±0,05
TAR (25%; tardía), n=13	37,2±0,9	244,4±5,9^{B}	0,789±0,02	0,215±0,03

A y B difieren (p≤0,05).

Correlación y selección de variables predictoras de la edad a la pubertad.

Los resultados de la correlación entre EPDIAS (días), EPEST (días), GDPPRE (kg), GDPPOS (kg) y PESO (kg) se presentan en la Tabla 1.3. Se encontró una correlación positiva

entre el PESO a la pubertad y EPDIAS a la pubertad (r=0,38, P<0,01); entre PESO a la pubertad y GDPPOS (r=0,43, P<0,02); y entre PESO a la pubertad y EPEST a la pubertad (r=0,82, P<0,01). Además, se encontró una correlación negativa entre EPEST y GDPPOS (r=-0,30, P<0,04). Por último, no se encontró correlación alguna entre; GDPPRE y EPDIAS, GDPPOS y EPDIAS (P>0,43; P>0,41); GDPPRE y EPEST, PESO y EPEST (P>0,42, P>0,53); GDPPRE y GPDPOS (P>0,23); y entre GDPPRE y PESO (P>0,46).

Tabla 1.3. Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables edad a la pubertad (EPDIAS, días), edad a la pubertad desde el inicio de la estación reproductiva (EPEST, días), ganancia diaria de peso predestete (GDPPRE, kg/d), ganancia diaria de peso posdestete (GDPPOS, kg/d) y peso a la pubertad (PESO, kg).

	EPDIAS	EPEST	GDPPRE	GDPPOS	PESO
EPDIAS	1				
EPEST	0,82343*	1			
GDPPRE	-0,11855	0,11935	1		
GDPPOS	-0,12225	-0,30032*	-0,18067	1	
PESO	0,38971*	0,09338	0,11004	0,43362*	1

*(P<0,05).

Análisis de Riesgos proporcionales de Cox para alcanzar la pubertad

Los resultados del análisis de riesgo del tiempo en días (EPDIAS) en que las bubillas alcanzan la pubertad considerando el año en que se realizó el experimento, la CP y la GDPPOS se presentan en la Tabla 1.4. Las bubillas del año 2015 tuvieron 2,3 veces más chances de alcanzar antes a la pubertad que las bubillas del año 2016 (Estimador [EST]: 2,3; Intervalo de Confianza del 95% [IC95%]: 1,3-3,8; P<0,05). Las bubillas de la CP2 y CP3 tuvieron 2,3 y 6,5 veces más chances de alcanzar la pubertad asumiendo que tuvieron una GDPPOS de 0,244 kg/d (EST 2,3; IC95% 2,1-2,5; P<0,05; EST 6,5; IC95% 3,6-11,8;

P<0,05). Por cada aumento de 0,17 kg sobre la media de GDPPOS (0,244 kg/d), las chances de pubertad aumentaron un 12%, 30% y 94% para las CP1, CP2 y CP3 respectivamente.

Los resultados del análisis de riesgo del tiempo en días desde el inicio EPEST en que las bubillas alcanzan la pubertad considerando el año en que se realizó el experimento, la CP y la ganancia diaria de peso posdestete se presentan en la Tabla 1.5. Las bubillas del año 2015 tuvieron 3,5 veces más chances de alcanzar la pubertad que las bubillas del año 2016 (EST 3,5; IC95% 1,4-8,6; P<0,05). Por cada aumento de 0,17 kg sobre la media de GDPPOS (0,244 kg/d), las chances de pubertad aumentaron un 24% para las CP1.

Los resultados del análisis de riesgo del tiempo en días (EPDIAS) en que las bubillas alcanzan la pubertad considerando el año en que se realizó el experimento, la categoría de parición y el peso alcanzado a la pubertad se presentan en la Tabla 1.6. Las bubillas del año 2015 tuvieron 6,8 veces más chances de alcanzar la pubertad que las bubillas del año 2016 (EST 6,8; IC95% 3,4-13,6; P<0,05). Las bubillas de la CP2 y CP3 tuvieron 2,6 y 3,2 veces más chances de alcanzar la pubertad asumiendo que tuvieron un PESO a la pubertad de 274 kg (EST 2,6; IC95% 1,5-4,4; P<0,05; EST 3,2; IC95% 1,5-6,7; P<0,05).

Tabla 1.4. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y ganancia diaria peso posdestete (GDPPOS).

Variables	Estimador	Intervalo de confianza del 95%	
Año 2015 vs. 2016	2,307*	1,367	3,895
CP2 vs. CP1	2,353*	2,172	2,550
CP3 vs. CP1	6,526*	3,608	11,805
GDPPOS por CP1	1,128	0,757	1,679
GDPPOS por CP2	1,304	0,475	3,581
GDPPOS por CP3	1,943*	1,161	3,251

Bubillas púberes (n=46); *P<0,05.
Variable de respuesta: EPDIAS; Variables explicativas: AÑO, CP y GDPPOS;
GDPPOS (media=0,244, Unidad D.E.= 0,17 kg/d).

Tabla 1.5. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPEST), en función de año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y ganancia diaria peso posdestete (GDPPOS).

Variables	Estimador	Intervalo de confianza del 95%	
Año 2015 vs. 2016	3,49*	1,409	8,647
CP2 vs. CP1	1,162	0,907	1,489
CP3 vs. CP1	0,994	0,690	1,433
GDPPOS por CP1	1,249*	1,019	1,531
GDPPOS por CP2	1,756	0,528	5,839
GDPPOS por CP3	1,230	0,719	2,105

Bubillas púberes (n=46); *P<0,05.
Variable de respuesta: EPEST; Variables explicativas: AÑO, CP y GDPPOS;
GDPPOS (media=0,244, Unidad D.E.= 0,17 kg/d).

Los resultados del análisis de riesgo del tiempo en días de la estación (EPEST) en que las bubillas alcanzan la pubertad considerando el año en que se realizó el experimento, la categoría de parición y el peso alcanzado a la pubertad se presentan en la Tabla 1.7. Las bubillas del año 2015 tuvieron 7,2 veces más chances de alcanzar la pubertad que las bubillas del año 2016 (EST 7,2; IC95% 2,5-20,0; P<0,05).

Tabla 1.6. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función del año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y peso (PESO).

Variables	Estimador	95% Intervalo de confianza	
Año 2015 vs. 2016	6,820*	3,412	13,629
CP2 vs. CP1	2,620*	1,549	4,430
CP3 vs. CP1	3,228*	1,533	6,796
PESO por CP1	0,511	0,322	0,810
PESO por CP2	0,381	0,291	0,499
PESO por CP3	0,334	0,203	0,548

Bubillas púberes (n=46); *P<0,05.
Variable de respuesta: EPDIAS; Variables explicativas: AÑO, CP y PESO;
PESO= (media=274,4, Unidad D.E.= 39 kg/d).

Tabla 1.7. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPEST), en función del año de experimentación (AÑO), categoría de parición (CP) y peso (PESO).

Variables	Estimador	95% Intervalo de confianza	
Año 2015 vs. 2016	7,215*	2,598	20,037
CP2 vs. CP1	1,062	0,732	1,540
CP3 vs. CP1	0,496	0,355	0,693
PESO por CP1	0,724	0,492	1,066
PESO por CP2	0,466	0,343	0,632
PESO por CP3	0,449	0,262	0,767

Bubillas púberes (n=46); *P<0,05.
Variable de respuesta: EPEST; Variables explicativas: AÑO, CP y PESO;
PESO = (media=274,4, Unidad D.E.= 39 kg/d).

Sensibilidad y especificidad de la US para el diagnóstico de pubertad

El diagnóstico de pubertad mediante la identificación de un CL a la imagen ecográfica posee una sensibilidad del 15% y una especificidad del 100%. Esto fue comparado con las muestras que presentaron ≥1 ng/ml de P_4 producido por un CL funcional mediante quimioluminiscencia (Tabla 1.8).

Tabla 1.8**.** Relación entre el diagnóstico positivo (presencia) y negativo (ausencia) de CL mediante US y el diagnóstico positivo (≥1 ng/ml) y negativo (<1 ng/ml) de P4 mediante quimioluminiscencia.

		Progesterona		
		Positivo (≥1 ng/ml)	Negativo (<1 ng/ml)	Total
Ultrasonografía	Positivo (presencia)	25	0	25
	Negativo (ausencia)	136	122	258
	Total	161	122	283

DISCUSIÓN

La edad a la pubertad es un carácter reproductivo influenciado por varios factores, como ser el ambiente, sistema de cría, raza, genética, etc. Por lo tanto, la misma se cita entre rangos, que van desde los 14,2 a los 21,9 meses como mínimo (Damé y Pimentel, 1994; Vale, 2000; Sousa et al. 1999; Borghese et al. 1994a), hasta 32,5 a 45,5 meses como máximo (Naqvi y Shami, 1999; NDRI, Annual Report, 1995-1996; Sule et al., 2001). Trabajos evaluados en condiciones como las del trópico amazónico húmedo y sistemas semi-extensivo alcanzan la pubertad a los 12 meses (Vale, 2000), similares a los nuestro y menores con respecto a Terzano et al. (2007) y Sabia et al. (2014), donde el inicio de la pubertad fue en promedio entre los 20 y 22 meses tanto para sistemas intensivos y extensivos.

Otra forma de descripción de pubertad en forma práctica en los campos es la determinación del peso corporal. Las hembras alcanzan la pubertad cuando poseen el 60% de su peso adulto, entre los 250 a 400 kg (Jainudeen y Hafez, 1993; Freetly et al., 2011). Sin embargo, claro está que esta variable se ve afectada de acuerdo con los sistemas, ambientes, manejo y por otro lado a factores intrínsecos (Taylor et al., 1971). Prajapati y Laxmi (2015), obtuvieron bubillas púberes Murrah a los 26,6±0,47 meses y 313,8±7,6 kg de peso a la pubertad, donde la ingesta y los metabolitos Nefastin-1 y Leptina influenciaron en forma significativa la llegada a la pubertad. Roa et al. (2010), consideran que el inicio de la pubertad está regulado por las reservas de energía y es sensible a las diferentes señales metabólicas que se produce en el animal. En este trabajo es coincidente el momento de la llegada de la pubertad con la fase de crecimiento acelerado de los animales (Sánchez Chopa, 2016), esto

se refleja en la variabilidad de los pesos y, por ende, las bubillas más precoces resulten ser las más livianas.

García et al., (2003), evaluó la media de concentraciones séricas de leptina y encontró aumentos a medida que se alcanzaba la pubertad conservando un adecuado porcentaje de grasa de cobertura (Garcia et al., 2002). Este resultado, nos orienta a pensar que las hembras para alcanzar la pubertad deberían tener una CC promedio óptima independientemente del peso vivo. En las búfalas con un CC <2,5 se presentaron problemas observó retraso en la ovulación posparto, signos de estro débil y mayor número de servicios por concepción (Vale, 2007). En un trabajo reciente efectuado en Corrientes reportaron que con una CC de 3,5 al servicio se obtuvo una preñez del 86%, por lo que se podría considerar como un valor óptimo (Sampedro y Crudeli, 2016). En el mismo estudio, las búfalas con CC≥3 tuvieron mayor porcentaje preñez con respecto a las de CC <3 (53,5% vs. 44,4 %). Si bien nuestros resultados no fueron significativos las mismas se encontraban en una CC óptima.

De acuerdo con los resultados CP y GDPPOS obtenidos en nuestro experimento, los animales paridos en el segundo (CP2) y último tercio de la temporada de partos (CP3) tuvieron más chances de entrar antes a la pubertad que los paridos en el primer tercio, por una parte, supondríamos que fue más corto el tiempo de exposición al fotoperiodo, desde el destete hasta el inicio de la temporada reproductiva. Sin embargo, los resultados se invertían al evaluarse dentro de la temporada reproductiva, aumentando las posibilidades para las bubillas del primer tercio de parición (CP1). En general, las posibilidades de tener una pubertad precoz se dan a medida que aumenta la GDPPOS (Pereira et al., 2017). Resultados similares han sido reportados por Capellari et al., (2018), donde los bucerros nacidos en los dos últimos meses de parición lograron una velocidad de crecimiento superior, coincidente con el inicio de la curva de crecimiento.

En este trabajo se ha rechazado la hipótesis planteada, con respecto al mayor impacto que tiene sobre la pubertad los efectos nutricionales durante el período predestete (Patterson et al., 1992; Wiltbank et al., 1985; Buskirk et al., 1995), en donde se produce una mayor secreción de LH, aumento del desarrollo de folículos ováricos, y disminución de la retroalimentación negativa que ejerce el estrógeno sobre la secreción de LH (Gasser et al., 2006 a, b, c). La ganancia de peso durante la recría y el peso al inicio del servicio son claves fundamentales para lograr la preñez (Frick et al., 2003; Flores et al., 2014), con ganancias diarias entre los 700 a 800 g/día (Flores et al., 2016). Terzano et al. (1996), indican que es posible criar bubillas a pasto y obtener el mismo rendimiento de aquellos criados con alimentación intensiva/confinamiento siempre que la ganancia diaria sea de aproximadamente 600 g/día. Coincidiendo con Bonamy (2018), donde las vaquillas bovinas con ganancias predestete superior a 0,75 kg/d o superior a 0,65 kg/d durante la recría alcanzaron la pubertad antes del servicio. La disminución abrupta de ganancia de peso desde la etapa del predestete al posdestete, ha sido uno de los factores negativos que influyó indirectamente (Monteiro et al., 2013). Borghese et al. (1994b), demostraron el hecho de que las hembras que ganaban 631 g/día llegaron a la pubertad a los 598 días, mientras que con una ganancia diaria de 441 g/día posponían la pubertad para 658 días, y esto se condice con nuestros resultados en donde las condiciones ambientales y la disponibilidad de pasto en los distintos años afectó las ganancias diarias y se reflejó en la edad a la pubertad de los animales (419 vs 517 días).

La especie bubalina está creciendo en nuestra zona, del mismo modo sucede con el conocimiento que se va generando. La nutrición es fundamental para el desarrollo reproductivo y productivo, ninguno está por encima del otro, en este trabajo lo correcto

hubiera sido evaluar el pastoreo, calidad y cantidad de forraje consumido por los animales, para confirmar las hipótesis.

El análisis del diagnóstico de pubertad por US resultó ser de baja sensibilidad y alta especificidad. De acuerdo con la bibliografía, los ovarios en los búfalos son típicamente más pequeños que en el bovino (Vittoria, 1997) y tienen menos folículos en cada onda folicular (Gimenes et al., 2009). El aparato genital femenino en la búfala es más difícil evaluar mediante palpación rectal, debido al menor tamaño del mesovario y del mesosasalpix (Adaptado de Luktuke y Rao, 1962; Vale et al., 1982; Dobson y Kamonpatana, 1986; Perera et al., 1987; Danell, 1987; Vale y col., 1990; Baruselli et al. 2000; Vale y Ribeiro, 2005). Los ovarios y el CL de las hembras madura de búfalo de agua (El-Wishy, 2007) son más pequeños (El-Sheikh et al., 1967; Ghosh y Mondal, 2006) que en los bovinos (Roy y Mullick, 1964). Por lo tanto, según Mondal y Prakash (2004), ellos explican que el menor tamaño, podría en parte, explicar la secreción reducida de P_4 y una menor concentración en la circulación de esta con respecto al bovino. Además, el parénquima tiende a tener un color gris claro en lugar del color naranja típico de los bovinos, debido a las cantidades reducidas de β-carotenos en sus tejidos (Ghosh y Mondal, 2006).

Se ha citado en un trabajo realizado por Assey et al., (1993), que existe una correlación entre el tamaño CL y la P_4 en vaquillas. Kaneko y Takagi (2014), reportan que la probabilidad de estimar incorrectamente P_4 como ≥ 1 ng /ml cuando el área CL es menor que 1,3 cm2, era de 1,5%, y la probabilidad de estimar incorrectamente P_4 como <1 ng / ml cuando el área CL es de 3,3 cm2 o más, fue del 1,8%, lo cual permitió concluir que un CL no es funcional cuando el área es menor a 1,3 cm2 y si lo es cuando supera 3,3 cm2 o más. Estos resultados se relacionan a lo reportado por Baldrighi (2013), donde obtuvo CL de menor tamaño en bubillas como así también disminución en la P_4 circulante, detectando baja ecogenicidad a la

US, poca protuberancia en el ovario, con diámetro reducido y de difícil delimitación presentando fallas en la detección de celo. El CL en búfalas hace que su detección por palpación rectal ocurra en apenas el 50% de las veces y que el tamaño también influye en la producción de P_4 en el ciclo (Perera et al., 1987). Suponemos que nuestros resultados han sido bajos en coincidencia con los autores mencionados, y en esta categoría ha resultado eficiente el método que se basa en las mediciones circulantes de P_4.

CONCLUSIONES

Las bubillas nacidas en el año 2014 fueron más precoces que las del 2015, sin embargo, ambos rodeos alcanzaron la pubertad a los 15 meses promedio siendo semejantes a los animales cercanos a la línea del Ecuador en condiciones de cría extensivas.

La CC y el peso fueron mayores en las bubillas nacidas en 2014 comparadas con el 2015. Sin embargo, al evaluarse las ganancias diarias, se concluyó que el posdestete fue un mejor indicador en ambos años, a pesar de que fueron dispares. Las evaluaciones mediante análisis de riesgos permitieron entender como el efecto ambiente influyó indirectamente sobre los animales al momento de ser evaluados, siendo el año 2015 mejor que el 2016. Además, permitieron concluir que los animales por cada aumento de 0,17 kg sobre la media de GDPPOS (0,244 kg/d), aumentaron las chances de pubertad en un 12%, 30% y 94% de acuerdo con la distribución de parición en el trimestre. Se presume que la disponibilidad forrajera debió ser ineficiente en cantidad y calidad en ambos años para la recría de las bubillas, sin embargo, los resultados han sido satisfactorios con un 64% de hembras a la pubertad en ambos años.

En este trabajo no se presentó grado de concordancia entre la US y los niveles de P_4 plasmática, siendo de baja sensibilidad y alta especificidad. Motivo por el cual deberían realizarse más investigaciones con respecto al tamaño del CL, la producción de P_4 y el estudio de la dinámica folicular en la categoría de Bubillas.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS EN LA PRECOCIDAD SEXUAL EN BUBILLAS DEL NORDESTE ARGENTINO.

INTRODUCCIÓN

Situación actual del país de acuerdo con las nuevas tecnologías.

La tecnología ganadera en nuestro país presenta dos facetas. Por un lado, se encuentra una deficitaria adopción de las tecnologías disponible, influenciadas por falta de capacitación y la necesidad de financiamiento. Por otro lado, las nuevas tecnologías en desarrollo, que pueden generar una tensión que aumente aún más la brecha tecnológica; sin embargo, son el camino para lograr una ganadería competitiva en el mundo (Feldkamp, 2017).

Uno de los aspectos de mayor avance en los últimos años es el mejoramiento genético de la mano de la genómica, la disciplina de la genética que estudia el ADN permitió acortar los tiempos necesarios para realizar las evaluaciones y aumentar la velocidad de progreso genético, que estima la diferencia alcanzada entre los promedios genéticos de una generación de animales respecto de los padres (Cantet, 2014). Se esperan que estos cambios se produzcan tanto en la metodología de evaluación de los animales como en la capacidad para diseminar los superiores. Actualmente, por ejemplo, si se incorpora un carácter como la eficiencia de conversión del alimento, mediante las nuevas tecnologías nos permitirá conocer si un animal es más pesado a cierta edad se debe a que come más o a que es efectivamente más eficiente. A través de la genómica sería posible detectar en el futuro animales más eficientes a muy

temprana edad, sin necesidad de pasar por las costosas instancias de evaluación (Feldkamp, 2017).

Las limitaciones que permanecen y se establecen en el sector ganadero, no solamente son un problema en nuestro país, sino que ocurren a nivel mundial. Por ejemplo, los consumidores exigen cada vez más cualidades particulares en sus alimentos, como ser una determinada composición de grasas al menor precio posible en la carne. Para el productor, la utilización inadecuada de algunos métodos de selección provocó un resultado negativo en la disminución de la fertilidad (por ejemplo, en ganado lechero y pollos de engorde), lo cual amenazaba la viabilidad de producción. Los productores lecheros se enfrentan al aumento de cojera en sus rebaños, mientras que los criadores de aves de corral deben hacer frente a las aves que tienen huesos frágiles. A partir de estos acontecimientos, surge el problema de la selección inadvertida de defectos genéticos ligados con los deseables, lo cual genera un riesgo potencial durante la selección, debido a que alelos de un gen particular puede ser beneficioso para un carácter, pero tiene efectos negativos en otro.

En la era pre-genómica se podía predecir que un animal recibía la mitad de los genes de su padre y la mitad del genoma de su madre, un cuarto del genoma de cada abuelo, un octavo de cada bisabuelo, y así sucesivamente. Actualmente, las metodologías de selección genómica utilizan sesenta mil marcadores (sobre 35.000 millones de posiciones potenciales en el genoma) para identificar nuevos patrones sumando a la información sobre el parentesco de los animales. Actualmente podemos inferir que, si bien por el padre recibirá 50% de sus genes, no necesariamente recibirá 25% del abuelo paterno y 25% de la abuela paterna, sino quizás 20 y 30% respectivamente, o 27 y 23%, por ejemplificar. De otro modo, conociendo el proceso de transmisión genética de manera precisa entre nietos y abuelos, podemos comprender mejor a cuál de nuestros hermanos nos parecemos más y usar mejor la

información fenotípica de los individuos que teóricamente comparten la misma relación de parentesco de pedigree. Así surgen las relaciones de parentesco genómicas que son más precisas para establecer qué fracción del genoma comparten dos animales cualesquiera, mostrando así un proceso real de trasferencia de la herencia entre distintas generaciones (Cantet, 2016).

Por lo tanto, en un futuro no muy lejano será posible evaluar el genotipo de los animales al nacer. A los animales detectados como superiores en los caracteres deseados (por ejemplo: eficiencia de conversión, calidad de carne, conformación), se les extraerá semen y óvulos antes de la pubertad y se generarán embriones por fertilización in vitro que luego serán transferidos a vacas receptoras. Esto permitiría una reducción enorme en los tiempos entre generaciones y una gran aceleración del mejoramiento genético (Feldkamp, 2017).

La genómica y el búfalo

El progreso en la ciencia depende de nuevas técnicas, nuevos descubrimientos y nuevas ideas, probablemente en ese orden (Brenner, 2002). Hace ocho años cuando se comenzó con la genómica, la caja negra dejó de ser un interrogante en muchos aspectos. Hoy en día, la mayoría de las especies domésticas tienen su genoma secuenciado y los métodos de genotipifación mediante los paneles masivos de SNPs han ido evolucionando a la par. Tradicionalmente los programas de mejoramiento evalúan el desempeño de un gran número de animales simultáneamente y reportan estimaciones del mérito genético, las denominadas DEPs, basadas exclusivamente en la colecta de información fenotípica y genealógica en la población. Sin embargo, el desarrollo de plataformas de genotipado ha permitido incorporar información proveniente de un número grande de marcadores moleculares del tipo SNP dispersos a lo largo del genoma. Esto ha abierto la posibilidad de explorar un nuevo enfoque

para la estimación del mérito genético, combinando información fenotípica, genealógica y genómica, que recibe el nombre de selección genómica.

En el país, el mayor impacto se produjo en la producción lechera, debido a que permite obtener predicciones de mérito genético para caracteres de difícil o costosa medición, pero con una alta implicancia en los sistemas de producción, como la resistencia a enfermedades, propiedades nutracéuticas de la leche o emisión de metano, por citar algunos ejemplos.

Independientemente del tipo de explotación, se debe tener en cuenta que, en el país, gracias a las investigaciones e investigadores hubo un notable avance en el área de la genómica principalmente en la especie bovina. Sin embargo, este desarrollo metodológico no ha sido aplicado apreciablemente en la especie bubalina. El búfalo de agua en nuestro país, constantemente nos da oportunidades para iniciar nuevas líneas de investigación. Es una especie que posee muchas ventajas y sin embargo permanecen subutilizado. En particular, los criadores y los agricultores se han enfrentado a muchos obstáculos, como una pobre eficiencia reproductiva, un potencial de producción subóptimo, mayor incidencia de infertilidad y menores tasas de supervivencia en terneros (Michelizzi et al., 2010). Es por eso, que el inicio del estudio de un carácter reproductivo en base a las informaciones obtenidas en bovinos se transformó en un desafío en el área de la genómica.

En un estudio reciente Williams et al. (2017), reportaron por primera vez el genoma del búfalo. El tamaño de dicho genoma es de 2.8 Gbp y la mayoría de la secuencia ensamblada muestra una buena coincidencia con el genoma de Bos taurus; sin embargo, alrededor del 15% no encuentra similitud con el genoma bovino y sería asumidas como específica del búfalo. Esta vez, el ADN de una hembra Mediterránea hija de dos medios hermanos arrojó la nueva información para el genoma. Este proyecto de secuencia de referencia de calidad se creó con las secuencias de lectura corta Illumina GA y Roche

454/WGS utilizando el ensamblador MaSuRCA. Por lo tanto, éste es el primer reporte de secuencias genómicas del búfalo de río.

Métodos de selección para la producción

La mejora genética implica cambio. Y para que un cambio implique una mejora, los efectos globales del cambio deben aportar beneficios positivos a los propietarios de los animales en cuestión, o a la comunidad donde residen los propietarios. Además, para ser una mejora, los efectos del cambio deben aportar beneficios positivos tanto a corto como a largo plazo, o como mínimo, un beneficio a corto plazo no debe conducir a un perjuicio a largo plazo (Rischkowsky y Pilling, 2007).

En un programa reproductivo se propone conseguir mejora genética como objetivo de cría mediante la selección de los animales que formarán la generación siguiente. El objetivo de cría refleja los caracteres que el ganadero quiere mejorar mediante selección. Está bien establecido que el método de elección para la evaluación genética de los caracteres lineales (p. ej., producción de huevos y leche, tamaño corporal y eficiencia del consumo de pienso) es la mejor predicción lineal no sesgada basada en un modelo animal (BLUP-AM; Simianer, 1994), el cual sólo es óptimo cuando se conocen los parámetros genéticos verdaderos. El uso de modelos animal es el método de elección en la genética cuantitativa, para la búsqueda del mérito genético en los animales.

Sin embargo, cuando hablamos de genética molecular nos basamos en estudios que comprenden la selección génica de caracteres mendelianos (básicamente patologías y defectos genéticos), selección asistida por marcadores e introgresión. Los marcadores genéticos pueden tomar una serie de formas y se definen simplemente como la observación de una variación genéticamente controlable que sigue un patrón de herencia mendeliana

(Williams, 2005). La selección asistida por marcadores, nos permiten evaluar los caracteres de mayor importancia económica en la producción animal. Estos son de naturaleza cuantitativa, y se ven afectados por un gran número de genes (loci), algunos de los cuales tienen efectos mayores, en tanto que la mayoría presenta efectos menores (Le Roy et al., 1990; Andersson et al., 1994). Los genes que controlan caracteres particulares se mapean mediante el uso de marcadores, los cuales ayudan a rastrear la herencia de las regiones cromosómicas en familias en las que el carácter de importancia está segregando, y a su vez este se correlaciona con la información que obtenemos a través de las mediciones fenotípicas de los individuos. Por lo tanto, esto permitirá identificar los genes que controlan el carácter de importancia y establecer el punto de partida (Williams, 2005).

En la práctica, esto se hace a través de un mapeo genético que nos ayuda a localizar la región QTL (del inglés *quantitative trait locus*, locus de un carácter cuantitativo) en un cromosoma y los genes candidatos. Por lo tanto, aunque los marcadores vinculados a QTL pueden usarse para la selección asistida por marcadores, se han identificado los genes subyacentes que controlan la variación, lo que proporciona marcadores más potentes (Williams, 2005).

Un tipo de marcador genético utilizado en selección es el SNP (del inglés *single nucleotide polymorphism,* polimorfismo de un nucleótido único). Este representa un sitio del genoma en el cual los miembros individuales de una especie difieren en un solo par de bases. El estudio de las asociaciones en todo el genoma utilizando SNPs puede ubicar con éxito genes que participan en enfermedades complejas, características reproductivas, características en producción deseables y no deseables, etc., causado por múltiples factores genéticos y ambientales.

Si bien es posible utilizar la plataforma de tipificación de SNPs de bovinos en los búfalos, los resultados obtenidos indican que las secuencias del genoma se conservan entre las especies, pero no necesariamente los polimorfismos (Camargo et al., 2015). Actualmente, existe un chip de SNPs de Affimetrix (Axiom Buffalo Genotyping Array) que proporciona una adecuada cobertura genómica en múltiples especies y razas del búfalo de agua y pantano *(Bubalus bubalis bubalis* y *Bubalus bubalis carabanensis)*, los más utilizados para la producción de carne y lácteos en Italia, Brasil y el sur de Asia. El mismo contiene 90.000 marcadores seleccionados a partir del proyecto de secuenciación del búfalo de agua (Ianmartino et al., 2017).

Regulación neuroendocrina de la pubertad

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, compuesto por *genes subordinados, genes de segundo nivel* y *genes reguladores superiores*, implicados en el control de la secreción de GnRH incluyendo las propias neuronas (Heger et al., 2007; Mastronardi et al., 2006; Ojeda et al., 2008; Roth et al., 2007). Por lo tanto, al estar interconectada desde los niveles superiores hasta los subordinados producen un control genético de la pubertad (Ojeda et al., 2010). Hay genes necesarios para la adquisición de función, como GPR54, KiSS1 y TAC3, y genes que, expresados en diferentes subconjuntos celulares del hipotálamo contribuyen a definir el momento correcto del proceso puberal. Además, existen otros genes que participan en la regulación de la pubertad (Ojeda et al., 1999; Rampazzo et al., 2000; Lomniczi et al., 2006; Mastronardi et al., 2006; y Heger et al., 2007; Parent et al., 2007; Choi et al., 2008; Ha et al., 2008; Garcia-Rudaz et al., 2008; Ojeda et al., 2008; Lomniczi y Ojeda, 2009).

Selección del receptor de LH (LHr) y melatonina (MTRN1A) en búfalas

La selección del gen LHr que codifica para la proteína receptora de la hormona luteinizante juega un papel crítico en la regulación del inicio de la pubertad. La hormona LH, interviene en la esteroideogénesis, precedida por su unión a un receptor especifico localizado en la membrana plasmática de las células diana (Catt y Dufau 1976; Catt y Pierce, 1978). Dados los roles discutidos que afectan la ovulación, estos factores intraováricos podría modular o influir en el inicio de la pubertad que conduce a el primer evento de ovulación (Weller et al., 2016). Singh (2006) reportó en búfalos de río la secuencia del gen LHr en el exón 11.

El exón 11 del gen bovino LHr está reportado en GenBank (NM_174381.1) con un tamaño de 1453pb, el cual 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 (Fernández, 2015). 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). En dicha especie, se han reportado polimorfismos del gen LHr (Kremmer et al., 1995), denominados mutación puntual (*missense*) donde se produce el cambio de un solo aminoácido de la proteína codificada presentes en el exón 11. Según Shanker et al. (2002), estos polimorfismos traen como consecuencia la pubertad precoz en niños y el trastorno autosómico dominante denominado pubertad familiar precoz limitada al varón (FMPP; Shanker, 2002).

Por otra parte, teniendo en cuenta los genes candidatos y la bibliografía actual en la especie bubalina se procedió a la elección del gen MTRN1A, el cual está involucrado en la estacionalidad reproductiva (Weaver et al., 1996; Dubocovich et al., 2003), y su sitio polimórfico en búfalas Mediterráneas (Carcangiu et al., 2011) tiene acción directa sobre la misma. Los patrones de secreción de melatonina proporcionan información sobre el fotoperíodo en relación con células cerebrales, que poseen los receptores necesarios para controlar las funciones reproductivas (Migaud et al., 2005). En los mamíferos se han identificado y caracterizado dos tipos de receptores de melatonina, llamados MT1 y MT2, pero solo el primero parece estar involucrado en la regulación de la actividad reproductiva (Weaver et al., 1996; Dubocovich et al., 2003).

El efecto de la hormona melatonina se lleva a cabo a nivel del hipotálamo, mediante la regulación de la GnRH (Malpaux et al., 1998), siendo la pubertad un carácter reproductivo influenciado por la secreción pulsátil de la misma. Esta hormona influye en la liberación de las gonadotropinas, necesaria para la secreción preovulatoria de LH que provoca la ovulación, evento fisiológico por el cual las hembras alcanzan la pubertad con la posterior formación de un CL. Por lo tanto, en este trabajo se caracterizó una región de 802 pb que corresponde al exón 2 del gen MTRN1A, utilizando la secuencia reportada en GenBank JN689386.1 (Zetouni et al., 2014). Teniendo en cuenta que ha sido un sitio previamente reportado como polimórfico que tiene relación con caracteres productivos (Zetouni et al., 2014) y reproductivos (Carcangiu et al., 2011).

OBJETIVOS

- Caracterizar la variabilidad genética del exón 11 del gen LHr.
- Caracterizar el sitio polimórfico del gen MTRN1A en bubillas Mediterráneas y su asociación con la estacionalidad reproductiva.

HIPÓTESIS

- Los búfalos poseen una moderada variabilidad genética en regiones codificantes del gen LHr, comparable a la hallada en los bovinos.
- Existiría una diversidad genética del gen MTRN1A en la especie bubalina y parte de esta variabilidad estaría asociada a ciertos caracteres reproductivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de sangre periférica y pelos

Se realizó la extracción de aproximadamente 10 ml de sangre a través de punción de vena yugular con el fin de obtener una fuente de linfocitos para la extracción de ADN genómico. Las muestras se recolectaron en tubos con 150 ul de anticoagulante EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, GTLab®), y luego se conservaron a -20°C para su posterior procesamiento. Alternativamente, se extrajeron muestras de pelos con bulbo piloso de la cola, para realizar la extracción de ADN en caso de no poseer la suficiente calidad en algunas de las muestras de sangre.

Extracción y purificación de ADN

El ADN total se extrajo de sangre periférica a partir de linfocitos. La extracción se realizó siguiendo las recomendaciones del Kit comercial Wizard Genomic (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). La cuantificación del ADN purificado se llevó a cabo mediante espectrofotometría de luz ultravioleta utilizando el dispositivo NanoVue® Plus (GE Healthcare, USA), con 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 se encuentra entre 1,8 y 2.

Secuenciación y búsqueda de SNPs en el gen LHr en bubillas Mediterráneas

A partir de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó el receptor de la hormona luteinizante (LHR) teniendo en cuenta las 46 bubillas totales en los años 2015 y 2016, de la cual se tomó una submuestra de 12 bubillas, correspondientes a 6 animales pertenecientes a ambos años, en base a los extremos (precoces/tardías) de la distribución de la edad a la pubertad.

Para el análisis del exón 11 del gen LH, se caracterizó mediante PCR un fragmento de 925 pb del exón 11 del gen que posee un tamaño completo de 1453 pb. Para llevar a cabo esta caracterización, se amplificaron un total de tres fragmentos solapados del correspondiente exón (Goszczynski, 2010) (Tabla 2.1, Figura 2.1).

Tabla 2.1. Cebadores utilizados en la amplificación del exón 11 del gen LHr diseñados mediante el programa DNAMAN v. 4.15 (Lynnon Biosof© 1994-1999, Quebec, Canadá). T: temperatura de *melting* (Tm) de los mismos. F1: fragmento1; F2: fragmento2 y F3: fragmento3 (Goszczynski, 2010).

Cebadores	Secuencia	Tm
F1: (1) LHRe-F	TGAACTGAGTGGCTGGGATTA	60.6°C
F3: (6) LHRe-R	CCTTTGGAATGCCTTTGTGA	61.0°C
F1: (2) LHRint-R1	TGGCATGGTTGTAATACTGGC	60.8°C
F3: (5) LHRint-F1	TGGAAAGCACTCTCTCACAGG	60.6°C
F2: (3) LHRint-F2	AGACTGGCAGACAGGGAGTG	60.5°C
F2: (4) LHRint-R2	GGCAAATGCGACCTTCATGT	62.3°C

```
1    ATTCTGCCATCTTTGCTGAGAGTGAACTGAGTGGCTGGGATTATGACTATGGTTTCTGCT
61   TACCCAAGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCTTTCAATCCCTGTGAAGACATTA
121  TGGGCTACAACTTCCTTAGAGTCCTGATTTGGCTGATTAATATCCTAGCCATCACGGGAA
181  ATGTGACTGTCCTCTTTGTTCTCCTGACCAGTCGTTACAAACTGACAGTCCCCCGCTTTC
241  TCATGTGCAACCTCTCCTTTGCAGACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCT
301  CAGTCGATGCCCAGACCAAAGGCCAGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGA
361  GTGGGTGCAGCGCGGCTGGCTTTTTCACTGTGTTTGCAAGTGAACTCTCTGTCTACACCC
421  TCACAGTCATCACACTAGAAAGATGGCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAA
481  AGCTGCGACTGAAACATGCCATTCCAGTCATGCTTGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCA
541  TTGCCGTGTTGCCTCTTGTGGGTGTCAGCAATTACATGAAGGTCAGCATTTGCCTCCCCA
601  TGGATGTGGAAAGCACTCTCTCACAGGTCTACATCTTAACCATCCTGATTCTCAACGTGA
661  TGGCCTTCATCATCATTTGTGCTTGCTACATTAAAATTTATTTTGCAGTTCAAGATCCAG
721  AGCTGATGGCTACCAACAAAGATACAAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCCTCACCTTCA
781  CCGATTTCACCTGCATGGCACCAATCTCTTCCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGC
841  CCCTCATTACAGTAACCAACTCAAAGGTTCTACTGGTTCTCTTTTATCCTGTCAATTCAT
901  GCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAATTTTCACAAAGGCATTCCAAAGGGATTTCTTTCTGT
961  TGCTGAGCAAATTTGGCTGCTGTAAATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTTT
1021 CAGCTTATATCTCCAACTGCAAAAATGGCTTCACTGGATCAAATAAGCCCTCCCGGTCTA
1081 CCTTCAAGTTGACTACATTACAATGTCAATATTCAGCTGTCCTGGACAAGACTTGCTATA
1141 AGGAATGTTAACTGTTGTATGAGTAACCAC
```

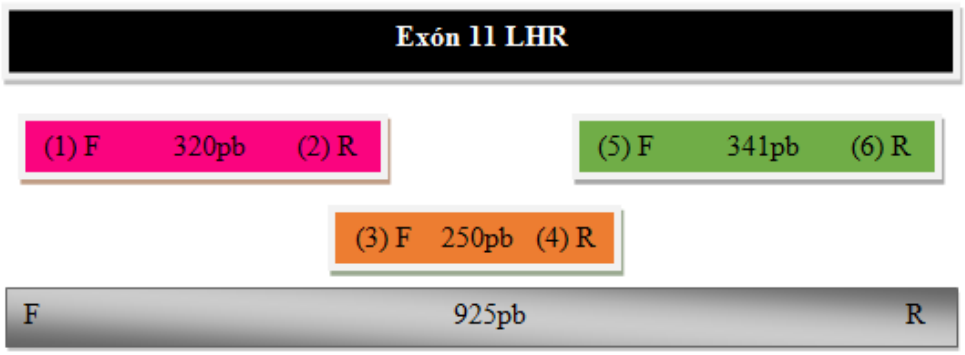

Figura 2.1. Representación esquemática de la localización de los cebadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen LHR bovino (NM_174381.1), y tamaño de los productos de amplificación. La letra F designa a los cebadores con orientación forward, mientras que R a los de orientación reverse.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 40 µl, 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. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 94°C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación (*annealing*) a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido por un período de extensión final de tres minutos para los fragmentos F1 y F2. En el caso del F3*,* varió la temperatura de hibridación, la cual fue de 58°C. En todos los casos se realizaron controles negativos para verificar la ausencia de contaminación.

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 (Figura 2.2).

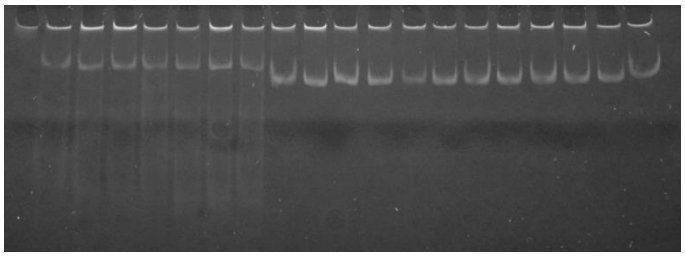

Figura 2.2. Productos amplificados por PCR correspondientes al fragmento F3 de 341pb (calles 2-8) y Fragmento F2 de 250pb (calles 9-20) del gen LHr de bubillas Mediterráneas.

Secuenciación de Fragmentos del gen LHR

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.

La secuenciación se realizó según el método modificado de Sanger et. al. (1977), donde el ADN blanco es copiado varias veces y resulta en fragmentos de diferentes longitudes. Luego los nucleótidos fluorescentes que actúan como terminadores de cadena marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia. El producto de la reacción con los fragmentos marcados con un fluorocromo es separado por un proceso de

electroforesis capilar en gel y un láser al iluminarlos permite la detección del pigmento asociado. De esta manera, se puede reconstruir nucleótido por nucleótido la secuencia del fragmento de ADN original a partir de los colores de los pigmentos registrados uno tras otro por el detector. Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos en la intensidad de la fluorescencia, que son informados en un electroferograma (Hagemann, 2015). Los amplicones de la cadena *forward* fueron secuenciados en un servicio comercial bajo las condiciones del mismo (Macrogen Inc., Corea del Sur).

Genotipificación del gen receptor de Melatonina tipo1A Bubalus bubalis (MTRN1A) en bubillas Mediterráneas.

Se ha identificado polimorfismos en el gen MTNR1A (JN689386.1), con posibles asociaciones en la producción de leche, grasa y proteína principalmente, la edad del primer entore e intervalo entre partos (Zetouni et al., 2014). Por lo tanto, se seleccionaron 46 bubillas que alcanzaron la pubertad para su genotipificación. Para amplificar por PCR una región de 100 pares de bases y posteriormente aislar una cadena del amplificado para su posterior tipificación mediante la técnica de pirosecuenciación se diseñaron los cebadores que se indican en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Cebadores utilizados para amplificar el SNPs del gen MTRN1A.

Cebadores	Secuencia	Tm
MTNR1A-F	5′-TGGCGTCTATAGTTA-3′	60°C
MTNR1A-R	5′-ACGCTCAAGCCCATCAGGA-3′	60°C
M13 biotilinado	5′-AGCGCATAACAATTTCACACAGG-3′	52°C

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25µl, conteniendo 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), 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. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido por 15 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 52°C por 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido de un período de extensión final de diez minutos. En todos los casos se realizaron controles negativos para verificar la ausencia de contaminación.

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 1µg/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 (Figura 2.3).

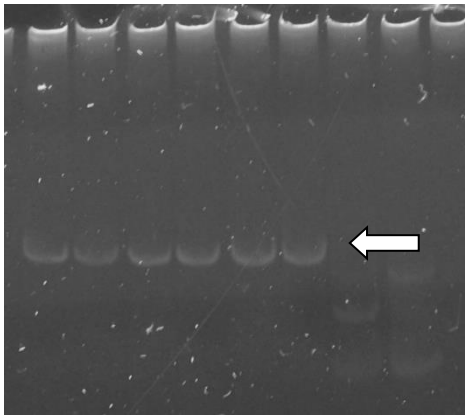

Figura 2.3. Producto amplificado por PCR del polimorfismo del gen MTRN1A en bubillas Mediterráneas.

Luego, se realizó la genotipificación del SNPs mediante 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, luego 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. La intensidad de la luz emitida es detectada por el equipo y presentada en forma de picos en un pirograma. Para llevar a cabo la pirosecuenciación se utilizó un cebador interno diseñado (Tabla 2.3) 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.

Tabla 2.3. Secuencia del cebador interno del gen MTNR1A.

Cebadores	Secuencia
MTNR1A-Seq	5′-GCTCAGGCTCCACCC-3′

La cadena de ADN que resulta biotinilada puede ser luego separada de su complemetaria 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 una solución alcalina. 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.

Por lo tanto, se realizó una purificación 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 (MTNR1A-Seq) en 45 µl de Anealing 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) (Fernández, 2015).

Análisis estadísticos

Se realizó un Test de desequilibrio de Hardy-Weinberg para cada año del SNP del locus MTRN1A mediante un Test de Fisher utilizando el programa Genepop (Raymond y Rousset, 1995). El análisis de asociación entre genotipos y edad de pubertad se realizó teniendo en cuenta los factores que podrían modificar o afectar las variables medidas y el resultado de la interacción. El modelo elegido para evaluar la interacción entre año y genotipo fue un modelo lineal generalizado mixto, utilizando el procedimiento PROC GLIMMIX implementado en SAS v. 9.2, y expresado de la siguiente forma:

$$\boldsymbol{y = \mu + Gi + Sj + (GS)k + eijk}$$

Dónde:

y_{ijk}= *observación fenotípica edad a la pubertad,*
μ = *media general,*
G_i = *es el efecto fijo del i -ésimo año, con i=1,2,*
S_j = *es el efecto fijo del j-ésimo genotipo, con j= 1, 2,3,*
$(GS)_k$=*es la k ésima interacción año-genotipo con k*
e_{ijk}= *error aleatorio.*

La variabilidad del intervalo a la pubertad fue analizada por regresión logística utilizando el modelo de los riesgos proporcionales de COX mediante el Procedimiento PHREG de SAS (SAS, 1990). El modelo utilizado tuvo en cuenta, las variables de respuestas EPDIAS, y las variables explicativas año de experimentación (2015/2016) y genotipo (AA, AG y GG).

RESULTADOS

Secuenciación y búsqueda de SNPs en el exón 11 del gen LHCGR en bubillas

Luego de comprobar la calidad de las secuencias obtenidas de la secuenciación capilar, se procedió a analizar y alinear las secuencias obtenidas de los 12 animales, en conjunto con las reportadas en genbank en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), en las siguientes razas, Murrah (DQ858168.1), Surti (DQ858172.1), Nili Ravi (DQ858170.1) y con la especie bovina (*Bos taurus;* NM_174381.1). De acuerdo a los fragmentos analizados, se detectaron en 3 bubillas heterocigotas (197, 843 y 918) para un polimorfismo de tipo SNP en la posición 1665 del ARNm y que corresponde a un cambio de bases de A/T (Figura 2.4). El polimorfismo encontrado A/T no produce un cambio en las secuencias de aminoácidos de la proteína.

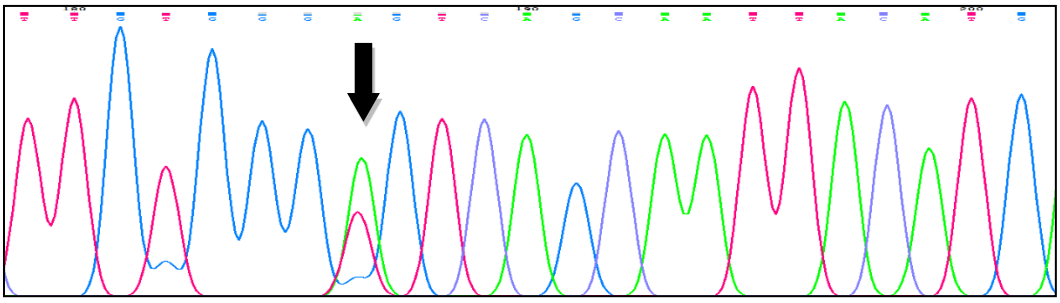

Figura 2.4. Cromatograma de un animal donde la flecha indica la presencia del SNPs, donde se produce un cambio de base de A/T.

El fragmento correspondiente al exón 11 del gen LHCGR de los animales analizados en esta tesis se corresponde 100% con la secuencia del genoma de referencia del búfalo (ARNm del gen LHCGR: XM_006078413.1) excepto tres animales heterocigotas AT

mencionados anteriormente (bubillas 197, 843 y 918) para la posición 1665 del mensajero XM_006078413.1 que es homocigota TT (Tabla 2.4.).

Tabla 2.4. Alineamiento de los 3 fragmentos (con la base polimórfica A del fragmento 2) con el genoma del búfalo de referencia XM_006078413.1, una secuencia Murrah (KY786095.1) y el genoma bovino (NM_174381.1). En el Fragmento 2 el polimorfismo: A/T (posición 1665 en ARNm de referencia XM_006078413, XP_006078475.1.

```
Query_14991    1 AGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCGTTCAATCCCTGTGAAGACATTATGGGCT   60
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................T...........................

Query_14991   61 ACGACTTCCTTAGAGTCCTGATTTGGCTGATTAATATCCTAGCCATCACGGGAAACGTAA  120
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ..A.........................................................T..G.

Query_14991   121 CTGTCCTCTTGGTTCTCCTGACCAGTCGTTATAAACTGACAGTCCCCCGCTTTCTCATGT 180
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ..........T.....................C.............................

Query_14991   181 GCAATCTCTCCTTTGCAGACTTCTGCATGGGACTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTTG 240
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ....C.........................G.............................C.

Query_14991   241 ATGCCCAGACCAAAGGCCAGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGT 300
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   301 GCAGCACGGCTGGCTTTTTCACTGTGTTTGCAAGTGAACTCTCTGTCTACACCCTCACAG 360
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        .....G......................................................

Query_14991   361 TCATCACACTAGAAAGATGGCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAGCTGC 420
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   421 GACTGAAACATGCCATTCCAGTCATGCTCGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCATTGCCG 480
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   481 TGTTGCCTCTTGTGGGAGTCAGCAATTACATGAAGGTCAGCATTTGCCCGTGATGGCCTT 540
KY786095         ..................................................
KY786095                                                           ............
XM_006078413     ................T...............................
XM_006078413                                                       ............
NM_174381        ................T...............................
NM_174381                                                          ............

Query_14991   541 CATCATCATTTGTGCTTGCTACATTAAAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGAT 600
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   601 GGCTACCAACAAAGATACGAAGATTGCTAAGAAAATGGCGGTCCTCATCTTCACCGATTT 660
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ................A.....................A.....................

Query_14991   661 CACCTGCATGGCACCAATCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCCTCAT 720
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   721 TACAGTAACCAACTCAAAGGTTCTACTGGTTCTCTTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAA 780
KY786095         ............................................................
XM_006078413     ............................................................
NM_174381        ............................................................

Query_14991   781 TCCGTTTCTGTACGCAATTTT 801
KY786095         .....................
XM_006078413     .....................
NM_174381        .....................
```

Genotipificación del Polimorfismo del gen receptor de Melatonina tipo1A *Bubalus bubalis* en bubillas

Las frecuencias alélicas y genotípicas del locus MTRN1A en los años 2015 y 2016, resultaron en el siguiente Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Frecuencias alélicas y genotípicas del locus MTRN1A.

	Frecuencias Alélicas		Frecuencias Genotípicas		
Años	A	G	AA	AG	GG
2015	0,50	0,50	0,233	0,533	0,233
2016	0,59	0,41	0,375	0,438	0,188

El test exacto para desequilibrio de Hardy-Weinberg para ambos años 2015 y 2016 resultó no significativo ($P > 0,05$). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Experimento I y el análisis de los genotipos en base al polimorfismo MTNR1A en bubillas púberes, se analizó la interacción año de experimentación por el genotipo, lo cual resultó significativo ($p<0,05$; Figura 2.5).

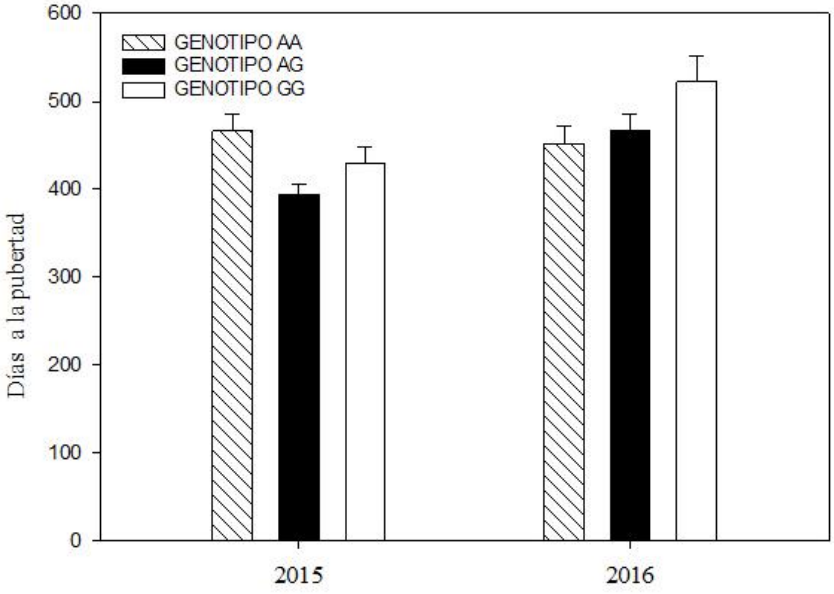

Figura 2.5. Interacción año de experimentación y genotipos del polimorfismo del gen receptor de MTNR1A en bubillas púberes.

El análisis de riesgo del tiempo en que los genotipos de las bubillas alcanzan la pubertad (EPDIAS) de acuerdo con el año de experimentación, se presenta en la Tabla 2.6. Las bubillas del genotipo AG tuvieron 3,9 veces más chance de alcanzar la pubertad que las bubillas del 2016 (Estimador [EST]: 3,9; Intervalo de Confianza del 95% [IC95%]: 1,8-8,4; P<0,05). Así también sucedió con el genotipo GG, las cuales tuvieron 5,7 veces más chance de alcanzar la pubertad en el año 2015 (EST: 5,7; IC95%: 2,0-16,3; P<0,05).

Tabla 2.6. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de año de experimentación (AÑO) y genotipo.

Variables	Estimador	95% Límite de confianza	
AÑO 2015 vs 2016 para el genotipo AA	1,402	0,476	4,133
AÑO 2015 vs 2016 para el genotipo AG	3,916 *	1,811	8,466
AÑO 2015 vs 2016 para el genotipo GG	5,779 *	2,039	16,375

n=46; *P<0,05.
Variable de respuesta: EPDIAS;
Variables explicativas: AÑO y genotipo.

Los resultados del análisis de riesgo del tiempo en días (EPDIAS) en que alcanzan la pubertad considerando los genotipos en los años de experimentación se presentan en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Riesgo diario de que las bubillas alcancen la pubertad (EPDIAS), en función de genotipo y AÑO de experimentación.

Variables	Estimador	95% Límite de confianza	
GENOTIPO AG vs GG para el año 2015	2,744*	1,353	5,563
GENOTIPO AA vs GG para el año 2015	0,859	0,274	2,700
GENOTIPO AG vs GG para el año 2016	4,049	0,952	17,211
GENOTIPO AA vs GG para el año 2016	3,541*	1,188	10,533

n=46; *P<0,05.
Variable de respuesta: EPDIAS;
Variables explicativas: AÑO y genotipo.

Las bubillas del genotipo AG tuvieron 2,7 veces más chance de alcanzar la pubertad que las bubillas del genotipo GG (EST: 2,7; IC95%: 1,3-5,5; P<0,05). Así también sucedió con el genotipo AA, las cuales tuvieron 3,5 veces más chance de alcanzar la pubertad que el genotipo GG (EST: 3,5; IC95%: 1,1-10,5; P<0,05).

DISCUSION

El polimorfismo correspondiente al exón 11 del gen LHCGR hallado en este trabajo ha sido reportado en una secuencia de una hembra de la raza Murrah (KY786095.1). Esta variante no cambia la secuencia de la proteína y por lo tanto no tiene implicancias directas en el fenotipo de las bubillas. Sin embargo, este polimorfismo resulta de utilidad en futuros trabajos de asociación de caracteres reproductivos. Así mismo, es interesante destacar que en el genoma de Búfalos contiguo al gen LHCGR se encuentra el receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR), en donde se ha encontrado asociaciones con fenotipos de pubertad precoz en animales Nellore (Milazzotto et al., 2008). Othman y Abdel-Samad (2013) y Singh (2006), también han reportado polimorfismos en el gen LHCGR, aunque no han realizado estudios de asociación. De esta manera es plausible suponer que algunas variantes del gen FSHR podrían estar en desequilibrio de ligamiento con polimorfismos del gen LHCGR incluyendo el aquí descripto. Esta cercanía genómica podría predecir que los polimorfismos genéticos del receptor de la hormona LH que generalmente se han asociado a la pubertad sexual y en variables de calidad seminal (Sun et al., 2012), resultarían en una herramienta de utilidad en estudios de asociación y selección genética de caracteres reproductivos. Ya que en hembras tiene importancia en células de la granulosa, la LH es fundamental para la foliculogénesis desde la adquisición de la dominancia folicular hasta la ovulación (Ginther et al., 2001; Barros et al., 2010). De la misma manera es importante en la identificación de vías de señalización diferencial que regulan la expresión del gen LHR, así como la elucidación de el/los mecanismo(s) de regulación del receptor, por su mayor relevancia a la comprensión de la fisiología reproductiva y la patología de los trastornos reproductivos (Zhang y Dufau, 2003).

Usualmente, cuando los búfalos son criados en regiones distantes a la línea del Ecuador, presentan un comportamiento reproductivo influenciado por la disminución de las

horas luz del día (Baruselli, 1994; Danev, 1997; Zicarelli, 1994). Sin embargo, Zicarelli (2016) atribuye que el comportamiento de la especie va a depender del ambiente donde se crie (temperatura, lluvias, hora luz, aspectos nutricionales), la domesticación y del componente genético, los cuales en conjunto determinaran que el momento de su actividad reproductiva sea el adecuado para garantizar la supervivencia de esta.

De acuerdo con el manejo de la especie bubalina en Brasil, Argentina y Venezuela la concepción se produce en los meses de escaso forraje, de hora luz decreciente (Baruselli, 1993; Baruselli et at., 1999). Sin embargo, difiere en la región del Amazonas, donde la estacionalidad es casi inexistente debido a la relación constante luz-oscuridad durante todo el año (Zicarelli, 2016). Esta dualidad nos hace suponer, que los resultados encontrados en este trabajo podrían ser un punto de partida en futuros estudios relacionados al comportamiento reproductivo de acuerdo con la zona donde son criados.

Al evaluarse los genotipos con respecto al estudio del polimorfismo del gen MTRN1A, el heterocigota AG y homocigota GG quienes muestran actividad a medida que disminuyen las horas luz (Carcangiu et al., 2011) tuvieron más probabilidades de llegar a la pubertad en el año 2015 cuando se realizó un análisis de riesgo.

En este trabajo no se realizó asociación entre el genotipo de los animales y la edad a la pubertad en los años de experimentación, dado que no se encontraron marcadores lo suficientemente polimórficos en la población estudiada. Si bien la interacción (año de experimentación*genotipo) es significativa se necesitan más datos para confirmar la hipótesis. Futuros estudios podrían determinar si el polimorfismo encontrado se encuentra ligado a caracteres reproductivos, lo que posibilitaría identificar animales que permitan realizar adecuados manejos reproductivos en los establecimientos (Carcangiu et al., 2011).

La pubertad está regulada por un reloj biológico controlado a nivel genético, el cual es extremadamente sensible a diferentes señales endógenas y ambientales, que a su vez interactuaban con los genes reguladores centrales para definir con precisión el momento de la pubertad (Parent et al., 2003). Además, la tendencia de los búfalos hacia un fotoperíodo negativo depende de las características del ambiente de donde son originarios (zona subtropicales-norte y sur del ecuador), en los cuales se producen variaciones nutricionales a través del año (Zicarelli, 2016).

Por lo tanto, se necesitan más datos para dar certeza de algún tipo de asociación, estos resultados nos ayudan a dilucidar algunos aspectos y roles que pueden influenciar en la red de señalización que juegan en este caso tanto la genética como la reproducción y el ambiente donde se crían los animales.

CONCLUSIONES

En este trabajo 3 bubillas resultaron heterocigotas para un polimorfismo de tipo SNP en el exón 11 del gen LHCGR correspondiente a un cambio de bases de A/T. Sin embargo, el polimorfismo encontrado A/T no produce un cambio en las secuencias de aminoácidos de la proteína. Esta información puede ser de gran utilidad para futuras investigaciones de asociaciones con caracteres reproductivos en esta especie, sobre todo en esta región del Nordeste Argentino, donde el sistema de cría en la producción bubalina y su estrecha relación con la reproducción es de suma importancia.

Los genotipos del polimorfismo del gen receptor de Melatonina tipo1A en las poblaciones para los años 2015 y 2016, se encuentran en equilibrio. Se observó un efecto año

de experimentación en la edad alcanzada a la pubertad de acuerdo con los genotipos evaluados, observándose un mayor riesgo de pubertad para los genotipos heterocigota AG y homocigota GG en el año 2015. Al no encontrarse marcadores lo suficientemente polimórficos en la población estudiada, no se realizó análisis de asociación. Sin embargo, estos resultados son el primer paso para poder realizar la identificación genética de esta especie y trabajar en la selección de animales precoces en el inicio de la temporada reproductiva.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES GENERALES

En los últimos años la investigación en nuestro país de la especie bubalina ha crecido a pasos agigantados, sin embargo, hay una dualidad. A medida que se investiga se descubren ciertas falencias en la ciencia básica, el comportamiento reproductivo, manejo de los animales, requerimientos nutricionales y su eficiencia de conversión, sus parámetros fisiológicos, etc en nuestra zona del Nordeste Argentino. Y nos permite replantearnos los objetivos y aportar nuevos resultados para que esta especie crezca en nuestro país.

En el capítulo 1 de esta tesis se llegó a la conclusión de que las hembras bubalinas en dos años de muestreos alcanzaron en promedio la pubertad a los 437(±61) días con un peso de 274(±38) kg. Siendo el peso a la pubertad, la variable predictora que se correlacionó en su mayoría de forma positivamente con respecto a las variables EPDIAS a la pubertad, GDPPOS y EPEST a la pubertad. Además, se observó que a medida que los animales aumentaban de 0,17 kg sobre la media de GDPPOS (0,244 kg/d), las chances de pubertad aumentaban aún más.

Por otra parte, los análisis de riesgo del tiempo en días en que las bubillas alcanzan la pubertad nos permitieron evidenciar que las hembras de experimentación del año 2015 tenían más chances de arribo de la pubertad que las del año 2016. Por lo tanto, inferimos que la nutrición, las precipitaciones, el manejo, tuvieron influencia sobre la edad a la pubertad en los diferentes años de experimentación.

Por último, el diagnóstico de pubertad mediante la identificación de un CL a la imagen ecográfica tuvo una sensibilidad del 15% y una especificidad del 100% comparado con la determinación de la presencia de un CL funcional que produce ≥1 ng/ml de P4 medida en

una muestra de suero mediante quimioluminiscencia. Lo cual es una herramienta de gran utilidad para las próximas investigaciones.

En el capítulo 2 de este trabajo se evaluaron los marcadores genéticos: LHCGR y MTRN1A. Con respecto, a los fragmentos analizados del exón 11 del gen LHCGR, se detectaron en 3 bubillas heterocigotas para un polimorfismo de tipo SNP en la posición 1665 del ARNm y que corresponde a un cambio de bases de Adenina por Tiamina, el cual no produce un cambio en las secuencias de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, es de gran utilidad para futuras investigaciones.

Las poblaciones analizadas se encontraron en equilibrio y al analizar la interacción año de experimentación por el genotipo, resultó ser significativa. Las bubillas del genotipo AG tuvieron 3,9 veces más chance de alcanzar la pubertad que las bubillas del 2016. Así también sucedió con el genotipo GG, las cuales tuvieron 5,7 veces más chance de alcanzar la pubertad en el año 2015. Poco concluyentes los resultados, consideramos que es un gran paso en la investigación de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andersen KJ, Brinks JS, LeFever DG, Odde KG. Genetic aspects of reproductive tract scores, condition scores and performance traits in beef heifers, Proceedings Western Section American Society of Animal Science.1988. 39:265-268.
2. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. Science. 1994. 263(5154):1771-1774.
3. André Mendes J. Escore de condição corporal em Bubalinos [audiovisual]. Disciplina de Bubalinocultura, UNESP-FMVZ, Botucatu.2013.
4. Assey RJ, Purwantara B, Greve T, Hyttel P, Schmidt MH. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. Theriogenology.1993. 39(6): 1321-1330.
5. Avallone, L., Russo, F., d'Angelo, A., Campanile, G., Esposito, L., Infascelli, F. Andamento del progesterone durante il ciclo estrale della bufala. In: Proc. XLII Congr. S.I.S.Vet, Mantova, Italy.1988. pp. 289–291.
6. Bagley CP. Nutritional management of replacement beef heifers: A review. J. Anim. Sci. 1993. 71:3155–3163.
7. Baldrighi JM. Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas sob o mesmo manejo nutricional. Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo.2013.
8. Barile VL. Reproductive Efficiency in Female Buffalo. En: Buffalo Production and Research, Rome, Italy, Borghese A. (Ed). Cap IV. 2005. p 77-100.

9. Baruselli PS, Viana WG. Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (Bubalus bubalis) [tesis maestrado]. Facultad de medicina veterinaria e Zootecnia Sao Paulo, Brazil .1992.

10. Baruselli BP. Manejo reprodutivo em bubalinos. Monografía, Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Ins Zoot Reg.1993. p 46.

11. Baruselli PS. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. Buffalo J. 1994. 2 (2) :53-60.

12. Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Molero-Filho JR. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology.1997. 47(8): 1531-1547.

13. Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA., Barnabe VH, Barnabe RC, R Amaral. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos Revista Brasileira de Reprodução Animal. 1999. 23, 60-362

14. Barros CM, Ereno RL, Simões RA, Fernandes P, Buratini J, Nogueira M. Use of knowledge regarding LH receptors to improve super stimulatory treatments in cattle. Reprod Fertil Dev. 2010. 22: 132-137.

15. Basra MJ, Khan MA, Nisa M, Riaz M, Tuqueer NA, Saeed MN. Energy and Protein requirements of 6-9 months old calves. Int J Agric Biol.2003. 5: 377-379.

16. Bernardes O. Situación de la Bubalinocultura en países americanos. Brasil. In: Crudeli GA, Konrad JL, Patiño EM, ed. by. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones. 2016. 237-240.

17. Bertaudiere PL. Etude de la physiologie et de la pathologie de la reproduction chez de buffle. Tesis Doctoral, Ecole National de Veterinaire d'Alfort, Paris. p 107. 1972.

18. Bhattacharya P. Some aspects of reproduction in Indian farm animals. Proceedings in Indian Sci Cong, 45, Madras.1958.p.22.

19. Bhattacharya P. Reproduction. En: WR Cockril, (Ed) The husbandry and health of the water buffalo,Rome FAO. 1974.

20. Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology. 1983.113(6): 2276-2283.

21. Bonamy M. Estudio cuantitativo y molecular de la edad de arribo a la pubertad en la hembra bovina. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata; 2018.

22. Borghese A, Terzano GM, Barile VL, Annicchiaric G, Allegrini S, Zicarelli L, Montemurro N, Pacelli C, Campanile G, Esposit L, Di Palo R, Boni R, Seren E, Parmeggiani A. Pubertà e mantenimento dell'attività ciclica ovarica nella bufala. [Puberty and maintenance of ovarian cyclic activity in buffalo] Agricoltura Ricerc.1994a. 153: 5-16.

23. Borghese A, Terzano GM, Barile VL, Annicchiaric G, Allegrini S, Zicarelli L, Montemurro N, Pacelli C, Campanile G, Esposit L, Di Palo R, Boni R, Seren E, Parmeggiani A. 1994a. Pubertà e mantenimento dell'attività ciclica ovarica nella bufala. [Puberty and maintenance of ovarian cyclic activity in buffalo] Agricoltura Ricerc.1994a. 153: 5-16.

24. Borghese A, Terzano, GM, Barile VL, Parmeggiani A. 1994b. Season and feeding level effects on onset of puberty in buffalo heifers. In: Proc. Fourth World Buffalo Congress, Sao Paulo, Brazil. (27-30 June).1994b. p.525-527.

25. Brenner S. Life sentences: Detective Rummage investigates. Genome Biology.2002. 3(9): comment1013.1–comment1013.2.

26. Buskirk DD., Faulkner DB, Ireland FA. Increased postweaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. J Anim Sci. 1995. 73:937–946.

27. Buskirk DD., Faulkner DB., Ireland FA. Increased postweaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. J Anim Sci.1995. 73:937–946.

28. Cantet R. Argentina dispondrá de un ranking de bovinos.2016. [online] Vetcomunicaciones.com.ar. Disponible en: https://www.vetcomunicaciones.com.ar/page/noticias/id/1793/title/Corrientes [Accessed 24 Nov. 2017].

29. Cantet R. Con genómica, apuntan a reactivar la ganadería argentina.2014. Agronomía Informa. [online] Agro.uba.ar. Disponible en: https://www.agro.uba.ar/noticias/interes-general-news/con-genomica-apuntan-reactivar-la-ganaderia-argentina [Accessed 24 Nov. 2017].

30. Capellari A, Patiño EM, Navarro Krilich LM, Velázquez R, Dellavalle F, Yostar E, Schultz M. Crecimiento en bucerros mediterráneo al pie de la madre, según mes de nacimiento, en el noreste de Corrientes. Revista Argentina de Producción Animal [Internet]. 2018 [cited 12 December 2018];(38) Supl.1. :105. Disponible en: http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/rapa/article/view/13926/45454575758836

31. Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. Endocrinology. 1999. 140(1): 165-170.

32. Carcangiu V, Mura MC, Pazzola M, Vacca GM, Palud, M, Marchi BC, Daga C, Bua S, Luridiana, S. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. Theriogenology. 2011. 76(3), 419-426.

33. Catt, KJ y Dufau, ML. Basic concepts of the mechanism of action of peptide hormones. BioI. Reprod. 1076. 1: 14,1.

34. Catt, KJ. y Pierce, JG. Gonadotropic homones of the adenohypophysis (FSH, LH and prolactin). In Reproductive Endocrinology. Yen, SSC and Jaffe, RB. (eds), Philadelphia, W.B. Saunders.1978. pp. 34-62.

35. Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. Domest Anim Endocrinol.2005. 29:3–22.

36. Choi J, Ha CM, Choi EJ, Jeong CS, Park JW, Baik JH, Park JY, Costa ME, Ojeda SR, Lee BJ. Kinesin superfamily-associated protein 3 is preferentially expressed in glutamatergic neurons and contributes to the excitatory control of female puberty. Endocrinology. 2008; 149:6146–6156.

37. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology. 2006.147(12): 5817-5825.

38. Crudeli GA, Konrad JL, Patiño EM. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones. 2016.

39. Damé MCF., Pimentel CA. Puberty in females' buffaloes. Proceedings in Rio Grande do Sul, Brazil, 4th World Buffalo Congress Proc, São Paulo.1994. 3: 507-509.

40. Danell B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.1987. p.124.

41. Danev AV. Oestrus behavior in buffaloes during winter. Proceeding Y World Buffaloes Congress, Caserta Italia. p.725. 1997

42. Day ML, Anderson LH. Current concepts on the control of puberty in cattle. Journal of Animal Science. 1998.76 (3): 1 – 15.

43. De Franciscis G. Buffalo improvment programme. Proceedings in Italy, Seminar Buffalo Reprod y AI, FAO/SIDA, Rome.1979. p 163-172.

44. Desjardins, C, Hafs, HD. Maduración de genitales femeninos bovinos desde el nacimiento hasta la pubertad. Revista de ciencia animal. 1969. 28(4):502-507.

45. Di Palo R, Parmeggiani A, Campanile G, Zicarelli L. Repeatability of melatonin plasma levels in buffaloes bred in Italy. 1993, September. In Proceedings of the XLVII SIS Vet Congress. 29: 331-333.

46. Díaz FJ, Anderson LE., Wu YL, Rabot A, Tsai, SJ, y Wiltbank, MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2α production in the CL. Molecular and cellular endocrinology. 2002. 191(1): 65-80.

47. Dobson H, Kamonpatana M. A review of female cattle reproduction with special reference to a between buffaloes, cows and zebu. J Reprod Ferti.1986.77:1-36.

48. Dohoo, I. R., W. Martin, and H. Stryhn. Veterinary epidemiologic research. Transcontinental, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.2003.

49. Drost, M. Bubaline versus bovine reproduction. Theriogenology. 2007. 68(3): 447-449.

50. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masan MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. Front Biosci .2003.8:1093–108.

51. Duittoz AH, Tillet Y, Le Bourhis D, Schibler L. The timing of puberty (oocyte quality and management). Proceedings of the Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE). 2016. September. En: 32nd.Vol. 9. p. 313-333.

52. El-Sheikh AS, Sakla FB, Amin SO. Changes in the density and progesterone content of luteal tissue in the Egyptian buffalo during pregnancy. Journal of Endocrinology.1969.43 (1): 1-NP.

53. El-Sheikh, AS, Sakla FB, Amin SO. Changes in the density and progesterone content of luteal tissue in the egyptian buffalo during the oestrous cycle. Journal of Endocrinology. 1967. 39(2):163-171.

54. El-Wishy, AB. Reproductive performance of Iraqi buffaloes. I. Pattern of female reproduction. Beitrage Trop.Landwirtsch. Veterinarmed. 1979. 17:77–83.

55. El-Wishy AB. The postpartum buffalo I. Endocrinological changes and uterine involution. Theriogenology. 2007. 97:201–15.

56. El-wishy AB. The postpartum buffalo: II. Acyclicity and anestrus. Animal Reproduction Science. 2007. 97 (3-4): 216-236.

57. Evans, ACO, Adams, GP, Rawlings, NC. Cambios foliculares endocrinos y ováricos que conducen a la primera ovulación en vaquillas prepuberales. Reproducción. 1994. 100(1): 187-194. doi: 10.1530/jrf.0.1000187.

58. Feldkamp, C. Ganadería: la revolución tecnológica al servicio del productor.2017. [online] Agrositio.com.ar. Disponible en: https://www.agrositio.com.ar/noticia/188518-ganaderia-la-revolucion-tecnologica-al-servicio-del-productor [Accessed 6 Jun. 2018].

59. Ferguson J, Chalupa W. Impact of protein nutrition on reproduccion in dairy cows. Proceedings in: Symposium «Interactions of nutrition and reproduction». J. Dairy Sci. 1987. 72:742-766.

60. Fernández, ME. Búsqueda y asociación de polimorfismos genéticos con la edad de pubertad en toros Angus. 2015. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. https://doi.org/10.35537/10915/45524

61. Ferrell CL. Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. J Anim Sci. 1982. 55:1272–1283.

62. Flores AJ, Aguilar D, Hug MG, Gómez M. Primer servicio de la vaquilla a los 15 meses 2016. Not. Y Com. N° 533. ISSN N° 0327-3059. E.E.A. Mercedes, Corrientes.

63. Flores AJ, Rochinotti D, Hug MG, Gómez M. 2014.Factores que afectan el entore de vaquillas de 15 meses de edad. 37º Congreso de la Asoc. Arg.de Prod. Anim. – RAPA.2014. 34(1): 21.

64. Fortes MRS, Reverter A, Zhang Y, Collis E, Nagaraj SH, Jonsson NN, Prayaga KC,Barris W, Hawken RJ. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010.107(3): 13642-13647.

65. Freetly HC., Kuehn LA., Cundiff LV. Growth curves of crossbred cows sired by Hereford, Angus, Belgian Blue, Brahman, Boran, and Tuli bulls, and the fraction of mature body weight and height at puberty. J Anim Sci.2011. 89:2373–2379.

66. Frick CF, Borges M, Sampedro DH, Vogel O. Factores que afectan la fertilidad de vaquillonas entoradas a los 18 meses. Rev. Arg. Prod. Anim. 2003. 23 (1):255-256.

67. Garcia MR., Amstalden M., Morrison CD., Keisler DH., Williams GL. Ageat puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four months of age. J Anim Sci.2003. 81:261–268.

68. Garcia MR., Amstalden M., Williams SW., Stanko RL., Morrison CD., Keisler DH. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. J Anim Sci.2002. 80:2158–2167.

69. Garcia-Rudaz C, Luna F, Tapia V, Kerr B, Colgin L, Galimi F, Dissen GA, Rawlings ND, Ojeda SR. Fxna, a novel gene differentially expressed in the rat ovary at the time of folliculogenesis, is required for normal ovarian histogenesis. Development. 2007; 134:945–957.

70. Gasser CL, Grum DE, Mussard ML, Fluharty FL, Kinder JE, Day ML. Induction of precocious puberty in heifers A: Enhanced secretion of luteinizing hormone. Journal of animal science. 2006. Aug 1;84(8):2035-2041.

71. Gasser CL, Burke CR, Mussard ML, Behlke EJ, Grum DE, Kinder JE, Day ML. Induction of precocious puberty in heifers B: Advanced ovarian follicular development. Journal of animal science. 2006. Aug 1;84(8):2042-2049.

72. Gasser CL, Bridges GA, Mussard ML, Grum DE, Kinder JE, Day ML. Induction of precocious puberty in heifers C: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. Journal of animal science. 2006 Aug 1;84(8):2050-2056.

73. Gasser CL., Behlke EJ., Grum DE., Day ML. Effect of timing of feeding a high concentrate diet on growth and attainment of puberty in early weaned heifers. J. Anim. Sci.2006. 84:3118-3122.

74. Ghosh J, Mondal S. Nucleic acids and protein content in relation to growth and regression of buffalo (Bubalus bubalis) corpora lutea. Animal reproduction science.2006. 93(3-4): 316-327.

75. Gimenes LU, Fantinato Neto P, Arango JSP, Ayres H, Baruselli PS. Follicular dynamics of Bos indicus, Bos taurus and Bubalus bubalis heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. Animal Reproduction.2009.6(1):256.

76. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. Biol Reprod. 2001. 64: 197-205.

77. Goszczynski, DE. Caracterización de los polimorfismos presentes en el exón 11 del gen bovino LHr [Grado]. Universidad Nacional de Quilmes; 2010.

78. Ha CM, Choi J, Choi EJ, Costa ME, Lee BJ, Ojeda SR. NELL2, a neuron-specific EGF-like protein, is selectively expressed in glutamatergic neurons and contributes to the glutamatergic control of GnRH neurons at puberty. Neuroendocrinology. 2008; 88:199–211.

79. Hagemann I. Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J, ed. by. Clinical Genomics. St. Louis, MO, USA; 2015. p. 3-19. doi:10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0

80. Hafez ESE. The buffaloes-a review. India J Vet Sci. 1952. 22: 257-263.

81. Hafez ESE. Oestrus and some related phenomena in the buffalo. J Agri Sci Cambridge. 1954.44: 165-172.

82. Hafez ESE. Puberty in buffalo-cow. J Agri Sci.1955. 46: 137-142.

83. Heger S, Mastronardi C, Dissen GA, Lomniczi A, Cabrera R, Roth CL, Jung H, Galimi F, Sippell W, Ojeda SR. Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis. J Clin Invest. 2007; 117:2145–2154.

84. Honaramooz, A., Aravindakshan, J., Chandolia, RK, Beard, AP, Bartlewski, PM, Pierson, RA y Rawlings, NC. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. Anim. Reprod. Sci. 2004. 80: 15-29. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00136-2.

85. Iamartino D, Nicolazzi EL, Van Tassell CP, Reecy JM, Fritz-Waters ER, Koltes JE, Biffani S, Sonstegard TS, Schroeder SG, Ajmone-Marsan P, Negrini R, Pasquariello R, Ramelli P, Coletta A, Garcia JF, Ali A, Ramunno L, Cosenza G, de Oliveira DAA, Drummond MG, Bastianetto E, Davassi A, Pirani A, Brew F, Williams JL. Design and validation of a 90K SNP genotyping assay for the water buffalo (Bubalus bubalis). PLoS One. 2017 Oct 5; 12(10): e0185220. doi: 10.1371/journal.pone.0185220. PMID: 28981529; PMCID: PMC5628821.

86. Ivanov P, Zachariev SJ. Biologische Eigeschaften und Wirtschaftlichkeit der Büffel in Bulgarien. Z Tierz Züchtungsbiol. 1960. 74: 340-360.

87. Jainudeen MR, Hafez ESE. Cattle and Buffalo. En: Hafez ESE. (Ed.), Reproduction in Farm Animals, 6th ed., Lea and Febiger, Philadelphia.1993. p. 315-329.

88. Jainudeen MR., Hafez, ESE. 1993. Cattle and Buffalo. En: Hafez ESE. (Ed.), Reproduction in Farm Animals, 6th ed., Lea and Febiger, Philadelphia. P. 315-329.

89. Kaleff B. Der Hausbuffel und seine Züchtunsbiologie. Vergleich zum Rind Z Tierz Züchtungsbiol. 1942. 51: 131-178.

90. Kaneko K, Takagi N. Accurate Ultrasonographic Prediction of Progesterone Concentrations Greater than 1 ng/ml in Holstein lactating dairy cows. Reproduction in domestic animals.2014. 49(6): 985-988.

91. Kinder JE, Day ML, Kittok RJ. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. Journal of reproduction and fertility. Supplement. 1987. 34: 167-186.

92. Kremer H, Kraaij R, Toledo SP, Post M, Fridman lB., Hayashida, CY, van Reen M, Milgrom E., Ropers HH, Mariman, E. 1995. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene Nat Genet.; 9(2): 160-164.

93. Kumar Gupta S, Pawan S, Kuladip Prakash S, Shabir Ahmad L, Kumar N, Kumar A. Strategies for attaining early puberty in cattle and buffalo. Review article. Agricultural Reviews. 2016. 37(2):160-167.

94. Le Roy P, Naveau J, Elsen JM, Sellier P. Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. Genetics Research.1990. 55(1): 33-40.

95. Linnaeus, C. Systema naturae. Laurentii Salvii: Stockholm, 1758.

96. Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. Methods Enzymol.1980. 65: 347-353.

97. Lomniczi A, Cornea A, Costa ME, Ojeda SR. Hypothalamic tumor necrosis factor-α converting enzyme (TACE) mediates excitatory amino acid-dependent neuron-to-glia signaling in the neuroendocrine brain. J Neurosci. 2006; 26:51–62.

98. Lomniczi A, Ojeda SR. A role for glial cells of the neuroendocrine brain in the central control of female sexual development. In: Parpura V, Haydon P, editors. Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System. Springer; NY: 2009. pp. 487–511.

99. Luktuke, S. N.; Rao, A. S. P. Studies on the biometry of the reproductive tract of the buffalo-cow. Indian J. Vet. Sci. 1962.32: 106-111.

100. Maldonado Vargas P. Situación de la Bubalinocultura en países americanos. Argentina. In: Crudeli GA, Konrad JL, Patiño EM, ed. by. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones. 2016. 246-247.

101. Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. Brain research bulletin.1997.44 (4):431-438.

102. Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. Endocrinol 1998;139: 1508–16.

103. Maquivar M, Day ML. Estrategias nutricionales y hormonales para la inducción a la pubertad en novillas de carne y su impacto en la fertilidad. En 9 Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2011, Septiembre. En: 9º Simposio de Reproducción Animal p. 43.

104. Martin LC, Brinks JS, Bourdon RM, Cundiff LV. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. J Anim Sci. 1992. 70: 4006–4017.

105. Martínez Trujillo M, Saenz R. Herencia y ambiente. En: Principios de Genética Mendeliana. Guías de Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás De Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 2003. p 4-12.

106. Mastronardi C, Smiley GG, Raber J, Kusakabe T, Kawaguchi A, Matagne V, Dietzel A, Heger S, Mungenast AE, Cabrera R, Kimura S, Ojeda SR. Deletion of the Ttf1 gene in differentiated neurons disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function. J Neurosci. 2006; 26:13167–13179.

107. McClure TJ. Infertilidad nutricional y metabólica de la vaca. En: Edit. Acribia, 1 edic. Zaragosa, España. 1995. p. 45-63.

108. McGregor R. The domestic buffalo. Vet Rec. 1941. 5:443-450.

109. Mialon MM, Renand G, Krauss D, Menissier F. Genetic variability of the length of postpartum anoestrus in Charolais cows and its relationship with age at puberty. Genet Sel Evol. 2000. 32:403–414.

110. Michelizzi VN, Dodson MV, Pan Z, Amaral ME, Michal JJ, McLean DJ, Womack JE, Jiang Z. Water buffalo genome science comes of age. Int J Biol Sci. 2010.6(4):333-349. doi: 10.7150/ijbs.6.333.

111. Migaud M, Daveau A, Malpaux B. MTNR1A Melatonin receptors in the ovine premammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. Biol Reprod 2005; 72:393–8.

112. 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.

113. Mondal M, Dhali A, Rajkhowa C, Prakash BS. Secretion patterns of growth hormone in growing captive mithuns (Bos frontalis). Zoological science.2004. 21(11): 1125-1129.

114. Monteiro FM, Mercadante MEZ, Barros CM, Satrapa RA, Silva JAV, Oliveira LZ, Garcia JM. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. Theriogenology. 2013.80(1): 10-17.

115. Morris CA, Wilson JA, Bennett GL, Cullen NG, Hickey SM, Hunter JC. Genetic parameters for growth, puberty, and beef cow reproductive traits in a puberty selection line. New Zeal J Ag Res. 2000. 43:83–91.

116. Naqvi AN, Shami SA. Comparative performance of early and late maturing Nili Ravi buffalo heifers. Asian-Australasia J. Anim. Sci.1999. 12 (3): 336 - 340.

117. Nascimento, C, Carvalho, LOM. Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações. Generalidades. EMBRAMPA-SPI. 1993. 10: 403. Vol. 10.

118. National Dairy Research Institute (NDRI), Karnal, Haryana, India. Annual Report. 1995–1996.

119. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, y McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiological reviews. 2000. 80(1): 1-29.

120. Niswender GD, Nett TM. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In 'The Physiology of Reproduction'. (Eds E. Knobil and JD Neill.) p. 781–816. 1994.

121. Nogueira GP. Puberty in South American bos indicus (Zebu) cattle. Animal reproduction science. 2004. 82: 361-372.

122. Ojeda SR, Hill J, Hill DF, Costa ME, Tapia V, Cornea A, Ma YJ. The Oct-2 POU-domain gene in the neuroendocrine brain: A transcriptional regulator of mammalian puberty. Endocrinology. 1999; 140:3774–3789.

123. Ojeda SR, Skinner MK. Puberty in the rat. In: Neill, JD., editor. The Physiology of Reproduction. 3.Academic Press/Elsevier; San Diego. 2006. 2061-2126.

124. Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. J Neuroendocrinol. 2008; 20:732–742.

125. Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, Kaidar G, Matagne V, Sandau US, Dissen AG. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. Mol. Cell. Endocrinol. 2010.324:3–11. doi: 10.1016/j.mce.2009.12.003.

126. Othman OE, Abdel-Samad MF. RFL polymorphism of three fertility genes in Egyptian buffalo. J Appl Biol Sci. 2013. 7: 94-101.

127. Pant MC, Roy A. The water buffalo and its future. (Ed). En: McDowell, Improvement of livestock production in warm climates.San Francisco: WM Freeman. 1972. p. 563-599.

128. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon, JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocrine reviews. 2003. 24(5): 668-693.

129. Parent AS, Mungenast AE, Lomniczi A, Sandau US, Peles E, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Ojeda SR. A contactin-receptor-like protein tyrosine phosphatase beta complex mediates adhesive communication between astroglial cells and gonadotrophin-releasing hormone neurones. J Neuroendocrinol. 2007; 19:847–859.

130. Parmeggiani A, Di palo R, Zicarelli L, Campanile G, Esposito L, Seren E, Accorsi, PA, Soflai SM. Melatonina e stagionalità riproduttiva della bufala. Agricoltura Ricerca.1994. 153. 41-48.

131. Patiño EM, Crudeli GA, Mitat Valdés A. Origen, Distribución y razas. In: Crudeli GA, Konrad JL, Patiño EM, ed. by. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones. 2016. 27-36.

132. Patterson DJ, Perry R C, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, y Corah LR. Management considerations in heifer development and puberty. Journal of Animal Science. 1992. 70(12): 4018-4035.

133. Peary, JY. Revisión de la posición de los búfalos en la escala zoológica. Buffalo Bulletin. 1990. 9(1): 9-17.

134. Pereira GR, Barcellos JO, Sessim AG, Tarouco JU, Feijó FD, Braccini Neto J, Prates ER, Canozzi ME. Relationship of post-weaning growth and age at puberty in crossbred beef heifers. Revista brasileira de zootecnia, Brazilian journal of animal science [recurso eletrônico]. Viçosa, MG. Vol. 46, n. 5 (maio 2017), p. 413-420. 2017.

135. Perera BMAO, De Silva LNA, Kuruwita VY, Karunatne AM. Postpartum ovarian activity, uterine involution and fertility in indigenous buffaloes at a selected village location in Sri Lanka. Anim Reprod Sci.1987.14:115- 127.

136. Perera BMAO. Reproductive cycles of buffalo. Animal reproduction science. 2011. 124(3-4): 194-199.

137. Perry GA. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. Review article. Theriogenology. 2016. 86: 373–378.

138. Prajapati, Gorakh Nath; LAXMI, N. Anand. Plasma Nesfatin-1 and Leptin in pubertal and non-pubertal Murrah buffalo heifers (Bubalus bubalis). Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. 2015. 2(4): 396-403.

139. Rampazzo A, Pivotto F, Occhi G, Tiso N, Bortoluzzi S, Rowen L, Hood L, Nava A, Danieli GA. Characterization of C14orf4, a novel intronless human gene containing a polyglutamine repeat, mapped to the ARVD1 critical region. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 278:766–774.

140. Rao AR, Rao SV. A Study on oestrus and conception rate in buffaloes in Andlha Pradesh. Indian Vet J.1968.45: 846-852.

141. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism, Journal of Heredity, Volume 86, Issue 3, May 1995, Pages 248–249, https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573

142. Rischkowsky B, Pilling D. Genetic improvement methods to support sustainable utilization. Section D. The state of the world's genetic resources for food and agriculture. FAO. 2007. p. 380-422.

143. Roa J, García-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. Molecular and cellular endocrinology.2010. 324(1-2): 87-94.

144. Roberts SJ, editor. Veterinary obstetrics and genital diseases. (Theriogenology). Woodstock, VT: Published by the author. 1986.

145. Roth CL, Mastronardi C, Lomniczi A, Wright H, Cabrera R, Mungenast AE, Heger S, Jung H, Dubay C, Ojeda SR. Expression of a tumor-related gene network increases in the mammalian hypothalamus at the time of female puberty. Endocrinology. 2007; 148:5147–5161.

146. Roy DJ, Mullick DN. Endocrine function of corpus luteum of buffaloes during estrous cycle. Endocrinology. 1964. 75(2): 284-287.

147. Rúgeles CP. Interrelaciones Entre Nutrición y Fertilidad En Bovinos. MVZ-CÓRDOBA.2001. 6(1): 24-30.

148. Sabia E, Napolitano F, De Rosa G, Terzano GM, Barile VL, Braghieri A, Pacelli C. Efficiency to reach age of puberty and behaviour of buffalo heifers (Bubalus bubalis) kept on pasture or in confinement. Animal 8.2014. (11): 1907-1916.

149. Sampedro DH, Crudeli GA, Barbera P, Konrad JL, Llano D. Effect of body condition score at mating on the rate of pregnancy in buffalo. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.2016. 11(3): 159-160.

150. Sánchez Chopa, F. Crecimiento y Desarrollo. Área de Zootecnia, 2016.

151. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature 265, 687–695.

152. SAS INSTITUTE. SAS/STAT user's guide: version 9.4. SAS Institute. 2015.

153. Seren E, Parmeggiani A, Campanile G. The control of ovulation in Italian buffalo. En Proc. of the Symposium Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy, Milan, Italy. 1995. 265-275.

154. Shalash MR. Physiology of reproduction in the buffalo cow. Int J Fert.1958. 3: 425-432.

155. Shanker, A. Review: Activating mutations of the Iutropin choriogonadotropin receptor in precocious puberty. Receptors Channel. 2002. 8(1): 3-18.

156. Simianer H. Current and future developments in applications of animal models. In proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to livestock production. Guelph. Canada. 1994. vol. 18, p. 435-442.

157. Singh, R. Characterization Of Luteinizing Hormone Receptor (Lhr) Gene In Buffaloes (Bubalus Bubalis). 2006. Tesis Doctoral. National Dairy Research Institute; Karnal.

158. Snelling WM, Cushman RA, Fortes MRS, Reverter A, Bennett GL, Keele JW, Kuehn LA, McDaneld TG, Thallman RM, Thomas MG. How single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. Journal of Animal Science. 2012.90(4): 1152-1165.

159. Sousa AO, Baruselli PS, Ohashi OM, Oliveira CA, Solano FR, Blume H, Santos HP. Idade a puberdade em fêmeas bubalinas da raça Murrah criadas no Vale do Ribeira. Bras Reprod Anim. 1999. 23: 173-175.

160. Sule SR, Taparia AL, Jain LS, Tailor SP. Reproductive status of Surti buffaloes maintained under sub-humid conditions of Rajasthan. Indian Vet. J.2001. 78 (11): 1049-1051.

161. Sun LP1, Du QZ, Song YP, Yu JN, Wang SJ, Sang L, Song LW, Yue YM, Lian YZ, Zhang SL, Hua GH, Zhang SJ, Yang LG. 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. 2012. 39(6): 7117–7123. doi: 10.1007/s11033-012-1543-x

162. Taylor CS, Fitzhugh Jr HA. Genetic relationships between mature weight and time taken to mature within a breed. J Anim Sci.1971. 33:726–31.

163. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endo Rev. 2001. 22:111–151.

164. Terzano GM, Barile VL, Borghese A. Overview on Reproductive Endocrine Aspects in Buffalo. Journal of Buffalo Science. 2012. 1: 126-138.

165. Terzano GM, Barile VL, Francia U, Malfatti A, Todini L, Borghese A. Onset of puberty in buffalo heifer bred on pasture or in intensive feeding systems. Bulgarian J. Agric.1996. Sci. 2:89-92.

166. Terzano GM, Neglia G, Maschio M, Barile VL, Razzano M, Martiniello P, Cannone I, Borghese A. Effect of intensive or extensive systems on buffalo heifers' performances: onset of puberty and ovarian size. Italian Journal of Animal Science. 2007.6(2): 1273-1276.

167. Themmen AP, Huhtaniemi IL. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. Endocr Rev. 2000. 21: 551-583

168. Tortonese DJ. Pubertad en hembras bovinas, determinación de la edad a la pubertad mediante el dosaje de progesterona por radioinmunoensayo en cuatro grupos genéticos bovinos: su correlación con peso y alzada. Tesis Doctoral en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, 1986.

169. Valasi I, Chadio S, Fthenakis GC, Amiridis GS. Management of pre-pubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. Animal Reproduction Science. 2012. 130(3-4): 126-134.

170. Vale WG, Ohashi OM, Sousa.S, Ribeiro HF. Biometria do sistema genital de búfalos (Bubalus bubalis). Arq Esc Vet UFMG.1982.34:193-202.

171. Vale WG. Bubalinos: fisiología e patologia da reprodução. Campinas: Fundação Cargill. 1988. p 86.

172. Vale WG, Ohashi OM, Sousa JS, Ribeiro HFL. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. Livestock in Latin America. Vienna: International Atomic Energy Agency. 1990. p.201-210.

173. Vale WG, Ohashi OM, Sousa JS, RibeiroHFL. Studies on the reproduction of water buffalo. Proceedings in the Amazon basin, Livestock in Latin America, International Atomic Energy Agency Vienna. 1990. p. 201-210.

174. Vale WG. Enhancing the puberty in bufalo heifers. Proceedings in 14th Int Cong Anim Reprod, Stockholm. Abstracts 1.2000. p. 271.

175. Vale WG, Ribeiro HFL. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2005.29 (2): 63-73.

176. Vale WG. Effects of environment on buffalo reproduction. Italian Journal of Animal Science.2007, 6:(2) 130-142.

177. Vittoria A. Anatomy of the female genital tract in the buffalo. Third Course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy, 1997, p. 15-20.

178. Weaver DR, Liu C, Reppert SM. Nature's knock-out: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. Mol Endocrinol. 1996.10:1478–87.

179. Weller MM, Fortes MRS, Marcondes MI, Rotta PP, Gionbeli TR, Valadares Filho SC, et al. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. J Dairy Sci .2016. 99:3056–71.10.3168/jds.2015-9673

180. Williams GL, Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. Domest Anim Endocrinol. 2002. 23:339–349.

181. Williams JL, Iamartino D, Pruitt KD, Sonstegard T, Smith TPL, Low WY, Tommaso Biagini T, Bomba L, Capomaccio S, Castiglioni B, Coletta A, Corrado F, Ferré F, Iannuzzi L, Lawley C, Nicolò Macciotta N, Matthew McClure M, Giordano Mancini G, Matassino D, Mazza R, Milanesi M, Moioli B, Morandi N, Ramunno L, Peretti V, Pilla F, Ramelli P, Steven Schroeder S, Strozzi F, Thibaud-Nissen F, Zicarelli L, Ajmone-Marsan P, Valentini A, Chillemi G, Zimin A. Genome assembly and transcriptome resource for river buffalo, Bubalus bubalis (2n = 50), GigaScience.2017.6(10):gix088, doi:10.1093/gigascience/gix088.

182. Williams JL. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 2005. 24(1): 379.

183. Wiltbank JN, Gregory KE, Swiger LA, Ingalls JE, Rothlisberger JA, Koch RM. Effects of heterosis on age and weight at puberty in beef heifers. Journal of Animal Science.1966. 25: 744 - 751.

184. Wiltbank JN., Roberts S., Nix J., Rowden L. Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. J Anim Sci.1985. 60:25–34.

185. Zhang Y, Dufau ML. Repression of the Luteinizing Hormone Receptor Gene Promoter by Cross Talk among EAR3/COUP-TFI, Sp1/Sp3, and TFIIB. Mol. Cell Biol., 23.2003. pp. 6958-6972.

186. Zava M. El búfalo en Argentina. In: Crudeli GA, Patiño EM, Cedrés J, González Fraga J, Maldonado Vargas P, Racioppi O, Zava M, Pellerano G. ed. by. Búfalos en Argentina. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones; 2005. p. 32-37.

187. Zetouni L, de Camargo GMF, da Silva Fonseca PD, Cardoso DF, Gil FMM, Hurtado-Lugo NA, Aspilcueta-Borquis RR, Cervini M, Tonhati, H. Polymorphisms in the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in buffaloes. Tropical animal health and production. 2014. 46(2), 337-340.

188. Zicarelli L. Management under different environmental condition. Buffalo J. 1994. 2: 17-38.

189. Zicarelli L. Estacionalidad reproductiva en Búfalas. In: Crudeli G, Konrad J, Patiño E, ed. by. Reproducción en Búfalas. 1st ed. Corrientes: Moglia Ediciones; 2016. p. 73-96.

190. Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. Domest Anim Endocrinol. 2005. 29:166–185.

BIOGRAFÍA

La Medica Veterinaria María Belén Acuña, nació en la ciudad de Resistencia, provincia del Chaco, el 24 de julio de 1986, y ha residido en la ciudad de Resistencia desde esa fecha junto a sus padres, Gladis M Yensen y Carlos M Acuña. Realizó sus estudios primarios en la escuela Nº2 Raúl B Díaz (1992-1998) y sus estudios secundarios en el colegio Nacional José M Paz (1999-2003). Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) durante el período 2004-2010. Durante el su etapa universitaria eligió ingresar como ayudante alumna ad honorem y luego ser adscripta en la Cátedra de Teriogenología, lo cual le permitió labrar su camino en el área de reproducción bovina y bubalina principalmente. En el año 2009 obtuvo una beca de investigación para estudiantes de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNNE, donde inició sus primeros pasos en investigación para trabajar en "Pubertad en machos de la raza Braford", bajo la dirección del Dr. Gustavo Crudeli.

Una vez finalizados los estudios, en 2011, concursó y obtuvo el cargo de Auxiliar Docente en la cátedra de Teriogenología. A su vez trabajó en un Centro de Inseminación por tres meses y luego inauguro su Veterinaria "Agroveterinaria El Caburei".

En abril de 2012, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnologías le otorgó una beca doctoral para comenzar a trabajar en su proyecto de tesis doctoral. En diciembre de 2013, ingresó como alumna de doctorado en la Universidad Nacional de La Plata, realizando veintisiete cursos de actualización y posgrado, una pasantía en el Laboratorio de Genética de Animales Domésticos del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) y curso de lectura y comprensión de textos en inglés relacionados con la ciencia, cumpliendo con los requisitos como alumna del doctorado.

Desde el año 2011 desarrolla tareas de docencia universitaria a través de redacción de guías de estudio, dictado de clases teóricas y prácticas, prácticas a campo con alumnos a su cargo, integrante de jurado y tutora interna de tesis finales de grado, actividades de transferencia, formación de pasantes, alumnos y docentes adscriptos en docencia e investigación, colaboradora e integrante de proyectos de extensión e investigación de diferentes cátedras y universidades. Cumple un cargo ad honorem como Docente Diplomada dentro del Programas de Tutorías de la FCV-UNNE.

Una vez finalizada esta tesis, durante su posdoctorado continuará con su labor de Médica Veterinaria en el sector privado.